

論文の内容の要旨

論文題目 放射線ストレスによるメチオニン転移 RNA の顆粒形成の解析

氏名 片野 厚人

【序文】

癌治療または健康への放射線被ばくの影響を検討するに際して、個々の細胞が電離放射線にどのように生物学的に反応するかは非常に重要である。電離放射線照射の直接・間接作用による deoxyribonucleic acid (DNA) への影響は一般によく知られた反応である。一方、古典的生物観では DNA の転写産物である Ribonucleic acid (RNA) は DNA 情報をタンパク質に変換する中間産物としての認識であった。しかしながら、近年になりタンパク質を直接コードしないゲノム DNA 領域からの非コード RNA (non-coding RNA ; ncRNA) が機能性 RNA として遺伝子調節過程に積極的に働いていることが分かるに従い、外因性ストレスに対する RNA 応答解析も 1990 年代以降に盛んとなってきている。

最も古くより知られている ncRNA の一つである転移 RNA (tRNA) はタンパク質への翻訳過程で中心的な役割を果たしていることは古くから知られてきたが、そのストレス反応に関しては近年になるまで明らかとされてこなかった。一例として、酵母を用いた飢餓状況下の報告においては tRNA の核内蓄積が指摘され、tRNA の細胞質-核輸送系がストレス応答機能に関わる可能性が示唆されている。

熱ストレスにおいてはメチオニン tRNA (tRNA^{Met}) が積極的に核へ移行し、それに伴い核内で顆粒を形成する現象が報告されている。更に、同顆粒は熱ショック蛋白質の発現制御に関わる転写因子群の一つである HSF1 (heat shock factor 1) と共局在を示した。これは熱ストレス時に tRNA^{Met} が核ストレス小体 (nuclear stress body) の構成成分である可能性を示唆している。また、メチオニンをコードする tRNA は翻訳開始時に用いられる tRNA (initiator tRNA^{Met} : Meti) と伸長時に使用される tRNA (elongator tRNA^{Met} : Mete) とは配列が異なり、このサブクラスによる核内移行の違いについても明らかにされている。然しながら、同反応がメチオニン以外の tRNA に関する影響や、他のストレス (酸化、飢餓、低酸素、放射線等) に対しても保存された反応であるかに関しては明らかにされていない。

歴史的に放射線ストレスに関しても短期的・長期的な面から多くの研究が為されてきたが、現在でも細胞レベルでの人体へのエクソ線照射の影響については未知の部分も多い。電離放射線が tRNA の細胞内動態に与える影響に着目をした研究はこれまでになく、新たな知見をもたらさうと考へ本研究を発足した。

【目的】

本研究は、放射線ストレスによる細胞への影響を tRNA の観点から理解するために、ヒト由来培養細胞株においてエックス線照射時の tRNA の細胞内局在を明らかにすることを目的とした。ターゲットとする tRNA としては翻訳開始時に重要と思われるメチオニン tRNA (Meti、Mete) を選択した。

【方法】

細胞内の tRNA 及び後述のマーカータンパク質の検出に関しては蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (Fluorescence in situ hybridization: FISH) 法及び免疫蛍光法 (immunofluorescence : IF) を使用した。電離放射線が tRNA の細胞内分布におよぼす影響を検討するため、ジゴキシゲニン (DIG) にラベルされた RNA プロブを用いてエックス線照射 2 時間後の Meti および Mete の細胞内分布の検出を行った。コントロール群としては非照射群の細胞を使用し、照射線量は 0.5Gy - 1.0Gy - 4.0Gy とした。FISH に使用した RNA probe は、ヒト培養細胞溶解液 (lysate) と設計したプライマーを用いて PCR (polymerase chain reaction) により生成されたものを使用し、細胞核の同定には 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) を使用した。同系を用いて、1) ヒト非小細胞肺癌由来細胞株 H1299 における Mete 及び Meti の顆粒形成の有無及び局在を有顆粒細胞の割合から検討、2) p53 発現 H1299 (wt p53 H1299) に関して同様の検討、3) 生成された Mete 顆粒とストレスマーカー蛋白との共局在の観測、4.) 0.5Gy 照射時における他の非小細胞肺癌系列細胞 (A549) における Mete 及び Meti の顆粒形成及びストレスマーカー蛋白との共局在の解析、を行った。

【結果】

エックス線照射後の非小細胞肺癌由来細胞株 (H1299) に Mete 顆粒の形成が認められた。伸長型 tRNA^{Met} である Mete に関しては 0.5Gy、1Gy、4Gy 照射群においてはコントロール群に比して観測細胞に対する有顆粒細胞の割合の増加が確認された。一方、同じ tRNA^{Met} のサブクラスである Meti に関してはコントロール群に比して明らかな有顆粒細胞の増加は認められなかった。また、ほぼ全例において Mete 顆粒は細胞質に認められた。

また、H1299 細胞株は p53 を欠損しているため、結果が p53 欠損株に特異的な反応かを確認するために野生型 p53 (wild type p53: wt p53) を発現させた細胞株 (wt p53 H1299) でも同様の照射実験をおこなった。結果としては H1299 の時と同様に Mete に特異的に有顆粒細胞割合の増加を認め、Meti では増加が確認されなかった。

次に、エックス線照射群の H1299 細胞に関して形成された Mete の顆粒が既知のストレス応答に関わる細胞質顆粒と一致するかに関して実験を行った。ストレス応答に関する細胞質顆粒としてはプロセッシングボディ (Processing body : PB) とストレス顆粒 (Stress granule : SG) が知られている。SG および PB は幾つかのタンパク質成分を共有するが、それぞれに固有なマーカーも存在する。本研究ではマーカータンパクとして PB 特異的マーカーである mRNA デキャップ酵素 1A (mRNA decapping enzyme 1a : Dcp1a)、SG 特異的マ-

カーであるポリアデニル酸結合タンパク質(polyadenylate binding protein-1: PABP1)、SG と PB に共通のマーカーである T 細胞細胞内抗原 1 (T-cell intracellular antigen 1 : TIA1)について染色を行なった。結果として Mete 顆粒は TIA1 と共局在を認めたが、他の Dcp1a や PABP とは一致しなかった。この結果は wt p53 H1299 に関しても同様であり、Mete 顆粒は TIA1 のみに共局在を呈した。

最後に同現象が H1299 系列に限ったものでないことを確認するため、他の非小細胞肺癌系列細胞 A549 において 0.5Gy の照射実験を行った。H1299、wt-p53 H1299 と同様に Mete に関しては顆粒の形成が検出された一方、Meti では明らかな顆粒形成は確認できなかった。共染色に関しても Dcp1a、TIA1、PABP1 について染色を行ったが、H1299 系列の時と同様に、Mete 顆粒の位置は Dcp1a、PABP1 とは一致せず、TIA1 と共局在を認めた。

【考察】

今回検出された Mete 顆粒は放射線照射による細胞内 tRNA の局在の変化を示唆するものである。共局在を認めた TIA1 は SG の成分であり、TIA1 の凝集は SG の形成を促進するとの報告がある。SG の形成はストレスにより誘導され、外部ストレスの結果に生じた非翻訳 mRNA の貯蔵庫としての役割を果たすことが知られている。tRNA は mRNA 上の塩基配列を元にタンパク質合成に働くことから、一つの可能性として、非翻訳 mRNA の周囲に Mete の凝集が認められたのではないかと考えられる。しかしながら、典型的な SG のマーカータンパク質(PABP1)とは局在しなかったことは不明点であり、他のストレスマーカーでの共染色の実験を検討していく必要がある、

この一方で Meti に関しては顆粒形成を認めなかった。Meti に関してはストレス付加時の分解促進や核内移行等が報告されており、細胞質濃度低下に起因して顆粒形成を認めなかった可能性がある。細胞質の tRNA 濃度は tRNA 新規産出、核内-細胞質輸送因子、tRNA 成熟過程、tRNA 代謝により厳密に調整を受けているため、これら検討が今後の課題である。

また、今回の実験においては、実際の翻訳抑制や細胞周期といった表現型との関連の有無に関して言及することはできなかった。このため、今回の結果の解釈に関しては限定的な内容しか言及することができないが、ストレスマーカーへの応用技術に展開できる可能性も有すると期待している。

現状で放射線ストレスマーカーとして最も確立されたものとして、 γ -H2AX、53BP1 が挙げられる。これらは、放射線により誘発された DNA 二本鎖切断の修復過程における損傷センサーや修復タンパク質を検出したものである。これら分子マーカーは DNA 損傷修復機構における役割も確立している反面、あくまで DNA 損傷を検出しているマーカーである。DNA 損傷とは独立に、もしくはそれに近い形で tRNA による顆粒形成が発生するとすれば、DNA 損傷を介さずに放射線の影響を検出することが可能になるかもしれない。所謂、エピジェネティックなストレス応答機構の一つとして細胞にこのような機構が備わってい

る可能性を本研究は示唆している。p53の有無に関わらず顆粒検出が認められたことから、この可能性を支持する。然しながら、これを確認するためには既存のDNAマーカー(γ -H2AX等)との共染色を行って、tRNA顆粒形成とのDNA損傷との相関を検討する必要がある。更には γ -H2AX、53BP1はDNA損傷過程における役割が明確化しているが、tRNA顆粒が細胞内代謝における役割は不明であり今後の更なる研究を積み重ねる必要がある。

【結論】

本研究を通じて、放射線ストレス下のヒト由来細胞株を用いて得られた主な知見は以下の通りである。

エックス線照射後2時間の時点で、ヒト非小細胞肺癌由来細胞株(H1299)、p53-発現H1299株(wt p53 H1299)及びヒト非小細胞肺癌由来細胞株A549細胞において、エックス線照射によりMet^e顆粒の形成が認められた。同じメチオニンtRNAであるMetⁱではコントロール群との間に明らかな有意差を認めず、顆粒形成現象はMet^eに特異的であることを明らかにした。このMet^e顆粒は細胞質に認められ、SGを示唆するTIA1と共局在を認めた。

本研究はヒト細胞におけるtRNAの細胞内分布へのエックス線照射による影響をtRNAプローブを用いて可視化した点に新規性を有する。検出されたtRNA顆粒が実際に細胞内で果たしている役割に関しては今後の検討課題である。応用の可能性としてはDNA損傷修復機構に独立した新規の分子マーカーとして利用可能である可能性も示唆される。しかしながら、時系列変化、顆粒内成分の検討、他刺激との比較、他細胞種での再現性、他分子マーカーとの比較等の面において更なる研究を積み重ねる必要がある。