

1. 研究課題名：動物細胞のストレス応答に関する研究（Ⅱ）：
ストレスによる情報伝達経路の活性化と細胞増殖制御
2. 研究機関：長崎大学薬学部放射線生命科学（kzsuzuki@net.nagasaki-u.ac.jp）
3. 研究者：鈴木啓司
4. 研究協力者：渡邊正己（長崎大学薬学部放射線生命科学）
児玉靖司（長崎大学薬学部放射線生命科学）
5. 研究期間：平成9年～11年

6. 要約

環境中に存在する多種多様なストレスに対して、生体は様々なストレス応答蛋白質の誘導や活性化を介して応答しその恒常性を維持している。しかしながら、生体がどのようにしてストレスを受容し、どのようにしてストレス応答蛋白質を誘導し、そしてどのようなメカニズムでこれらストレス応答蛋白質の機能発現を制御しているのかについては不明な点が多い。そこで様々な種類の環境ストレスに対し普遍的に応答するストレス応答蛋白質、p53 蛋白質および MAP kinase ファミリーに着目し、ストレス受容・伝達のメカニズムおよびその機能制御機構について検討した。

その結果、放射線・紫外線・温熱いずれのストレスに対しても p53 および MAP kinase ファミリーは応答するが、ストレスの質あるいは量によってその反応性が異なることを明らかにした。また、放射線ストレスの受容が、放射線や制限酵素により誘導される DNA 損傷を特異的に認識する ATM 蛋白質が放射線によって生じた DNA 鎖切断部位にリクルートされることによって行われていることを解明した。さらに、活性化された ATM 蛋白質が部位特異的に p53 蛋白質をリン酸化することによって情報を伝達していること、p53 蛋白質からさらに下流への情報伝達には p53 蛋白質のみならず細胞膜からの情報伝達により活性化された IRF-1 が協同的に働くこと、を明らかにした。さらに、ATM および類似蛋白質の阻害剤であるウォルトマンニンを用いた実験から、ATM 蛋白質が p53 蛋白質以外の因子にも情報を伝達していることを発見した。一方、放射線が MAP kinase ファミリーの1つである ERK1/2 を活性化することを見いだした。IP-キナーゼ分析から下流の転写因子である Elk1 がリン酸化されていること、MEK1/2 阻害剤である PD98059 を用いた実験から放射線による ERK1/2 の活性化に上流の MEK1/2 の活性化が関与していること、さらに MEK1/2 の活性化に細胞膜に存在する EGFR の活性化が関与する可能性を示した。ERK1/2 は、細胞膜で生じた情報の核内への伝達を仲介する蛋白質リン酸化酵素であることから、放射線は細胞膜近傍でも受容され、その情報も核へ伝達されることが明らかになった。また興味深いことに、これら阻害剤は放射線による p53 蛋白質の蓄積や活性化も抑制することが明らかになった。

ストレス受容に伴う情報伝達経路の活性化は最終的には核内に伝達され、転写因子のリン酸化を介して遺伝子発現を誘導する。その結果細胞に様々なストレス応答反応が誘導されるが、そのストレスの量が許容できる範囲を超えた場合には、細胞増殖の停止や細胞死が引き起こされる。我々は細胞死のメカニズムにこれまで報告されていたアポトーシス以外の新たなメカニズム、細胞老化様増殖停止、が存在することを明らかにした。また、アポトーシス

あるいは老化様細胞増殖停止はストレスの種類や細胞の種類によって選択的に誘導されることが明らかになった。さらに、ヒト癌細胞に野生型 p53 遺伝子を誘導したところ、老化様細胞増殖停止が誘導されストレス応答機能を回復させることによって癌細胞の増殖を抑制する新たな癌治療指針を確立した。

以上の結果から、放射線ストレスは細胞核および細胞膜近傍で受容され、ATM や ERK1/2 などの蛋白質リン酸化酵素の活性化を介して核に伝達され、p53 蛋白質を始めとする様々なストレス応答分子の機能を活性化することが明らかになった。さらに、核および細胞膜からの情報伝達は、p53 蛋白質など共通のストレス応答因子のリン酸化を介して互いにクロストークし情報を集約することにより細胞応答を制御していることが示された。また、ストレスによる新たな細胞増殖抑制機構を発見し、このストレス応答の消失が細胞がん化の1つのメカニズムであることを提唱した。

7. 目的

地球上に存在する生命は、数 10 億年に渡り急激な環境変化に曝されながらその中で生存しうるように進化してきた。このような環境変化には、宇宙放射線量の変化や、紫外線線量変化、あるいは気温の変化、酸素濃度変化などが含まれる。現在このような急激な変化は激減し、穏やかな環境の中で活動しているが、それでも、進化の過程で獲得してきた環境変化に対応するメカニズム、いわゆる " ストレス応答反応 " は現在の微弱な環境変化に対処するためにも現存し応用されている。

近年、ストレス応答反応に関与するいくつかの興味深い蛋白質が同定された。その1つが HSP72 蛋白質である。HSP72 蛋白質は、微生物から高等生物に至るまで幅広く普遍的に存在する熱誘導蛋白質 hsp70 ファミリーに属する蛋白質の1つであり、別に報告した我々の研究から、その機能が細胞増殖や細胞分化、あるいは細胞老化など生命活動の多くの基本的なプロセスに関わっていることが明らかになった（動物細胞のストレス応答に関する研究 (I) : 熱ショック蛋白質(HSP)の機能に関する研究参照）。しかしながら、HSP72 蛋白質そのものには特定の機能はなく、HSP72 蛋白質と会合する別の蛋白質を介してその機能を発現していることが予想された。その蛋白質こそが、もう1つのストレス応答蛋白質である癌抑制遺伝子産物 p53 蛋白質であった¹⁾。p53 蛋白質の活性化は HSP72 蛋白質よりもさらに幅広いストレスにより普遍的に誘導され、細胞のストレス応答において HSP72 蛋白質よりもさらに多くの機能を有していることが明らかになった。さらに、p53 蛋白質はその変異あるいは消失がほとんど全ての癌細胞で見いだされ²⁾、p53 蛋白質の機能が細胞増殖・分化・老化・がん化など生命の存在に関わる極めて基本的なプロセスに幅広く関与していることが予想された³⁾。

生体を構成する細胞は、環境中に存在する様々なストレス（放射線、紫外線、熱あるいは化学物質）に絶えず応答しその恒常性を維持する。これらストレス応答反応は、HSP72 や p53 蛋白質など、いわゆる細胞内ストレス応答分子の機能発現を介して行われるが、最近、その機能制御にストレス受容とそれに続く蛋白質リン酸化を介した細胞内情報伝達経路の活性化が重要な役割を果たしている可能性が出てきた⁴⁾。これら蛋白質リン酸化反応は多くが

一連の経路を構成しており、そのストレスに応じて別々の経路を構成する分子が連鎖的にリン酸化されていくことにより情報が伝達されると考えられる。また、細胞内情報伝達経路の活性化の引きがねとして、細胞はストレスをいずれかの場所で受容しその情報をリン酸化へと変換しているはずである。しかしながら現在までのところ、どのようにしてストレスを受容し、どの情報伝達経路にその情報を渡し、活性化された複数の蛋白質リン酸化経路がどのようにしてその情報を核に伝達するのか、については不明な点が多い。そこで本研究では、正常ヒト細胞において各種ストレスがどのようにして受容され、活性化された蛋白質リン酸化経路がどのようにしてその情報を核へ伝達し、その情報が核内でどのように集約されるのかについて p53 あるいは MAP kinase ファミリーに着目し検討した。

ストレスに対し細胞は様々なストレス応答経路を活性化することによってその回避を試みる。しかしながら、多変する環境中のストレス量は必ずしも細胞が許容できる範囲内でない場合もある。その場合細胞は自らの増殖を一時的に停止したり、また自らを排除するメカニズムが存在する。これまでその排除メカニズムについてはアポトーシスが主に研究されてきたが、我々は細胞に加えられるストレスの種類あるいは量によってそれとは異なるメカニズムが誘導される事実を見いだした。このメカニズムが細胞老化様増殖停止である。さらに、ヒト癌細胞に p53 蛋白質を人為的に発現させ細胞のストレス応答能を回復させると、癌細胞にこの老化様細胞増殖停止が発現した。以上の結果をもとに、ストレス応答研究と癌治療研究の接点についても考察した。

8. 材料と方法

8-1. 各種ストレスによる p53 蛋白質活性化の多様性

【細胞培養】

ヒト正常細胞として正常ヒト胎児由来 (HE) 細胞を用いた。細胞は 10% 牛胎児血清 (FBS) を含む MEM 培地を用い、CO₂ インキュベーター内で 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。継代培養は、3 ~ 4 日毎に 0.2% トリプシンを用いて細胞を回収し、1 × 10⁶ 個の細胞を T75 型培養フラスコ (底面積 75cm²) に植え直すことにより行った。

【細胞処理】

細胞の X 線照射には T25 型フラスコ (底面積 25cm²) に植えた細胞を用いた。対数増殖期にある細胞に、X 線発生装置 (150kVp、5mA) により線量率 0.44G/min の条件で照射を行った。紫外線照射は、殺菌灯ランプ (GL-15、Toshiba) により行った。直径 100mm のディッシュに植えた細胞を照射直前にリン酸緩衝液 (PBS) により 2 度洗浄し照射した。温熱処理は、細胞を植えた T25 型フラスコをプラスチックバッグに入れシールした後に 43 °C のウォーターバスインキュベーターに沈めることにより行った。

【蛋白質抽出およびウェスタンブロッティング】

細胞全蛋白質の抽出は、トリプシン処理により回収した細胞を RIPA 溶液 (50mM Tris, pH7.2, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS) で溶解し、遠心処理 (15000rpm、10 分、4 °C) により得られる上清を回収することにより調製した。上清中の蛋白質量を BCA アッセイキット (Pierce) を用いた比色定量法により測定し、

8 ~ 16 μg の蛋白質を泳動した。蛋白質は、7.5%もしくは 10%のゲルを用いた SDS-PAGE 法により分画した後 PVDF 膜に電氣的に転写した。PVDF 膜は 1 晩 10%スキムミルク中でブロッキングし、TBS-T (20mM Tris, pH7.6, 0.1% Tween-20) 溶液で洗浄後 1 次抗体を処理した。1 次抗体処理後 PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗浄し、ビオチン化 2 次抗体を処理した。処理後再び TBS-T で 3 回洗浄し、ストレプトアビジン-アルカリフォスファターゼを加えさらに反応させた。さらに TBS-T で 3 回洗浄した PVDF 膜に NBT/BCIP を基質として加え発色させた。出現したバンドの相対濃度は、PVDF 膜をデンストメーターでスキャンすることにより求めた。

【IP-キナーゼアッセイ】

ERK1/2 の活性は Elk-1 蛋白質を基質として用いた IP-キナーゼアッセイにより検討した。抽出した細胞全蛋白質にリン酸化 ERK1/2 特異的抗体を加え反応後、Protein-A によりリン酸化 ERK1/2 を沈殿させ回収した。免疫沈降物に ATP および 2 mg の Elk-1-GST 融合蛋白質を加え、30 °C で 30 分間リン酸化反応を行った。その後反応溶液をリン酸化 Elk-1 を特異的に認識する抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。

8-2.放射線ストレスの受容と伝達の分子メカニズム

【細胞培養】

ヒト正常細胞として正常ヒト胎児由来 (HE) 細胞を用いた。Ataxia telangiectasia (AT) としては皮膚由来細胞である AT5BI および AT2KY を用いた。細胞は 10%牛胎児血清 (FBS) を含む MEM 培地を用い、CO₂ インキュベーター内で 37 °C · 5%CO₂ 条件下で培養した。継代培養は、3 ~ 4 日毎に 0.2%トリプシンを用いて細胞を回収し、1 × 10⁶ 個の細胞を T75 型培養フラスコ (底面積 75cm²) に植え直すことにより対数増殖期にある細胞を維持した。

【細胞処理】

細胞の X 線照射には T25 型フラスコ (底面積 25cm²) に植えた細胞を用いた。対数増殖期にある細胞に、X 線発生装置 (150kVp, 5mA) により線量率 0.44G/min の条件で照射を行った。各種阻害剤は DMSO に溶解後 -20 °C で保存した。細胞への処理は培地中に直接添加することにより行った。

【蛋白質抽出およびウェスタンブロットティング】

細胞全蛋白質の抽出は上述の方法で行った。核蛋白質は、Lysis buffer (10 mM HEPES, pH8.0, 50 mM NaCl, 0.5 M Sucrose, 0.1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂) を用いて 4 °C で 5 分間細胞を溶解後 5000rpm で 1 分間遠心し、回収した細胞核を 0.5 M NaCl, 5 mM Spermidine 存在下で溶解して抽出した。蛋白質の定量およびウェスタンブロットティングは上述の方法にしたがって行った。

【免疫沈降法】

上述の RIPA 溶液を用いて作成した 500 μg ~ 1 mg の蛋白質試料に 1 次抗体を加え、4 °C の冷蔵庫中でゆっくりと旋回 (12rpm) 攪拌させながら抗原抗体反応を行った。その後、Protein A/G-agarose (OSI) を加えさらに旋回反応させ免疫複合体を形成させた。反応後、

遠心 (12,000rpm、10 分) により免疫複合体を沈殿として回収し、RIPA 溶液で 3 回洗浄した。免疫複合体は泳動用のサンプル溶液 (500 μ l 蒸留水に 125 μ l 0.5M Tris、pH6.2、50 μ l β -mercaptoethanol、100 μ l グリセリン、50 μ l BPB を加えたもの) に懸濁し遠心 (12000rpm、10 分) 後得られた上清をその後の解析に用いた。

【DNA-セルロースを用いたプルダウンアッセイ】

ATM 蛋白質と DNA との会合は、2 本鎖 DNA を固相化した DNA-セルロースを用いて検討した。RIPA 溶液により得た細胞全蛋白質を、処理あるいは未処理 DNA-セルロースと混合し、4 $^{\circ}$ C で静かに混和しながら反応させた。十分量の RIPA で DNA-セルロースを洗浄後、遠心 (15,000rpm、10 分) により DNA-セルロースに結合した蛋白質を回収、サンプルバッファーで溶出しウェスタンブロット解析を行った。X 線処理は、トリスバッファーに懸濁した DNA-セルロースを X 線発生装置内に静置し照射した。紫外線処理は、トリスバッファーに懸濁した DNA-セルロースを殺菌灯 (UV-C ランプ) 下に置き照射することにより行った。制限酵素処理は、1000U の Pvu II を含む溶液に DNA-セルロースを添加し 37 $^{\circ}$ C で 4 時間反応させ処理した。

8-3. ストレスによる細胞増殖抑制・排除の分子メカニズム

【細胞培養】

ヒト正常細胞として正常ヒト胎児由来 (HE) 細胞を用いた。遺伝子導入用の細胞としてはヒト肺非小細胞癌である NCI-H1299 細胞を用いた。細胞は 10% 牛胎児血清 (FBS) を含む MEM 培地を用い、CO₂ インキュベーター内で 37 $^{\circ}$ C \cdot 5% CO₂ 条件下で培養した。対数増殖状態にある細胞維持するため、3 ~ 4 日毎に 0.2% トリプシンを用いて細胞を回収し、1 \times 10⁶ 個の細胞を T75 型培養フラスコ (底面積 75cm²) に植え直すことにより継代培養を繰り返した。

【細胞処理】

細胞の X 線照射には T25 型フラスコ (底面積 25cm²) に植えた細胞を用いた。対数増殖期にある細胞に、X 線発生装置 (150kVp、5mA) により線量率 0.44G/min の条件で照射を行った。紫外線照射は、殺菌灯ランプ (GL-15、Toshiba) により行った。直径 100mm のディッシュに植えた細胞を照射直前にリン酸緩衝液 (PBS) により 2 度洗浄し照射した。温熱処理は、細胞を植えた T25 型フラスコをプラスチックバッグに入れシールした後に 43 $^{\circ}$ C のウォーターバスインキュベーターに沈めることにより行った。

【蛋白質抽出およびウェスタンブロットティング】

細胞全蛋白質の抽出およびウェスタンブロットティングは上述した方法により行った。

【p53 遺伝子発現誘導系の確立】

ヒト正常 p53 遺伝子発現誘導システムの樹立には、エクダイソン依存性遺伝子発現誘導ベクターシステム (Invitrogen、K1000-01) を応用した。図 1 に示したように、2 つのプラスミドからなるこのシステムは、第 1 のプラスミド (pVgRXR) から 2 種類の転写因子 (VgEcR および RXR) が合成され、これらがヘテロダイマーを形成した形で第 2 のプラスミド (pIND) 上に存在する転写因子結合配列に結合し、下流の遺伝子の転写を誘導するとい

う原理に基づいている。第1のプラスミドから合成された蛋白質がヘテロダイマーを形成するには昆虫ホルモンであるエクダイソンが必須で、この点でバックグラウンドの発現が0であることを保証している。実験にはエクダイソンの合成類似体であるムリステロン A (MA) あるいはポナステロン A (PA) を使い、培地中にこれら誘導剤を添加することにより遺伝子発現を誘導した。実験には、第2のプラスミドにヒト正常型 p53 遺伝子を挿入して、誘導剤添加により野生型ヒト p53 遺伝子が誘導されるように設計した。

【プラスミドの細胞への導入】

作成した組換え体はキアジェン DNA 抽出キット (Qiagen) を用いて精製した。プラスミド DNA の細胞への導入は、エレクトロポレーション法により行った。1 ~ 5 μ g のプラスミド DNA を細胞を懸濁した PBS に添加し、パルス高 400V/cm、パルス幅 1m sec のパルス を細胞に作用させた。まず pVgRXR を細胞に導入後ゼオシン抵抗性をマーカーにして導入細胞を選別した。さらに、pINDp53 プラスミドを導入し、ネオマイシン抵抗性を獲得したクローンを単離し、その中で MA 添加により効率的に p53 遺伝子の発現を誘導できるクローンを 選び出した。

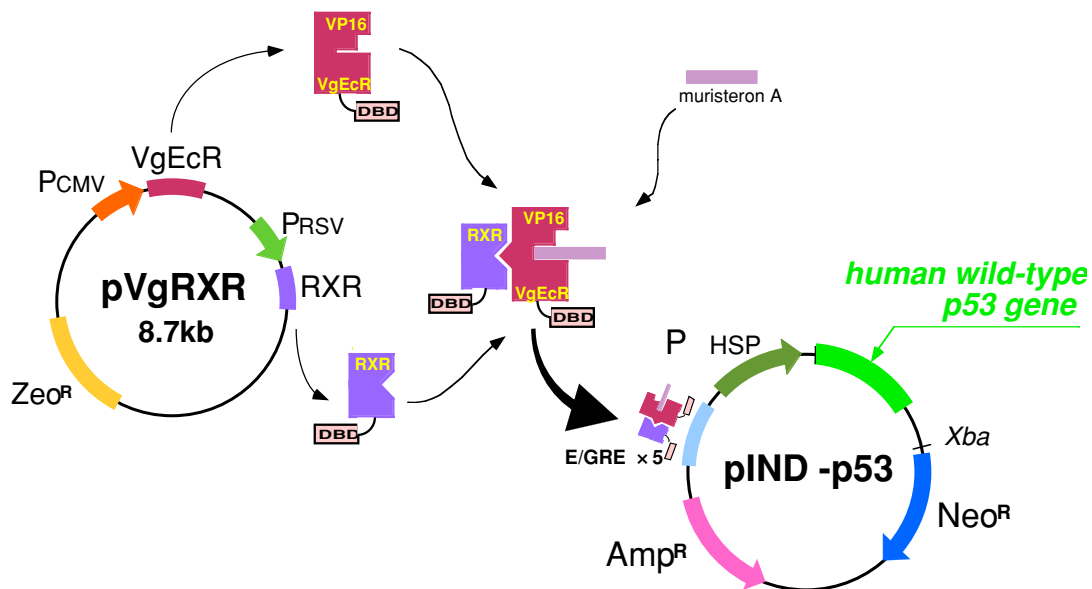


図1 野生型 p53 遺伝子発現誘導システム

【蛍光抗体法】

細胞の免疫染色には蛍光抗体法を用いた。22 x 22mm の滅菌カバーグラスに植えた細胞を各種ストレスで処理した後、-20 のメタノールで5分間固定し、PBS で洗浄し1次抗体を処理した。抗体の処理は 37 の CO₂ インキュベーター中で行った。洗浄後、FITC 標識した2次抗体を加えさらに反応させた。反応後は蒸留水を用いて洗浄し、風乾した後にオイキットを用いてスライドグラス上に封入した。蛍光顕微鏡により顕鏡し写真撮影した。

【老化マーカー発現の検出】

老化マーカーとして Dimri らの報告に基づき Senescence-associated β -galactosidase

(SA-β-gal) の発現を用いた⁵⁾。T25 型フラスコ中に培養した細胞をまず固定液 (2% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde) で固定後、PBS でよく洗浄して 1mg/ml の X-gal を含む反応溶液 (40 mM Citric acid/sodium phosphate, pH6.0, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂) を加え 37 °C で培養した。一定時間反応後、細胞質が緑色に染まった細胞を SA-β-gal 陽性細胞として数えた。

9. 結果

9-1. 各種ストレスによる p53 蛋白質活性化の多様性

【各種ストレスによる p53 蛋白質および MAP キナーゼの活性化】

放射線ストレス、紫外線ストレスおよび温熱ストレスによる p53 蛋白質の活性化を正常ヒト胎児由来細胞で調べた (図 2)。正常細胞内では p53 蛋白質は速やかに分解され極めて低いレベルにその発現が抑制されている。ストレスが細胞に加わった後はリン酸化により安定化しそのレベルが増加することによって活性化される。放射線ストレスの場合、照射後 1 時間で既に p53 蛋白質の増加が確認され、3 時間を最大に一時的に減少した。その後再びレベルが上昇して照射後約 10 時間で最大になった。一方、紫外線ストレスの場合は照射後 2 時間で増加が観察され、その後時間を追うごとにそのレベルは上昇し続けた。温熱ストレスの場合には、温熱処理直後に一時的にレベルが減少したが、その後増加しはじめ約 10 時間後で最大レベルに達した。

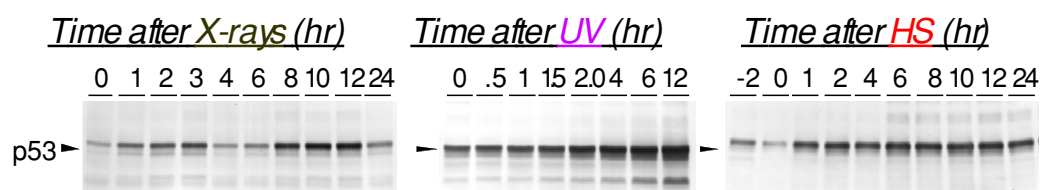


図 2 各種ストレスによる p53 蛋白質の増加

p53 蛋白質が全てのストレスに応答するのに対し、MAP キナーゼの反応性にはストレス依存性が見られた。MAP キナーゼには 3 つのファミリー (ERK1/2、JNK1/2、p38) が存在するが、各ファミリーはリン酸化されることによって活性化される。そこでリン酸化された MAP キナーゼを特異的に認識する抗体を用いて各種ストレス後の MAP キナーゼの活性化を検討した (図 3)。その結果、正常ヒト細胞においては、紫外線ストレスに対しては全てのファミリーが応答することを見いだした。リン酸化はいずれのファミリーにおいても照射後 1 時間で既に観察され、詳細な検討から照射 15 分後で既に活性化されることがわかった。これに対し、放射線ストレスでは ERK1/2 のみがリン酸化されていた。また図には示さないが温熱ストレスによる活性化も ERK1/2 のみで確認された。

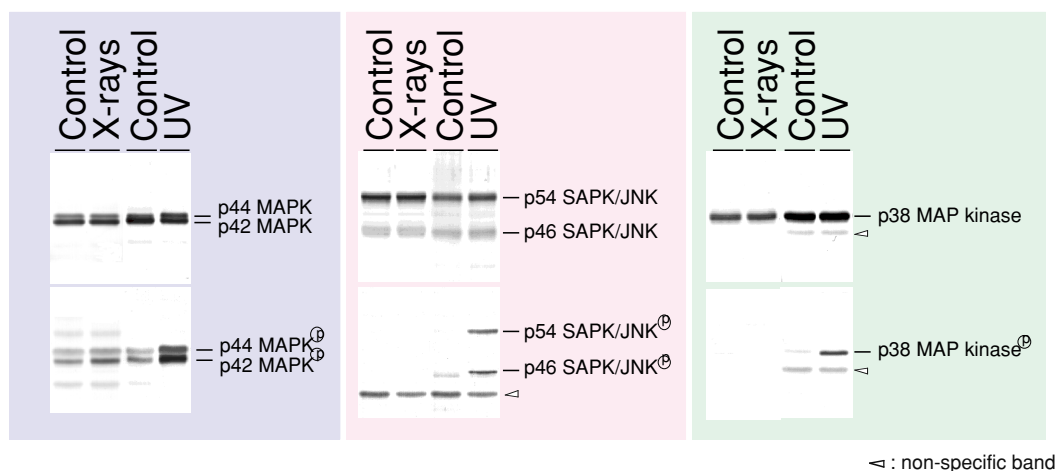


図3 各種ストレスによる MAP キナーゼファミリーの活性化

【低レベルストレスによる p53 蛋白質および MAP キナーゼの選択的活性化】

p53 蛋白質あるいは MAP キナーゼの活性化がストレスの量によってどのように変化するか検討した。正常ヒト細胞に対し全く致死的に作用しない 1 cGy から、生存率を 100 分の 1 にまで下げる 6 Gy まで様々な量の X 線を照射した後に各蛋白質の活性化を検討した (図 4)。その結果、p53 蛋白質の活性化は 4 Gy 以上の線量で確認されるのに対し、MAP キナーゼ (ERK1/2) の場合は 2 cGy 程度の微量放射線により活性化されることが明らかになった。

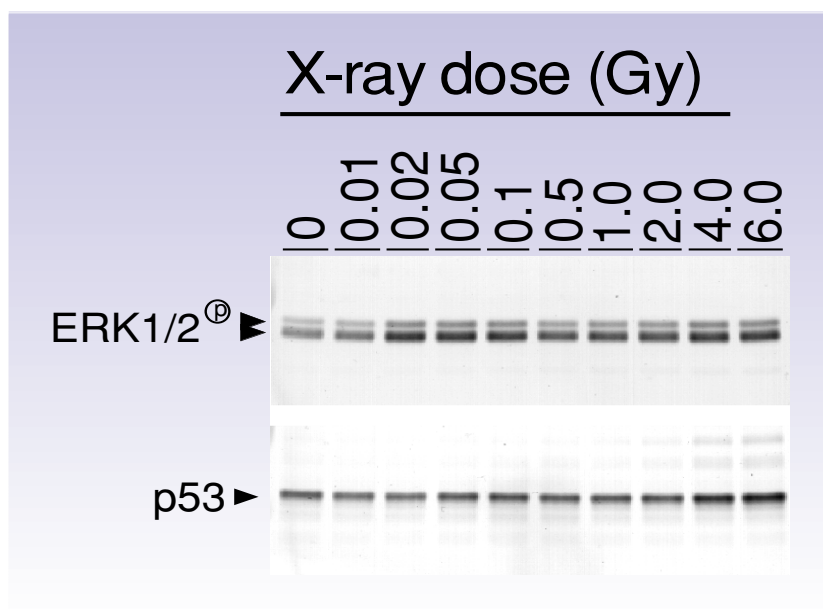


図4 p53 蛋白質および MAP キナーゼ活性化のストレス量依存性

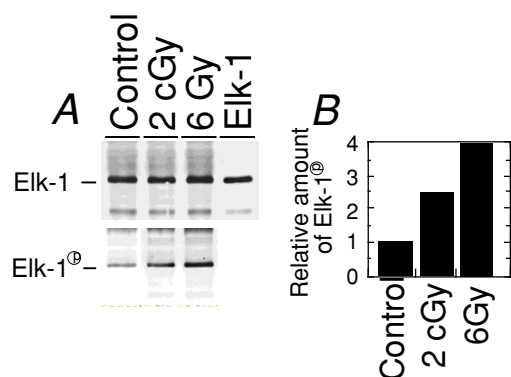


図5 低レベル放射線ストレスによる ERK1/2 の活性化

A: リン酸化 Elk-1 の検出 B: Elk-1 相対的リン酸化量

その後線量を上げるとその活性化は一時的に弱まり、4 Gy 以上の放射線ストレスで再び強い活性化が起こることを見いだした。低線量放射線ストレスによる ERK1/2 のリン酸化が ERK1/2 の機能を活性化しているかどうか明らかにするため、ERK1/2 の基質である Elk-1 のリン酸化 IP-キナーゼ分析により調べた。Elk-1 は転写因子である SRF の補助因子で、リン酸化され二量体の SRF と三者複合体を形成することにより SRE に結合して遺伝子転写を誘導する。その結果、図5に示すように2 cGy あるいは6 Gy いずれのストレス量においても Elk-1 のリン酸化が確認され、低線量放射線ストレスによる ERK1/2 のリン酸化は生物効果を示す活性化であることが確認された。

9-2. 放射線ストレスの受容と伝達の分子メカニズム

【ATM 蛋白質による放射線ストレスの受容】

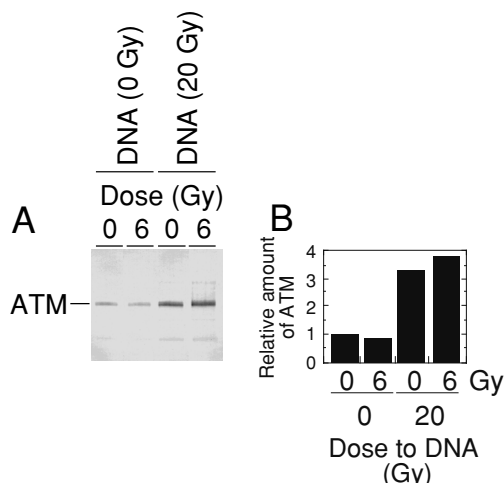


図6 ATM 蛋白質の損傷 DNA 結合

放射線ストレスは核内の DNA に鎖切断を誘発する。ストレス応答蛋白質である p53 の機能が二重鎖切断 DNA によって活性化されることから、なんらかの分子が放射線による DNA

切断を認識することによってストレスを受容し、その情報を p53 に伝達していると考えた。我々は、DNA-セルローズを用いたプルダウン法を応用し、p53 蛋白質の上流に位置するとされる ATM 蛋白質が放射線による DNA 損傷を直接認識するかどうか検討した。その結果図 6 に示すように、ATM 蛋白質は普段から未照射 DNA に会合しているが、放射線照射 DNA に対してはその親和性が有意に増加することを明らかにした。また、ATM と DNA との会合の増加は、X線や制限酵素 Pvu II を処理した DNA に対してはみられるが、紫外線照射 DNA に対しては親和性の増加は認められなかったことから、ATM 蛋白質は2重鎖 DNA の切断を特異的に認識していることが示された。ATM と DNA-PK との相互作用を免疫沈降法を用いて調べた結果、非常に弱いながら両蛋白質間の相互作用が確認された。しかしながら、DNA-PK を除去した細胞抽出液に含まれる ATM 蛋白質でも損傷 DNA に対し効率的に会合することから、ATM 蛋白質の損傷 DNA への親和性に DNA-PK は関与していないことが明らかにされた。

【p53 蛋白質の活性化における情報伝達経路のクロストーク】

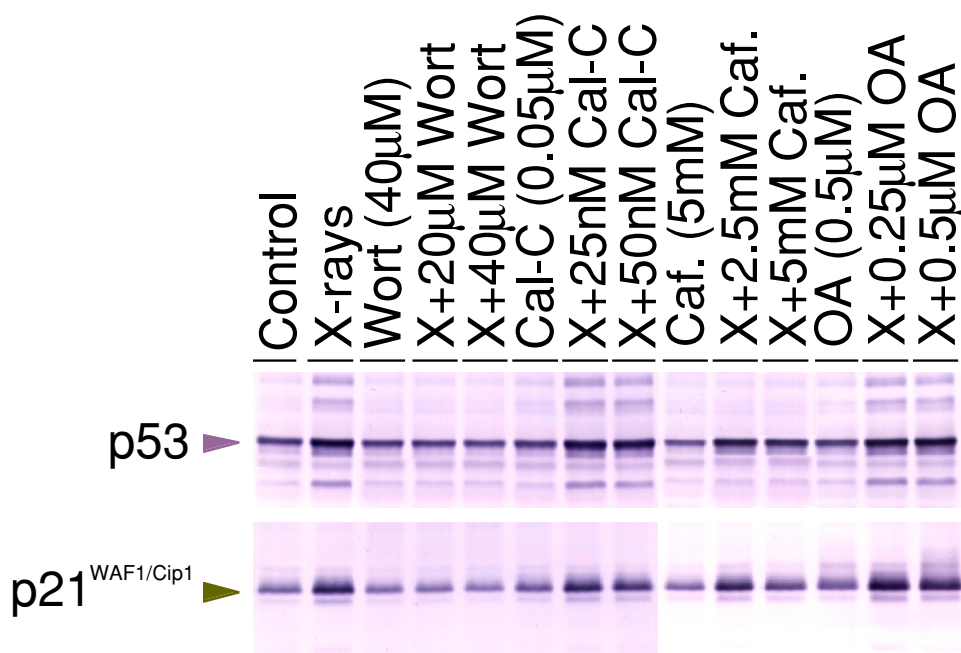


図7 放射線ストレスによる p53 蛋白質活性化に及ぼす各種阻害剤の効果

ATM 蛋白質による放射線ストレス受容情報は細胞内情報伝達経路の活性化により p53 蛋白質へと伝達される。そこで、p53 蛋白質の活性化に関与する情報伝達経路を特定するため、各種リン酸化酵素阻害剤を用いて、放射線ストレス後の p53 蛋白質の活性化に対する影響を調べた(図7)。また同時に活性化された p53 蛋白質により誘導される p21^{WAF1/CIP1} 蛋白質の発現に対する影響も調べた。その結果、wortmannin (Wort) により放射線ストレスによる p53 蛋白質の増加がほぼ完全に抑制されることが明らかになった。さらに、p53 蛋白質下

流の p21^{WAF1/CIP1} 蛋白質の誘導も抑制されることから、wortmannin 処理が ATM 蛋白質から p53 蛋白質への情報伝達を完全に遮断していることが示された。これに対し、calphostine C (Cal-C) や caffeine (Caf.) あるいはオカダ酸 (OA) は様々な濃度の処理を試みたが、caffeine を除いてその効果は認められなかった。Caffeine の場合は低濃度ではなんら影響は見られなかったが、高濃度の処理では p53 蛋白質の増加に対し抑制的に働くことが示された。

Wortmannin の抑制効果の標的である情報伝達経路を特定するため、制限酵素を細胞へ導入し DNA 切断のみが起こす p53 蛋白質の活性化を wortmannin が抑制するかどうか検討した (図 8)。その結果、まず細胞膜に微細な孔を開ける Streptolysin O (St-O) 処理単独では p53 蛋白質のレベルになんの影響も及ぼさないが、制限酵素 Pvu II の存在下では放射線ストレスによるのと同じ様な活性化を確認した。そのさい wortmannin を処理しておく、p53 蛋白質の増加が抑制され、また下流の p21^{WAF1/CIP1} 蛋白質の誘導も抑制された。

放射線ストレスによる細胞膜からの情報伝達の可能性を明らかにするため、細胞膜中に存在する糖脂質の合成を抑制することにより p53 蛋白質の活性化に変化が起きるのかどうか検討した。糖脂質の合成抑制はセラミドグリコシルトランスフェラーゼの阻害剤である DL-threo-PDMP (40~80 μM) を処理することにより行った。PDMP 処理後、糖脂質の 1 つである GM3 に対する抗体を用い細胞膜表面の GM3 量の変化を調べたところ、PDMP 処理前に比べ GM3 量は 10 分の 1 以下に減少することが確認できた。そこで、40~80 μM の PDMP を処理した後放射線ストレスによる p53 蛋白質の活性化の変化を調べた (図 9)。その結果、X線照射による p53 蛋白質の活性化が 40%程度抑制されることがわかった。しかしながら、下流の p21^{WAF1/CIP1} の誘導には顕著な影響は確認できなかった。

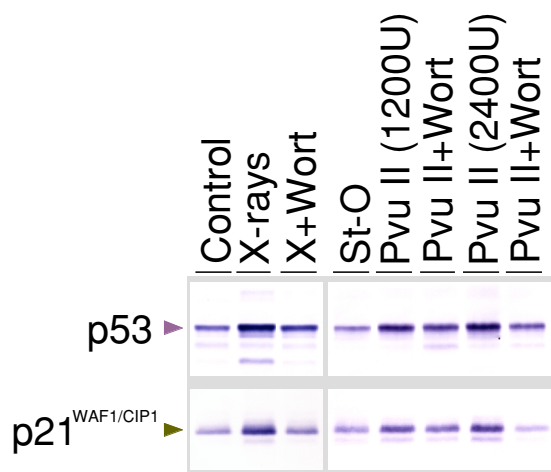


図 8 制限酵素処理による p53 蛋白質の活性化と wortmannin 処理による抑制

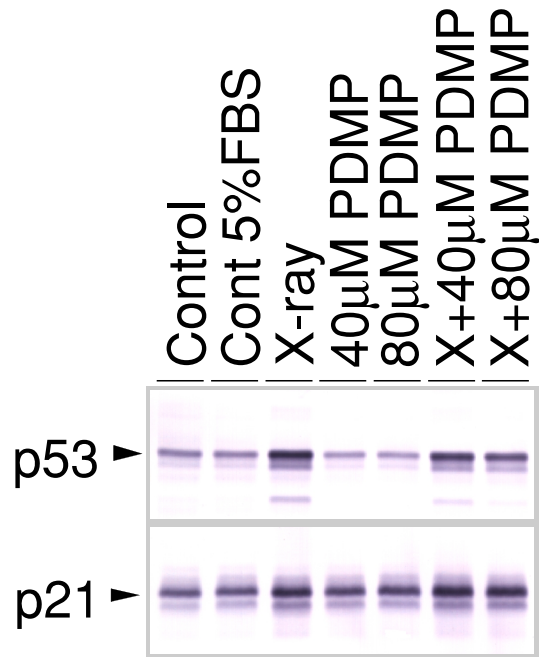
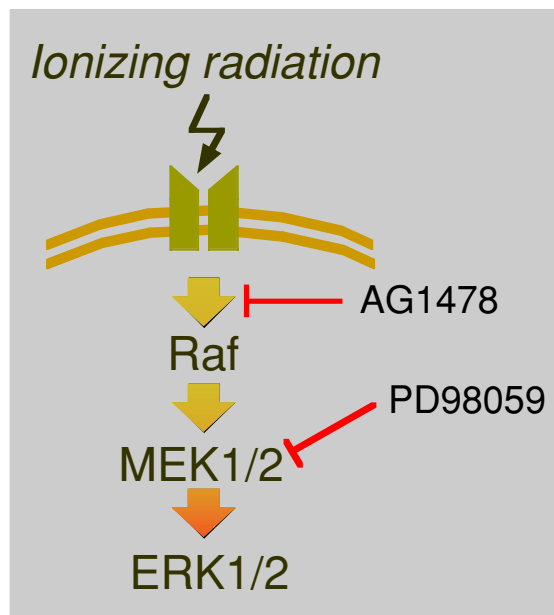


図9 PDMP 処理による p53 活性化の抑制

放射線ストレスによる MAP キナーゼの活性化が p53 蛋白質の活性化に影響を及ぼしているかどうか明らかにするため、MAP キナーゼ経路に対する阻害剤を用いて p53 蛋白質の活性化の変化を検討した。図 10 に示すように、MAP キナーゼ経路は一連のカスケードをなしている。まず、細胞膜に存在する増殖因子から細胞内の因子へと情報が伝達され、さらにいくつかの因子を介して ERK1/2 のリン酸化が起こる。



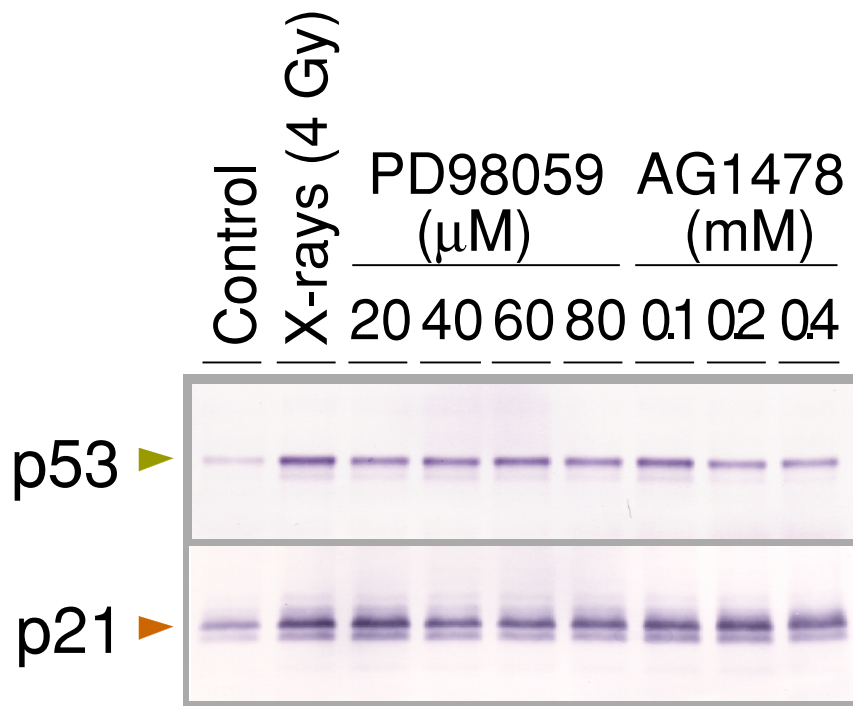


図 11 MAP キナーゼカスケードの阻害剤による p53 蛋白質活性化の抑制

そこで、細胞膜に存在する増殖因子の中で、MAP キナーゼの活性化に中心的な役割を果たしていると言われる Epidermal growth factor receptor (EGFR) を標的とする阻害剤、AG1478、および ERK1/2 の上流に位置して ERK1/2 のリン酸化をつかさどる MEK1/2 の阻害剤、PD98059 を用いた。その結果図 11 に示すように、2つの阻害剤ともに放射線ストレスによる p53 蛋白質の活性化に対し抑制的な効果を示した。また、p21^{WAF1/CIP1} の誘導に対しても阻害効果を示した。しかしながら、いずれの阻害効果も完全ではなく、p53 蛋白質の活性化は最大で 40%程度抑制されるに過ぎなかった。

【ストレス応答遺伝子発現における情報伝達経路のクロストーク】

様々なストレスによる p53 蛋白質の活性化は、p53 応答配列をもつ数多くの遺伝子の転写を誘導する。p21^{Waf1/Cip1} はそのような遺伝子の1つであるが、p21^{Waf1/Cip1} の誘導に p53 蛋白質以外の因子が関与している可能性が示された。図 12 に示すように、Staurosporine (STP) 処理が p53 蛋白質の増加を抑制せずに p21^{WAF1/CIP1} の誘導を抑制したのである。そこで、STP によって抑制されている p53 蛋白質以外の因子を同定するため、放射線により誘導される蛋白質で STP 処理によりその誘導が抑制される蛋白質を検索した。その結果、Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) の放射線照射による誘導が STP 処理により抑制されることを見いだした(図 12)。以上の結果から、p21^{WAF1/CIP1} の誘導には、活性化された p53 蛋白質と誘導された IRF-1 蛋白質の間のクロストークが必要であることが示唆された。

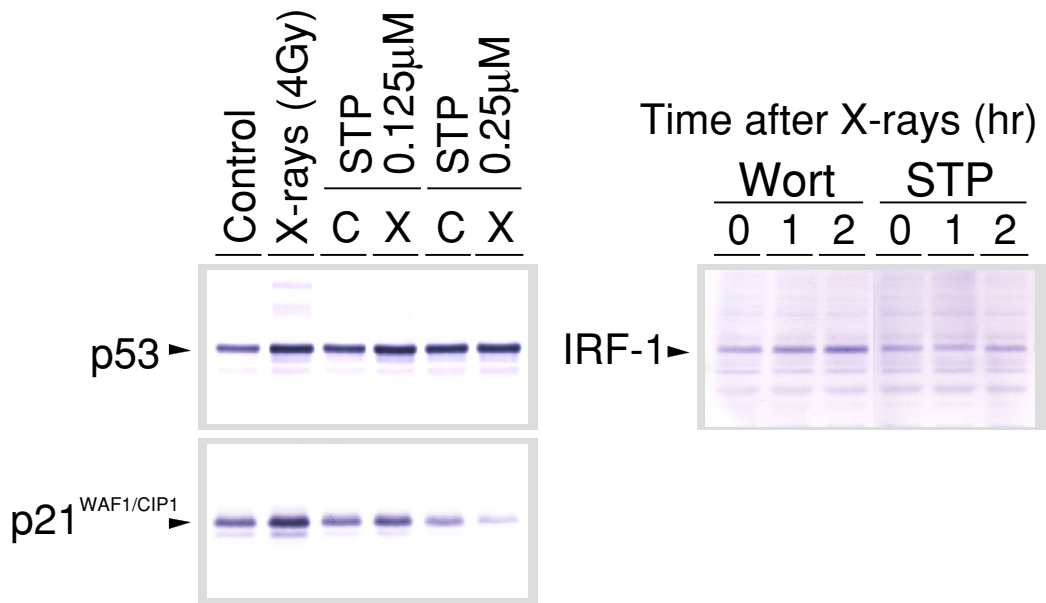


図 12 STP 処理による IRF-1 誘導の抑制

【ATM 蛋白質による多重情報伝達】

放射線ストレスによって生じた DNA 切断を認識して活性化した ATM 蛋白質が、p53 蛋白質以外の因子に情報を伝達している可能性について検討した。その結果、p53 蛋白質以外にも多くの蛋白質が ATM 蛋白質の標的になりうるということが明らかにされた。

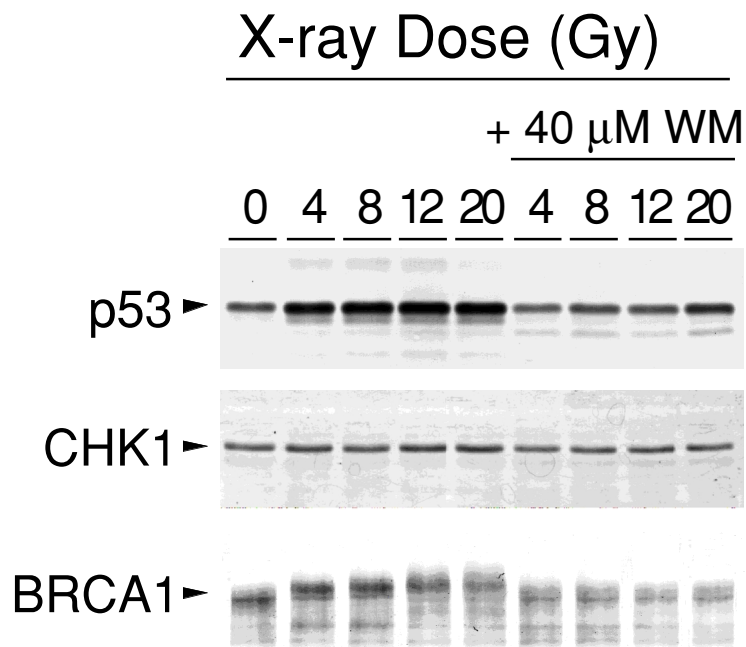


図 13 放射線ストレスによる各種蛋白質のリン酸化

我々は、その中に DNA 損傷修復に関与する新たな蛋白質が標的として含まれていことを発見した。BRCA1 蛋白質は遺伝性の乳癌家系において変異していることから同定された癌抑制遺伝子産物であるが、図 13 に示すように、放射線ストレスの後にリン酸化されることが SDS-PAGE 分析における移動度の変化から明らかになってきた。さらに、BRCA1 蛋白質のリン酸化が wortmannin によって阻害されることから、BRCA1 蛋白質が ATM 蛋白質の新たな標的ではないかと予想した。そこで、AT 細胞において放射線ストレスによる BRCA1 蛋白質のリン酸化を調べたところ、調べたかぎりの全ての線量で BRCA1 蛋白質のリン酸化は確認されなかった。一方、CHK1 蛋白質は G2/M 制御に関わるとして同定された蛋白質であるが、放射線ストレスによる CHK1 蛋白質の移動度の変化は全く観察されず、CHK1 蛋白質は ATM 蛋白質の標的ではないことがわかった。

BRCA1 蛋白質は放射線ストレスによって核内での局在性が変化し、斑点状の構造を示す (BRCA1 フォーカス形成)。そこで、放射線ストレスによる BRCA1 蛋白質のリン酸化が BRCA1 蛋白質の局在性変化に関与しているのかどうか検討した。その結果、BRCA1 蛋白質のフォーカス形成が wortmannin 処理により完全に阻害されることがわかった (図 14)。さらに、BRCA1 局在化の消失に伴って、BRCA1 蛋白質に会合する DNA 2 重鎖切断修復関連蛋白質である RAD50 蛋白質のフォーカス形成も消失することを見いだした。しかも、DNA 2 重鎖切断の組換え修復に関与する RAD51 蛋白質放射線ストレス後にフォーカスを形成するが、そのフォーカス形成も阻害されることを発見した。

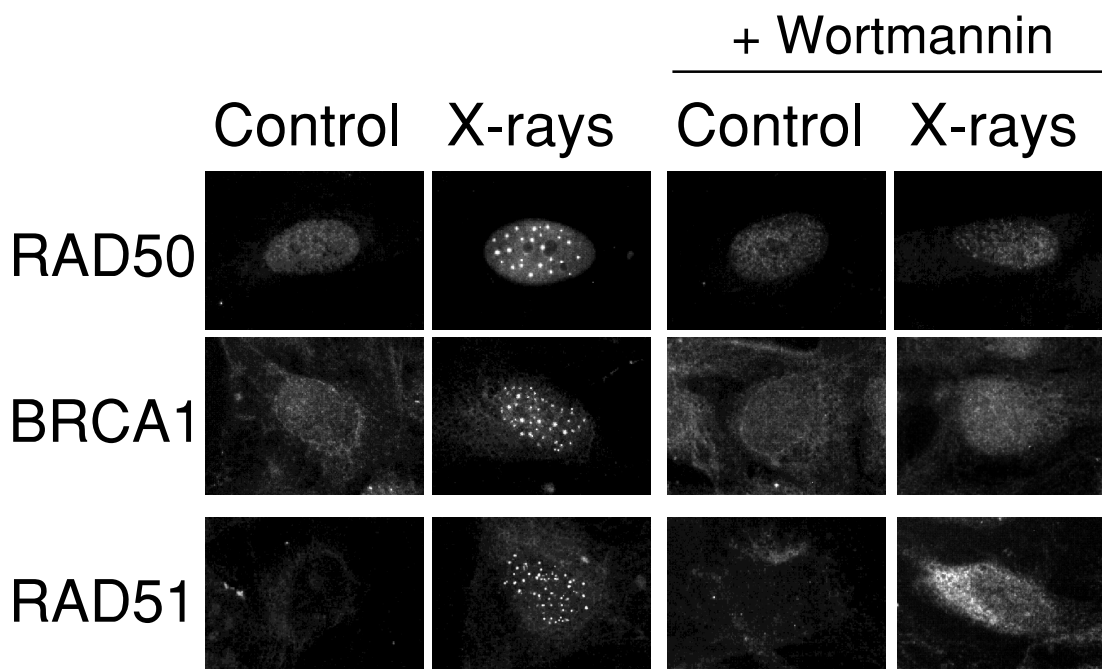


図 14 Wortmannin 処理による BRCA1/RAD50/RAD51 フォーカスの消失

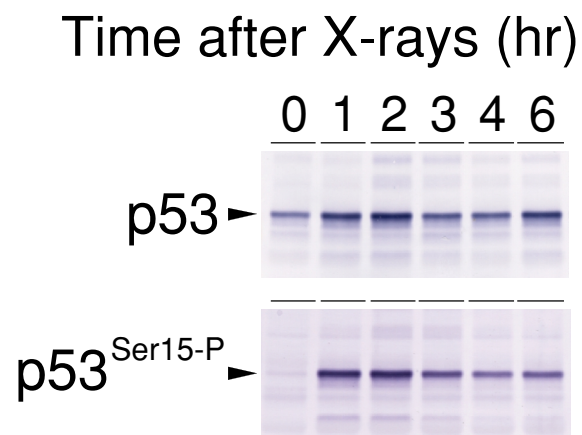


図 15 放射線ストレスによる p53 Ser15 のリン酸化

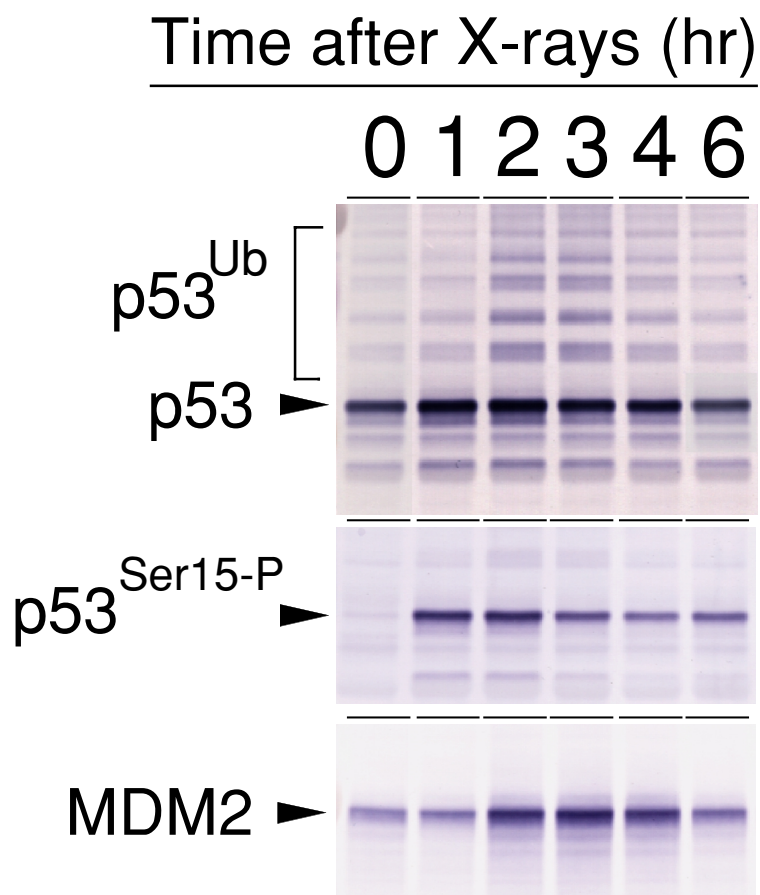


図 16 p53 蛋白質のユビキチン化と Ser15 のリン酸化

9-3. p53 蛋白質部位特異的リン酸化とその意義

放射線ストレス後に活性化された ATM 蛋白質は p53 蛋白質の情報を伝達するが、この情報伝達が p53 蛋白質の特定部位のリン酸化によってなされていることが明らかになった。正常ヒト p53 蛋白質は 15 番目のアミノ酸にセリンを持っているが (Ser15)、この Ser15 がリン酸化された p53 蛋白質のみを特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた検討から、この部位が ATM 機能依存的にリン酸化されることが明らかになった (図 15)。さらに、Ser15 のリン酸化が照射後極めて早い時期から起こっていること、p53 蛋白質の活性化に異常がある AT 細胞では Ser15 のリン酸化にも異常があることなどから、Ser15 のリン酸化は p53 蛋白質の活性化に重要な役割を果たしているのではないかと考えられた。そこで、Ser15 のリン酸化役割についてさらに検討をすすめた。図 16 に示したように p53 蛋白質は放射線ストレス後増加するが、その際ユビキチン化されたバンドが多数出現した。p53 蛋白質のユビキチン化は p53 蛋白質によって誘導される MDM2 蛋白質の発現に対応しており、核内で p53 蛋白質と MDM2 蛋白質が会合することによりその反応が進む。Ser15 のリン酸化は p53 蛋白質がユビキチン化されている間にも観察されることから、p53 蛋白質と MDM2 蛋白質の会合の制御には直接関与せず、ユビキチン化された p53 蛋白質の分解抑制に関与することが示唆された。

9-4. ストレスによる細胞増殖抑制・排除の分子メカニズム

【各種ストレスによる細胞増殖抑制・排除誘導メカニズムの多様性】

環境中に存在する代表的なストレスである放射線ストレス、紫外線ストレスおよび温熱ストレスは、それぞれが異なった様式で p53 蛋白質を活性化する (図 2 参照)。そこで、p53 蛋白質活性化の結果どのようなストレス応答反応が細胞発現されるかを調べた。その結果、紫外線ストレスの場合は照射 12 時間前後で分裂した細胞質や微細な繊維状の細胞形態、いわゆる典型的なアポトーシスを起こした細胞の形態、を示す細胞が出現した。そこで、アポトーシスの代表的な指標である DNA のラダー状の分解について検討したところ、照射 12 時間で顕著な DNA ラダーの出現が確認された (図 17)。また、温熱ストレスの場合は典型的なアポトーシス状の細胞形態変化はほとんど観察されず、そのかわり処理後 24 時間以降で分裂異常を示す多核の細胞 (Fragmental nuclei; F.Nuc) や異常な中心体形成 (Tri-centrosome; T.Cen) などが観察された (図 18)。

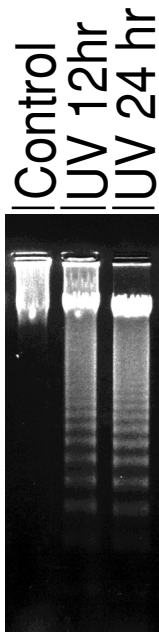


図 17 紫外線ストレスによる DNA ラダー

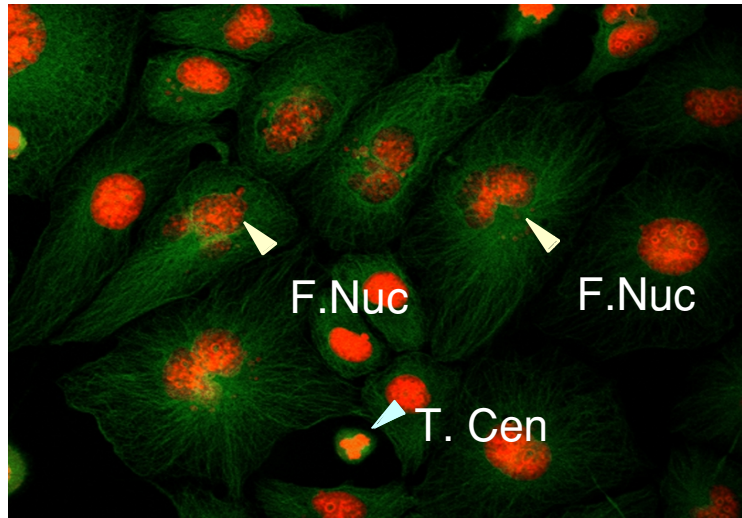


図 18 温熱ストレスによる多核細胞の出現



図 19 放射線ストレスによる SA-β-gal の誘導

一方放射線ストレスの場合には、アポトーシスや分裂異常による増殖停止を示すような細胞は全く出現せず、これら従来知られている細胞増殖抑制・排除機構とは異なるメカニズムが働いていることが予想された。我々はそれが不規則の細胞老化誘導メカニズムであることを突き止めた。図 19 に示すように、放射線ストレスにより細胞増殖を制御された細胞において老化マーカーである SA-β-gal が発現していたのである。

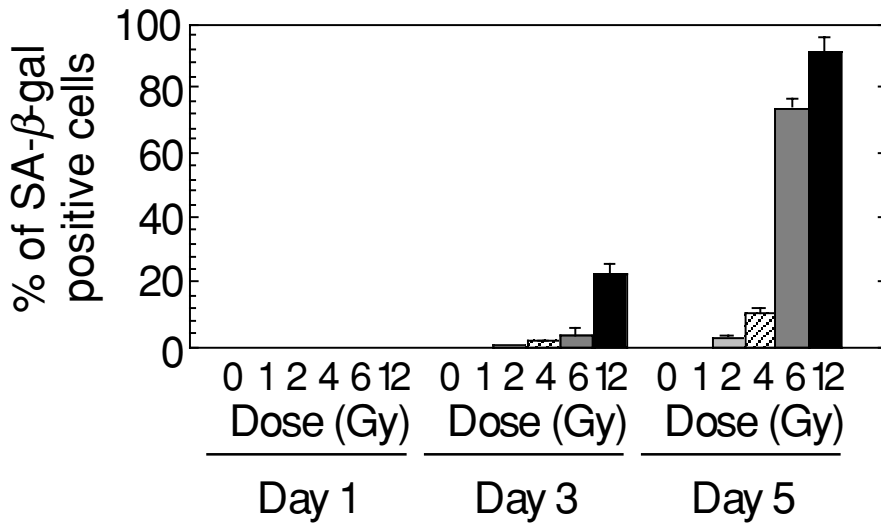


図 20 SA-β-gal 発現の線量依存性

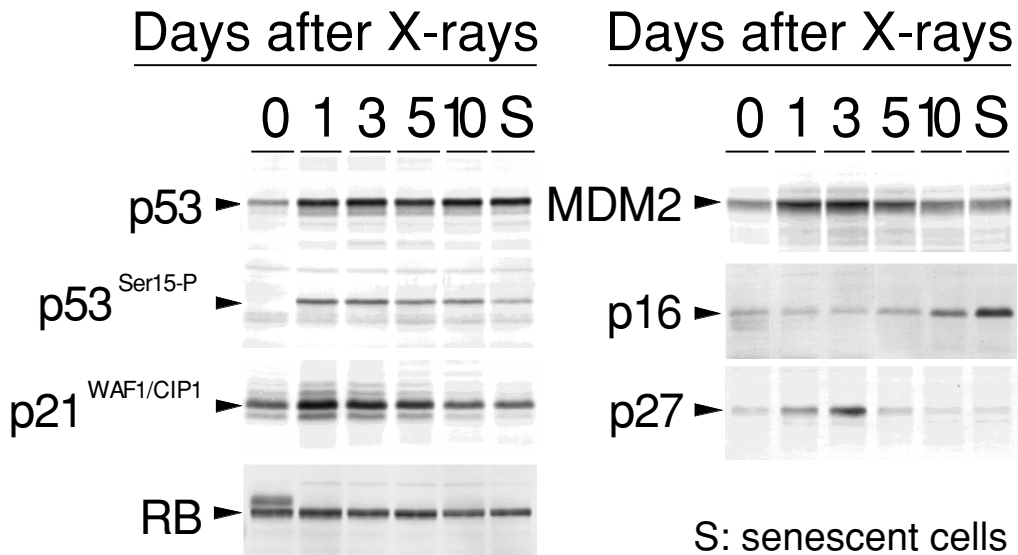


図 21 放射線ストレスによる p53 蛋白質および下流遺伝子発現の恒常的活性化

SA-β-gal の発現は図 20 に示すように放射線ストレスの量およびストレスを受けてからの時間に比例して強くなっていることから、放射線ストレスによる p53 蛋白質の活性化と老化様細胞増殖制御との関連について検討した。その結果、放射線ストレスを受けた細胞において p53 蛋白質の恒常的活性化が認められた (図 21)。また、p53 蛋白質下流遺伝子の発現や Cyclin-dependent kinase inhibitor である p16 の発現など、老化細胞で見られる細胞増殖抑制因子の発現様式と全く同じ蛋白質発現制御が認められた。正常ヒト胎児由来細胞の場合、細胞老化は染色体末端に存在するテロメアの短縮により招来される。そこで、放射線ストレス後に老化様形質を発現した細胞においてテロメアの長さを測定したところ、活発に増殖している細胞と同じ長いテロメアを有していることが明らかになった。

【癌細胞におけるストレス応答能回復と老化様増殖停止】

癌細胞は細胞老化プロセスから逸脱した細胞であるが、多くの癌細胞が p53 機能を欠失していることから、ストレス応答機能の消失と細胞がん化との間に密接な関係があるのではないかと考え検討を加えた。まず p53 機能に依存したストレス応答能の回復が癌細胞にどのような影響を及ぼすかを明らかにするため、正常 p53 遺伝子を欠失しているヒト肺非小細胞癌株 (NCI-H1299) に p53 発現誘導型ベクターを導入した細胞系 (99p53) を樹立した。99p53 細胞は培地中に誘導剤を添加すると図 22 に示すように p53 蛋白質が誘導される。それにともない p53 蛋白質の下流の遺伝子も誘導され、一連のストレス応答能が回復していることがわかる。

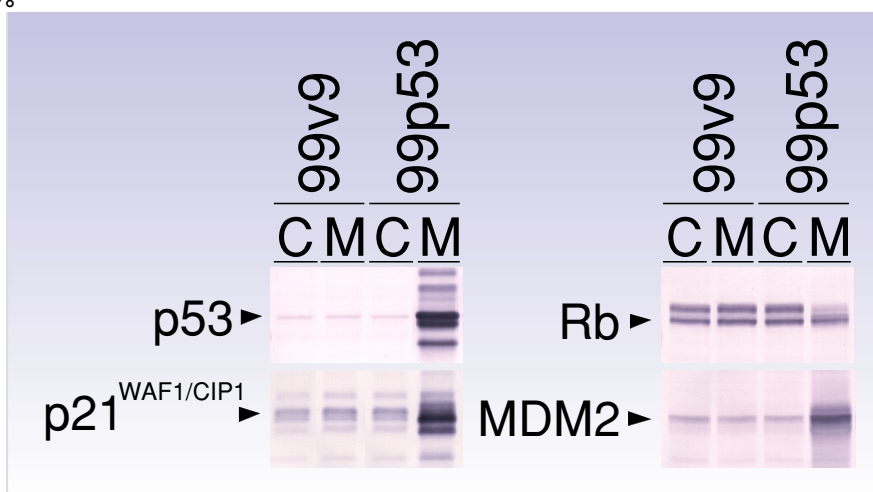


図 22 ムリステロン A 添加にする p53 蛋白質の誘導と下流蛋白質の発現

そこで、p53 蛋白質を誘導した後にどのようなストレス応答反応が細胞に起こるか調べたところ、癌細胞が老化様の形態を示し、さらに SA-β-gal の発現が確認された。そこでさらに放射線ストレスを加えることにより SA-β-gal の発現がどう変化するか検討した。その結果、表 1 に示すように、誘導剤単独でも SA-β-gal の発現が誘導されるが、その頻度は放射線ストレスを加えることにより飛躍的に増加することがわかった。以上の結果から、癌細胞においてストレス応答能を回復させることにより癌細胞に老化様細胞増殖停止が誘導されることが示された。

表 1 p53 蛋白質誘導および放射線ストレスによる SA-β-gal の発現

Cells (treatment)	% of SA-β-galactosidase positive cells		
	0 Gy	10 Gy	20 Gy
99V9 (None)	2.18	2.37	2.12
99p53-1 (-MA)	2.55	2.81	2.02
99p53-1 (+MA)	15.54	35.57	58.92

10. 考察

10-1. 各種ストレスによる p53 蛋白質活性化の多様性

我々生命は環境中に存在する様々なストレスの中で生命活動を行っている。そこで、これら多種多様なストレスに応答する共通の因子が存在するかどうか明らかにすることは、生体のストレス応答を考えるうえでは極めて重要なポイントになる。我々は、環境中に存在する代表的なストレスとして、放射線ストレス、紫外線ストレスおよび温熱ストレスを用い、これら3種のストレスに応答する共通のストレス応答因子が存在するかいなか検討した。その結果、癌抑制遺伝子産物である p53 蛋白質がいずれのストレスに対しても応答することを見いだした(図2)。放射線ストレスは核内の DNA に作用して一重鎖切断や二重鎖切断を引き起こす。一方紫外線ストレスは遺伝子 DNA を構成する塩基に作用して、ピリミジン二量体や(6-4)光産物を生成する。また温熱ストレスは細胞内存在する様々な蛋白質に作用してその高次構造を変化させ蛋白質の変性を引き起こす。これら独自の作用メカニズムを持ち別々の情報伝達経路を活性化するストレスによって p53 蛋白質が活性化されたことは、p53 蛋白質が多くのストレスに対する応答性を有していることを意味する。事実最近の研究では、

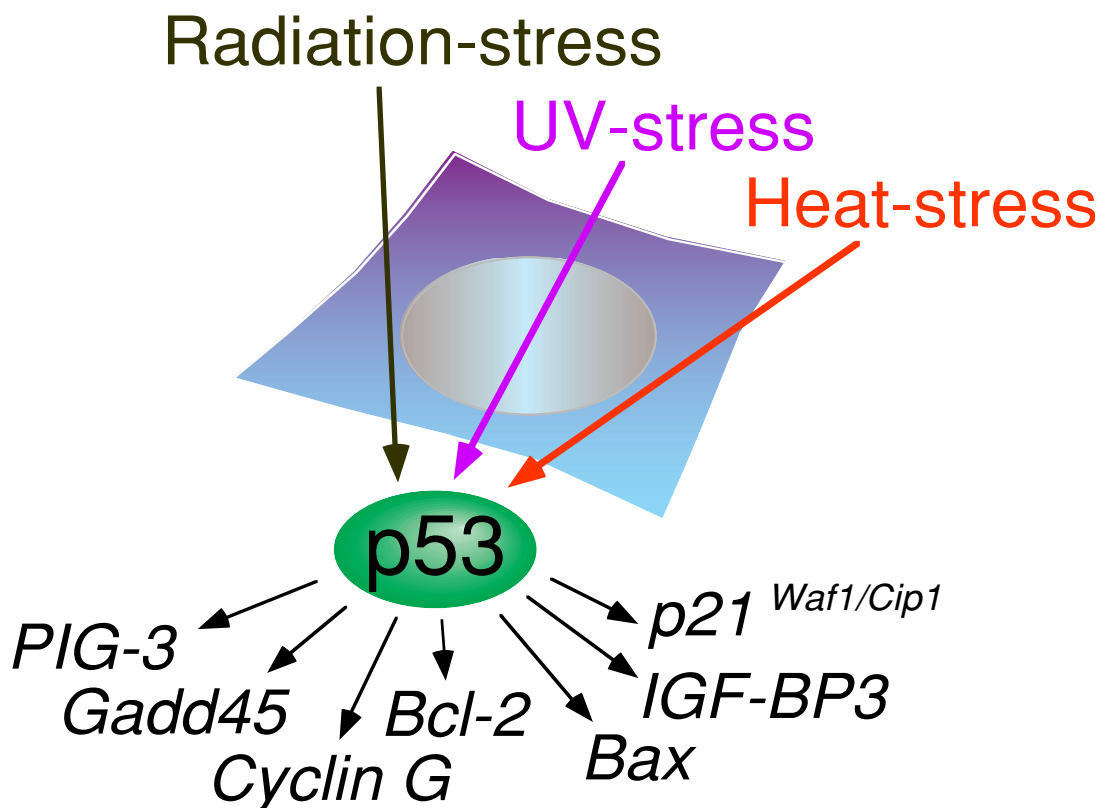


図 23 p53 蛋白質によるストレス情報の集約と下流遺伝子発現の制御

p53 蛋白質はこれらストレスに加えヌクレチドプールの変化やウイルス感染あるいは低酸素環境によっても活性化することが報告され⁶⁾、p53 蛋白質が我々が遭遇する多種多様なあらゆるタイプのストレスに対し応答する普遍的なストレス応答因子である可能性が高い。p53 蛋白質のストレス応答における意味はまだ十分には解明されていないが、p53 蛋白質の機能

の大半は p53 蛋白質結合配列を有する遺伝子の発現制御を介して行われると予想されている⁷⁾。この様なことから、p53 蛋白質の機能は様々なストレスによって活性化し伝達された情報を集約することであり、その情報をさらに様々な遺伝子発現の制御に変換して細胞に多種多様なストレス応答を発現させるというストレス応答の中心的な役割を担うものであると考えることができる(図 23)。

p53 蛋白質のストレス応答の多様性については、別のストレス応答因子である MAP キナーゼの活性化との比較でも明らかになった。MAP キナーゼには 3 つの異なる経路が存在するが⁸⁾、紫外線ストレスが全ての経路を活性化するのに対して、放射線ストレスは ERK1/2 のみを活性化した。この様に、他のストレス応答経路が活性化されない場合でも、p53 蛋白質は普遍的に活性化することがわかった。しかしながら、ストレスのレベルによっては p53 蛋白質が活性化されず他の経路が活性化される場合もあった。図 4 に示すように低レベル放射線ストレスの場合は、p53 蛋白質の活性化が 4 Gy 以上で見られるのに対して、ERK1/2 の活性化は極低レベルの放射線ストレスによっても引き起こされることを確認した。このように、p53 蛋白質はストレスの質やその量によって多様な活性化パターンを示すことが予想された。

さらに興味深いことに、図 2 に示すように放射線、紫外線、温熱、各ストレスによる p53 蛋白質活性化の時間的経緯に明らかな差があった。既に述べたように、この 3 種のストレスは細胞における作用機作が異なる。この様なことから、多種多様なストレスは異なる受容メカニズムによって感知され、異なる情報伝達経路によって伝達され、異なるメカニズムによって p53 蛋白質を活性化するのではないかと考えられる。そこで、次項では放射線ストレスによる p53 蛋白質の受容・伝達の分子メカニズムについて詳細に検討した。

10-2. 放射線ストレスの受容と伝達の分子メカニズム

放射線ストレスは地球創成の時から存在し、現在でもなお低レベルではあるが我々生命に絶えず刺激を与え続けている。この様な放射線ストレスを生命はいかにして受容し、その情報をどのようにして伝達しているのか、その分子メカニズムを明らかにする目的で以下の検討を行った。放射線ストレスは核内で DNA 切断によって受容されると同時に細胞膜の活性化によっても受容されると考え、核内での放射線ストレスの受容メカニズムについて最初に検討した。まず、DNA 切断による放射線ストレス受容の過程を明らかにするために DNA 切断を認識する蛋白質の同定を試みた。その結果、ATM 蛋白質が損傷 DNA 認識蛋白質として特定された(図 6)⁹⁾。約 370kDa の分子量を持つ ATM 蛋白質は、放射線高感受性の遺伝性疾患である Ataxia telangiectasia の原因遺伝子であり、アミノ末端から約 1/3 付近にロイシンジッパー(LZ)構造を持つ¹⁰⁾。LZ 構造は他の LZ 構造を持つ分子と二量体を構成し DNA に結合することが知られているため、類縁蛋白質で同じく LZ 構造を持つ DNA-PK 蛋白質が ATM 蛋白質の損傷 DNA への会合に必要であるか検討した。しかしながら、ATM 蛋白質による DNA 切断の認識は DNA-PK 非存在下でも見られることから、未同定の蛋白質との複合体形成かあるいは自身の二量体形成により DNA 損傷を認識しているのではないかと考えられた。

次に活性化した ATM 蛋白質がどのような経路を介して p53 蛋白質に情報を伝達しているか明らかにするため、リン酸化酵素に対する各種阻害剤を用いて、放射線ストレスによる p53 蛋白質の活性化に及ぼす効果について調べた (図 7)。

その結果、wortmannin、calphostin C、caffeine、Okadaic acid の中で唯一 wortmannin だけが p53 蛋白質の活性化に対して阻害効果を示した。これまで放射線によって活性化される情報伝達経路としては PKC、NF- κ B、Abl、MAP キナーゼ、PI-3 キナーゼなどが報告されているが、calphostin C に効果が見られなかったことから放射線ストレスによる p53 蛋白質の活性化に PKC は関与していないことが明らかになった。制限酵素の導入により DNA の切断のみを起こした場合にも wortmannin は p53 蛋白質の活性化を阻害することから、wortmannin に感受性の情報伝達経路は核内に存在する経路であることが予想された。最近、ATM 蛋白質に蛋白質リン酸化活性が存在すること¹¹⁾、ATM 蛋白質が in vitro で p53 蛋白質をリン酸化すること^{12、13)}、ATM 蛋白質が wortmannin に感受性の核内蛋白質である DNA-PK の類縁蛋白質であることが明らかにされた¹⁴⁾。この様なことから、核内における放射線ストレスの受容は DNA の切断を介して ATM 蛋白質によって行われ、その情報の伝達は活性化した ATM 蛋白質による p53 蛋白質のリン酸化活性によって行われていることが明らかにされた。

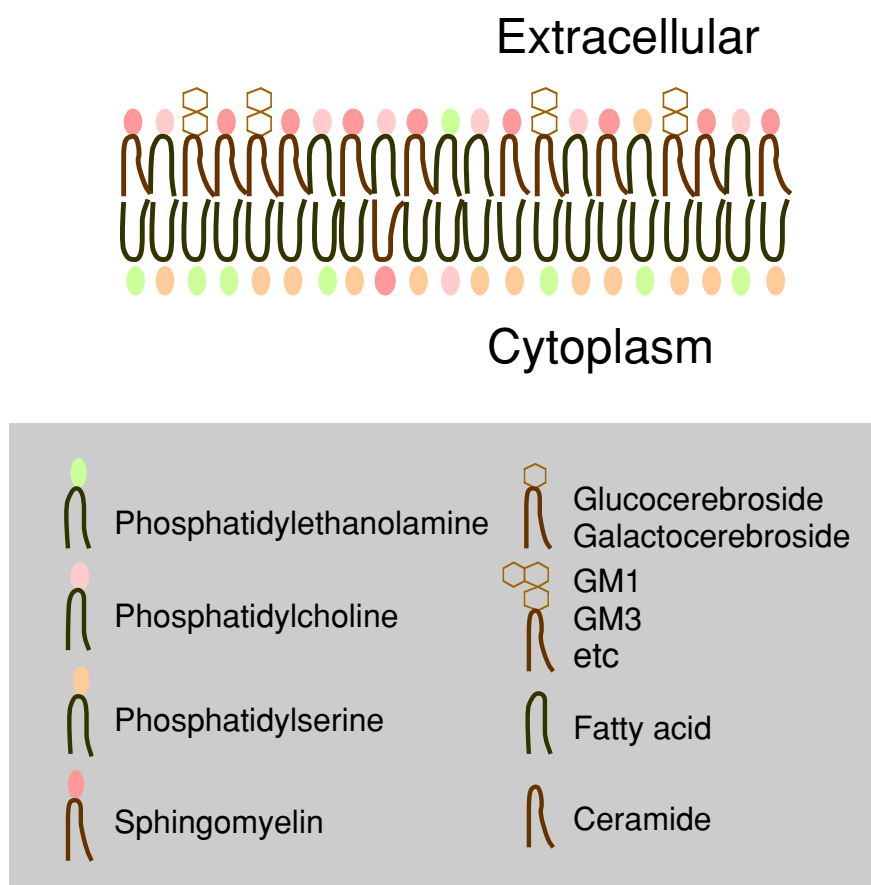


図 24 細胞膜構成成分とその分布

一方、細胞膜における放射線ストレスの受容に糖脂質が関与している可能性を見いだした。図 24 に示すように、細胞膜は様々な構成要素から成り立っているが、細胞膜外側には糖脂質やスミンゴミエリンが特異的に分布し、これら分子が放射線ストレスの受容になんらかの役割を果たしているのではないかと予想した。そこで、まず糖脂質代謝に作用する阻害剤を用いて、放射線ストレスによる p53 蛋白質の活性化に変化が観察されるかどうか検討した。

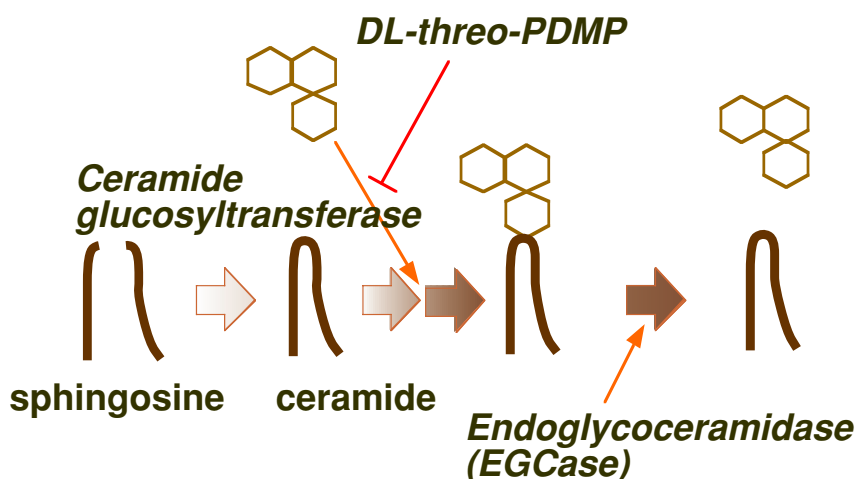


図 25 糖脂質合成と分解経路および阻害剤の作用点

図 25 に示すように、糖脂質の代謝にはセラミドに糖鎖を結合する重要な過程があるが、用いた阻害剤、DL-threo-PDMP はこの過程をつかさどる酵素であるセラミドグルコシルトランスフェラーゼを特異的に阻害する。その結果、細胞膜表面の糖脂質は代謝され続け存在量が減少すると予想される。そこで、糖脂質の 1 種である GM3 を指標に阻害剤の効果を調べたところ、処理後 GM3 シグナルの顕著な減少が認められた。そこで、放射線ストレス応答に対する効果を調べたところ、阻害剤効果により p53 蛋白質の活性化が抑制されることがわかった（図 9）。以上の結果より、細胞膜外側に存在する糖脂質が放射線ストレスの受容体として機能している可能性が高まった。それでは、糖脂質によって受容された情報はどのようなメカニズムで伝達されているのであろうか？我々は 2 つの可能性について考察した。1 つは、放射線ストレスを受容した糖脂質が代謝され、遊離したセラミドが細胞内に情報を伝達するメカニズムであり、もう 1 つは活性化した糖脂質が細胞膜の構造を変化させ、結果として細胞膜に存在するなんらかの受容体を活性化する可能性である。図 25 に示したように、糖脂質は EGCase によって代謝され糖鎖とセラミドに分解されている。そこで、細胞に EGCase を作用させセラミドの遊離を促進させたときにどのような変化が起きるか調べた。その結果、若干ではあるが p53 蛋白質のレベルが上昇した。一方、糖脂質の活性化にともない活性化する受容体として増殖因子受容体の 1 つである EGFR に着目した。また、EGFR の活性化にともない活性化される情報伝達経路である MAP キナーゼが p53 蛋白質の活性化に関与するかどうかを各種阻害剤を用いて検討した。用いた阻害剤は EGFR のリン酸化活性を阻害する

AG1478 と ERK1/2 上流の MEK1/2 を阻害する PD98059 である。結果は図 11 に示したが、いずれの阻害剤も p53 蛋白質の活性化を抑制することがわかった。以上の結果から、放射線ストレスの細胞膜での受容には細胞膜外側に分布する糖脂質が関与することが示された。さらに、活性化された糖脂質からの情報伝達にはセラミドの遊離あるいは細胞膜中に存在する EGFR の活性化が関与する可能性が明らかにされた。

以上のように、放射線ストレスは核および細胞膜で同時に受容されていることがわかったが、興味深いことに図 9 および 10 に示した結果はともにその阻害効果が完全ではないことを示していた。この事実は、放射線ストレス応答では、細胞膜あるいは核からの情報が共に伝達されていることを意味する（図 26）。放射線照射後の wortmannin の抑制効果が完全であるのは、wortmannin が細胞膜および核からの情報伝達を共に抑制するからで、従って核からの情報伝達あるいは細胞膜からの情報伝達、いずれかを抑制しただけでは p53 蛋白質の活性化は完全には抑制できないのであろう。これまでの研究では、p53 蛋白質の活性化に必要な量的閾値が存在することが予想されている。したがって、核からの情報と細胞膜からの情報が共に存在することによって初めて p53 機能の発現に必要な十分な量的増加が得られるのではないだろうか。

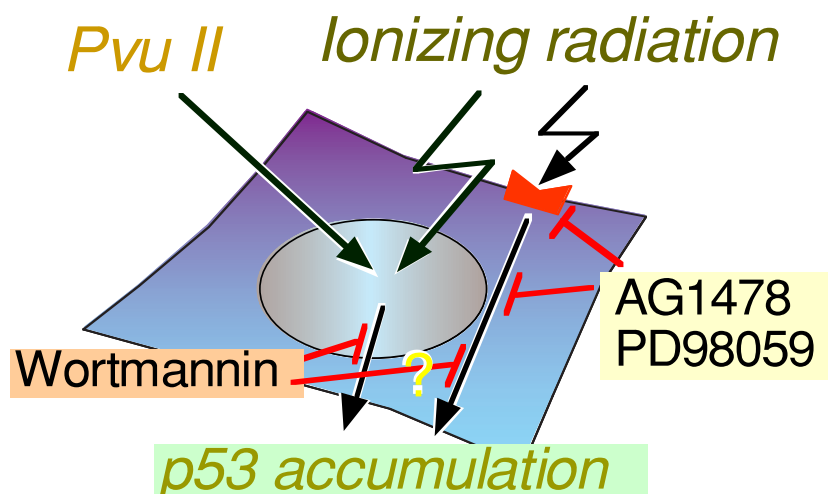


図 26 核および細胞膜からの複合情報伝達による p53 蛋白質の活性化

この結果はまた、複数の p53 蛋白質活性化メカニズムがその活性化に必要であるとも解釈できる。最近、p53 蛋白質に伝達された情報が p53 蛋白質のどのアミノ酸残基のリン酸化を引き起こすかが明らかになってきた¹⁵⁻¹⁷⁾（図 27）。例えば ATM 蛋白質は主に 15 番目のセリンをリン酸化し、p53 蛋白質を安定化する^{18、19)}。ERK1/2 のリン酸化については p53 蛋白質のアミノ酸配列の検討からは該当する部位がないと報告されているが、最近 JNK が 91-115 の領域をリン酸化するのではないかとの報告がなされている²⁰⁾。この様に、核および細胞膜から伝達された情報はそれぞれが p53 蛋白質上の別々の部位をリン酸化することによって p53 蛋白質の活性化に協同的に関与している（クロストークしている）ことが示唆された。このような複数経路の間のクロストークは p53 蛋白質による下流遺伝子の発現誘導の際にも見られた。

- p53 protein

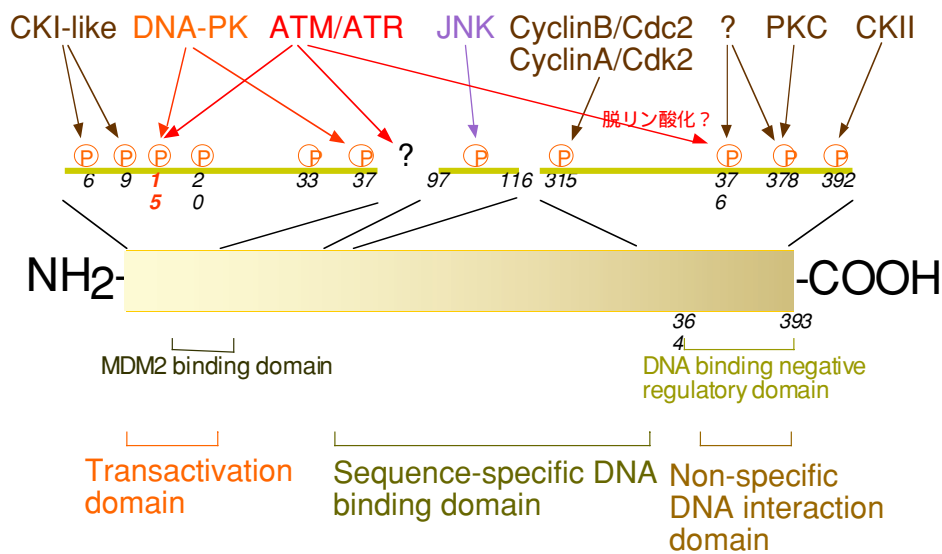
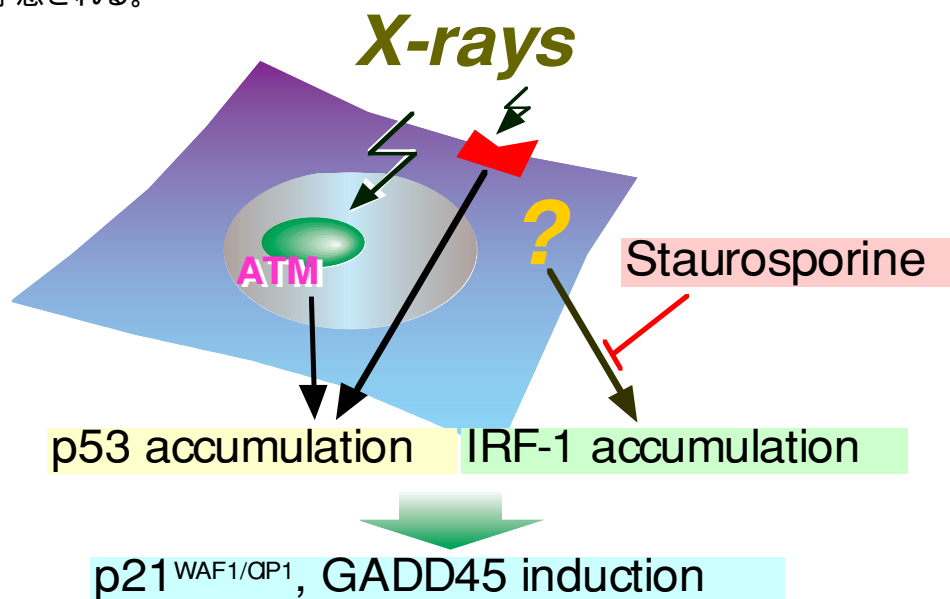


図 27 p53 蛋白質のリン酸化部位

p21^{Waf1/Cip1} 遺伝子は、p53 蛋白質によって誘導される代表的な遺伝子であるが、蛋白質リン酸化酵素の阻害剤である staurosporine が p53 蛋白質の活性化には影響を及ぼさないのにも関わらず p21^{WAF1/CIP1} の誘導を抑制したのである (図 12)。この結果は p21^{Waf1/Cip1} 遺伝子の誘導に p53 蛋白質以外の因子が関与していることを示すものであった。解析の結果、その因子が IRF-1 であることがわかった。Staurosporine は IRF-1 の誘導を阻害することによって p21^{Waf1/Cip1} 遺伝子の誘導を抑制していたのである (図 28)。以上のように、ストレス応答反応においては複数の情報伝達経路間に普遍的にクロストークが存在する可能性が示されたが、これは我々生命が経験するような複合的なストレスに対する応答の基本的なメカニズムではないかと予想される。



核におけるストレス応答反応において重要な役割を担っている ATM 蛋白質が p53 蛋白質以外の因子を標的としているかについて検討したところ、家族性乳癌の原因遺伝子である BRCA1 蛋白質が標的分子の1つであることがわかった²¹⁾。BRCA1 蛋白質は核内に存在するリン酸化蛋白質であるが、放射線ストレスの後高度にリン酸化することが明らかになった(図 13)。しかも、このリン酸化が wortmannin によって抑制されることから、ATM 蛋白質からの情報が BRCA1 蛋白質にも伝達されているのではないかと考えた。そこで ATM 機能を欠損している AT 細胞での BRCA1 蛋白質のリン酸化を検討したところ、放射線ストレスによるリン酸化が全く認められなかった。このようなことから、BRCA1 蛋白質が ATM 蛋白質の新たな標的であることが明らかにされた。BRCA1 蛋白質が放射線ストレスによる DNA 二重鎖切断修復に関与する RAD50/MRE11/p95(NBS1)複合体に会合することが最近示された²²⁾。RAD50/MRE11/p95(NBS1)複合体はエキソヌクレアーゼ活性を有し、放射線ストレスでできた DNA 切断末端のクリーニングに働いているのではないかと予想されている²³⁾。RAD50/MRE11/p95(NBS1)複合体は放射線ストレスの後斑点状の存在形態を示すことから²⁴⁾、放射線ストレス後の BRCA1 蛋白質の局在性変化を調べた(図 14)。その結果、RAD50 と同様の斑点状の存在形態を示すことが明らかになった。また、RAD50 あるいは BRCA1 蛋白質の局在性変化が wortmannin によって阻害されることも明らかになった。さらに、wortmannin の処理が RAD51 の局在化をも阻害することが示された(図 14)。RAD51 は RAD52/54/55/57 とともに相同組換えに関与する修復関連蛋白質である²⁵⁾。このようなことから、ATM 蛋白質は BRCA1 蛋白質に情報を送り、そのリン酸化を介して局在性変化を制御することによって DNA 切断修復過程をも制御しているのではないかと考えられた。

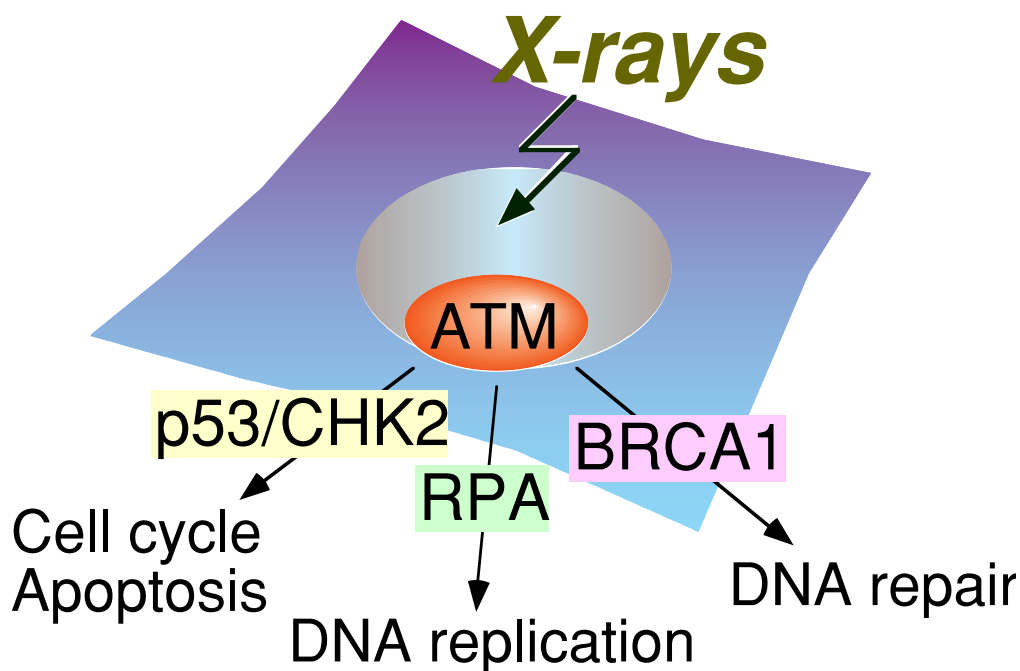


図 29 ATM 蛋白質の標的蛋白質とその機能

現在までに ATM 蛋白質の標的は複数同定され (図 29)、すでに述べたように p53 蛋白質はストレス応答蛋白質として様々な遺伝子の発現を制御して G1/S 期での細胞周期停止やアポトーシスを細胞に引き起こす。CHK2/CDS1 は p53 と同様に細胞周期制御を引き起こすが、CHK2/CDS1 の標的は G2/M 期での細胞周期進行に關与する CDC2 を活性化する CDC25C の抑制で、G2/M 期での細胞周期停止を引き起こす²⁶⁾。Replication protein A (RPA) は DNA 複製に關与する因子で、一重鎖 DNA に結合する。これまでに RPA の機能がリン酸化により抑制されることが報告されているが、この結論については議論も多い²⁷⁾。BRCA1 蛋白質は DNA 二重鎖切断修復關連酵素であり、リン酸化を受けることにより局在性を変化させ DNA 修復過程の最初のプロセスを制御すると考えられる。このように ATM 蛋白質の機能は多岐にわたることから、p53 蛋白質を介したストレス応答以外にも ATM 機能によって制御されているストレス応答経路が存在する可能性も示唆される。

10-3. p53 蛋白質部位特異的リン酸化とその意義

放射線ストレスを受容した ATM 蛋白質は、自己の持つリン酸化活性により p53 蛋白質をリン酸化することにより情報を伝達するが、我々はそのリン酸化が p53 蛋白質の特定の部位で起こること、またそのリン酸化が p53 蛋白質の活性化にどのように関わっているのかを明らかにした。これまでも p53 蛋白質はストレスによって N 末端がリン酸化されることが報告されていたが²⁸⁾、N 末から 15 番目のセリンがリン酸化された p53 蛋白質を特異的に認識する抗体を用いた実験から、この 15 番目のセリン (Ser15) が放射線ストレスにより速やかにリン酸化されることを確認した。Ser15 のリン酸化が ATM 蛋白質によって引き起こされることは *in vitro* の実験から明らかにされたが^{12, 13)}、その意義については明らかではない。これまでに示された 1 つの可能性は Ser15 のリン酸化が p53 蛋白質と MDM2 蛋白質との相互作用を阻害するというものであった^{18, 19)}。正常ヒト細胞では p53 蛋白質の量は極めて低い状態に抑えられているが、これは新しく合成され核に移行した p53 蛋白質が次々に分解されているからである。図 30 に示したように、細胞質で合成された p53 蛋白質は核内に移行するやいなや MDM2 蛋白質によって認識され、p53-MDM2 複合体が形成される。MDM2 蛋白質はユビキチン結合酵素として機能し^{29, 30)}、MDM2 と複合体を形成した p53 蛋白質はたちどころにユビキチン化される (図 16 参照)。また同時に、MDM2 蛋白質には核移出シグナル (Nuclear export signal: NES) が存在し、これによって p53-MDM2 複合体は核から細胞質へと移行する。ここでユビキチン化された p53 蛋白質は蛋白質分解酵素複合体であるプロテアソームに認識されることによりたちどころに分解され、この様にして普段の p53 蛋白質は低いレベルに保たれている。放射線などストレスが細胞に加わったときは、p53 蛋白質の特定部位がリン酸化を受け、それによって MDM2 蛋白質との複合体形成が阻害されて p53 蛋白質は分解されなくなると考えられていた。しかしながら、我々の結果はこの考えを修正する必要があることを示していた。図 16 に示すように、Ser15 がリン酸化されているにもかかわらず p53 蛋白質は高度にユビキチン化されていたのである。プロテアソームの阻害剤である ALLN を処理した実験でも、未処理細胞で見られたユビキチン化の程度と放射線照射後の程度には全く差はなかった。

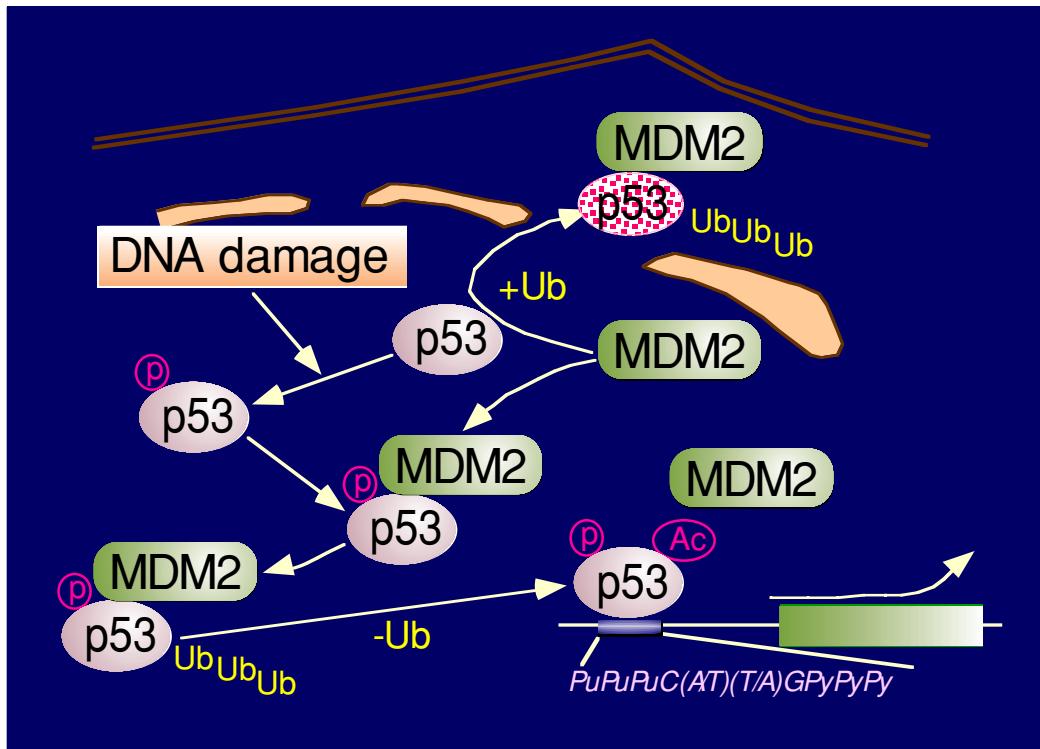


図 30 p53-MDM2 複合体形成と p53 蛋白質の分解

この様なことから、新しい考え方として図 30 を提唱した。すなわち、Ser15 のリン酸化は p53-MDM2 複合体形成には直接影響を及ぼさないが、複合体がプロテアソームに認識されるのを防いでいるという考えである。この様にして分解を免れた p53 蛋白質は、更なる修飾、例えば C 末端部位のリン酸化やアセチル化、によって転写活性化因子として活性化し様々な遺伝子の転写を制御するようになるのではないだろうか。

10-4. ストレスによる細胞増殖抑制・排除の分子メカニズム

各種ストレスによって p53 蛋白質が普遍的に活性化することを明らかにしてきたが、活性化した p53 蛋白質がどのようなストレス応答をどのようなメカニズムで引き起こすかについて考察した。その結果、放射線ストレス、紫外線ストレス、温熱ストレスの 3 種のストレスに対してでさえ細胞の応答は多種多様であることが明らかになった。図 17-19 に示したように、紫外線ストレスではアポトーシスが、温熱ストレスでは核の断片化が、そして放射線ストレスでは細胞老化が誘導されたのである。この様な様々なストレス応答が引き起こされるメカニズムについては十分に解明されていないが、例えば図 3 に示したように、p53 蛋白質のような全てのストレスに普遍的に応答する分子のほかに MAP キナーゼのようにストレスに応じて選択的に活性化する系が存在することが、この問題に解答を与える 1 つの鍵になると考えられる。すなわち、p53 蛋白質によって誘導あるいは抑制される遺伝子発現とともに、他の経路によって制御される遺伝子発現が様々な様式で組合わさることによりストレス応答反応が発現されるということである。さらに最近、p53 蛋白質そのものも p53 蛋白質応答配

列を持つ遺伝子を等しく活性化するわけではないことが示され、例えばストレスの種類に応じたリン酸化部位の違いにより、異なった遺伝子発現制御が行われる可能性も考えられる。この点については今後 DNA チップ技術などを導入した詳細な検討が必要であると思われる。

これまでに、細胞のストレス応答としてはアポトーシスが最もよく研究されてきたが、我々は全く新しいストレス応答様式が存在することを明らかにした。それが細胞老化様増殖停止である。古くから放射線ストレスにより間期死と分裂死（あるいは増殖死）が誘導されることが研究されてきたが、間期死あるいは分裂死を起こした細胞の中に細胞周期が永続的に停止する細胞が含まれることが明らかになってきた^{31, 32}。我々はそのような細胞の形態が老化した細胞のそれと極めて似ていることから、永続的細胞分裂停止細胞において老化プロセスが誘導されているのではないかと考え検討を加えた。その結果、図 19 に示すように老化した全ての細胞でその発現が見られる SA-β-gal が、永続的細胞分裂停止細胞において発現していたのである。また、これら細胞においては老化細胞と同じような p53 蛋白質あるいはその他の細胞増殖抑制因子の発現様式が認められた（図 21）。正常ヒト細胞の老化は染色体末端に存在するテロメアーの長さによって規定されていると考えられている³³。細胞分裂の度にテロメアーは短くなり、ある一定の長さを越えると細胞増殖が抑制されるというのである。そこで、放射線ストレスにより老化様形質を発現した細胞についてテロメアーの長さを調べたところ、活発に分裂を続ける細胞の長さとなんら違いはなかった。この様なことから、老化様増殖停止はテロメアーの短縮を介さない別のメカニズムで引き起こされていることが明らかになった。現在我々はそのメカニズムとして細胞中に修復されずに残った DNA 損傷からの恒久的情報伝達を考えているが、図 21 に示したように、p53 蛋白質の活性化に伴う一連の遺伝子発現は放射線照射後 10 日で定常状態と同じレベルにまで減少する。したがって、恒久的情報伝達とともに不可逆的老化プロセスを促進する別のメカニズムが存在するのではないかと考えさらに検討を加えている。

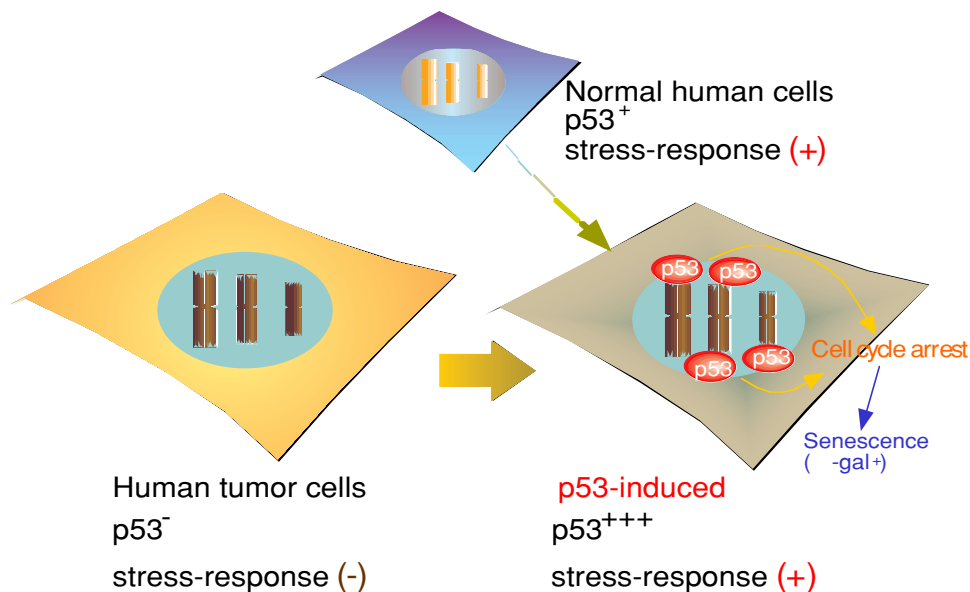


図 31 癌細胞におけるストレス応答能の回復と老化様細胞増殖停止

多くの癌細胞で p53 遺伝子が欠失あるいは変異していることから、癌細胞の多くはストレスに対する応答能を失っていると考えられる。癌細胞では正常ヒト細胞と比べ染色体末端の繰り返し構造であるテロメアーが極端に短縮していることが知られている。これら短縮したテロメアー構造は、正常ヒト細胞においてはある種の DNA 損傷として認識されて細胞の増殖が恒久的に抑制され細胞老化が招来されることから、癌細胞では放射線ストレスが細胞に加わったときのように常にストレスに曝された状態になっていると考えられる。この様なことから、ストレス応答能を欠失した癌細胞にストレス応答因子を導入し、その応答能を回復させることによって、癌細胞の増殖を停止させることができるのではないかと考え、p53 遺伝子を欠失した癌細胞に野生型 p53 遺伝子発現誘導ベクターを導入して p53 蛋白質の誘導がどのような効果を示すか検討した。その結果、表 1 に示すように、誘導剤添加により p53 蛋白質を誘導した細胞では細胞周期停止が引き起こされることがわかった。この細胞において SA-β-gal の発現を調べたところ、p53 蛋白質の誘導量に応じて SA-β-gal が発現していることが確認された。同様の結果は、p21^{Waf1Cip1} 遺伝子を誘導したときにも観察されることから、放射線ストレス応答と同様のストレス応答経路によって引き起こされた現象であると結論付けた。そこでさらに、p53 蛋白質を誘導してストレス応答能を回復した癌細胞に放射線ストレスを加え SA-β-gal の発現に変化が生じるか検討した結果、放射線ストレスの量に依存して最大 60% 近くの細胞に SA-β-gal を発現させることが可能であることを見いだした(表 1)。以上の結果から、テロメアーが短い多くの癌細胞では、テロメアーからの情報を受け取るストレス応答能に欠損があるため細胞増殖を制御できないことが明らかになった(図 31)。このようなことから、多くの癌細胞でストレス応答蛋白質を導入することにより本来細胞の持つ細胞老化プロセスを再開させることが可能であると考えられる^{34, 35}。

現在多くの癌治療が癌細胞におけるアポトーシス誘導を治療指針としているが、必ずしも全ての癌細胞が抗癌剤や放射線によるアポトーシス誘導に感受性ではない。我々の発見した老化様細胞増殖停止はこの様な癌細胞においてアポトーシスに変わる治療指針を与えるものであると期待している。また、癌治療において組織を温存する治療法としても応用できるのではないかと考えている。今後の課題として、どのようなストレスがより効率的に癌細胞に老化様細胞増殖停止を引き起こすか明らかにすると同時に、p53 以外のどのような遺伝子がどの癌細胞にストレス応答能を回復させられるか明らかにしていくことが必要であると考えている。

11. 今後の展開

本研究によって、普遍的なストレス応答分子である p53 蛋白質が細胞の増殖や分化あるいは老化など生命の本質的な諸過程を規定する因子として機能していることが明らかになった。また、ストレスの質あるいは量に依存した独自の経路が p53 蛋白質活性化に關与することも示唆された。我々生命を取り巻く環境では多くの多変するストレスが複合的に作用する。従って生体におけるストレス応答を解明するためには、それぞれのストレスがどのような特異性をもって受容され、どのような独立した経路によってその情報が伝達されているのか解析する必要がある。本研究では、まず放射線ストレスが核および細胞膜で受容されていること、

それぞれが別々の情報伝達経路によって p53 蛋白質に情報を伝達していること、を明らかにした。この様なことから今後の展開としてまず第 1 に、紫外線ストレスや温熱ストレスがどのようにして受容され、どのような情報伝達経路が利用されているのか明らかにしたい。これら両ストレスは放射線ストレスとは異なる作用を示す。そこで、放射線ストレスの受容・伝達メカニズムとどこが異なりどこが共通しているかを明らかにすることにより、複合的なストレス環境下でどのようにして生命が様々なストレスに应答しているのか明らかにする手掛かりを得たい。

放射線ストレスの場合、核および細胞膜で受容されたストレスは別々の情報伝達経路によって伝達されるが、細胞のストレス応答においてはそれらは互いにクロストークしていることが示された。この様なことから第 2 に、ストレスにより活性化される情報伝達経路のクロストークがどのような意味を持っているか明らかにしたい。8-3.項に示したように、我々は p53 遺伝子を欠失した癌細胞を用いて p53 遺伝子を任意に誘導できる系を確立した。同細胞では、放射線や紫外線あるいは温熱ストレスに対し MAP キナーゼ経路が反応する。そこで、MAP キナーゼの活性化に加えて p53 機能を誘導したときに細胞のストレス応答能がどう変わるのか、ストレス応答遺伝子発現には変化があるのか、それぞれの経路の活性化のタイミングがずれた場合何が起こるのかなどについて検討を加えたい。

細胞のストレス応答反応はストレス応答遺伝子の発現によって制御されている。9-3.で報告したように、放射線ストレス・紫外線ストレス・温熱ストレス間でもその応答反応が異なる。この結果は、共通した p53 蛋白質の活性化に加えそれ以外のストレス応答分子の活性化によってストレス応答遺伝子発現様式が変わることを意味する。また、p53 蛋白質そのものもストレスに応じたリン酸化様式の変化により活性化する遺伝子標的が変わる可能性もある。この様なことから第 3 に、ストレス応答反応における遺伝子発現の多様性を明らかにするため、ストレス応答遺伝子および p53 蛋白質制御遺伝子の発現を最新の DNA マイクロアレイ (DNA チップ) 方を応用して検索する。この方法ではまず最初にこれまで明らかになっているストレス応答遺伝子および p53 応答配列をプロモーター領域に持つ p53 蛋白質制御遺伝子をスライドガラス上にスポットし、未処理細胞あるいはストレス処理細胞から抽出した mRNA を異なった蛍光色素で標識し、同時にスライドガラスにハイブリダイゼーションすることにより各スポットの蛍光を検出する。この様にして各種ストレスに应答する多数の遺伝子発現を俯瞰的に解析する。

10-4.で議論したように、我々はこれまで認知されてこなかった新たなストレス応答反応を発見した。細胞老化様増殖停止である。驚くべきことに、9-4.で示したように、癌細胞にストレス応答能を回復させると、この老化様細胞増殖停止が誘導された。これまでの癌治療では主にアポトーシスが重要視されてきたが、癌組織でアポトーシスを誘導した結果、逆に機能障害や臓器障害が起こる可能性もあった。もし、癌細胞に効率良く老化様増殖停止を誘導することができれば、高い QOL を保つことができると考えられる。そこで第 4 に、癌細胞において老化様細胞増殖停止を効率良く起こす方法を模索したい。まず本研究で用いた p53 機能は癌の半数で欠損していることから、p53 機能の回復は第 1 の選択肢である。しかしながら癌細胞の中には p53 遺伝子に異常を持たないものも多数存在する。そこで、この様

な癌細胞において正常なストレス応答能が維持されているのかどうか明らかにする。さらに最近の我々の研究から、p53 蛋白質にはその機能を発現するために必要な量的閾値が存在する。p53 遺伝子が正常な癌細胞でもストレス応答に十分な量の p53 蛋白質が発現されていなければ正常なストレス応答ができない可能性がある。そこで、p53 遺伝子に異常を持たないような癌細胞でも、p53 蛋白質を高発現させることによってストレス応答能を高めることができるのかどうか検討する。さらに本研究で得られた結果により、放射線ストレスが老化様細胞増殖停止の発現を促進することが明らかにされたことから、p53 機能に欠損を持つような癌細胞において放射線や温熱ストレスが p53 機能非依存的に老化様細胞増殖停止を誘導できないかその可能性を模索したい。

21 世紀に入り我々を取り巻く環境はますますストレスフル (stressful) なものになることは確実である。この様な時代の中でいかにストレスとうまく折り合って生活していくかという問題は我々に突き付けられた極めて切実な問題である。地球上の多変する環境の中で進化してきた生命にとって、環境変化は本来積極的な意味での刺激として我々に作用し、そして我々生命を育ててきたことは間違いない。したがって、我々はストレスの本質をより科学的に解明することによって、健やかに生活し老いていくための基礎技術を手にするのは我々生命の持つ本質的な能力を開花させることにほかならない。さらに、ストレス応答機構の研究は単に科学的な興味に留まらず、その研究結果が医療や福祉に直接反映させることができる可能性を秘めている。このような意味で、ストレス科学は今後ますます成熟させるべき領域であり、そこでは生物学者に留まらず社会系や人文系をはじめ多くの学問領域の研究者が集い学際的な研究を推し進める必要があると切に感じる。今後本研究の結果が、そのような新しい社会生活の基盤技術の開発に貢献できることを期待している。

12. 参考文献

1. L. J. Ko, and C. Prives: p53: puzzle and paradigm, *Genes Dev.*, 10, 1054-1072 (1996)
2. C. C. Harris: p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic-an abridged historical perspective, *Carcinogenesis*, 17, 1187-1198 (1996)
3. A. J. Levine: p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell*, 88, 323-331 (1997)
4. J. M. Kyriakis, and J. Avruch: Sounding the alarm: Protein kinase cascades activated by stress and inflammation, *J. Biol. Chem.*, 271, 24313-24316 (1996)
5. G. P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, M. Peacocke, and J. Campisi: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*, 92, 9363-9367 (1995)
6. A. J. Giaccia, and M. B. Kastan: The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.*, 12, 2973-2983 (1998)
7. M. L. Agarwal, W. R. Taylor, M. V. Chernoc, O. B. Chernova, and G. R. Stark: The

- p53 network, *J. Biol. Chem.*, 273, 1-4 (1998)
8. C. E. Canman, and M. B. Kastan: Three paths to stress relief, *Nature*, 384, 213-214 (1996)
 9. K. Suzuki, S. Kodama, and M. Watanabe: Recruitment of ATM protein o double strand DNA irradiated with ionizing radiation, *J. Biol. Chem.*, 274, 25571-25575 (1999)
 10. K. Savitsky, S. Sfez, D. A. Tagle, Y. Ziv, A. Sartiel, F. S. Collins, Y. Shiloh, and G. Rotman: The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species, *Human Mol. Genet.*, 4, 2025-2032 (1995)
 11. T. Hunter: When is a lipid kinase not a lipid kinase? When it is a protein kinase, *Cell*, 83, 1-4 (1995)
 12. C. E. Canman, D-S. Lim, K. A. Cimprich, Y. Taya, K. Tamai, K. Sakaguchi, E. Appella, M. B. Kastan, and J. D. Siliciano: Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53, *Science*, 281, 1677-1679 (1998)
 13. S. Banin, L. Moyal, S.-Y. Shieh, Y. Taya, C. W. Anderson, L. Chessa, N. I. Smorodinsky, C. Prives, Y. Reiss, Y. Shiloh, and Y. Ziv: Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage, *Science*, 281, 1674-1677 (1998)
 14. K. Savitsky, et al.: A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase, *Science*, 268, 1749-1753 (1995)
 15. W. T. Steegenga, A. J. van der Eb, and A. G. Jochemsen: How phosphorylation regulates the activity of p53, *J. Mol. Med.*, 263, 103-113 (1996)
 16. D. W. Meek: Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53, *Cell. Signal.*, 10, 159-166 (1998)
 17. C. Prives: Signaling to p53: Breaking the MDM2-p53 circuit, *Cell*, 95, 5-8 (1998)
 18. S.-Y., Shieh, M. Ikeda, Y. Taya, and C. Prives: DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2, *Cell*, 91, 325-334 (1997)
 19. J. D. Siliciano, C. E. Canman, Y. Taya, K. Sakaguchi, E. Appella, and M. B. Kastan, DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53, *Gene Dev.*, 11, 3471-3481 (1997)
 20. S. Y. Fuchs, V. Adler, M. R. Pincus, and Z. Ronai: MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 10541-10546 (1998)
 21. R. Scully, J. Chen, R. L. Ochs, K. Keegan, M. Hoekstra, J. Feunteun, and D. M. Livingston: Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage, *Cell*, 90, 425-435 (1997)
 22. Q. Zhong, C.-F. Chen, S. Li, Y. Chen, C.-C. Wang, J. Xiao, P.-L. Chen, Z. D. Sharp, and W.-H. Lee: Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response, *Science*, 285, 747-750 (1999)

23. Z. Dong, Q. Zhong, and P.-L. Chen: The Nijmegen breakage syndrome protein is essential for Mre11 phosphorylation upon DNA damage, *J. Biol. Chem.*, 274, 19513-19516 (1999)
24. R. S. Maser, K. J. Monsen, B. E. Nelms, and J. H. J. Petrini: hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks, *Mol. Cell. Biol.*, 17, 6087-6096 (1997)
25. L. Y. Marmorstein, T. Ohuchi, and S. A. Aaronson: The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 13869-13874 (1998)
26. S. Matsuoka, M. Huang, and S. J. Elledge: Linkage of ATM to cell cycle regulation by the chk2 protein kinase, *Science*, 282, 1893-1987 (1998)
27. D. P. Gately, J. C. Hittle, G. K. T. Chan, and T. J. Yen: Characterization of ATM expression, localization, and associated DNA-dependent protein kinase activity, *Mol. Biol. Cell*, 9, 2361-2374 (1998)
28. U. Knippschild, D. Milne, L. Campbell, and D. Meek: p53 N-terminus-targeted protein kinase activity is stimulated in response to wild type p53 and DNA damage, *Oncogene*, 13, 1387-1393 (1996)
29. M. H. G. Kubbutat, S. N. Jones, and K. H. Vousden: Regulation of p53 stability by Mdm2, *Nature*, 387, 299-303 (1997)
30. Y. Haupt, R. Maya, A. Kazaz, and M. Oren: Mdm2 promotes the rapid degradation of p53, *Nature*, 387, 296-302 (1997)
31. A. Di Leonardo, S. P. Linke, K. Clarkin, and G. M. Wahl: DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts, *Gene Dev.*, 8, 2540-2551 (1994)
32. S. P. Linke, K. C. Clarkin, and G. M. Wahl: p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to γ -irradiation, *Cancer Res.*, 57, 1171-1179 (1997)
33. Z. Yang, S. Kodama, K. Suzuki, and M. Watanabe, Telomerase activity, telomere length, and chromosome aberrations in the extension of life span of human embryo cells induced by low-dose X-rays, *J. Radiat. Res.*, 39, 35-51 (1998)
34. B.-D. Chang, Y. Xuan, E. V. Bronde, H. Zhu, B. Schott, J. Fang, and I. B. Roninson: Role of p53 and p21^{waf1/cip1} in senescence-like terminal proliferation arrest induction in human tumor cells by chemotherapeutic drugs, *Oncogene*, 18, 4808-4818 (1999)
35. B.-D. Chang, E. V. Broude, M. Dokmanovic, H. Zhu, A. Ruth, Y. Xuan, E. S. Kandel, E. Lausch, K. Christov, and I. B. Roninson: A senescence-like phenotypes distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents, *Cancer Res.*, 59, 3761-3767 (1999)

13 . 研究業績

13-1 . 原著論文

1. K. Suzuki: Multistep nature of X-ray-induced neoplastic transformation in mammalian cells: genetic alterations and instability, *J. Radiat. Res.*, 38, 55-63 (1997)
2. K. Suzuki, S. Kodama, and M. Watanabe: Effect of Low-dose preirradiation on induction of the HSP70B-LacZ fusion gene in human cells treated with heat shock, *Radiat. Res.*, 149, 195-201 (1998)
3. K. Suzuki, R. Takahara, S. Kodama, and M. Watanabe: In situ detection of chromosome bridge formation and delayed reproductive death in normal human embryonic cells surviving X irradiation, *Radiat. Res.*, 150, 375-381 (1998)
4. K. Suzuki, S. Kodama, and M. Watanabe: Suppressive effect of low-dose preirradiation on genetic instability induced by X rays in normal human embryonic cells, *Radiat. Res.*, 150, 656-662 (1998)
5. S. Kodama, G. Kashino, K. Suzuki, T. Takatsuji, Y. Okumura, M. Oshimura, M. Watanabe, and J. C. Barrett, Failure to complement abnormal phenotypes of Simian virus 40-transformed Werner syndrome cells by introduction of a normal human chromosome 8, *Cancer Res.*, 58, 5188-5195 (1998)
6. S. Koyama, S. Kodama, K. Suzuki, T. Matsumoto, T. Miyazaki, and M. Watanabe: Radiation-induced long-lived radiacals which cause mutation and transformation, *Mutat. Res.*, 421, 45-54 (1998)
7. M. Suzuki, Z. Yang, K. Nakano, F. Yatagai, K. Suzuki, S. Kodama, and M. Watanabe, Extension of in vitro life-span of γ -irradiated human embryo cells accompanied by chromosome instability, *J. Radiat. Res.*, 39, 203-213, 1998.
8. Z. Yang, S. Kodama, K. Suzuki, and M. Watanabe, Telomerase activity, telomere length, and chromosome aberrations in the extension of life span of human embryo cells induced by low-dose X-rays, *J. Radiat. Res.*, 39, 35-51 (1998)
9. K. Suzuki, S. Kodama, and M. Watanabe: Recruitment of ATM protein to double strand DNA irradiated with ionizing radiation, *J. Biol. Chem.*, 274, 25571-25575 (1999)
10. J. C. Ghosh, K. Suzuki, S. Kodama, and M. Watanabe: Effects of protein kinase inhibitors on accumulation kinetics of p53 protein in normal human embryo cells following X irradiation, *J. Radiat. Res.*, 40, 23-37 (1999)
11. J. C. Ghosh, Y. Izumida, K. Suzuki, S. Kodama, and M. Watanabe: Dose-dependent biphasic accumulation of p53 protein in normal human embryo cells following X-irradiation, *Radiat. Res.*, in press.

13-2 . 総説など

1. 鈴木啓司, 細胞による放射線受容とシグナル伝達経路活性化の分子メカニズム, 放射線生物研究, 32, 31-45 (1997)
2. 鈴木啓司, 放射線応答とシグナル伝達系, 放射線科学, 40, 304-308 (1997)

13-3 . 国際学会発表

1. K. Suzuki, S. Kodama, and M. Watanabe: Signal transduction pathways involving p53 activation required for the induction of p21WAF1/CIP1 and GADD45 in X-irradiated normal human cells. The 9th International p53 Workshop, May 9-13, 1998, Crete, Greece.
2. K. Suzuki, S. Kodama, M. Watanabe: X-ray-induced genomic instability in normal human cells and DNA repair-deficient CHO cells. The 11th International Congress of Radiation Research, July 18-23, 1999, Dublin, Ireland.
3. K. Suzuki, S. Kodama, and M. Watanabe: The nuclear and the membrane signals are involved in p53 accumulation in X-irradiated normal human cells. The 11th International Congress of Radiation Research, July 18-23, 1999, Dublin, Ireland.
4. S. Kodama, M. Md Desa, K. Roy, K. Suzuki, and M. Watanabe: Radiation-induced delayed chromosomal instability in cultured mouse cells. The 11th International Congress of Radiation Research, July 18-23, 1999, Dublin, Ireland.
5. M. Miyakoda, K. Suzuki, S. Komada, and M. Watanabe: A role of p53 protein accumulation in heat-shocked normal human cells. The 11th International Congress of Radiation Research, July 18-23, 1999, Dublin, Ireland.
6. K. Suzuki, S. Kodama, and M. Watanabe: Radiation-induced senescence-like phenotypes require p53, p21, and ATM function, but not telomere shortening. 11th ICRR satellite meeting: In vitro transformation, July 24-25, 1999, Cork, Ireland.
7. S. Kodama, I. Mori, K. Suzuki, and M. Watanabe: Cellular senescence in rodent cells does not require telomerase repression. 11th ICRR satellite meeting: In vitro transformation, July 24-25, 1999, Cork, Ireland.

13-4 . 国内学会発表

1. 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：X線照射正常ヒト細胞における ATM-p53 経路及び IRF-1 経路活性化機構、日本癌学会第 56 回総会、平成 9 年 9 月 25 日-27 日、京都。
2. 渡邊正己、児玉靖司、鈴木啓司：細胞がん化過程におけるテロメア不安定性の関与、日本癌学会第 56 回総会、平成 9 年 9 月 25 日-27 日、京都。
3. 児玉靖司、橋本裕数、鈴木啓司、渡邊正己：Werner 症候群細胞における自然突然変異のスペクトラム解析、日本癌学会第 56 回総会、平成 9 年 9 月 25 日-27 日、京都。
4. 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：X線照射正常ヒト細胞における多重情報伝達経路による p53 蛋白質の活性化、日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、

京都.

5. 中畑圭二、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：非アポトーシスである温熱処理の細胞傷害、日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都.
6. 菓子野元郎、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：Werner 症候群由来細胞への正常 8 板染色体移入効果、日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都.
7. 楊 治、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：長期間培養ヒト胎児由来細胞の染色体に対する低線量放射線の影響、日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都.
8. 児玉靖司、鈴木啓司、M. F. Lavin、渡邊正己：C-Abl と ATM 及び DNA-PK とのタンパク質相互作用の解析、日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都.
9. 都田真奈、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：熱に対するヒト正常細胞の細胞応答と p53 蛋白質蓄積との関係、日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都.
10. ゴーシュ JC、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：ヒトの正常細胞における放射線による p53 蛋白質への情報伝達、日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都.
11. 渡邊正己、鈴木啓司、児玉靖司、PLDR 修復能と p53 機能：日本放射線影響学会第 40 回大会、平成 9 年 11 月 5 日-7 日、京都.
12. 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：ヒト細胞における X 線照射および野生型 p53 蛋白質誘導による老化様形質の発現、日本癌学会第 57 回総会、平成 10 年 9 月 30 日~10 月 2 日、横浜.
13. 都田真奈、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：ヒト細胞の温熱感受性に対する p53 蛋白質の蓄積、日本癌学会第 57 回総会、平成 10 年 9 月 30 日~10 月 2 日、横浜.
14. 渡邊正己、児玉靖司、鈴木啓司：放射線で誘発された遺伝的不安定性の細胞がん化への寄与、日本癌学会第 57 回総会、平成 10 年 9 月 30 日~10 月 2 日、横浜.
15. 児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：細胞不死化過程におけるテロメア動態-ヒトと齧歯類との比較、日本癌学会第 57 回総会、平成 10 年 9 月 30 日~10 月 2 日、横浜.
16. 後藤佐智子、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：XP バリエント細胞の高突然変異性への p53 経路の関与、日本癌学会第 57 回総会、平成 10 年 9 月 30 日~10 月 2 日、横浜.
17. J. C. Ghosh、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：ヒトの正常細胞における放射線による p53 蛋白質への情報伝達、日本癌学会第 57 回総会、平成 10 年 9 月 30 日~10 月 2 日、横浜.
18. 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：X 線照射正常ヒト細胞における p53 蛋白質活性化シグナルの受容と伝達、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日~4 日、長崎.
19. 都田真奈、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：正常細胞における温熱処理後の p53 を介する RB 非依存的細胞周期制御、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2

- 日～4日、長崎.
20. 後藤佐智子、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：紫外線照射された XP バリエント細胞における細胞周期制御異常、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日～4 日、長崎.
 21. 山口健太郎、児玉靖司、鈴木啓司、石崎寛治、渡邊正己：ヒト細胞の放射線による G1 停止機構における Gadd45 遺伝子の役割、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日～4 日、長崎.
 22. 森勲、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：齧歯類細胞はなぜ不死化しやすいか-テロメア維持機構からの解析、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日～4 日、長崎.
 23. J. C. Ghosh、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：X線線量に依存したヒト正常細胞における p53 蛋白質蓄積の二相性、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日～4 日、長崎.
 24. 森雅子、児玉靖司、鈴木啓司、宮崎哲郎、田中隆、渡邊正己：日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日～4 日、長崎.
 25. 児玉靖司、Md. D. Mohamad、鈴木啓司、鈴木文男、渡邊正己：Scid マウス細胞における放射線誘発遅延型損傷の解析、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日～4 日、長崎.
 26. K. Roy、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：ヒト胎児由来細胞におけるX線誘発遅延型損傷、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日～4 日、長崎.
 27. 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：X線照射正常ヒト細胞における p53 蛋白質 Ser15 のリン酸化制御、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日～3 日、広島.
 28. 児玉靖司、鈴木啓司、鈴木文男、島田義也、渡邊正己：適応応答と遺伝子不安定性の誘導、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日～3 日、広島.
 29. ロイ・カナクラタ、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：X線による遅延性損傷への酸化ストレスの関与、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日～3 日、広島.
 30. 森田真希子、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：Wild type p53 を有するがん細胞における放射線照射後の p53、p21 の誘導、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日～3 日、広島.
 31. 森勲、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：テロメラーゼ活性の抑制を必要としない齧歯類細胞の老化過程、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日～3 日、広島.
 32. 中山由紀子、児玉靖司、鈴木啓司、横山兼久、渡邊正己：ヒト細胞の分裂寿命に対する酸素分圧の影響、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日～3 日、広島.
 33. 長迫信一、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：Werner 症候群細胞の異常形質発現に及ぼす WRN 遺伝子変異の影響、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日～3 日、広島.
 34. 後藤佐智子、鈴木啓司、児玉靖司、森俊雄、渡邊正己：XP バリエント細胞における高突然変異性発現機構の解析、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日～

3日、広島.

35. 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：X線照射正常ヒト細胞における p53 および BRCA1 蛋白質のリン酸化および ATM 蛋白質の関与、日本癌学会第 58 回総会、平成 11 年 9 月 29 日～10 月 1 日、広島.
36. 岡市協生、奥村寛、鈴木啓司、渡邊正己：放射線感受性に関わる変異 p53 によるアポトーシスと細胞周期の調節、日本癌学会第 58 回総会、平成 11 年 9 月 29 日～10 月 1 日、広島.
37. 児玉靖司、鈴木啓司、鈴木文男、島田義也、荻生俊昭、渡邊正己：放射線による遅延性染色体異常精製に対する *scid* 突然変異の影響、日本癌学会第 58 回総会、平成 11 年 9 月 29 日～10 月 1 日、広島.
38. 鎌田雅行、奥田平和、鈴木啓司、執印太郎：VHL 蛋白誘導株における細胞変化、日本癌学会第 58 回総会、平成 11 年 9 月 29 日～10 月 1 日、広島.

13-5 . 新聞など なし

13-6 . 特許 なし

14 . 英訳

(1) Title: Molecular mechanism of stress response in mammalian cells (II):

Stress-induced activation of ATM-p53 pathway and its role in stress-response in mammalian cells.

(2) Institute: Laboratory of Radiation and Life Science, School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University (kzsuzuki@net.nagasaki-u.ac.jp).

(3) Name: Keiji Suzuki

(4) Collaborators: Seiji Kodama and Masami Watanabe (Nagasaki University)

(5) Research year: 1997~1999

(6) Abstract:

Ionizing radiation causes activation of signal transduction pathways, which plays an important role in cellular response to external stresses. Activation of signal transduction pathways result in the induction of a variety of gene products involving cell cycle arrest, induction of apoptosis, DNA repair, and cell recovery. One of the signal transduction generated within the nucleus is mediated by p53 protein. We found that ATM, the gene product deficient in ataxia telangiectasia cells, sense DNA double strand breaks, and activate phosphorylation of p53 protein. Phosphorylated p53 protein is activated as a transcription factor and it induces a group of genes including p21^{Waf1/Cip1}. With the aid of Pull-down assay using DNA-cellulose, we demonstrated that ATM protein preferentially recruited to DNA containing double strand breaks induced by X-rays or by the treatment with restriction endonuclease Pvu II. Another signal transduction pathway generated by the membrane transduce signals to the nucleus through the function of MAP kinases. In normal human embryo cells, X-rays activated only ERK1/2, whereas ultraviolet light induces all three members of MAP kinases, ERK1/2, JNK1/2, and

p38. X-ray irradiation causes activation of MEK1/2 and they activate ERK1/2 by phosphorylating them, resulting in phosphorylation of Elk-1 protein, which is the transcription factor and the downstream effector of ERK1/2. Using the specific inhibitors we proved that X-ray irradiation stimulated EGF receptor tyrosine kinase. From these results, it is indicated that ionizing radiation generates both the nuclear signal transduction caused by DNA strand breaks and the membrane signal transduction by stimulation of EGF receptor. Both signals transduced to the nucleus and cross-talk each other to determine the cellular response to radiation-stress.

Although the stress response decreases cell susceptibility to the lethal effect of external stresses, excess stresses make cells to die. We found that the process was dependent on the type of stress, because ionizing radiation arrested cell division but UV induced apoptosis. Interestingly, the process induced by lethal doses of X-rays was quite similar to that of cellular senescence. The damaged cells showed senescent morphology and these cells expressed SA- β -gal, senescence-associated- β -galactosidase. Therefore, stress response mechanism is thought to be involved in cellular aging. In fact, we found that senescent-like phenotypes were induced in p53- tumor-derived cells, if p53 protein was re-introduced into these cells. This result provided a new aspect of the relationship between the study of stress response and cancer treatment.