

1. 研究課題名：UV 照射後の選択的 MAPK 活性化における酸素の役割

2. 研究機関：長崎大学アイソトープ総合センター

3. 研究者：松田尚樹

4. 共同研究者：堀川美和（長崎大学薬学部・放射線生命科学）

王立紅（長崎大学薬学部・放射線生命科学）

吉田正博（長崎大学アイソトープ総合センター）

岡市協生（長崎大学医学部・原研放射）

奥村寛（長崎大学アイソトープ総合センター）

渡邊正己（長崎大学薬学部・放射線生命科学）

5. 研究期間：平成9年～平成11年

## 6. 要約

UV により生じる酸素ストレスは、細胞の UV 応答性に関わるシグナル伝達経路において重要な役割を演じていると考えられている。MAP キナーゼ (MAPKs)、すなわち extracellular-related kinase (ERK) 1/2、c-Jun N-terminal kinase / stress activated protein kinase (JNK/SAPK) そして p38 は、そのようなシグナル伝達に関わる分子の一群であるが、UV に対する各 MAPK 経路の活性化と、その結果生じる生物学的応答の間の関係は明らかではない。本研究では、異なる酸素ストレス量が MAPKs の活性化および細胞応答性に与える影響について検討した。通常酸素環境 (normoxic, 20% O<sub>2</sub>) で培養したヒト胎児由来正常細胞 (HE49) に UV-C (254nm ; 16J/m<sup>2</sup>) を照射すると、照射後 30 分で細胞内酸化状態 (redox level) が上昇した。それに対して、抗酸化剤である N-acetyl-L-cysteine (NAC) 存在下、あるいは生理的低酸素環境 (hypoxic, 5% O<sub>2</sub>) で培養した細胞では、UVC 照射による細胞内酸化状態の上昇が抑制された。MAPKs の中では、ERK1/2 と JNK が UVC により活性化した。このうち ERK1/2 活性は細胞内酸化状態によって影響を受けなかったが、JNK 活性は NAC 存在下あるいは hypoxic な環境では顕著に抑制された。さらに、NAC 存在下あるいは hypoxic な環境では UVC 照射によるアポトーシスが抑制され、細胞生存率の上昇が見られた。以上の結果より、UV により生じる酸素ストレスは主に JNK 経路から細胞内シグナルに変換されること、さらに、異なる酸素ストレス環境における ERK1/2 と JNK 活性化のバランスの違いが細胞の UV 応答性を修飾している可能性が示唆された。

## 7. 研究目的

オゾン層の破壊に伴い、生物にとって有害な短波長紫外線 (UVC) が増加することが懸念されている。UVC 照射を受けた細胞では、主としてシクロブタン型ピリミジンダイマーや (6-4) 光生成物などの DNA 損傷が光化学的に生じ、その結果、細胞増殖の遅延、細胞死、突然変異などが起こる。この DNA 損傷以外の重要な UVC 生成物が、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) である<sup>1)</sup>。ROS は常に細胞内のエネルギー代謝に伴って生じ、細胞内抗酸化分子とのバランスにより細胞内酸化還元レベル (redox level) が維持されている。UVC 照射による ROS の生成は、このバランスを崩し、その結果、酸素ストレスとなって細

胞内の種々の化学変化の引きがねとなる。UV 以外の環境ストレス因子である電離放射線やアルキル化剤も細胞内で ROS を生成するが、これらのストレス場合は ROS が DNA 損傷（一本鎖切断など）の直接的原因であるのに対して、UV の場合は DNA 損傷の生成の主原因ではない。したがって、UV により生成する ROS は、UV 応答シグナル伝達経路において重要な役割を担っているのではないかと考えられている<sup>2-4)</sup>。

UVC が DNA 損傷とは直接関係しない分子、例えば増殖因子受容体<sup>3,5)</sup>、mitogen activated protein kinases (MAPKs)<sup>2,3,6-8)</sup>、転写因子<sup>5,9,10)</sup>などを介して、細胞内にシグナルを送り込むことを示す報告が、近年増加している。これらの分子はシグナル伝達経路を形成し、UV からのシグナルを細胞質を経て核に伝える働きをしているものと思われる。このうち MAPKs は、その上流分子 (MAPKKs) によってスレオニン残基およびチロシン残基がリン酸化を受けることにより活性化し、次に転写因子群を基質として活性化し、選択的な遺伝子の転写を引き起こす<sup>11,12)</sup>。そのため、MAPKs は UVC により誘導された細胞内シグナルを核に伝える重要な位置にあり、DNA 損傷に起因する細胞応答を修飾し、細胞の運命決定にも関与しうる分子群と考えられる。

3種類のMAPKs、すなわち extracellular-related kinase (ERK) 1/2、c-Jun N-terminal kinase / stress activated protein kinase (JNK/SAPK)、p38 は、細胞外からの刺激やストレスの種類に応じて、異なったパターンで活性化を受けることが知られている<sup>12,13)</sup>。正常ヒト細胞を用いた我々の結果によれば、EGF1/2 は増殖刺激に対して活性化し、それに対して JNK はメカニカストレスによる増殖停止あるいは細胞分化に伴い活性化した<sup>14)</sup>。一般的に、ERK は JNK や p38 と比較して増殖刺激に、また JNK や p38 は細胞にとってストレスとなる刺激に対して応答するようである。しかし、UVC 照射を受けた種々の細胞においては、JNK のみならず ERK1/2 も活性化することが知られている<sup>15,16)</sup>。この UVC に対する ERK1/2 経路および JNK 経路の活性化機構、およびそれぞれの経路の活性化の結果生じる生物学的応答は明らかではない。

我々は、UVC による MAPKs の活性化の結果は、異なる MAPK 経路間の活性化バランスにより規定されており<sup>17,18)</sup>、このバランス決定に UV により生成する酸素ストレスが関わっているのではないかと仮説を立てた。この可能性を検討するため、本研究ではヒト正常細胞を抗酸化剤の存在下、もしくは非存在下で培養した。さらに、通常の培養条件における酸素濃度 (normoxic, 20% O<sub>2</sub>) は生体内での酸素濃度よりも明らかに高く<sup>19)</sup>、細胞はすでに酸素ストレスに暴露されている可能性があるため、細胞を生理的酸素濃度に近い環境 (hypoxic, 5% O<sub>2</sub>) においても培養した。このように酸素環境が異なる細胞に UVC を照射し、細胞内酸化状態の変化、MAPK 活性化、アポトーシス、および細胞生存性を調べた。

## 8. 材料と方法

### 8-1. 細胞培養

ヒト胎児由来正常細胞 (HE49)<sup>20)</sup> は、DMEM (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) / 10%FBS (Intergen Co., Purchase, NY) を培養液として、37 °C、5% CO<sub>2</sub> - 20% O<sub>2</sub> の条件 (normoxic) で培養した。細胞の回収には 0.05%トリプシン - 0.53mM EDTA

(Gibco) を用い、継代は 1:4 split ratio で行なった。なおすべての実験には継代数 7 から 15 の細胞を用いた。

低酸素環境での培養には、マルチガスインキュベーター (BNR-110M、タバイエスペック、大阪) を用い、5% CO<sub>2</sub> - 5% O<sub>2</sub> の条件で細胞を培養した。酸素モニター (GMS, Kiel-Mielkendorf, Germany) による計測結果では、この条件における培養液中の pO<sub>2</sub> は 41.5mmHg であった。

#### 8-2 . UVC 照射

Semi-confluent に達した細胞を、DMEM/0.5%FBS で 24 時間培養し、serum starvation を施した。その後 PBS で 2 度洗い、細胞表面がほぼ浸るまで PBS を加え、GS Gene Linker チャンバー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて 254nm の UV-C (線量率 1J/m<sup>2</sup>/sec) を照射した。低酸素培養された細胞を照射する場合には、あらかじめ低酸素環境で 1 時間放置し、液中の pO<sub>2</sub> を 41.5mmHg に平衡させた PBS で細胞を浸し、照射した。また抗酸化剤処理を行なう場合には、最終濃度 10mM の N-acetyl-L-cysteine (NAC, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を照射 1 時間前に加えた。

#### 8-3 . MAPK リン酸化および活性化の検出

UV 照射後の細胞を、5、15、30、60、120 分培養し、RIPA バッファー (1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM PMSF, 1mg/ml aprotinin, leupeptin, pepstatin, and 1mM sodium orthovanadate in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) で細胞を溶解した。この細胞溶解液を材料として、MAPK およびリン酸化された MAPK に対する抗体を用いたウエスタン・ブロット法により MAPK リン酸化を調べた。ERK1/2、JNK/SAPK、p38 のリン酸化部位はそれぞれ Tyr204、Thr183/Tyr185、Thr180/Tyr182 である。すべての抗体はウサギ・ポリクローナルで、New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) より入手した。

また、同じ材料を用いて ERK1/2 活性および JNK 活性を、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP 存在下における基質のリン酸化反応 (phosphotransfer) により調べた。ERK1/2 は特異的ペプチドを基質として用い、リン酸化反応 (30 °、30 分) 後、ニトロセルロースフィルターでリン酸化ペプチドのみを分離し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。JNK 活性は、c-Jun (1-169)-GST fusion protein を基質とし、反応後、リン酸化タンパクを 5% SDS-PAGE にて分離し、autoradiography 後、bio-imaging analyzer (BAS5000、富士写真フイルム、東京) により検出、定量化した。

#### 8-4 . 細胞内酸化状態の検出

細胞内酸化状態は dihydrorhodamine 123 (DHR, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) 染色<sup>5)</sup> により検出した。この無色の化合物は細胞内に速やかに取り込まれ、細胞内酸化状態に依存して酸化開裂して膜不透過性の蛍光化合物である rhodamine 123 に変化し、ミトコンドリアを染色する。したがって、この蛍光量によって細胞内酸化状態を間接的に知る

ことができる。UVC 照射 1 時間前より最終濃度  $2\ \mu\text{M}$  の DHR を細胞培養液に加え、UVC 照射後 30 および 60 分培養した。1%ホルムアルデヒドで 20 分固定後、細胞をレーザースキャン顕微鏡 (LSM410、Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて観察した (excitation 488nm)。

#### 8-5 . アポトーシスの検出

UVC 照射後の細胞を 24 時間培養した後、細胞の apoptic な DNA を Ioannou と Chen の方法<sup>21)</sup> によって分離した。すなわち、 $2 \times 10^6$  個の細胞を Lysis バッファー (1% NP-40, 20mM EDTA in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) で溶解し、氷中で 10 分間静置した後、 $15,000 \times g$  で 20 分間遠心した上清を取り、4 mg/ml の Rnase A および proteinase K (和光) で 30、1 時間処理した。イソプロパノール沈殿後、得られた DNA の断片を 1.5%アガロースゲル電気泳動により分離し、SYBR Green I (Molecular Probes) によって検出した。

#### 8-6 . 細胞生存性

種々の線量の UVC 照射を受けた細胞をトリプシン処理により回収し、細胞懸濁液として、200 cells/dish の濃度でシャーレに植えた。その後、normoxic、hypoxic、または NAC 存在下で約 14 日間培養し、形成したコロニーをギムザ法により染色し、コロニー数を計測した。

### 9 . 結果

#### 9-1 . UVC 照射による MAPK のリン酸化および活性化

ウエスタン・プロット法により Normoxic な細胞の MAPK のリン酸化を調べた結果を Fig. 1 に示す。44kDa の ERK1 および 42kDa の ERK2 のリン酸化タンパク量が  $16\text{J}/\text{m}^2$  の UVC 照射 5 分後に顕著に増加し、その後徐々に減少した。リン酸化されないものも含めたすべての ERK1/2 タンパク量には変化は見られなかった。さらに UVC 照射 15 分後には JNK もリン酸化し、その量は照射 120 分後まで高いレベルを保った。P38 タンパクも明確に検出され

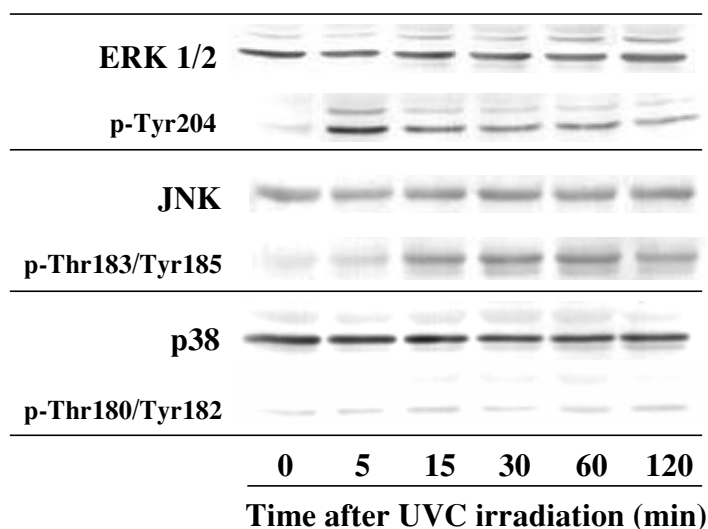


Fig.1 UVC 照射による ERK1/2, JNK, p38 のリン酸化

たが、そのリン酸化タンパクの発現量は極めて少なく、UVC 照射によっても変化を受けなかった。

次に、UVC によるリン酸化を受けた ERK1/2 と JNK の活性、および、その酸素環境による変化について検討した。リン酸化のデータから予想された通り、 $4\text{J}/\text{m}^2$  および  $16\text{J}/\text{m}^2$  の UVC 照射 5 分後には、ERK1/2 活性はそれぞれ 30% および 50% 上昇した (Fig. 2)。また NAC 処理細胞、および hypoxic な細胞でも、最大活性レベルおよびタイムコースのいずれ

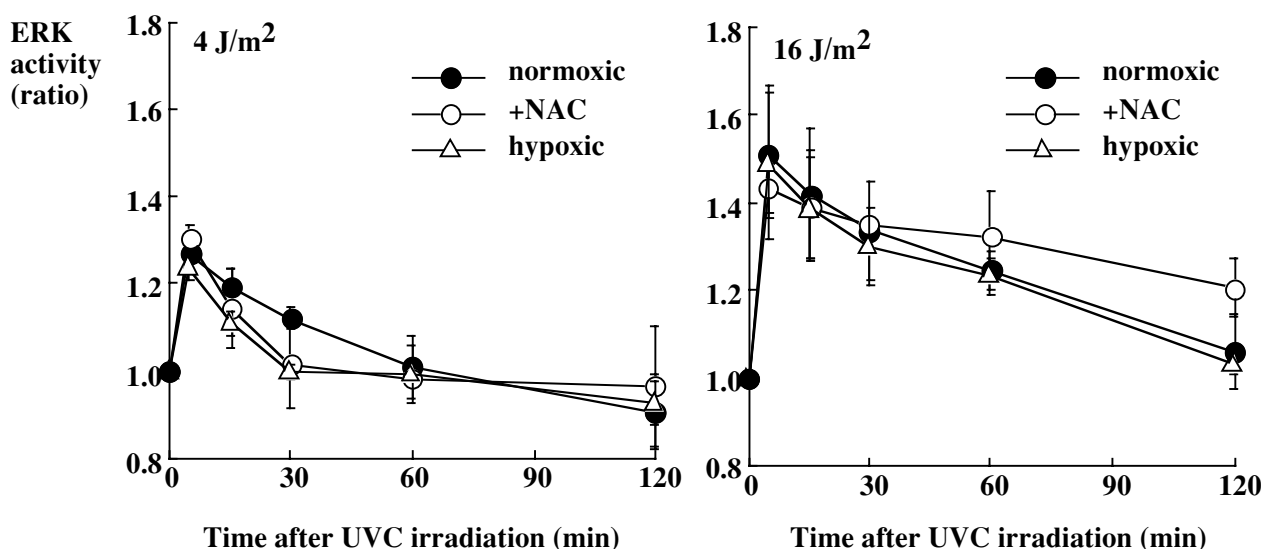


Fig.2 種々の酸素環境で培養された細胞の UVC 照射による ERK1/2 の活性化

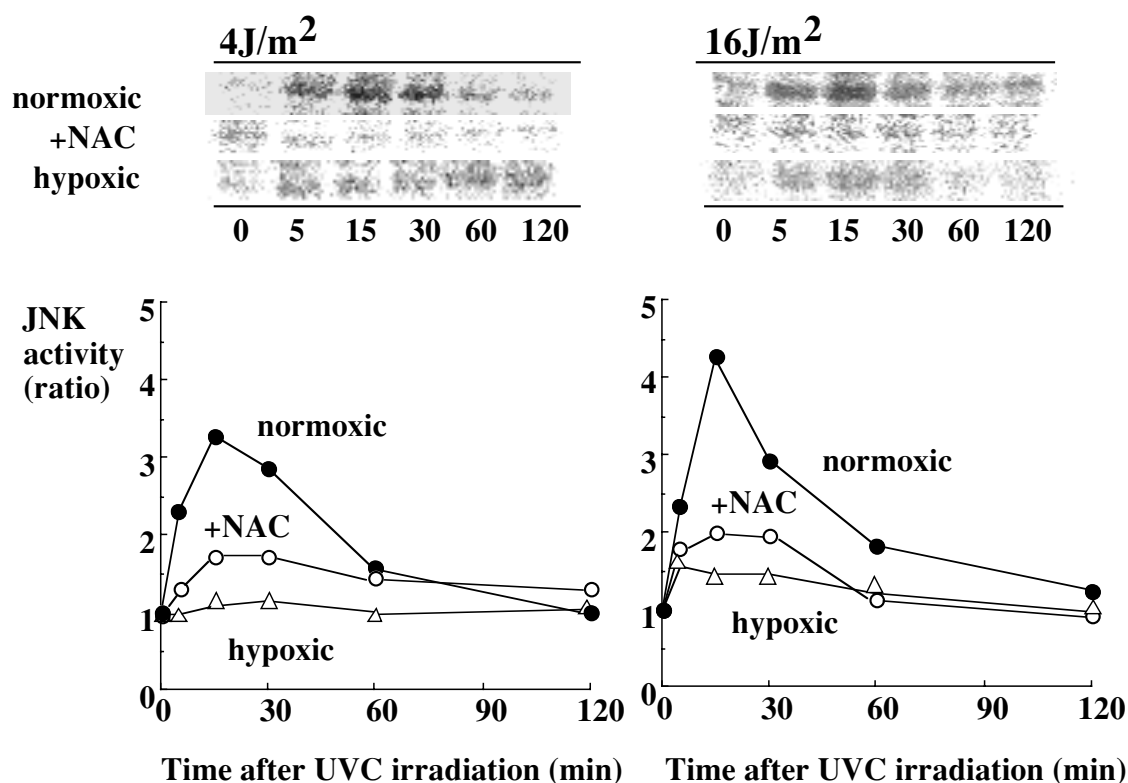


Fig.3 種々の酸素環境で培養された細胞の UVC 照射による JNK の活性化

においても normoxic な細胞と同様の結果が得られた。JNK 活性に関しては、Normoxic な細胞では、 $4\text{J}/\text{m}^2$  および  $16\text{J}/\text{m}^2$  の UVC により活性が上昇し、照射 15 分後に活性のピークが見られた (Fig. 3)。ところが NAC 処理細胞、および hypoxic な細胞では JNK の活性化はごくわずかにとどまった。

以上の結果より、UVC による MAPK の活性化パターンは細胞の酸素環境により変化することが明らかとなった。

### 9-2 . UVC 照射による細胞内酸化状態の変化

異なる酸素環境が細胞内の酸化状態の変化におよぼす影響について、DHR を蛍光プローブとして調べた。この方法では、細胞内の蛍光量が酸化状態を表す。Fig. 4 に示したように、未照射の細胞では細胞内の蛍光は全く観察されなかった。ところが  $16\text{J}/\text{m}^2$  の UVC 照射 15 分後の normoxic な細胞中には蛍光が観察されはじめ (データには示していない)、30 分後には顕著な蛍光が観察された。照射 60 分後においては蛍光量は減少したが、それでもなお未照射のレベル以上を保っていた。それに対して、NAC 処理細胞、および hypoxic な細胞では、この UVC による蛍光量の増加が抑制されていた。したがって、normoxic な細胞と、NAC 処理細胞および hypoxic な細胞では、UVC により生成する細胞内酸化状態が異なることが明らかとなった。NAC 処理細胞および hypoxic な細胞では細胞内酸化状態が低かったという結果は、UVC による細胞内の酸素ストレスと、JNK を介するシグナル伝達経路の間に、繋がりのある可能性を示すものである。

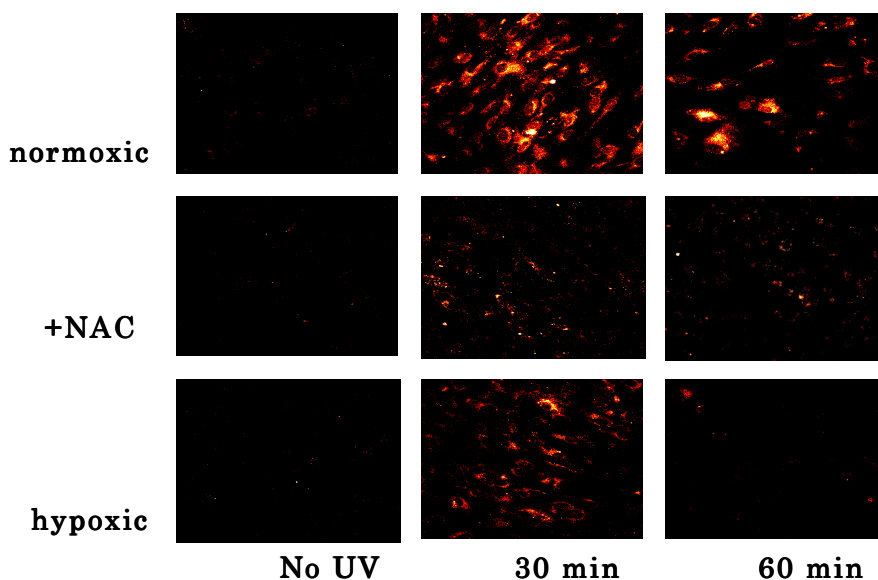


Fig.4 UVC ( $16\text{J}/\text{m}^2$ ) 照射後の細胞内酸化状態の変化

### 9-3 . アポトーシスおよび細胞生存性

アポトーシスは JNK 経路活性化による細胞応答の一つと考えられている。すでに示したように、細胞内酸化状態の違いにより UVC 照射による JNK 活性化の程度は異なっていたため、

次にアポトーシスの違いについて検討した。アポトーシスは DNA 断片化をアガロースゲル電気泳動で検出することにより調べた。データには示さないが、UVC 照射 8 時間後より、normoxic な細胞で DNA ラダーが最初に観察された。照射 24 時間後には、Fig. 5 に示すように線量依存的な DNA ラダーが観察された。そして、NAC 処理細胞および hypoxic な細胞の DNA ラダーは、normoxic な細胞よりも明らかに短かった。すなわち、細胞内酸化状態の低い条件では、アポトーシスも抑制されることが示唆された。

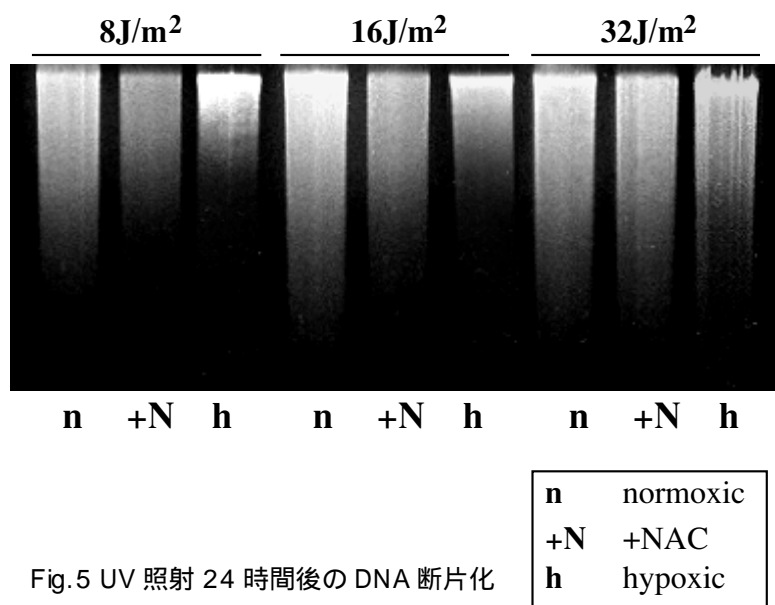


Fig.5 UV 照射 24 時間後の DNA 断片化

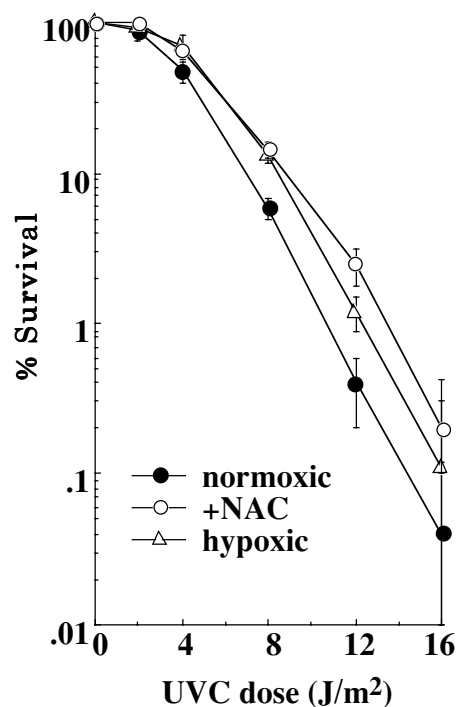


Fig.6 UVC 線量-生存率曲線

この細胞内酸化状態に依存するアポトーシスの程度の違いの細胞生存率への影響をコロニー形成法により調べた。Fig. 6 に示すように、4J/m<sup>2</sup> 以上の線量において、NAC 処理細胞および hypoxic な細胞は、normoxic な細胞よりも生存率が增加していた。またデータには示さないが、NAC 処理細胞および hypoxic な細胞ではコロニーのサイズも大きく、コロニー内の細胞も密であった。以上の結果より、細胞内酸化状態の低い細胞では、UVC 照射後の生存率が上昇し、増殖性も亢進していることが示唆された。

## 10. 考察

本研究で、我々は細胞を異なる酸素環境におくことにより、UVC による MAPKs 活性化のパターンが異なり、その結果、細胞応答性にも変化が起こることを示した。すなわち Normoxic な環境では、UVC 照射は細胞内酸化状態を上昇させ、ERK1/2 と JNK を活性化し、アポトーシスを誘導した。抗酸化剤存在下あるいは hypoxic な環境では、UVC 照射による酸化状態の上昇が抑制され、JNK 活性化およびアポトーシスも抑えられた。これらの結

果は、以下の可能性を示唆する。

培養環境の酸素濃度が UVC により生成する活性酸素量に影響する。

UVC により生じる酸素ストレスは JNK 経路を介して細胞内シグナルに変換される。

ERK1/2 経路は酸素ストレスの量により変化を受けなかったため、酸素ストレスにより変化する JNK の活性化量が ERK1/2 と JNK 間のバランス変化を引き起こす。

これらのバランス変化がアポトーシスと細胞生存性に寄与する。

UVC により生成する ROS には、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、スーパーオキシド ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ )、一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ )、ヒドロキシルラジカル ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) がある。本研究でこの中のどの ROS が多く生成したのかという点については不明であるが、DHR 染色法により細胞中の酸化状態を間接的に検出した。過去の報告<sup>5,22)</sup>と同様に、細胞内酸化状態は UVC 照射 15 分後には上昇し、30 分後にはピークを示した。ROS の化学的半減期は極めて早いにも関わらず、比較的長時間にわたって抗酸化状態が維持されたということは、細胞内で持続的に ROS が生成していたことを意味する。NAC 処理細胞では、UVC 照射 1 時間前から照射後の培養にいたるまで NAC が培養液中に含まれていた。そのため、これらの細胞では ROS が生成後速やかに NAC により不活性化されたものと考えられる。一方、hypoxic な細胞でも ROS 量は抑えられていたが、これは ROS 生成量に対して十分量の細胞内抗酸化分子が存在していた、もしくは UVC による ROS 生成に関与する光増感分子 (photosensitizer) が減少していたことを示す。低酸素状態に応答する転写因子である hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)<sup>23)</sup> や、抗酸化剤応答配列 (ARE)<sup>24)</sup> が、これらの分子の増減に関わっているかも知れない。また、未照射の細胞における normoxic と hypoxic 間の酸化状態の差が DHR 染色法では見られなかったが、そもそも細胞内に存在する ROS の量がこの両者間で異なっていた可能性も考えられる。さらに今回の結果より、体内の生理的な酸素濃度は、normoxic な培養環境よりもかなり低いことから、UV 照射によって in vivo で生成する ROS の量は、in vitro の実験で得られるレベルよりも低いことが予想される。

JNK の活性化の抗酸化剤による抑制は、UVC 照射マウス線維芽細胞<sup>25)</sup>、UVB 照射ヒト表皮細胞<sup>26)</sup>、サイトカイン処理ウシ軟骨細胞<sup>27)</sup> において報告されている。我々の結果はこれらの報告と一致するとともに、hypoxic な培養でも UVC 照射による JNK 活性化が抑制されるという新たな知見を加えるものである。DHR 染色の結果と合わせ考えると、UV 照射後の酸素ストレスが JNK 活性化に密接に関わっている可能性がある。この酸素ストレスが JNK 経路に入り込む機構は不明であるが、一つのゲートウェイとして、抗酸化分子であるチロレドキシシン (Trx) が考えられる。Trx は、通常、JNK の上流に位置する MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) である ASK1 と会合しているが、TNF- $\alpha$  処理や低血清培養により酸素ストレスを生成させると、Trx が酸化されることにより、この Trx-ASK1 会合体が解離し、ASK1 が活性化することが最近示された<sup>28)</sup>。この分子機構が UVC 照射の場合にも当てはまるかも知れない。もう一つの分子としてはグルタチオン S トランスフェラーゼ・ピロリン酸 (GSTp) が考えられる。この GSTp も通常は JNK と会合体を形成しているが、Adler ら<sup>29)</sup> によれば、UV 照射および過酸化水素処理が GSTp のオリゴマー化を引き起こし、その結果、JNK が遊離する。これらの報告を総合すると、酸素ストレスは ASK1 と JNK の双方をそれ



それぞれの会合タンパクを酸化することによって遊離させ、それによって JNK 経路の信号伝達を活性化することが考えられる。また、UV による JNK 活性化に関与すると報告されている他の分子、例えば増殖因子受容体<sup>7)</sup>、セラミド<sup>30)</sup>、フォスファチジルイノシトール 3 キナーゼ<sup>16)</sup>を、酸素ストレスが JNK 経路にシグナルを送り込む際に利用している可能性もある。

ERK1/2 もまた UVC により活性化した。UV は、活性化された増殖因子受容体を起点として、Src、Ras、Raf、プロテインキナーゼ C などの分子を介して、ERK 経路を活性化することが知られている<sup>2,3,15)</sup>。データには示さなかったが、我々が予備的に行なった実験では、増殖因子受容体の阻害剤であるスラミン<sup>31)</sup>は UVC による ERK1/2 活性化を約 50%抑制した。また UV により生成する ROS も、増殖因子受容体を活性化するとの報告もあるが、その機構は明らかでない<sup>5,22)</sup>。今回の結果では、細胞内酸化状態の違いは ERK1/2 活性には影響しなかった。したがって、UVC による ERK1/2 活性化には、増殖因子受容体活性化が関与するが、それは酸素ストレスにはよらないものと推測される。むしろ UV のエネルギー吸収による細胞膜および受容体構造の物理的変化<sup>7)</sup>が、受容体活性化に関与していることが考えられる。

MAPKs 活性化の生理的結果は、対立する経路のバランスに依存するという考え方がある<sup>17)</sup>。これまでに、ERK 経路と JNK 経路のバランスが、ヒト骨性細胞の増殖分化制御<sup>14)</sup>や HeLa 細胞のアポトーシス<sup>18)</sup>の鍵を握っているとの報告がある。今回の結果は、ERK と JNK のバランスがヒト正常細胞の UVC 照射によるアポトーシスを制御し、さらにこのバランスが酸素ストレスにより影響を受けることを示唆する。UVC による細胞致死が、主として DNA 損傷により規定されることは明白である。しかし、酸素ストレスの少ない環境ではアポトーシスが抑えられ細胞生存率が上昇した今回の結果は、酸素ストレスによる MAPKs の活性化の制御が、細胞の UVC に対する応答性を修飾できることを示す。このよう酸素ストレスを介したシグナル伝達経路は、DNA 光産物は生成せず、主として酸素ストレスが生じる生理的な線量域、すなわち UVA や可視光照射を受けた細胞においては、もっと重要であろう<sup>1,4,32,33)</sup>。

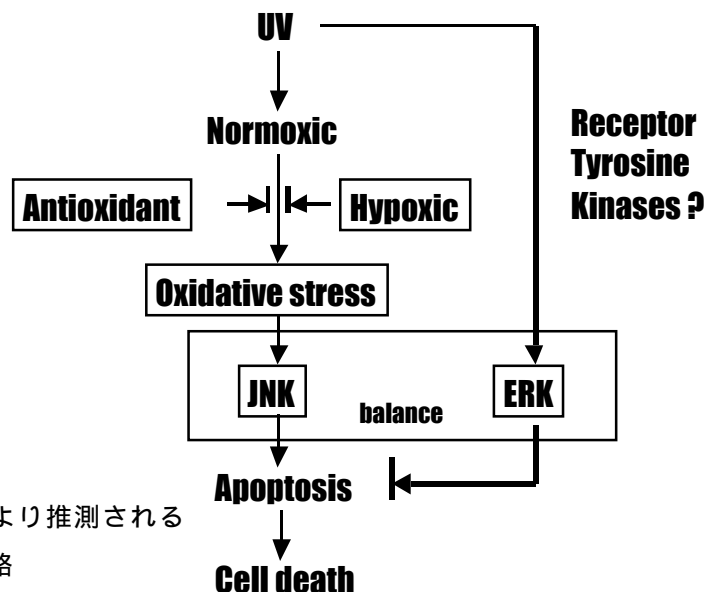


Fig.7 本研究の結果より推測される UVC シグナル伝達経路

結論として、ヒト正常細胞は酸素環境によって UVC に対する異なった応答を示し、そこには MAPKs の異なった活性化パターンが関与していた。p53 やその下流の分子群など DNA 損傷に起因する他のシグナル分子も、細胞周期制御に影響するなどして細胞応答性に関わっていることも知られている<sup>34,35)</sup>。したがって、今後はこれら異なるシグナル伝達経路間のクロストークを明らかにすることにより、UVC に対する細胞の応答機構の全貌を知ることができるであろう。

## 11. 今後の展開

考察の項で述べた、酸素ストレスが JNK 経路に入り込む分子機構についての実証が必要である。また、より生理的に近い UV ストレスを扱う意味で、UVA、UVB との比較研究も重要である。この点に関しては、UVA によるメラノサイトの色素産生機構に着目した研究を開始しており、その予備的結果を別稿で紹介する。

## 12. 参考文献

- 1) J. Cadet, M. Berger, T. Douki, B. Morin, S. Raoul, J.-L. Ravanat and S. Spinelli: Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage, *Biol. Chem.*, 378, 1275-1286 (1997)
- 2) Y. D. Devary, R. A. Gottlieb, T. Smeal and M. Karin: The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases, *Cell*, 71, 1081-1091 (1992)
- 3) C. Sachsenmainer, A. Radler-Pohl, R. Zinck, A. Nordheim, P. Herrlich, P. and H. J. Rahmsdorf: Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response, *Cell*, 78, 963-972 (1994)
- 4) K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, P. Brenneisen, M. Schauen, R. Blaudschun, and J. Wenk: UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging, *Biol. Chem.*, 378, 1247-1257 (1997)
- 5) R. Huang, J.-X. Wu, Y. Fan and E. Adamson: UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates, *J. Cell Biol.*, 133, 211-220 (1996)
- 6) B. Derijard, M. Hibi, I.-H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin and R. Davis: JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain, *Cell*, 76, 1025-1037 (1994)
- 7) C. Rosette and M. Karin: Ultraviolet Light and Osmotic Stress: Activation of the JNK Cascade Through Multiple Growth Factor and Cytokine Receptors, *Science*, 274, 1194-1197 (1996)
- 8) Z.-G. Liu, R. Baskaran, E. T. Lea-Chou, L. D. Wood, Y. Chen, M. Karin and J. Y. J. Wang: Three distinct signalling responses by murine fibroblasts to genotoxic stress, *Nature*, 384, 273-276 (1996)
- 9) P. Herrlich, C. Blattner, A. Knebel, K. Bender and H. J. Rahmsdorf: Nuclear and

- non-nuclear targets of genotoxic agents in the induction of gene expression. Shared principles in yeast, rodents, man and plants, *Biol. Chem.*, 378, 1217-1229 (1997)
- 10) K. Bender, M. Goettlicher, S. Whiteside, H. J. Rahmsdorf and P. Herrlich: Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF- $\kappa$ B by UV, *EMBO J.*, 17, 5170-5181 (1998)
  - 11) R. Seger and E. G. Krebs: The MAPK signaling cascade, *FASEB J.*, 9, 726-735 (1995)
  - 12) A. J. Whitmarsh and R. J. Davis: Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways, *J. Mol. Med.*, 74, 589-607 (1996)
  - 13) C. E. Canman and M. B. Kastan: Three paths to stress relief, *Nature*, 384, 213-214 (1996)
  - 14) N. Matsuda, N. Morita, K. Matsuda and M. Watanabe: Proliferation and differentiation of human osteoblastic cells associated with differential activation of MAP kinases in response to epidermal growth factor, hypoxia, and mechanical stress in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249, 350-354 (1998)
  - 15) S. Zhuang, S. Hirai, K. Mizuno, A. Suzuki, K. Akimoto, Y. Izumi, A. Yamashita and S. Ohno: Involvement of protein kinase C in the activation of extracellular signal-related kinase 1/2 by UVC irradiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240, 273-278 (1997)
  - 16) G. Fritz and B. Kaina: Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 by UV irradiation is inhibited by wortmannin without affecting c-jun expression, *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1768-1774 (1999)
  - 17) Z. Xia, M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis and M. E. Greenberg: Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis, *Science*, 270, 1326-1331 (1995)
  - 18) X. Wang, J. L. Martindale, Y. Liu and N. J. Holbrook: The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival, *Biochem. J.*, 333, 291-300 (1998)
  - 19) A. G. Tsai, B. Friesenecker, M. C. Mazzone, H. Kerger, D. G. Buerk, P. C. Johnson and M. Intaglietta: Microvascular and tissue oxygen gradients in the rat mesentery, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 95, 6590-6595 (1998)
  - 20) M. Watanabe, M. Suzuki, K. Suzuki, K. Nakano and K. Watanabe: Effect of multiple irradiation with low doses of gamma-rays on morphological transformation and growth ability of human embryo cells in vitro, *Int. J. Radiat. Biol.*, 62, 711-718 (1992)
  - 21) Y. A. Ioannou and F. W. Chen: Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis, *Nucleic Acids Res.*, 24, 992-993 (1996)

- 22) D. Peus, R. A. Vasa, A. Meves, M. Pott, A. Beyerle, K. Squillace and M. R. Pittelkow: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, 110, 966-971 (1998)
- 23) K. Guillemin and M. A. Krasnow: The hypoxic response: Huffing and HIFing, *Cell*, 89, 9-12 (1997)
- 24) N. S. Waleh, J. Calaoagan, B. J. Murphy, A. M. Knapp, R. M. Sutherland and K. R. Laderoute: The redox-sensitive human antioxidant responsive element induces gene expression under low oxygen conditions, *Carcinogenesis*, 19, 1333-1337 (1998)
- 25) V. Adler, A. Schaffer, J. Kim, L. Dolan and Z. Ronai: UV irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways, *J. Biol. Chem.*, 270, 26071-26077 (1995)
- 26) Z. Assefa, M. Garmyn, R. Bouillon, W. Merlevede, J. R. Vandenheede and P. Agostinis: Differential stimulation of ERK and JNK activities by ultraviolet B irradiation and epidermal growth factor in human keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, 108, 886-891 (1997)
- 27) Y. Y. C. Lo, J. M. Wong and T. F. Cruz: Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases, *J. Biol. Chem.*, 271, 15703-15707 (1996)
- 28) M. Saitoh, H. Nishitoh, M. Fujii, K. Takeda, K. Tobiume, Y. Sawada, M. Kawabata, K. Miyazono and H. Ichijo: Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1, *EMBO J.*, 17, 2596-2606 (1998)
- 29) V. Adler, Z. Yin, S. Y. Fuchs, M. Benezra, L. Rosario, K. D. Tew, M. R. Pincus, M. Sardana, C. J. Henderson, C. R. Wolf, R. J. Davis and A. Ronai: Regulation of JNK signaling by GSTp, *EMBO J.*, 18, 1321-1334 (1999)
- 30) M. Verheij, R. Bose, X. Lin, B. Yao, W. Jarvis, S. Grant, M. Birrer, E. Szabo, L. Zon, J. Kyriakis, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks and R. Kolesnick: Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signaling in stress-induced apoptosis, *Nature*, 380, 75-79 (1996)
- 31) C. R. Middaugh, H. Mach, C. J. Burke, D. B. Volkin, J. M. Dabora, P. K. Tsai, P.K., M. W. Bruner, J. A. Ryan and K. E. Marfia: Nature of the interaction of growth factors with suramin, *Biochemistry*, 31, 9016-9024 (1992)
- 32) M. Djavaheri-Mergny, J.-L. Mergny, F. Bertrand, R. Santus, C. Maziere, C., L. Dubertret and J.-C. Maziere: Ultraviolet-A induces activation of AP-1 in cultured human keratinocytes, *FEBS Letters*, 384, 92-96 (1996)
- 33) L.-O. Klotz, K. Briviba and H. Sies: Singlet oxygen mediates the activation of JNK by UVA radiation in human skin fibroblasts, *FEBS letters*, 408, 289-191 (1997)
- 34) M. Kapoor and G. Lozano: Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 95, 2834-2837 (1998)

- 35) H. Lu, Y. Taya, M. Ikeda and A. J. Levine: Ultraviolet radiation, but not gamma radiation or etoposide-induced DNA damage, results in the phosphorylation of the murine p53 protein at serine-389, Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 95, 6399-9402 (1998)

### 13 . 研究業績

#### 13-1 . 原著論文

- 1) N. Matsuda, M. Horikawa, L.-H. Wang, M. Yoshida, K. Okaichi, Y. Okumura and M. Watanabe: Differential activation of MAP kinases in response to UVC radiation under different oxygen tensions, submitted.

#### 13-2. 総説など (proceedings)

- 1) N. Matsuda, N. Morita and M. Watanabe: Differential activation of MAP kinases in response to UV radiation under different oxygen tension. Photomed. Photobiol., 20, 37-38 (1998).
- 2) N. Matsuda, M. Horikawa, Y. Yoshida, Y. Okumura and M. Watanabe: Role of oxygen stress in intracellular signal transduction via MAP kinases in UV-C irradiated human cells, Photomed. Photobiol., submitted.

#### 13-3 . 国際学会発表 なし

#### 13-4 . 国内学会発表

- 1) 森田直子, 松田尚樹, 王立紅, 渡邊正己 : UV 照射後の選択的 MAPK 活性化における酸素の役割について, 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.
- 2) 松田尚樹, 森田直子, 渡邊正己 : UV および酸素ストレスに対する細胞の応答性と MAPK 活性化の関連性, 第 20 回日本光医学・光生物学会, 平成 10 年 7 月 18 日-19 日, 熊本.
- 3) 松田尚樹, 堀川美和, 吉田正博, 奥村寛, 渡邊正己 : UVC による MAPK を介したシグナル伝達機構の解析, 第 21 回日本光医学・光生物学会, 平成 11 年 8 月 6 日-7 日, 金沢.
- 4) 松田尚樹, 堀川美和, 吉田正博, 奥村寛, 渡邊正己 : UV による MAP キナーゼ活性化の制御機構, 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.

#### 13-5 . 新聞など なし

#### 13-6 . 特許 なし

### 14 .

- (1) Differential Activation of MAP Kinases in Response to UVC Radiation under Different Oxygen Tensions

(2) Nagasaki University Radioisotope Center

(3) Naoki Matsuda

(4) Miwa Horikawa (Nagasaki University School of Pharmaceutical Sciences)

Li-Hong Wang (Nagasaki University School of Pharmaceutical Sciences)

Masahiro Yoshida (Nagasaki University Radioisotope Center)

Kumio Okaichi (Nagasaki University School of Medicine)

Yutaka Okumura (Nagasaki University Radioisotope Center)

Masami Watanabe (Nagasaki University School of Pharmaceutical Sciences)

(5) 1997 – 1999

(6) Abstract

UV-induced oxygen stress is implicated in signal transduction pathways that lead to the modification of cellular responses to UVC radiation. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs), including extracellular-signal related kinase (ERK) 1/2, c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 are recognized as such signaling molecules. However, the mechanisms by which these molecules respond to the input of UV-induced signal transduction pathways and the resulting biological functions of each pathway are not well understood. In this study, we investigated whether the level of oxygen tension of culture was responsible for the differential activation of MAPKs and different cellular outcomes. The intracellular oxidative level of normal human fibroblasts in a normal atmosphere (normoxic, 20% O<sub>2</sub>) was increased within 30 min after UVC (254nm) irradiation. When cells were cultured at lower oxygen tension in the presence of an antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC) or under physiologically hypoxic (5% O<sub>2</sub>) conditions, the elevation of the oxidative level by UV-irradiation was significantly reduced. Among MAPKs, ERK1/2 was activated by UV regardless of the oxidative level, while JNK activation was inhibited in NAC-treated and in hypoxic cultures. In addition, in cultures at lower oxygen tension, there was less apoptosis and cell survival was enhanced. These results suggested that UV-induced oxidative stress was converted to intracellular signaling through the JNK pathway. Furthermore, the balance between ERK1/2 and JNK activities after UV irradiation under different oxygen tensions possibly modified cellular outcome in response to UV.