

1. 研究課題名：放射線ストレス誘発遺伝子の機能解析
2. 研究機関：長崎大学薬学部保健衛生薬学講座放射線生命科学教室
(s-kodama@net.nagasaki-u.ac.jp)
3. 研究者：児玉靖司
4. 研究協力者：鈴木啓司、渡邊正己
(長崎大学薬学部保健衛生薬学講座放射線生命科学教室)
5. 研究期間：平成7年～平成10年
6. 要約

Gadd45 は、*Gadd* 遺伝子群のうちで唯一電離放射線によっても発現誘導がみられる遺伝子である。放射線高感受性遺伝病として知られる ataxia telangiectasia (AT) 細胞では、放射線照射後の *Gadd45* 遺伝子の誘導に異常がみられることから、本研究では *Gadd45* 遺伝子の発現異常と AT 細胞の表現形質との関連性を調べた。ヒト *Gadd45* 遺伝子の cDNA を単離し、誘導型発現ベクターに、センス及びアンチセンス方向に組み込んだ。このうちセンス *Gadd45* 遺伝子を、AT5BIVA 細胞に導入して、発現誘導剤である isopropyl thiogalactoside (IPTG) により、導入した *Gadd45* 遺伝子の発現誘導が可能な AT 細胞を樹立した。まず、GADD45 を過剰発現させた AT 細胞に X 線を照射し、放射線感受性への影響を調べた。その結果、GADD45 の過剰発現は、AT 細胞の放射線感受性には全く影響を与えないことが分かった。次に GADD45 過剰発現の細胞増殖能への影響をコロニー形成法により調べた。その結果、GADD45 過剰発現により、コロニー形成率が約 50% 抑えられることが分かった。この GADD45 によるコロニー形成抑制能は、細胞播種後 24 時間に限局した過剰発現でも効果がみられた。しかし、細胞集団で調べると、GADD45 過剰発現による細胞増殖抑制、細胞周期の停止、およびアポトーシスは観察されなかった。本研究の結果は、孤立的環境にある細胞が足場依存的増殖を始める初期段階において、GADD45 が増殖抑制的に作用することを示唆している。

7. 研究目的

細胞は環境変化によるストレスに対し、積極的に応答する機構を保持している。これまでに我々は、環境ストレスに対する細胞応答研究のひとつとして、微量放射線の細胞刺激効果に着目し、その効果として、(1) 細胞障害作用の軽減化、(2) ヒト細胞の分裂寿命の延長、(3) 遺伝的不安定性の軽減化、等を明らかにしてきた。そのメカニズムについてはまだ不明であるが、我々は、刺激効果を与える放射線線量が遺伝子損傷を誘発するには不十分と考えられることから、遺伝子損傷とは異なる事象が発端となっているものと推定している。一方、これとは別に、近年、明らかに遺伝子損傷が引き金となってその発現が誘発される一連の遺伝子群の存在が明らかにされてきている。この現象も細胞の環境ストレスに対する応答現象と捕らえることができる。この場合には、遺伝子が捕らえられていることから、その機能を探ることにより細胞応答機構に迫るというアプローチが可能となる。*Gadd* 遺伝子群は、紫外線により誘発される遺伝子群として Fornace らによって CHO 細胞から単離されたものである¹⁾。*Gadd* 遺伝子群は、紫外線だけでなく、MMS (methyl methanesulfonate) などの

化学発癌物質、過酸化水素、及び細胞増殖停止状態でも誘導されることが明らかにされている¹⁾。*Gadd45* は、*Gadd* 遺伝子群のうちで唯一電離放射線によっても誘発される遺伝子として着目されている²⁾。Kastan らは、放射線高感受性遺伝病である ataxia telangiectasia (AT) 細胞を用いた研究から、AT 細胞ではこの p53 依存的経路に異常があり、放射線照射後の *Gadd45* 遺伝子発現が正常とは異なることを報告した³⁾。そこで本研究は、*Gadd45* 遺伝子の発現を人為的に制御しうるシステムを構築し、それを用いて AT 細胞における GADD45 高発現の影響を調べることにより、この遺伝子機能の一端を明らかにすることを旨とした。

8. 材料と方法

(1) *Gadd45* 遺伝子誘導型発現ベクターの構築

ヒト線維芽細胞に 20Gy の X 線を照射し、4 時間後に RNA を抽出して RT-PCR を行い、*Gadd45* 遺伝子の cDNA を pGEM-T ベクター上にクローニングした。単離したヒト *Gadd45* cDNA の長さは約 800bp であるが、PCR で用いる *Taq* polymerase は DNA 複製の忠実度が低いので、単離した cDNA の遺伝子配列を調べて突然変異の有無を確認する必要がある。そこで、蛍光色素 Cy5 でラベルしたプライマーを作成して、DNA Sequencer (Pharmacia Biotech) により、単離した全領域の遺伝子配列を調べた。次に、大腸菌の *lac* オペロンシステムを利用した誘導型発現ベクター (pOPRSVICAT) に、単離した *Gadd45* cDNA をセンス方向及びアンチセンス方向に挿入した。

(2) 細胞への遺伝子導入と遺伝子発現の確認

遺伝子受容細胞としては、SV40 不死化 AT5BIVA 細胞、及びその対照として、SV40 不死化 GM638 細胞を用いた。まず、これらの細胞に *lac* repressor 遺伝子が挿入されたプラスミド (p3'SS) を導入し、hygromycin 耐性を指標として細胞を分離した。分離した細胞につき、Western blotting 法を用いて *lac* repressor の発現が見られる細胞を同定した。次に、*lac* repressor 陽性細胞に、センス *Gadd45* 遺伝子 (pOPRSVI/*gadd45*) を導入し、G418 耐性を指標として細胞を分離した。分離した細胞につき、導入 *Gadd45* 遺伝子の存在を PCR 法を用いて確認し、さらに Western blotting 法を用いて GADD45 の発現が見られる細胞を同定した。

(3) GADD45 発現動態の解析

細胞は、大腸癌由来 RKO 細胞 (野生型 p53)、galactosemia 由来 SV40 不死化 GM638 細胞、及び ataxia telangiectasia 由来 SV40 不死化 AT5BIVA 細胞を用いた。対数増殖期にある細胞に、6 Gy の X 線を照射し、2、4、8、12、24 時間後に細胞を回収してタンパクを抽出し、Western blotting にて GADD45 の発現量を調べた。また、X 線 6 Gy、12 Gy 照射 4 時間後の GADD45 発現量について 3 種の細胞で比較した。次に、GADD45 発現の見られる ATH2S3-1 細胞について、GADD45 発現の経時的な変化を見るために、5mM IPTG (isopropyl-thiogalactoside) 添加後、2、4、8、12、及び 24 時間後に細胞を回収し、Western blotting 法で GADD45 の発現を調べた。

(4) GADD45 発現の放射線感受性に対する影響

AT 細胞は、放射線に対し高感受性を示す。その原因は現在のところ不明であるが、GADD45 の発現が AT 細胞の放射線感受性を修飾するか否かについて調べた。細胞は、GMH2S3-4、ATH2S3-1、ATH7S3-2 細胞をそれぞれ用いた。細胞を、5mM IPTG を含んだ培地で 24 時間培養した後、X 線を照射した。その後、IPTG を含まない培地中で 2 週間培養して形成されたコロニー数を調べた。

(5) 細胞増殖能の解析

GADD45 発現の細胞増殖への影響を、細胞増殖曲線を調べることによって検討した。細胞を 2 群 (対照群と IPTG 処理群) に分け、ディッシュ当たり (60mm) 2×10^5 細胞を植え込み、4 日間、毎日細胞数を計測して求めた。IPTG は、細胞の植え込みと同時に添加した。

(6) GADD45 発現の細胞周期に対する影響

GADD45 が、G1 チェックポイント機構において重要な役割を担っているならば、その発現が少ないと予想される AT 細胞において、人為的に発現を上昇させることによりチェックポイント機構の異常を相補させることができる可能性がある。そこで GMH2S3-4 細胞と ATH2S3-1 細胞を 24 時間、5mM IPTG を含む培地中で培養した後、X 線を照射した。その 16 時間後に細胞をエタノール固定し、propidium iodide (PI) 染色した後、Laser Scanning Cytometer (LSC; Olympus) を用いて、細胞周期の分布を調べた。また、BrdU を取り込ませて DNA 合成の動態を LSC を用いて調べた。

(7) GADD45 発現のコロニー形成能に対する影響

実験には、IPTG による GADD45 発現陽性細胞として ATH2S3-1 細胞を用いた。培養皿に細胞を 500 個植え込み、5mM IPTG を含む培地、及び含まない培地中で 2 週間培養し、形成されたコロニー数を調べた。また、GADD45 の発現時期を、(i)播種前 24 時間、(ii)播種後 24 時間、(iii)播種 24 時間以降の 3 群に分け、GADD45 の発現のタイミングによってコロニー形成能に違いが現れるかを調べた。

9. 結果

(1) *Gadd45* 遺伝子誘導型発現ベクターの構築

大腸菌 lac operon を利用した LacSwitch 遺伝子発現システムの概略は、図 1 に示す通りである。p3'SS プラスミドを導入した細胞について、lac repressor 発現を調べたところ、AT5BIVA 細胞で 3 個、GM638 細胞で 1 個の発現陽性細胞が得られた。lac repressor 陽性細胞に pOPRSV/*gadd45* プラスミドを導入し、hygromycin/G418 耐性細胞を AT5BIVA 細胞より 11 個、GM638 細胞より 8 個分離した。これらの細胞につき、導入 *Gadd45* 遺伝子の存在を PCR 法で確認したところ、AT5BIVA 細胞で 73% (8/11)、GM638 細胞で 75% (6/8) の細胞に存在が確認できた。

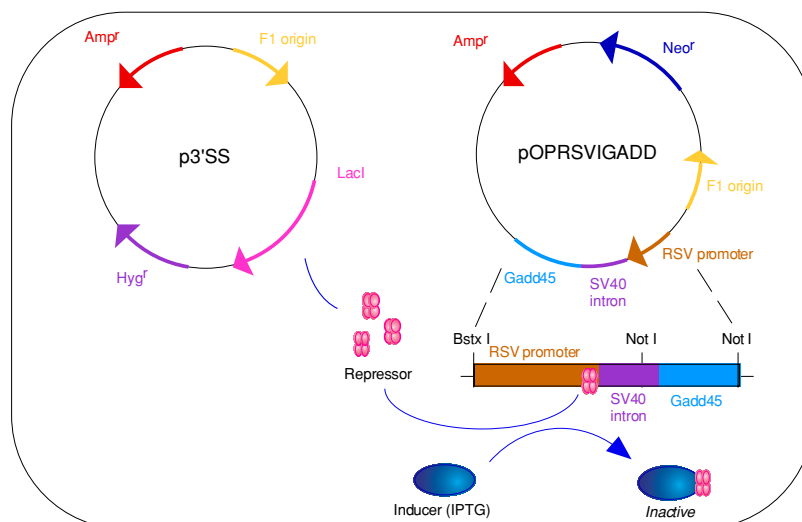


図1 LacSwitch遺伝子発現システムの概要。このシステムは、2種類のベクター（pOPRSVGADD, p3'SS）によって成り立つものである。pOPRSVGADDにはGadd45遺伝子が挿入してあり、上流プロモーター領域のオペレーターにp3'SSより恒常的に発現するLacリプレッサー4量体が結合することで、Gadd45遺伝子の発現が抑制されている。誘導剤IPTGを加えると、Lacリプレッサーがオペレーターから解離し、プロモーター領域が活性化され、Gadd45遺伝子が誘導される。

(2) GADD45 発現の誘導

AT 細胞では、X線照射後の p53 の発現が遅延し、その発現量も少ないことが報告されている^{5,6)}。GADD45 は、その発現が p53 依存的であることから、AT 細胞と対照細胞では、X線照射後の GADD45 の発現動態が異なるものと考えられる。そこで 6 Gy 照射 2 時間~24 時間後の GADD45 の発現量を調べてみた(図2)。正常 p53 遺伝子型を持つ RKO 細胞では、GADD45 の発現はX線照射後速やかに上昇し、4 時間後には初期発現量の 2 倍となりプラトーに達した。これに対して、SV40 不死化 GM638 細胞では発現が遅延し、12 時間、および 24 時間後にほぼ RKO 細胞と同レベルの発現量となった。SV40 T antigen は、p53 と安定な複合体を形成し、p53 の機能を不活性化するとされている。この SV40 T antigen による p53 タンパクの不活性化により、GADD45 の誘導が遅延するものと考えられる。しかし、24 時間後の発現量は RKO 細胞と同等であることから、一部の p53 タンパクは不活性化されずに残っている可能性がある。あるいは、遅れて発現してくる GADD45 は、p53 非依存的である可能性も否定できない。SV40 不死化 AT5BIVA 細胞では、GM638 細胞以上に発現が遅延し、少なくとも、X線照射後 12 時間まではほとんど発現が見られないことが分かった。誘導発現量だけでなく、構成的発現量も低いことが明らかとなった。しかし、24 時間後の発現量は、RKO 細胞の構成的発現量の約 1.5 倍まで上昇した。したがってこの場合も、GM638 細胞の場合と同様に、(1) 活性 p53 タンパクの漏出、あるいは、(2) p53 非依存的発現経路の可能性が考えられる。以上の結果から、AT 細胞においては、X線による GADD45 の発現が著しく遅延し、しかもその発現量も低いことが明らかとなった。

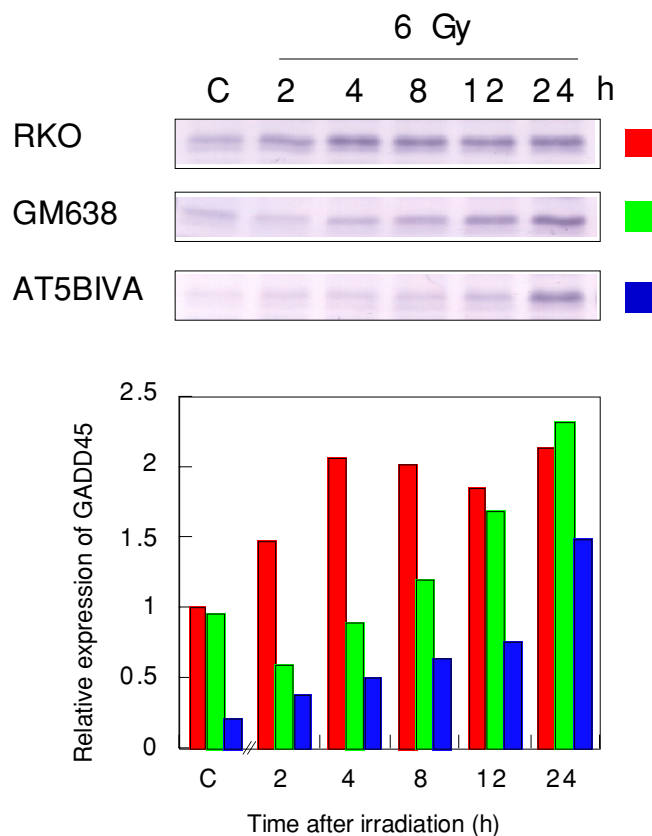


図2 X線照射により誘発されるGADD45発現量の経時的変化。細胞は、RKO、GM638、AT5BIVA細胞を用いた。発現量は、非照射RKO細胞の発現量を1として規格化して表した。

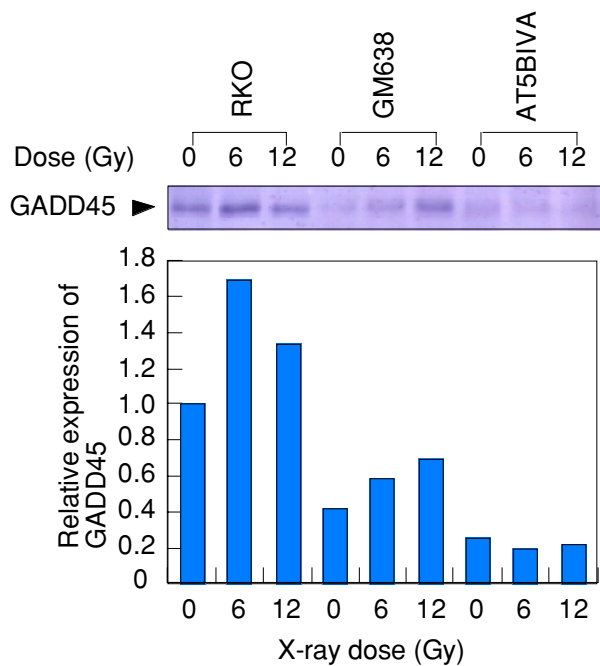


図3 X線によるGADD45誘導の線量依存性。細胞は、RKO、GM638、AT5BIVA細胞を用い、X線照射後4時間での発現量を調べた。発現量は、非照射RKO細胞の発現量を1として規格化して表した。

次に放射線による GADD45 発現誘導の線量依存性をみるために、RKO 細胞、GM638 細胞、及び AT5BIVA 細胞について、それぞれ 6Gy、12Gy の X 線を照射し 4 時間後の GADD45 発現を調べた (図 3)。RKO 細胞では、わずかに構成的発現があり、X 線照射によってその発現量が増加した。GM638 細胞では、構成的発現はほとんど無く、X 線による発現誘導量は RKO 細胞に比べて少なかった。これに対し、AT5BIVA 細胞では、構成的発現も X 線による発現誘導も全くみられなかった。

次に、外来性ヒト *Gadd45* 遺伝子を導入した ATH2S3-1 細胞について、誘導剤 5mM IPTG 処理による GADD45 発現誘導の経時的变化を 24 時間まで調べた。その結果、2 時間処理から速やかな誘導が見られ、24 時間後には無処理の 8 倍レベルまで誘導されることが分かった (図 4)。

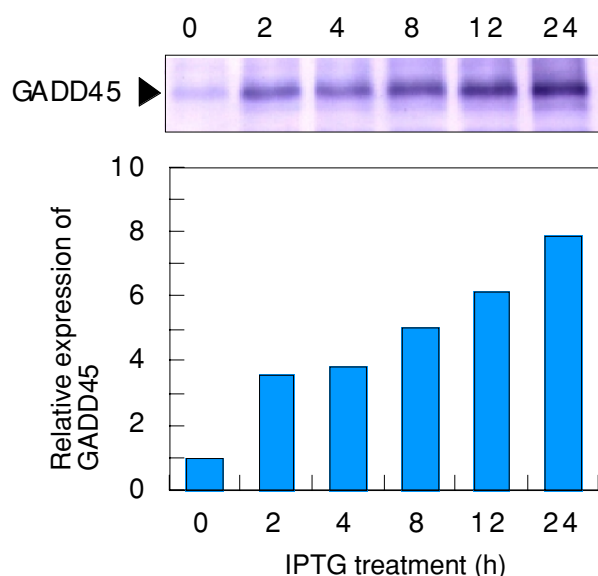


図 4 誘導剤 (IPTG) による GADD45 発現量の経時的变化。細胞は ATH2S3-1 細胞を用いた。発現量は誘導直後を 1 として規格化した。

(3) GADD45 発現の放射線感受性に対する影響

AT の原因遺伝子として ATM 遺伝子が単離されたが⁷⁾、ATM 遺伝子の異常によりなぜ放射線高感受性になるのかは依然として不明である。ATM タンパクは、signal transduction に関わるタンパクであると考えられるので、その下流にある遺伝子群の発現を変化させることによって放射線感受性を正常化できる可能性がある⁸⁾。そこで、GADD45 について調べてみた (図 5)。その結果、GADD45 の発現を上昇させた状態で X 線を照射しても、AT 細胞の放射線感受性は全く変化しないことが分かった。少なくとも、AT 細胞における放射線高感受性は、GADD45 の発現異常では説明できないことが明らかとなった。

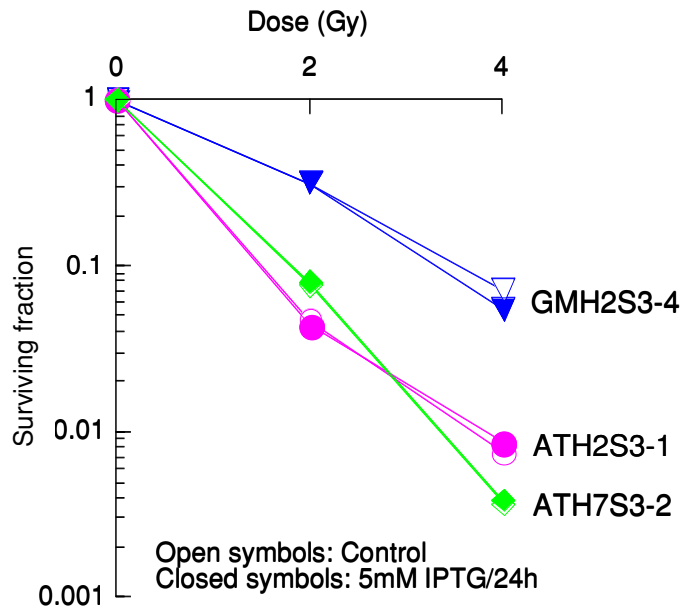


図5 GADD45発現によるX線感受性への影響。細胞はIPTGによるGADD45発現誘導が低い対照細胞 (GMH2S3-4;) とAT細胞 (ATH7S3-2;)、及び発現誘導が高いAT細胞 (ATH2S3-1;) を用いた。

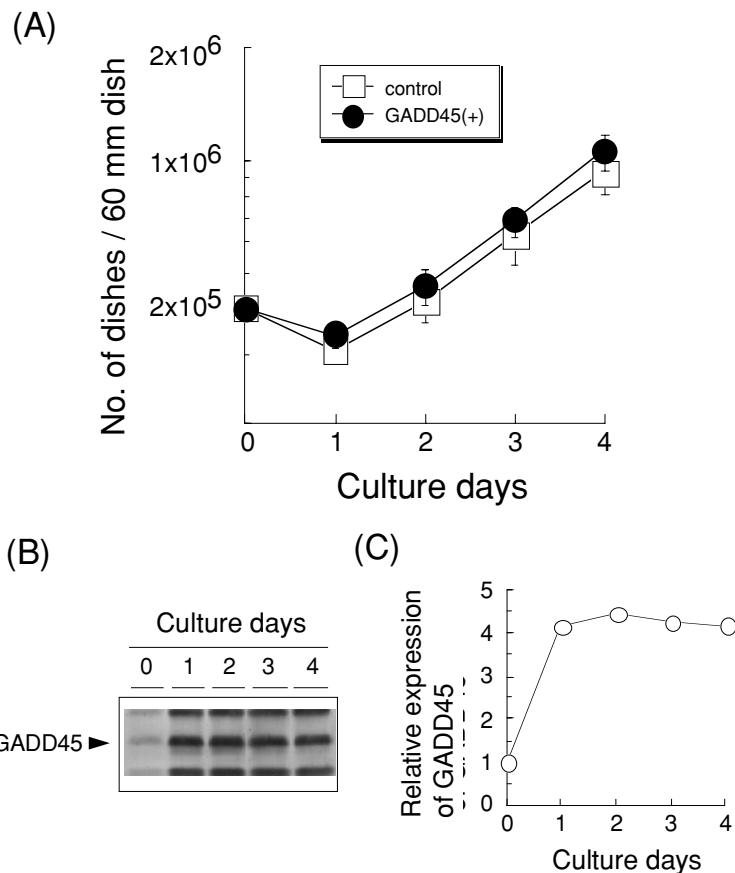


図6 GADD45発現の細胞増殖への影響。(A)細胞は、播種と同時に誘導剤で処理し、4日間毎日細胞数を計数した。培養液と誘導剤は1毎日交換した。誤差線は5回の実験の標準誤差を示す。(B)ウエスタンブロッティング法による誘導剤処理後のGADD45発現量の変化。(C) GADD45の相対的発現量。(B)における0日目の発現量を1として規格化して表した。

(4) GADD45 発現の細胞増殖への影響

GADD45 は、細胞増殖抑制効果があるという報告があるので⁹⁾、誘導剤 IPTG により GADD45 の発現誘導がみられる ATH2S3-1 細胞について、IPTG 処理による細胞増殖曲線への影響を調べた(図 6 A)。細胞播種と同時に誘導剤を処理してその後 4 日間の細胞増殖状態を調べたところ、対照細胞と誘導細胞で増殖状態には全く差がないことが分かった。このとき GADD45 が実際に発現されているのかをウエスタンブロット法で確認したところ、培養 1 日目から十分高い発現が見られることが分かった(図 6 B, C)。したがって、GADD45 は、少なくとも細胞集団の増殖状態には影響を全く与えないことが分かった。

(5) GADD45 発現の細胞周期に対する影響

ATH2S3-1 細胞を用いて、GADD45 発現の細胞周期に及ぼす影響を調べた。細胞播種 24 時間後に誘導剤を加えて 2~24 時間処理し、その後細胞を固定染色して細胞周期の分布を調べ、結果を図 7 に示した。細胞分布の変化をみるために、G2 期集積細胞の割合に対する G1 期集積細胞の割合の比 (G1/G2) を計算してみると、誘導処理 12 時間までは、0.73~0.86 の値を示し、誘導剤処理群と未処理群で相違が無かった。また、処理 24 時間後には、0.98 とやや G2 期細胞の割合が増加したが、両群に差は見られなかった。すなわち、GADD45 の過剰発現による細胞周期アレストは観察されなかった。

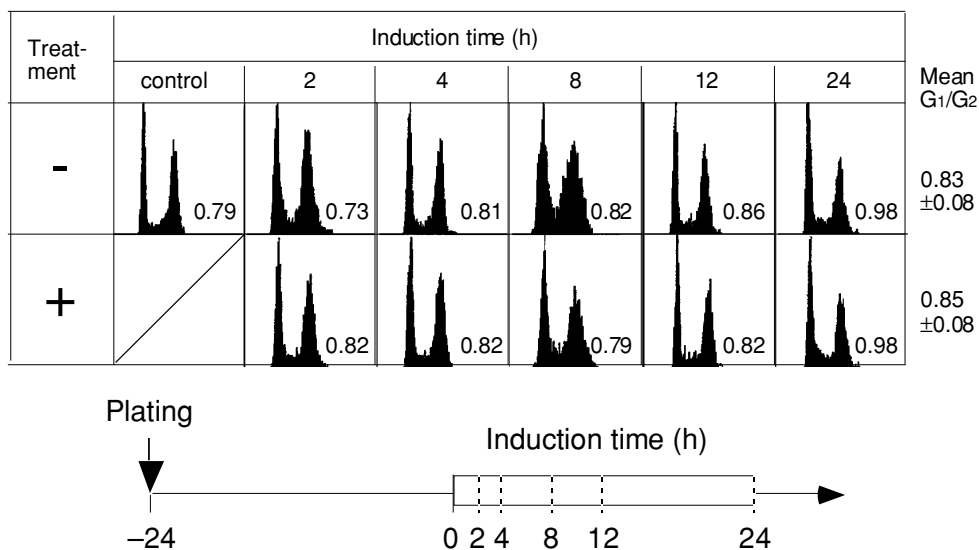


図 7 GADD45発現の細胞周期への影響。細胞はATH2S3-1を用いた。PI染色した細胞を、レーザースキャニングサイトメーターを用いて解析した。図中の数字はG2に対するG1の比(G1/G2)を表す。

次に、ATH2S3-1 細胞、及び GMH2S3-4 細胞を用いて、GADD45 過剰発現の DNA 合成に対する影響を調べた(図 8)。GMH2S3-4 細胞は、誘導剤による発現が見られない陰性対照として用いた。誘導剤で 24 時間処理して十分 GADD45 が誘導されている状態で BrdU を 1 時間取り込ませて、その取り込み量を定量し、GADD45 を誘導していない場合と比較したところ、両群に差が無いことが分かった(図 8)。このことは、GADD45 の過剰発現が、DNA 合成に全く影響を与えないことを示している。

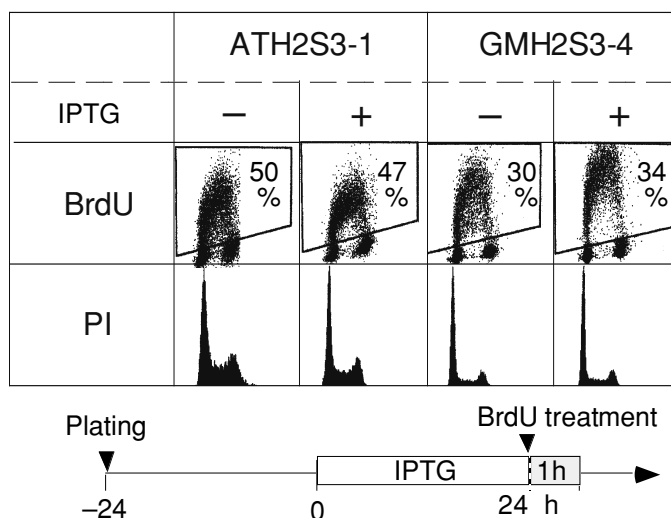


図8 GADD45発現のDNA合成への影響。BrdUの取り込み量を抗BrdU抗体を用いた蛍光染色法で定量化した。BrdUにおける内枠は、BrdUの取込みによりFITCの蛍光量が増加した部分。数字(%)は、枠内の細胞の割合を示す。

そこで次に、同じ細胞を用いて、X線照射によるG2アレストに対するGADD45発現の影響について調べた(図9)。GADD45を誘導した状態で6 GyのX線を照射し、その16時間後のG2アレストを解析した。図9に示す通り、GADD45が誘導されるATH2S3-1細胞において、X線照射16時間後のG1/G2比を算出すると、非誘導細胞で0.40であり、誘導細胞で0.45であった。このことは、放射線照射後のG2アレストに対しても、GADD45の過剰発現は影響を与えないことを示している。

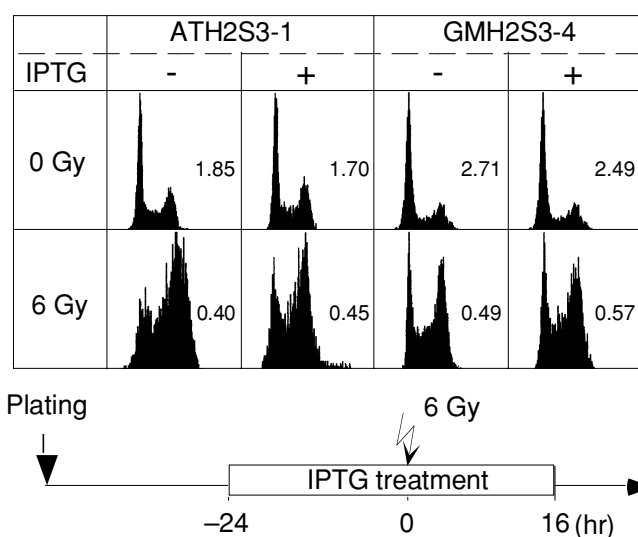


図9 放射線照射によるG2アレストに対するGADD45発現の効果。誘導剤を24時間処理してGADD45を誘導し、その時点で6 GyのX線を照射して16時間後のG2アレストを調べた。図中の数字はG2に対するG1の比(G1/G2)を示す。

(6) GADD45 発現のコロニー形成能に対する影響

ATH2S3-1 細胞について、GADD45 発現のコロニー形成能に対する効果を調べた。その結果、図 10 に示すように、細胞播種と同時に誘導剤を添加して GADD45 を発現させると、コロニー形成能は約 50%低下した。このことは、GADD45 が低細胞密度環境下では、細胞増殖に対して抑制的に作用することを示している。こうした効果は、細胞密度が高い環境下では見られないものであった(図 6)。そこでこの GADD45 によるコロニー形成抑制機能のメカニズムを探るために、GADD45 の発現時期を、(i)播種 24 時間前、(ii)播種後 24 時間以内、(iii)播種後 24 時間以降の 3 群に分け、GADD45 の発現のタイミングによってコロニー形成

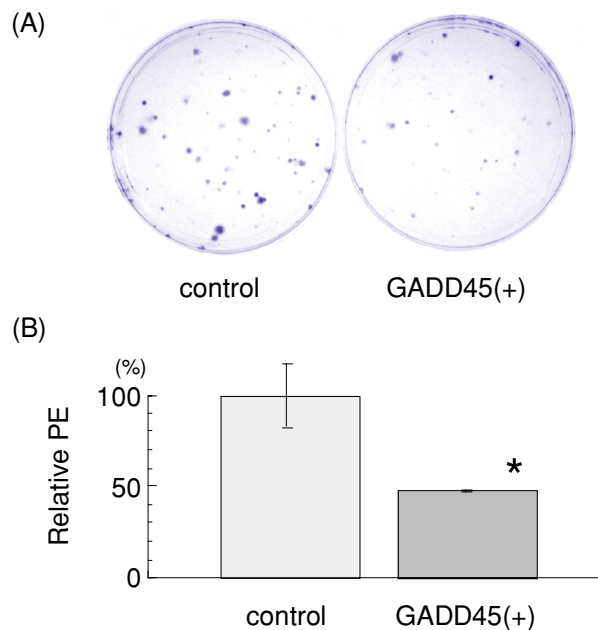


図 10 GADD45 発現によるコロニー形成能の低下。(A)直径100mmのディッシュに細胞を500個播種し、播種と同時に誘導剤処理した。約2週間後に固定し、5%ギムザ液で染色した。細胞数50個以上の細胞集団をコロニーと判定した。(B)GADD45発現のコロニー形成率への影響を非誘導時のコロニー形成能に対する相対値で示した。誤差線は5回の実験の標準誤差を示す。検定はStudent's t-test を用いた。* $p < 0.05$

能に違いが現れるかを調べた。その結果を図 11 に示す。この結果は、以下のことを示している。(1)少なくとも細胞播種 24 時間以降に GADD45 を持続的に発現させるとコロニー形成率は抑制される(図 11 ; c, d, g, h)。(2)細胞播種前の 24 時間だけ GADD45 を発現させてもコロニー形成率は抑制されない(図 11 ; e)。(3)細胞播種後、少なくとも 24 時間 GADD45 を発現させるだけでコロニー形成率は抑制される(図 11 ; b, f)。以上の結果は、GADD45 の発現によるコロニー形成抑制作用が、細胞播種後、24 時間以内という極めて限定された時間でも有効に機能することを示している。

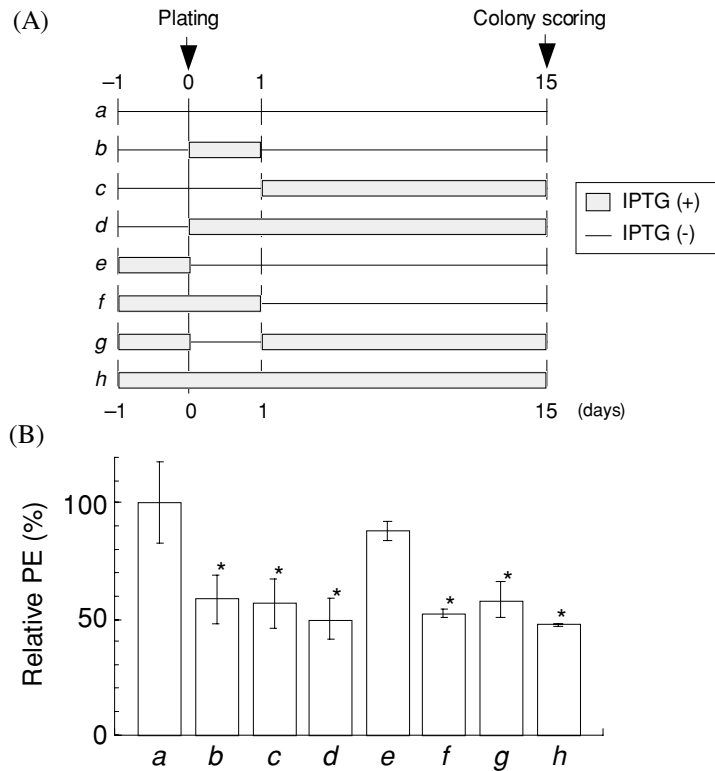


図 1 1 GADD45の発現時期とコロニー形成能抑制効果との関係。(A)コロニー形成能は、*a* ~ *h*の8通りの誘導剤処理との関係を調べた。誘導剤の処理は、(i)播種前24時間、(ii)播種後24時間以内、(iii)播種後24時間以降の3期間を設定して組み合わせた。(B)各実験群のコロニー形成率を無処理群のコロニー形成率に対する相対値として比較した。

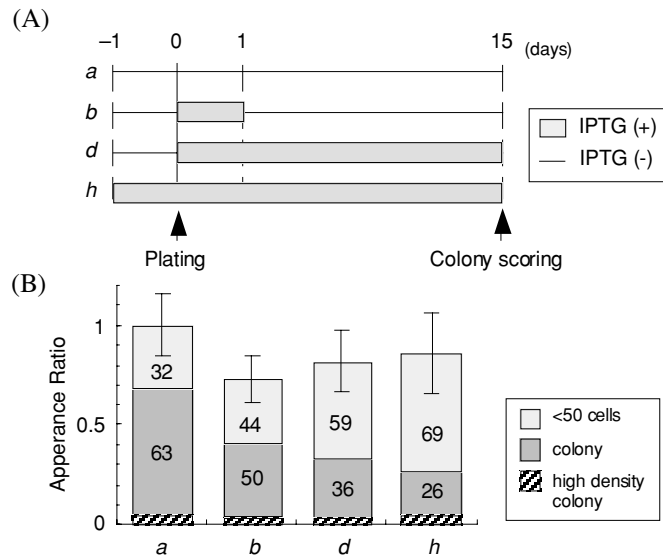


図 1 2 GADD45による接着細胞数の変化。(A)播種後24時間のみ処理、播種以降を連続処理、及び播種24時間前から連続処理したものについて解析した。(B)コロニーのうち、細胞数50個未満と50個以上からなるもの、及び高密度なもの3種に分類して集計した。図中の数字は各領域の全体に対する百分率を示す。

そこで次に、ディッシュ中のコロニーについて、50 個未満の細胞よりなるものを計数してみた。その結果、24 時間の GADD45 誘導処理により、細胞数 50 個未満の細胞集団が未処理群に比べて増加していることが分かった(図 12)。さらに、コロニーの中でも細胞が密に集積し、かつ巨大細胞などの異常細胞が無いが非常に少ないコロニー(以下「高密度コロニー」)を集計した結果、高密度コロニーの数は誘導剤処理の有無、タイミングに関わらず変化しないことが分かった(図 12)。

以上の結果は、GADD45 によるコロニー形成抑制作用が、細胞接着の阻害作用よりは、むしろ細胞増殖阻害作用に起因していることを示唆している。

10. 考察

(1) lac オペロンシステムを利用した誘導型発現ベクター

大腸菌の lac オペロンシステムを利用した誘導型発現ベクターを、哺乳動物細胞への遺伝子導入に用いた報告例はまだ少ない。Inducer である IPTG の細胞内への取り込みは、2 時間から 4 時間で最大になると報告されている¹⁰⁾。従って、ATH2S3-1 細胞において IPTG による GADD45 の発現誘導が 2 時間目から見られたことは、IPTG の細胞内移行が報告通りであることを示している。しかし、発現誘導の強さは、細胞間で大きく異なることが分かった。このことは、導入遺伝子の発現がゲノムの挿入位置に依存することを示唆している。我々の結果は、この発現ベクターが、ヒト細胞における導入遺伝子発現システムとして有用であることを示している。

(2) 放射線による GADD45 の発現誘導

X 線による GADD45 の発現を、RKO、GM638、AT5BIVA の各細胞で調べたところ、p53 機能が正常と考えられる RKO 細胞において、最も鋭敏に発現誘導がみられることが分かった。SV40 virus によって不死化している GM638、AT5BIVA の各細胞では、large T 抗原によって p53 機能が失活していると考えられる。しかし、両細胞間に GADD45 発現に関して相違があり、AT5BIVA 細胞の方がより強い不感性を示したことは、AT 遺伝子産物(ATM)の機能を考える上で重要な現象であると言えよう。

(3) 細胞周期監視機構における GADD45 の役割

GADD45 が、放射線による G1 アレストに関与しているという可能性は、Kastan らによって最初に示唆された³⁾。彼らは、ATM(AT 原因遺伝子の遺伝子産物)蛋白質の機能を p53 依存的チェックポイント経路の制御と位置づけて、AT 細胞における放射線による Gadd45 遺伝子の発現誘導を解析した。その結果、AT 細胞では p53 経路の下流にある GADD45 の誘導が異常になることを示した。AT 細胞には放射線による G1 アレストが見られないことから、これに GADD45 の誘導異常が関与している可能性が示されたことになる。その後、p53 依存的チェックポイント経路による G1 停止機構に関する研究は飛躍的に進み、p53 蛋白質によって転写活性化される遺伝子のうち、p21 遺伝子が G1 停止現象に中心的な役割を果たしていることが明らかにされた¹¹⁾。しかし、これまでの報告では、GADD45 が放射線による G1 停止機構に関与していることを示す直接的な証拠はまだ無い。本研究でも、AT 細胞を用いて GADD45 過剰発現による細胞周期への影響について調べたが、どのような

影響も見られなかった。我々の結果は、Kastan らが最初に示唆した GADD45 の G1 停止機構への関与という点について、これを指示するものでは無かった。

では、GADD45 は、細胞周期監視機構には全く無用なのであろうか？最近、この点に関して興味深い事実が明らかにされた。GADD45 を正常ヒト線維芽細胞にマイクロインジェクションして強制発現させると G2 アレストが生じることが示された^{12,13)}。さらに、GADD45 の G2 アレスト誘発機能は p53 依存的であることが分かった。また、乳癌感受性を支配する遺伝子である BRCA1 を強制発現させると GADD45 が誘導されること、さらに JNK (c-Jun N-terminal kinase) の活性化を通してアポトーシスが誘導されることが明らかにされた¹⁴⁾。こうした事実は、GADD45 が、環境ストレスに呼応して生じる細胞周期停止やアポトーシス現象の mediator として重要な役割を果たしていることを示している。

(4) GADD45 による増殖抑制効果

ATH2S3-1 細胞では、培地への inducer 添加により、コロニー形成能が低下することが分かった(図10)。この効果は、高細胞密度で細胞増殖曲線を解析した場合には見られなかったことから(図6)、低細胞密度の場合に特異的に現れるものと考えられる。この結果は、*Gadd45* 遺伝子を構成的発現ベクターに組み込んで発現させるとコロニー形成率が低下するという Zhan らの報告と一致している⁹⁾。本研究では、さらに細胞播種後の 24 時間に GADD45 を誘導するだけで、持続的に発現させた場合と同程度のコロニー抑制効果が得られることを明らかにした。この場合、コロニー形成率の低下は、主に細胞数 50 個未満のコロニーフラクションの増加が原因であった。用いた ATH2S3-1 細胞は、ATM、及び p53 蛋白質が正常に機能しない細胞であることを考えると、GADD45 のコロニー抑制効果は、それ単独で作用している可能性が高い。すなわち、低密度状態でしかも細胞接着後の増殖の初期段階において、GADD45 は、細胞増殖を抑制する作用を持つものと考えられる。アポトーシスが生じている可能性についても検討したが、アポトーシスが誘導されているという証拠は得られなかった。したがって、GADD45 が、どのようなメカニズムで細胞増殖の初期段階に作用するのかは今後解明されるべき課題である。

11. 今後の展開

ストレス応答蛋白質の中でも、p53 蛋白質は、ゲノム安定化維持に中心的役割を果たすことが知られている。最近になって、GADD45 ノックアウト (-/-) マウスを用いた研究から、GADD45 (-/-) 細胞では、染色体異常、遺伝子増幅、中心体増幅、および分裂異常などの遺伝的不安定性が誘起されることが明らかにされ、GADD45 が、p53 蛋白質によるゲノム安定化に関与していることが示唆されている¹⁵⁾。こうした GADD45 のゲノム安定化機能と本研究でみられた GADD45 一過性誘導による細胞増殖抑制機能がどのように関連づけられるかを探ることが今後の重要な課題である。一過性誘導で増殖抑制が見られるという点は、細胞増殖機構を探る上でも大変ユニークな実験系を構築できることを示すものであり、今後より詳細な解析を行っていきたい。

12. 参考文献

- 1) Fornace, A. J. Jr., Nebert, D. W., Hollander, M. C., Liethy, J. D., Papathanasiou, M. A., Farbnoli, J., and Holbrook, H. J.: Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents, *Mol. Cell. Biol.*, 9, 4196-4203 (1989)
- 2) Papathanasiou, M. A., Kerr, N. C. K., Robbins, J. H., McBride, O. W., Alamo, I. Jr., Barrett, S. F., Hickson, I. D., Fornace, A. J. Jr.: Induction by ionizing radiation of the gadd45 gene in cultured human cells: Lack of mediation by protein kinase C, *Mol. Cell. Biol.*, 11, 1009-1016 (1991)
- 3) Kastan, M. B., Zhan, Q., El-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, A. J. Jr.: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia, *Cell*, 71, 587-597 (1992)
- 4) Carrier, F., Smith, M. L., Bae, I., Kilpatrick, K. E., Lansing, T. J., Chen, C. Y., Engelstein, M., Friend, S. H., Henner, W. D., Gilmer, T. M., Kastan, M. B., and Fornace, A. J. Jr.: Characterization of human Gadd45, a p53-regulated protein, *J. Biol. Chem.*, 51, 32672-32677 (1994)
- 5) Lu, X. and Lane, D. P.: Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: Defects in chromosome instability syndrome?, *Cell*, 75, 765-778 (1993)
- 6) Canman, C. E., Wolff, A. C., Chen, C. Y., Fornace, A. J. Jr., Kastan, M. B.: The p53-dependent G1 cell cycle checkpoint pathway and ataxia-telangiectasia, *Cancer Res.*, 54, 5054-5058 (1994)
- 7) Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D. A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Harnik, R., Patanjali, S. R., Simmons, A., Clines, G. A., Saryiel, A., Gattie, R. A., Chessa, L., Sanal, O., Lavin, M., Jaspers, N. G. J., Taylor, A. M. R., Arlett, C. F., Miki, T., Weissman, S. M., Lovett, M., Collins, F. S., and Shiloh, Y.: A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase, *Science*, 268, 1749-1753 (1995)
- 8) Jung, M., Zhang, Y., Lee, S., and Ditschilo, A.: Correction of radiation sensitivity in ataxia telangiectasia cells by a truncated I κ B- α , *Science*, 268, 1619-1618 (1995)
- 9) Zhan, Q., Lord, K. A., Alamo, I. Jr., Hollander, M. C., Carrier, F., Ron, D., Kohn, K. W., Hoffman, B., Liebermann, D. A., and Fornace, A. J. Jr.: The gadd and Myd genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth, *Mol. Cell. Biol.*, 14, 2361-2371 (1994).
- 10) Wyborski, D. L. and Short, J. M.: Analysis of inducers of the *E. coli* lac repressor system in mammalian cells and whole animals, *Nuc. Acids Res.*, 17, 4647-4653

(1991)

- 11) Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J. and Leder, P.: Mice lacking p21^{CIP1/WAF1} undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control, *Cell*, 82, 675-684 (1995)
- 12) Wang, X. W., Zhan, Q., Coursen, J. D., Khan, M. A., Kontny, H. U., Yu, L., Hollander, M. C., O'Connor, P. M., Fornace, A. J. Jr. and Harris, C. C: GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3706-3711 (1999)
- 13) Zhan, Q., Antinore, M. J., Wang, X. W., Carrier, F., Smith, M. L., Harris, C. C. and Fornace, A. J. Jr.: Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45, *Oncogene*, 18, 2892-2900 (1999)
- 14) Harkin, D. P., Bean, J. M., Miklos, D., Song, Y-H., Truong, V. B., Englert, C., Christians, F. C., Ellisen, L. W., Maheswaran, S., Oliner, J. D. and Haber, D. A.: Induction of *GADD45* and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of *BRCA1*, 97, 575-586 (1999)
- 15) Hollander, M. C., Sheikh, M. S., Bulavin, D. V., Lundgren, K., Augeri-Henmueller, L., Shehee, R., Molinaro, T. A., Kim, K. E., Tolosa, E., Ashwell, J. D., Rosenberg, M. P., Zhan, Q., Fernandez-Salguero, P. M., Morgan, W. F., Deng, C-X. and Fornace, A. J. Jr.: Genomic instability in Gadd45-deficient mice, *Nature Genet.*, 23, 176-184 (1999)

13 . 研究業績

13-1 . 原著論文

- 1) M. Watanabe, K. Suzuki, S. Kodama and T. Sugahara: Normal human cells at confluence get heat resistance by efficient accumulation of HSP72 in nucleus, *Carcinogenesis*, 16, 2372-2380 (1995)
- 2) T. Tsutsui, T. Fujino, S. Kodama, M. A. Tainsky, J. Boyd and J. C. Barrett: Aflatoxin B1-induced immortalization of cultured skin fibroblasts from a patient with Li-Fraumeni syndrome, *Carcinogenesis*, 16, 25-34 (1995)
- 3) S. Kodama, H. Yamada, L. Annab and J. C. Barrett: Elevated expression of mitochondrial cytochrome b and NADH dehydrogenase subunit 4/4L genes in senescent human cells, *Exp. Cell Res.*, 219, 82-86 (1995)
- 4) T. Miyazaki, S. Nagasaka, I. Maeda, T. Matsumoto, S. Koyama, S. Kodama and M. Watanabe: Radiation-induced emission from golden hamster embryo cells, *Radiat. Phys. Chem.*, 47, 817-819 (1996)
- 5) K. Komatsu, S. Matsuura, H. Tauchi, S. Endo, S. Kodama, D. Smeets, C. Weemaes and M. Oshimura: The gene for Nijmegen breakage syndrome (V2) is not located on chromosome 11, *Am. J. Hum. Genet.*, 58, 885-888 (1996)

13-2 . 著書、総説等

- 1) 児玉靖司：放射線発がんにおける遺伝的変異、RADIOISOTOPES, 44, 395-400 (1995)

13-3 . 国際学会発表

- 1) M. Watanabe, K. Maeda, S. Kodama and K. Suzuki: Suppression of p53 gene by transfection of anti-sense p53 DNA vector lead to increase in X-ray sensitivity of human cells. 10th International Congress of Radiation Research, August 28-September 1, 1995, Wurzburg, Germany.
- 2) S. Kodama, S. Koyama, K. Suzuki, T. Miyazaki, and M. Watanabe: Suppression of X-ray-induced mutation and malignant transformation by ascorbic acid, The First Kazakhstan-Japan Symposium on "Radiomodification in Cancer Therapy", September 17-20, 1996, Almaty, Kazakhstan.

13-4 . 国内学会発表

- 1) 渡邊正己、児玉靖司、鈴木啓司: アンチセンス遺伝子導入法と発現解析とその応用、放射線医学研究のための分子生物学入門 III、第 34 回生物部会学術大会、平成 7 年 4 月 13 日-14 日、名古屋。
- 2) 渡邊正己、児玉靖司、鈴木啓司 : 放射線で誘導される発がんに関与する遺伝的不安定性、第 32 回放射線影響懇話会、平成 7 年 7 月 21 日、福岡。
- 4) 渡邊正己、三宅美恵子、鈴木啓司、児玉靖司、鈴木雅雄、加瀬陽子、菅原努、低線量放射線で誘導される遺伝的不安定性、日本放射線影響学会第 38 回大会、平成 7 年 11 月 8 日-10 日、千葉。
- 5) 児玉靖司、橋本裕数、鈴木啓司、井上さとみ、石崎寛治、渡邊正己、発現誘導型ベクターを用いたヒト gadd45 遺伝子のヒト不死化細胞への導入、日本放射線影響学会第 38 回大会、平成 7 年 11 月 8 日-10 日、千葉。
- 6) 栢多慎吾、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己、マウス m5S 細胞における遺伝的不安定性の誘導、日本放射線影響学会第 38 回大会、平成 7 年 11 月 8 日-10 日、千葉。
- 7) 児玉靖司、橋本裕数、鈴木啓司、井上さとみ、渡邊正己、石崎寛治：放射線により誘導されるヒト gadd45 遺伝子の機能解析、日本薬学会第 116 年会、平成 8 年 3 月、金沢。
- 8) 渡邊正己、小山真治、鈴木啓司、児玉靖司、宮崎哲郎、松本拓郎：ビタミン C の抗変異作用の機構、日本薬学会第 116 年会、平成 8 年 3 月、金沢。
- 9) 児玉靖司、押村光雄、菓子野元郎、鈴木啓司、奥村 寛、渡邊正己、J. C. Barrett : 8 番染色体を移入した Werner 症候群由来細胞における表現形質解析、第 69 回日本組織培養学会、平成 8 年 5 月、広島。
- 10) 児玉靖司、小山真治、鈴木啓司、宮崎哲郎、渡邊正己：放射線誘発突然変異と細胞癌化のアスコルビン酸による抑制、第 2 回癌治療増感研究発表会、平成 8 年、京都。
- 11) 栢多慎吾、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：X 線により誘導された遺伝的不安定性、第 33 回放射線影響懇話会、平成 8 年 7 月、久留米。

- 12) 菓子野元郎、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：Werner 症候群由来細胞における突然変異特異性、第 33 回放射線影響懇話会、平成 8 年 7 月、久留米。
- 13) 中畑圭二、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：熱による細胞形態と細胞骨格の変化、第 33 回放射線影響懇話会、平成 8 年 7 月、久留米。
- 14) 児玉靖司、橋本裕数、鈴木啓司、石崎寛治、渡邊正己：ヒト gadd45 遺伝子の機能解析、第 55 回日本癌学会総会、平成 8 年、横浜。
- 15) 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：正常ヒト細胞における p53 蛋白質発現と機能制御、第 55 回日本癌学会総会、平成 8 年、横浜。
- 16) 渡邊正己、児玉靖司、鈴木啓司：放射線による突然変異と細胞癌化の原因となる常温で安定なラジカル、第 55 回日本癌学会総会、平成 8 年、横浜。
- 17) 児玉靖司、山口健太郎、鈴木啓司、石崎寛治、渡邊正己：Ataxia telangiectasia 細胞における導入 gadd45 遺伝子の機能解析、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年、大阪。
- 18) 菓子野元郎、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：Werner 症候群由来細胞における突然変異の多重 PCR 法による解析、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年、大阪。
- 19) 栢多慎吾、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：遺伝的不安定性に対する適応応答効果、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年、大阪。
- 20) 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：正常ヒト細胞における X 線による情報伝達系および p53 応答経路の活性化、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年、大阪。
- 21) 中畑圭二、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：温熱によるヒト細胞の致死過程における細胞球状化の意味、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年、大阪。
- 22) 渡邊正己、小山真治、木村多賀子、児玉靖司、鈴木啓司：突然変異と細胞癌化の原因となる長寿命有機ラジカル、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年、大阪。
- 23) 楊 治、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：ヒト胎児由来細胞の分裂寿命に対する低線量放射線の影響、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年、大阪。
- 24) 菓子野元郎、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：Werner 症候群由来細胞における突然変異特性、第 13 回日本薬学会九州支部大会、平成 8 年 1 2 月、熊本。
- 25) 中畑圭二、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：温熱刺激に対するヒト細胞の球状化と細胞死の関連、第 13 回日本薬学会九州支部大会、平成 8 年 1 2 月、熊本。
- 26) 楊 治、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：ヒト胎児由来細胞における低線量放射線の生物効果、第 13 回日本薬学会九州支部大会、平成 8 年 1 2 月、熊本。
- 27) 栢多慎吾、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：低線量放射線の遺伝的不安定性への影響、第 13 回日本薬学会九州支部大会、平成 8 年 1 2 月、熊本。

13-5 . 新聞など なし

13-6 . 特許 なし

14 .

(1) Functional analysis of environmental stress-induced genes

(2) Laboratory of Radiation and Life Science, Department of Health Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852, Japan. (s-kodama@net.nagasaki-u.ac.jp)

(3) Seiji Kodama

(4) Keiji Suzuki and Masami Watanabe (Laboratory of Radiation and Life Science, Department of Health Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852, Japan.)

(5) 1995 – 1998

(6) Abstract

Gadd (growth arrest and DNA damage-inducible) genes have been isolated as those inducible by a variety of DNA-damaging agents, such as, chemical carcinogens or UV. Their functions are suggested to be involved in control of cell growth and differentiation. Among the *Gadd* genes, *Gadd45* is unique because of induction by ionizing radiation. Recently, it has been reported that GADD45 might be involved in p53 dependent G1 arrest pathway and that radiation-sensitive ataxia telangiectasia (AT) cells showed an impaired induction of *Gadd45* gene by radiation. To investigate abnormal expression of the *Gadd45* gene in AT cells, we examined the time dependent expression of GADD45 after X-irradiation. We show here that X-ray-induced expression of the GADD45 is severely delayed in AT5BIVA cells compared to the control RKO cells and that the basal expression level also diminishes in the AT cells. To know the function of GADD45 in the AT cells, we transfected the inducible human *Gadd45* gene into the AT5BIVA cells and established the AT cells whose GADD45 expression was inducible by isopropyl thiogalactoside (IPTG) treatment. Using this AT cell line, we investigated the effect of GADD45 expression on radiation sensitivity, cell cycle arrest and colony forming ability. We demonstrate that the excess GADD45 expression neither change radiation sensitivity nor cause G1 arrest in the AT cells. On the other hand, the increased expression of GADD45 reduced plating efficiency to 50% of control, confirming that the *Gadd45* gene functions as a negative growth regulator. Further analysis reveals that the temporal expression of the *Gadd45* gene within 24 h after cell inoculation is enough to suppress the colony forming ability, suggesting that there may exist a critical target for GADD45 at the beginning of cell growth.