


財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金—在留中国人研究者—報告書

2009年 3月15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 郭文智 
指導責任者名： 鈴木信夫 職名： 教授
所属機関名： 千葉大学 環境影響生化学
〒 260-8670
所在地： 千葉市中央区支那1-8-1
電話： 043-226-2041 内線： 5133

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

ヒト細胞においてユビキチン様蛋白質 sumo-3 を介する X線応答反応における分子メカニズム

3. 成果の概要 (100字程度)

X線照射後は DNA合成レベルが上昇する現象が「コピー」の異常由来細胞で見出されている。本研究では、この現象における sumo-3 遺伝子の発現低下の関与が調べられた。sumo-3 発現を抑制した HeLa 細胞において、二次元電気泳動において差別的発現解析を行い、X線照射後は量的変動するタンパク質を複数見出した。これは、Nm23-H1 と同定され、sumo-3 と結合することから His-sumo-3 過剰発現 HeLa において確認された。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (学会名・演題)

2008.11.19~21. 日本放射線影響学会第51回大会.

ヒト細胞で見られる X線照射後の DNA合成能の増大に
関するユビキチン様タンパク sumo-3 の役割.

(2) 発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・題名)

ヒト細胞においてユビキチン様蛋白質 SUMO-3 を介する X 線応答反応における分子メカニズムの解明

研究者氏名	郭文智
中国所属機関	河北医科大学薬理学 助手
日本研究機関	千葉大学 院生
指導責任者	教授 鈴木 信夫
共同研究者	菅谷茂、佐藤守、野村文夫

要旨

細胞の DNA 合成レベルは放射線照射後通常低下するが、X 線照射後に DNA 合成レベルが上昇する現象がゴーリン患者由来細胞で見出されている。本研究では、この現象におけるユビキチン様 SUMO-3 遺伝子の発現低下の関与が調べられた。RNA 干渉法により SUMO-3 発現を抑制させた HeLa 細胞を作製し、X 線照射後の DNA 合成レベルをパルス標識法を用いて調べたところ、X 線照射後の DNA 合成誘導が見られた。また、SUMO-3 発現を抑制させた HeLa 細胞において、二次元電気泳動法により差別的発現解析を行い、X 線被照射後に量的変動するタンパク質を複数見出した。うち一つは、Nm23-H1 と同定され、Nm23-H1 の siRNA 処理でも、X 線照射後の DNA 合成上昇が見られた。一方、X 線照射後に Nm23-H1 は SUMO-3 と結合することが His-SUMO-3 過剰発現 HeLa 細胞において確認された。

Key Words Nm23-H1, DNA synthesis, SUMO-3, X-ray irradiation, human cell

緒言:

細胞の DNA 合成レベルは放射線照射後低下することは、生物種を問わない不変の現象である。ところが、X 線照射後に DNA 合成レベルが上昇する現象もあることをゴーリン患者由来細胞で見出している。さらに、X 線照射後の DNA 合成能の誘導にユビキチン様 SUMO-3 遺伝子の発現低下が関わるとの示唆を得ている。SUMO-3 タンパク質は様々なタンパク質の局在化、安定性に関わることが知られている。そこで、本研究では、SUMO-3 と結合するタンパク質を探索することにより、SUMO-3 を介した X 線照射後の DNA 合成上昇に関わる分子機構の解明を試みた。

方法:

SUMO-3 タンパク質の産生を RNA 干渉法(siRNA)により抑制させた HeLa 細胞を作製し、その細胞において、X 線照射後の DNA 合成レベルを pulse-labeling 法を用いて調べた。また、SUMO-3 発現抑制させた HeLa 細胞において、二次元電気泳動法により差次的発現解析を行い、X 線被照射後に量的変動するタンパク質を探索した。この探索したタンパク質の発現を RNA(siRNA)干渉法により HeLa 細胞において抑制し、X 線照射後の DNA 合成レベルを測定した。また、His-SUMO-3 過剰発現 HeLa 細胞を作製し、SUMO-3 と結合するタンパク質を検出し、目的とするタンパク質の SUMO 化の有無を調べた。

結果:

ゴーリン患者由来細胞のみならず、HeLa 細胞においても、SUMO-3 の siRNA 処理により、X 線

照射後の DNA 合成誘導が見られた。一方、SUMO-3 産生を低下させたことに連動して、X 線照射後発現量に変化する複数のタンパク質を見出した。うち一つは、Nm23-H1 と同定され、NM23-H1 の siRNA 処理でも、X 線照射後の DNA 合成上昇が見られた。一方、X 線照射後に Nm23-H1 は SUMO-3 と結合することが確認された。

考察:

Nm23-H1 は、癌転移の抑制因子として単離され、DNA 代謝に関わるヌクレオチドニリン酸キナーゼ(NDP kinase)活性を持つことが知られている。今回、SUMO-3 の発現抑制した場合のみ、X 線照射後に Nm23-H1 タンパクの低下が見られ、しかも、X 線照射後の DNA 合成上昇に Nm23-H1 の関与が示唆されたことから、SUMO-3 は Nm23-H1 と共に DNA 合成に関わるメカニズムのあることが示唆された。

参考文献:

- [1] K. Fujii, N. Suzuki, S. Ishijima, K. Kita, T. Sonoda, M. Dezawa, K. Sugita, H. Niimi, Abnormal DNA synthesis activity induced by X-rays in nevoid basal cell carcinoma syndrome cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240 (1997) 269-272.
- [2] S. Sugaya, H. Nakanishi, H. Tanzawa, K. Sugita, K. Kita, N. Suzuki, Down-regulation of *SMT3A* gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in NBCCS cells, *Mutat. Res.* 240 (2005) 327-332.
- [3]. V. Lapenta, P. Chiurazzi, P. van der Spek, A. Pizzuti, F. Hanaoka, C. Brahe, SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family, *Genomics.* 40 (1997) 362-366.
- [4] M. Sramko, J. Markus, J. Kabát, L. Wolff, J. Bies, Stress-induced inactivation of the c-Myb transcription factor through conjugation of SUMO-2/3 proteins, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 40065-40075.
- [5] Y. Azuma, A. Arnautov, M. Dasso, SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis, *J. Cell. Biol.* 163 (2003) 477-87.
- [6] H. D. Ulrich, S. Vogel, A. A. Davies, SUMO keeps a check on recombination during DNA replication. *Cell Cycle* 4 (2005) 1699-1702.
- [7] F. Z. Watts: Sumoylation of PCNA, wrestling with recombination at stalled replication forks, *DNA Repair (Amst).* 5 (2006) 399-403.
- [8] T. Li, R. Santockyte, R.F. Shen, E. Tekle, G. Wang, D.C. Yang, P.B. Chock, Expression of SUMO-2/3 induced senescence through p53- and pRB-mediated pathways. *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 36221-36227.
- [9] Y. Kozaki, T. Ariki, M. Kubo, T. Onishi, M. Muramatu, trans-4-amidinocyclohexanecarboxylic acid 4-tert-butylphenyl ester, a trypsin inhibitor, blocks entry of HeLa cells from G2 phase into mitosis, *Biol. Pharm. Bull.* 16 (1993) 829-833.
- [10] L. Zhai, K. Kita, C. Wano, Y. Wu, S. Sugaya, N. Suzuki, Decreased cell survival and DNA repair capacity after UVC irradiation in association with down-regulation of GRP78/BiP in human R5a cells, *Exp. Cell. Res.* 305 (2005) 244-252.
- [11] C. Pasquali, S. Frutiger, M.R. Wilkins, G.J. Hughes, R.D. Appel, A. Bairoch, D. Schaller, J. Sanchez, D.F. Hochstrasser: Two-dimensional gel electrophoresis of *Escherichia coli* homogenates, the *Escherichia coli* SWISS-2DPAGE database, *Electrophoresis.* 17 (1996) 547-555.
- [12] L. Tonella, B.J. Walsh, J.C. Sanchez, K. Ou, M.R. Wilkins, M. Tyler, S. Frutiger, A.A. Gooley, I.

- Pescaru, R.D. Appel, J.X. Yan, A. Bairoch, C. Hoogland, F.S. Morch, G.J. Hughes, K.L. Williams, D.F. Hochstrasser, '98 Escherichia coli SWISS-2DPAGE database update, Electrophoresis. (1998) 1960-1971.
- [13] J. Lu, T. Suzuki, M. Satoh, S. Chen, T. Tomonaga, F. Nomura, N. Suzuki, Involvement of aldolase A in X-ray resistance of human HeLa and UV(r)-1 cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 369 (2008) 948-952.
- [14] T. Nishimori, T. Tomonaga, K. Matsushita, M. Oh-Ishi, Y. Koderu, T. Maeda, F. Nomura, H. Matsubara, H. Shimada, T. Ochiai, Proteomic analysis of primary esophageal squamous cell carcinoma reveals downregulation of a cell adhesion protein, periplakin, Proteomics 6 (2006) 1011-1018.
- [15] H. Saitoh, H. Joseph, Functional Heterogeneity of Small Ubiquitin-Related Protein Modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3, J. Biol. Chem. 275 (2000) 6252-6258.
- [16] J. Shimada, T. Maruyama, T. Hosogi, J. Tominaga, N. Kamiya, M. Goto, Conjugation of DNA with protein using His-tag chemistry and its application to the aptamer-based detection system, Biotechnol Lett. 30 (2008) 2001-2006.
- [17] M.L. Lacombe, L. Milon, A. Munier, J.G. Mehus, D.O. Lambeth, The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases, J. Bioenerg. Biomembr 32 (2000) 247-258.
- [18] P.S. Steeg, G. Bevilacqua, L. Kopper, U.P. Thorgeirsson, J.E. Talmadge, L.A. Liotta, M.E. Sobel, Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential, J. Natl. Cancer. Inst. 80 (1988) 200-204.
- [19] J. Nordman, O. Skovgaard, A. Wright, A novel class of mutations that affect DNA replication in *E coli*, Mol Microbiol. 64 (2007) 125-138.
- [20] MH. Bosnar, R. Bago, K. Gall-Troselj, T. Streichert, J. Pavelic: Downstream targets of Nm23-H1, gene expression profiling of CAL 27 cells using DNA microarray, Mol Carcinog. 8 (2006) 627-633.
- [21] E. Warbrick, The puzzle of PCNA's many partners, BioEssays. 22 (2000) 997-1006.
- [22] L. Haracska, I. Unk, Robert E. Johnson, B. Phillips, J. Hurwitz, L. Prakash, S. Prakash, Stimulation of DNA Synthesis Activity of Human DNA Polymerase α by PCNA, Mol. Cell. Biol. 22 (2002) 784-791.
- [23] J. Xu, GF. Morris, p53-mediated regulation of proliferating cell nuclear antigen expression in cells exposed to ionizing radiation, Mol. Cell. Biol. 19 (1999) 12-20.
- [24] M. Scheffner, JM. Huibregtse, RD. Vierstra, PM. Howley, The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53, Cell. 75 (1993) 495-505.
- [25] J. Wesierska-Gadek, D. Schloffer, V. Kotala, M. Horky, Escape of p53 protein from E6-mediated degradation in HeLa cells after cisplatin therapy, Int. J. Cancer, 101 (2002) 128-136.
- [26] S. Nakahara, A. Raz, Regulation of cancer-related gene expression by Galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway, Cancer. Metastasis. Rev. 26 (2007) 605-610.
- [27] R. L. Welchman, C. Gordon, R.J. Mayer, ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6 (2005) 599-609.
- [28] F. Melchior, SUMO--nonclassical ubiquitin, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16 (2000) 591-626.

注:本研究は、2008年11月19日「日本放射線影響学会」にてポスター発表