

低線量放射線と細胞内シグナリング

鈴木啓司,^{*,a} 児玉靖司,^b 渡邊正己^c

Low-dose Radiation Effects and Intracellular Signaling Pathways

Keiji SUZUKI,^{*,a} Seiji KODAMA,^b and Masami WATANABE^c

^aDivision of Radiation Biology, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki City 852-8521, Japan, ^bRadiation Biology Laboratory, Radiation Research Center, Organization for University-Industry-Government Cooperation, Osaka Prefecture University, 1-2 Gakuen-cho, Sakai City 599-8570, Japan, and ^cLaboratory of Radiation Biology, Division of Radiation Life Science, Kyoto University Research Reactor Institute, 1010 Asashiro-nishi, Kumatori-cho, Sennan-gun, Osaka 590-0494, Japan

(Received April 25, 2006)

Accumulated evidence has shown that exposure to low-dose radiation, especially doses less than 0.1 Gy, induces observable effects on mammalian cells. However, the underlying molecular mechanisms have not yet been clarified. Recently, it has been shown that low-dose radiation stimulates growth factor receptor, which results in a sequential activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. In addition to the activation of the membrane-bound pathways, it is becoming evident that nuclear pathways are also activated by low-dose radiation. Ionizing radiation has detrimental effects on chromatin structure, since radiation-induced DNA double-strand breaks result in discontinuity of nucleosomes. Recently, it has been shown that ATM protein, the product of the ATM gene mutated in ataxia-telangiectasia, recognizes alteration in the chromatin structure, and it is activated through intermolecular autophosphorylation at serine 1981. Using antibodies against phosphorylated ATM, we found that the activated and phosphorylated ATM protein is detected as discrete foci in the nucleus between doses of 10 mGy and 1 Gy. Interestingly, the size of the foci induced by low-dose radiation was equivalent to the foci induced by high-dose radiation. These results indicate that the initial signal is amplified through foci growth, and cells evolve a system by which they can respond to a small number of DNA double-strand breaks. From these results, it can be concluded that low-dose radiation is sensed both in the membrane and in the nucleus, and activation of multiple signal transduction pathways could be involved in manifestations of low-dose effects.

Key words—radiation; signal transduction; DNA damage; phosphorylation; ATM

1. はじめに

放射線は、治療や診断など生命医療科学の分野で広く利用されているが、放射線の持つ生物作用の多くは 1 Gy を超えるような線量を用いて研究されてきており、日常授受しているレベルの放射線や、治療・診断で用いられているようなレベルの放射線、いわゆる低レベルの放射線の影響は、詳細に検討さ

れることは少なかった。しかしながら、放射線適応応答 (radioadaptive response) の発見を契機として、¹⁾ 0.1 Gy 以下の今日低線量放射線と定義されている低レベル放射線の生物影響が様々な角度から研究されるようになってきた。²⁻⁶⁾ その結果、低線量放射線による生体影響の誘導が複数の研究者によって確認されるに至り、低線量放射線が生体に対し確実に作用していることが認識されるようになってきた。しかしながら、これら低線量放射線影響の発現には何らかの分子メカニズムが関与しているはずであるが、つい最近まで、その実態は不明であった。本レビューでは、われわれ研究グループが得た細胞レベルでの研究結果を中心に、低線量放射線に対して細胞がどのように応答しているのか、その分子メカニズムの解明を通じて、低線量放射線影響の発現

^a長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻放射線生物学研究室 (〒852-8521 長崎市文教町 1-14), ^b大阪府立大学産学官連携機構先端科学イノベーションセンター放射線生命科学研究室 (〒599-8570 堺市学園町 1-2), ^c京都大学原子炉実験所放射線生命科学部門粒子線生物学分野粒子線生物学研究室 (〒590-0494 大阪府泉南郡熊取町朝代西 1010)

*e-mail: kzsuzuki@nagasaki-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S27 で発表したものを中心に記述したものである。

機序について考察する。

2. 低線量放射線による細胞内情報伝達経路の活性化

放射線照射による細胞影響の発現は、これまで主に細胞死の誘導や染色体異常あるいは突然変異の誘導などを指標にして調べられてきたが、物理的なエネルギー付与の多くが、細胞に対してある種のストレスとして作用するという認識から、われわれは放射線によるある種のストレスとして捉え、放射線によるストレス応答の誘導を検討した。これまでの細胞におけるストレス応答機構の研究から、ストレス応答は細胞内情報伝達経路の活性化によって起こることが明らかにされていたため、まず、放射線により活性化される情報伝達経路を同定することから始めた。細胞内情報伝達経路には、主に3つの経路が存在するといえる。1つは、細胞膜上の受容体で情報を捉え、細胞質を経由して細胞核に情報を伝達する経路、2つ目は、細胞質で情報を受容し、細胞核に情報を伝達する経路、そして3つ目は、細胞核内で発生した情報を受容し伝達する経路である。これまでも、放射線による2番目の経路であるPKC (protein kinase C) を介した経路の活性化が報告されていたが、われわれは、1番目の経路に属するMAP キナーゼ経路に着目した。その理由の1つは、低線量放射線が細胞の増殖を促進するという知見があったからである。⁷⁾

まず、電離放射線による照射により、MAP (mitogen activated protein) キナーゼの活性化があるのかどうか検討した。MAP キナーゼには、古典的な経路として3つの経路が存在する。それぞれ、ERK1/2 (Extra-cellular signal regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38 を介して細胞核内に伝達される経路である。他の情報伝達経路と同様に、MAP キナーゼ経路も上流のキナーゼによる下流メディエーターの部位特異的リン酸化によって情報が伝達される。そこで、MAP キナーゼの活性化を、リン酸化型MAP キナーゼを認識する抗体を用いたウェスタンブロット法により検討した。一連の研究は正常ヒト二倍体細胞を用いて行い、放射線照射はX線発生装置により行った。まず、MAP キナーゼを効率よく活性化するとして知られる紫外線 (UV-C) を照射したところ、3つのいずれの経路も活性化されることが明らかになった。そこで、同程

度の細胞致死効果を与える高線量の放射線を照射したところ、JNK 及び p38 では、リン酸化MAP キナーゼのバンドが検出されず、唯一 ERK1/2 のみが放射線照射後活性化することを見出した。⁷⁾

そこで、ERK1/2 経路のみに焦点を当てて、様々な線量による ERK1/2 の活性化を検討した。その結果、Fig. 1 に示すように、ERK1/2 のリン酸化レベルの亢進は、2 Gy 以上の放射線でみられると同時に、20 mGy 以上 0.1 Gy 以下の低線量放射線でも効率よく起こることが明らかになった。リン酸化レベルを照射後の時間を追って検討したところ、照射後数時間でそのレベルがピークになり、その後定常レベルまで減少した。同一細胞を用いた放射線適応応答の発現が、20 mGy から 50 mGy までの線量の範囲でみられること、また適応応答を誘導する最適条件が、放射線照射数時間後であることを考え合わせると、^{8,9)} ERK1/2 の活性化の動態は、低線量放射線により誘導される細胞影響の発現動態と極めて相関すると考えられた。そこで、ERK1/2 の活性化の分子機構を明らかにするために、ERK1/2 の上流の経路を探ることにした。

既に、ERK1/2 の活性化に係わる経路には、細胞膜に存在する増殖因子受容体を基点とする経路が知

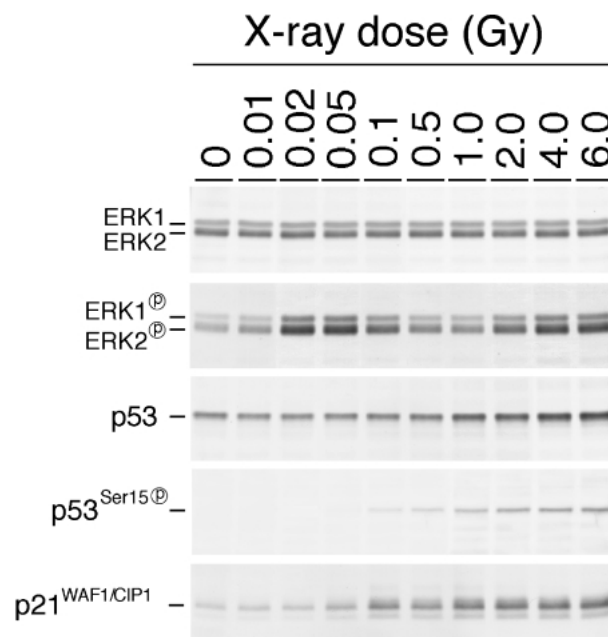


Fig. 1. Dose Dependent Phosphorylation and Activation of ERK1/2 and p53

Exponentially growing normal human diploid cells were irradiated with various doses of X-rays as indicated. Total proteins were extracted 2 hr (for p53), or 5 hr (for ERK1/2) after X-irradiation.

られていた。¹⁰ そこで、ERK1/2 の 1 つ上流のキナーゼである MEK1/2 (MAPK/ERK kinase)、及び最上流の受容体の 1 つである EGF (Epidermal growth factor) 受容体の阻害剤を用いて、低線量放射線による ERK1/2 の活性化が抑制されるかどうか調べた。その結果、MEK1/2 阻害剤である PD98059 及び EGF 受容体阻害剤である AG1478 はともに濃度依存的に ERK1/2 のリン酸化レベルを減少させることが確認できた。以上の結果から、低線量の放射線は、EGF 受容体の活性化を引き金に EGF 受容体から MEK1/2 に至る経路を活性化し、その情報を受けた ERK1/2 が細胞核内に移動して機能を発現するということが明らかになった。

次の問題は、ERK1/2 の下流で低線量放射線応答に関与する実行因子が何であるか同定することであった。先ほどと同様に、ERK1/2 の下流の因子も既に多くの分子が報告されているが、¹⁰ その中でも代表的な因子である Elk1 (member of ETS oncogene family) への情報伝達を確認した。Elk1 蛋白質に対する抗体及びリン酸化 Elk1 抗体を用いた IP (immunoprecipitation)-kinase アッセイを実施した結果、低線量放射線照射後の細胞内で、Elk1 が活性化していることを明らかにした。さらに、ERK1/2 の下流の別の因子である RSK2 (ribosome S6 kinase) についてもリン酸化 RSK2 抗体を用いて調べた結果、低線量放射線によってリン酸化が誘導されていることを確認した。以上の検討の結果、ERK1/2 への情報伝達は、最終的に細胞核内の実行因子に到達し、細胞核内の複数の標的因子を活性化していることが確認された。

3. 低線量放射線による核内情報伝達経路の活性化

細胞内情報伝達経路の活性化は、情報伝達経路に係わる因子のリン酸化を検出することが最も有効な確認方法であるが、抗リン酸化抗体を用いた方法には、細胞蛋白質を抽出してウェスタンブロットを行う方法と、細胞を固定して免疫蛍光抗体法により解析する方法とがある。上述した低線量放射線による細胞内情報伝達経路の活性化は、Fig. 1 に示すようにウェスタンブロット法による解析により検討した。その結果、EGF 受容体からの情報が細胞核内へ伝達されていることを確認した。一方、細胞核内の情報伝達経路の活性化を調べるために、細胞核

内での主要な情報伝達経路である DNA 損傷チェックポイント経路の活性化を調べた。¹¹ ここでは、DNA 損傷チェックポイント経路のメディエーターである p53 蛋白質の活性化を検討した。p53 は、癌抑制遺伝子産物として有名な蛋白質で、もともとは DNA 型の癌ウイルスである SV40 の T 抗原に結合する細胞内蛋白質として同定された。^{12,13} 当初クローニングされた遺伝子に変異を有していたことから、癌抑制遺伝子産物としての活性が考えられたが、その後野生型遺伝子がクローニングされて、その機能が癌抑制にあることが明らかになった。¹⁴⁻¹⁶ p53 は細胞核内蛋白質で 4 量体を構成し、DNA 上の PuPuPuC (AT/TA) GpyPyPy という p53 応答配列がタンデムに並んだ部位に結合して転写調節因子として機能する。¹⁷

p53 機能の調節メカニズムは、p53 の発見後しばらく不明であったが、p53 蛋白質が正常ヒト細胞内では極低レベルで維持されていること、DNA 損傷の誘導後にそのレベルが上昇することから、蛋白質の量的変化が p53 の機能調節に重要であると考えられるようになった。¹⁸⁻²⁰ さらに、放射線高感受性の遺伝病である AT (ataxia telangiectasia) (毛細血管拡張性運動失調症) において、DNA 損傷誘導後の p53 の応答に異常があることが発見され、²¹⁻²³ AT の原因遺伝子産物である ATM (AT mutated) が、DNA 損傷後に p53 へ情報を伝達している可能性が示されるに至った。発見当初、その相同性から脂質リン酸化酵素と思われた ATM は、その後蛋白質リン酸化酵素であることが判明し、その基質の 1 つが p53 の 15 番目のセリンであることが突き止められた。²⁴⁻²⁶ 以上のような経緯から、細胞核内の DNA 損傷チェックポイント経路の活性化を、p53 のセリン 15 のリン酸化により評価できることになった。

そこで、Fig. 1 に示すように抗リン酸化 p53 抗体を用いたウェスタンブロットにより p53 への情報伝達を検討したが、100 mGy 以上の線量では明確なリン酸化が確認できたものの、それ以下の低線量域では、リン酸化は検出できなかった。転写調節因子として活性化した p53 は、下流因子の転写を制御し、p21 に代表される一連の遺伝子群の転写を促進して、細胞に DNA 損傷応答を誘導する。そこで、p21 のレベルについても検討したが、100 mGy 以上

の線量の放射線によってのみ誘導が確認できた。

以上の結果から、低線量放射線による細胞核内情報伝達経路の活性化はないと結論付けたが、この結論はのちに間違いであることが判明した。それは、ATMの活性化を免疫蛍光抗体法により検討した実験から明らかになった。p53のリン酸化に係わるATMは、DNA損傷チェックポイント経路の最上流に位置する蛋白質として機能するが、ATMがどのようにして損傷DNAを認識し、どのようにして活性化するのが注目された。われわれは、アガロースビーズに固相化された二重鎖DNAを用いて、細胞抽出液中に含まれるATMが損傷を有するDNAに親和性を示すかどうか検討した。²⁷⁾ その結果、損傷を持たないDNAにも若干の結合が確認されたが、その結合量はDNAに放射線を照射したときに飛躍的に増大することを見出した。興味深いことに、結合量の増加は紫外線照射によっては誘導されなかったが、制限酵素処理によっては放射線照射と同様にみられた。さらに、一本鎖DNAを固相化した場合には、放射線によるATMの増加がないことも確認した。これらの結果は、ATMが二重鎖切断を有するDNAを認識して結合することを意味し、損傷を認識したATMがリン酸化活性を亢進してp53などの下流の因子をリン酸化すると予想された。

最近、放射線照射後のATM蛋白質の活性化メカニズムが解明された。²⁸⁾ それによると、ATMは普段2量体かあるいは多量体の形で存在する。ひとたび細胞が放射線にさらされると、DNA損傷によって惹起するクロマチン構造の変化によりATMの単量体への変換が促進され、単量体になったATMは互いに中央部にある1981番目のセリンをリン酸化し、これによって単量体化が維持されたATMは下流の因子をリン酸化できるようになるという。さらに、セリン1981がリン酸化されたATMを特異的に認識する抗体が開発され、免疫蛍光抗体法によりATMのリン酸化による活性化を検討したところ、リン酸化ATMが細胞核内で斑点状の局在性を示すことが明らかになった (Fig. 2)。そこで、斑点状のシグナル(フォーカス)の数と放射線線量との関係を調べると、1000 mGyの高線量放射線から10 mGyの低線量放射線まで、フォーカスの数は線量に応じて直線的に増加することが明らかになった。

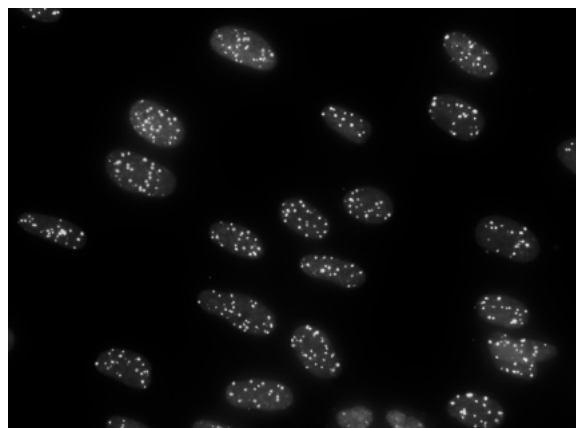


Fig. 2. Induction of Phosphorylated ATM Foci by X-irradiation

Exponentially growing normal human diploid cells on cover slips were irradiated with X-rays (0.5 Gy), fixed with formaldehyde, and immunostained with anti-phosphorylated ATM at serine 1981 antibody. The nuclei were counterstained with DAPI.

また、1000 mGy当たりのフォーカス数は50で、20 mGyで細胞核当たり平均1個のフォーカスが生成することが明らかになった。

これらの結果は、低線量放射線によっても細胞核内の情報伝達経路が確かに活性化していることを如実に示すもので、その意味では、低線量放射線であってもp53のリン酸化は起きていることを示唆する。しかしながら、ウェスタンブロット法による検討では、p53のリン酸化は確認できなかった。この理由は以下のように考察できる。地球上に存在する生命は、その誕生のときから宇宙放射線などに由来する自然放射線を甘受してきた。下等生物では、DNAが環状であることが多く、取り戻放射線によって起こるDNA二重鎖切断は生物にとって致命的に作用する。このため、生物は初期の段階からDNA二重鎖切断を修復する能力を進化させ、現在、下等生物から高等生物に至るまでのすべての生物がDNA二重鎖切断を修復するDNA損傷修復能を有している。DNA二重鎖切断の修復は効率よくかつ迅速に行われ、低線量放射線によって生成した細胞核当たり数個のDNA二重鎖切断は放射線照射後たちどころに消失する。DNA二重鎖切断の誘発に伴い自己リン酸化して活性化したATMは、DNA損傷の修復に伴い、脱リン酸化して元の定常状態に戻る。したがって、ATMの活性化は確かにあるものの、活性化が下流の因子を十分にリン酸化するまでは持続せず、このような理由からp53の

リン酸化が十分に起こらず検出もできなかったと考えることができる。

このように、低線量放射線によっても細胞核内の情報伝達経路が活性化することが確認されたが、これら一連の実験の間に興味深い現象を発見した。それは、リン酸化 ATM フォーカスのサイズが、照射後時間を減るに従い変化するという結果である。

Figure 3 に 250 mGy 照射細胞で得られた結果を示したが、照射直後 0.1 μ 程度であったフォーカスの直径は、その後増加して照射後 30 分では、0.8 μ 程度にまで成長した。その後、大半のフォーカスはサイズが減少して最終的には消失していくが、少数残ったフォーカスの中にはさらにサイズが増加して長期間残存するものもある。このような結果は、DNA 二重鎖切断に起因して誘起されたクロマチン構造が、さらに二次的な構造変化を引き起こして、DNA 損傷シグナルを増幅しているという事実を示唆する。そこで、低線量放射線によってできたフォーカスと、高線量放射線によって誘導されたフォーカスとで、できたフォーカスのサイズの変化を比較したところ、低線量放射線によって誘発されたフォーカスのサイズ変化は、高線量放射線によって起こる変化と同様に起こることを見出した。このことは、低線量放射線で誘導された細胞核当たり極少数の DNA 二重鎖切断でも、情報の増幅メカニズムによって確実に検出されるようなシステムが生物には備わっていることを意味する。事実、ATM の下流には多数の因子が存在して ATM によるリン酸化の制御を受けているが、²⁹⁻³²⁾ ヒストン H2AX を始め、53BP1 や NBS1, MDC1 などの下流の因子は

いずれもリン酸化 ATM フォーカスと同様にそのサイズが増加して、リン酸化 ATM フォーカスと一致した局在性を示す。

4. 低線量放射線による情報伝達経路の活性化と低線量放射線影響の発現

上述したように、低線量放射線によって細胞内情報伝達経路の活性化が誘導されることが明らかになった。細胞膜からは、EGF 受容体の活性化から伝達された情報がかたや Elk1 に伝わり、一方で RSK2 の活性化を誘導する。Elk1 は SRE (serum response element) に結合する TCF (ternary complex factor) の構成要素であることから、Elk1 のリン酸化による活性化は、遺伝子転写の亢進を誘導すると考えられる。他方、RSK2 の活性化はそれ自身がリン酸化酵素であることからさらに下流の因子のリン酸化を引き起こすと考えられるが、実際に RSK2 の下流に位置するヒストン H3 の 10 番目のセリンのリン酸化が低線量放射線で亢進することを見出した。さらに、ヒストン H3 のセリン 10 のリン酸化に引き続いてヒストン H3 のリジン 9 のメチル化が促進されることも確認された。これら一連のヒストン蛋白質の修飾は、クロマチン構造の変化を誘導する反応であり、ヒストン H3 のリン酸化セリン 10 を標的にリクルートされる HAT (histone acetyltransferase) 活性は、クロマチン構造のリモデリングを促進すると考えられる。³³⁾ したがって、その結果構造がオープンになったクロマチンは、一方で DNA 修復因子の DNA 損傷へのアクセスを容易にすることが予想され、他方で、転写因子のプロモーターへのアクセスを促進すると考えられる。このような結果、DNA 損傷修復が効率よく行われれば、細胞の生存率が上昇して放射線適応応答が観察されるであろうし、遺伝子転写が効率よく行われることによって細胞増殖が促進されるであろう。

一方、細胞核内での情報伝達経路の活性化は、ATM の下流因子への情報伝達を効率よく行う。既に述べたように、ATM の下流には p53 が存在する。p53 は、p21 の発現誘導などを介して細胞周期制御を行うことがよく知られている。また、Bax の誘導を介してアポトーシスを誘導することも知られている。いずれも放射線によって DNA 損傷を持った細胞を死に至らしめる応答であるが、このような応答は高線量放射線照射後には顕著であっても、低線量

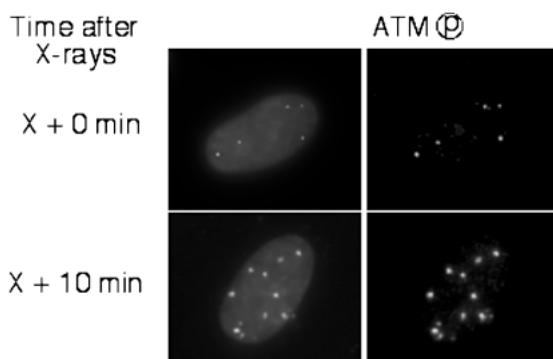


Fig. 3. Growth of Phosphorylated ATM Foci

X-irradiated normal human diploid cells were fixed immediately or 10 minutes after irradiation, and immuno-stained with anti-phosphorylated ATM antibody. The nuclei were counter stained with DAPI.

放射線の場合には誘導されない。しかしながら、一方でリン酸化 ATM のフォーカスのサイズ増加に呼応するように、別の下流因子のフォーカスサイズの増加が確認された。これらは Fig. 4 に示すように、p53 とは別の反応経路を構成して、DNA 損傷修復を促進するように機能する。^{11,34,35} 例えばヒストン H2AX は、クロマチン構成要素の 1 つとして DNA 二重鎖切断修復に関与するとされている因子であるし、NBS1 や MRE11 は相同組換え修復の実行因子である。さらに、BRCA1 や SMC1 も DNA 二重鎖切断修復に関与するとされているし、53BP1 や MDC1 も直接 DNA 損傷修復には関与しないながらも、NBS1 や SMC1 の機能を補佐する役割を果たしているとされている。さらにごく最近報告された ATM の下流因子の同定の結果もこれらの結果とよく呼応する。既に述べたように、下等生物から高等生物に至るまで広く保存されている DNA 二重鎖切断修復の経路には、主に分けて非相同末端結合修復 (non-homologous end-joining: NHEJ) と、相同組換え修復 (homologous recombination: HR) とがある。前述した NBS1 は、MRE11 及び RAD50 蛋白質と三者複合体を形成して、HR に関与する。一方で、NHEJ に関与する因子としては、DNA-PK 及び Ku80/70 が知られ、これらはいずれも ATM とは無関係であるとされてきた。しかしながら、最近の報告で、DNA-PK 及び Ku80/70 と協調して働く因子として artemis が同定され、この artemis が ATM によるリン酸化制御を受けるといふ。³⁶ すな

わち、DNA 二重鎖切断に係わる主要な経路のいずれもが、大なり小なり ATM により機能制御を受けるといふことである。以上の結果から、低線量放射線にさらされた細胞では、DNA 二重鎖切断修復能が一時的に亢進しており、そのために放射線適応応答などの現象が起こると結論付けても不思議ではない。

5. 考 察

本レビューでは、低線量放射線によって活性化される細胞内情報伝達経路に着目して、低線量放射線照射を受けた細胞内で何が起きているのか、その分子メカニズムを概説した。その結果、1 つは細胞膜に存在する増殖因子受容体が放射線エネルギーを受容し、主要な情報伝達経路の 1 つである MAP キナーゼ経路を経由して情報を細胞核に送り、細胞増殖の促進や DNA 二重鎖切断修復の亢進を引き起こしていることが予想された。もう 1 つは、細胞核内で ATM によって放射線による DNA 損傷が感知され、核内での情報伝達により DNA 二重鎖切断修復因子の活性化が考えられた。これら細胞内での情報伝達経路の活性化が全体として作用して、低線量放射線影響が具現化すると考えられるが、一連の分子メカニズムの解明においてまだいくつかの疑問点が残されている。その 1 つは、Elk1 やヒストンの修飾など最下流の分子の変化が具体的にどのような遺伝子の転写を活性化しているかである。近年、遺伝子発現の変化を網羅的に解析する方法として、DNA マイクロアレイなどの技術が応用されている

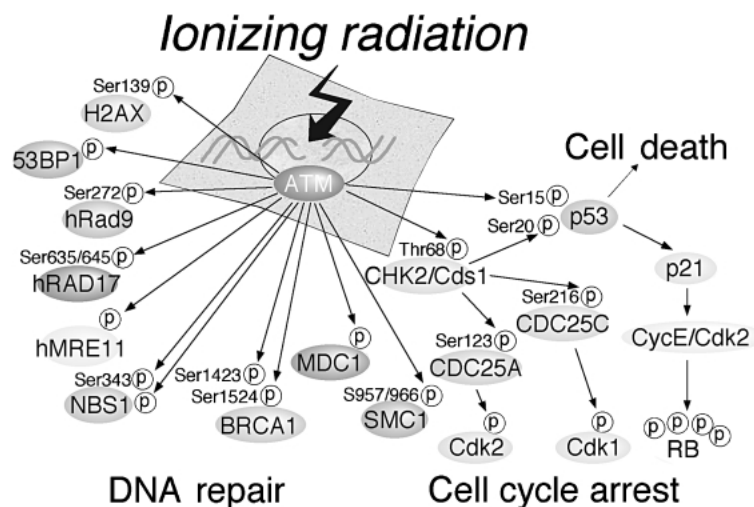


Fig. 4. DNA Damaging Checkpoint Pathways

が、これらの解析によると、低線量放射線照射により変化する遺伝子は、多くが細胞のストレス応答に係わる遺伝子であるという。^{37,38)} 今後、同定された遺伝子のプロモーターにどのような共通配列が存在するのか解析することを通じて、細胞膜からの情報伝達と遺伝子発現制御の間のギャップが埋まることを期待したい。

もう1つの疑問は、どのようなメカニズムで低線量放射線照射によってEGF受容体が活性化するかである。従来、増殖因子受容体はリガンドである増殖因子が結合することにより2量体を形成し、複数のリン酸化部位がリン酸化され細胞膜内側の活性触媒領域が活性化する。³⁹⁻⁴¹⁾ したがって、受容体の多量体形成が低線量放射線によって誘導されることが期待されるが、リガンド非存在下で、そのような反応が進むためには何かしらの受容体高次構造変化が必要になる。1つの可能性は、放射線によって生じたラジカルによって受容体内のジスルフィド結合が解離する可能性であるが、蛋白質のラジカル化によってその活性が変化するかどうかは、今後解明すべき大きな問題である。もう1つの可能性は、低線量放射線による影響がEGF受容体の脱リン酸化活性を制御する可能性である。細胞内での蛋白質リン酸化レベルは、リン酸化活性と脱リン酸化活性のバランスにより決定する。つまり、受容体の構造そのものが変化してリン酸化活性が変化しなくても、脱リン酸化活性が変化することによってもリン酸化型への変換が起こる場合もある。この場合には、低線量放射線がどのような方法で脱リン酸化活性を抑制するか明らかにする必要があるが、今後検討すべき可能性の1つである。

さて、最近数多くの論文が放射線による非標的効果 (Non-targeted effects) の誘導を報告している。⁴²⁻⁴⁶⁾ 非標的効果とは、直接照射を受けていない細胞において、直接照射を受けた細胞でみられるのと同様の放射線影響が誘導されることを指す。非標的効果には、放射線によって誘導されるバイスタンダー効果と、放射線によって誘導される遅延的ゲノム不安定性が存在する。前者は、 α 線照射やマイクロビーム照射によって研究されてきたが、同一培養環境にある細胞のうち一部を照射して、照射を受けていない周辺の細胞 (バイスタンダー細胞) において細胞死や突然変異が誘発されることからその存

在が確認された。⁴⁷⁾ バイスタンダー効果の発現には、細胞間の接着を必要とする経路と、必要としない経路の2種類の経路が関与するとされている。細胞間接着を必要とする経路では、細胞間に形成されたコネキシン蛋白質からなるギャップジャンクションを通じて低分子量の物質がやり取りされることにより照射細胞の情報が非照射 (バイスタンダー) 細胞に伝達される。ギャップジャンクションを介して細胞間で共有される分子としては、カルシウムや長寿命ラジカルが候補として挙げられている。一方、細胞接着を必要としない経路では、細胞の培養液を介して照射細胞から分泌された液性因子 (バイスタンダー因子) が非照射細胞に作用して、バイスタンダー効果が発現すると言われている。バイスタンダー因子の候補としては、TGF- β (tumor growth factor) や TNF- α (tumor necrosis factor), IGF (insulin-like growth factor) などが挙げられている。

後者の放射線誘発遅延性ゲノム不安定性は、放射線照射後に生き残った細胞の子孫に、様々な放射線影響がランダムに誘導される現象からその存在が明らかにされた。遅延性細胞死の誘導、遅延性染色体異常の誘導、遅延性突然変異の誘導などがそれである。これら遅延性の影響発現は、生存細胞において何世代もの細胞分裂のあとにもランダムに生じることから、特定の遺伝子の変異に基づく現象ではないと結論付けられている。放射線による遅延性のゲノム不安定性の誘導には、恒常的なラジカル生成の亢進が関与するとの考えがある。事実、ゲノム不安定クローンとしてクローニングされた細胞では、高頻度の細胞死と高いラジカルレベルが確認されている。一方、われわれは放射線誘発遅延性ゲノム不安定性にゲノムそのものの高次構造変化が関与している可能性を示している。⁴⁸⁾ 放射線は、ゲノムに欠失を誘導することがよく知られているが、このようなゲノム欠失に基づく大規模なクロマチン構造の変化や、染色体末端のテロメアの構造変化など、DNAの高次構造の変化にその原因があるという可能性もある。

これら非標的効果は、ある低線量放射線であってもある確率で起こることが予想され、低線量放射線による細胞影響のある側面を説明し得る分子機構になる可能性がある。現在のところ、非標的効果の研究はまだ発展途上の段階で、低線量放射線影響への

関与を議論できるレベルではないが、今後の研究が期待されるところである。

低線量放射線の研究は、誘導される生物反応が微弱なためにその影響を検出するのに多くの困難があるが、今後、これら一連の低線量放射線影響の分子メカニズムの全貌が解明されることによって、われわれの放射線に対する知識が向上し、もって、放射線の医療科学への利用の適用が広まることを期待したい。

REFERENCES

- 1) Olivieri G., Bodycote J., Wolff S., *Science*, **223**, 594–597 (1984).
- 2) Bonner W. M., *Mutat. Res.*, **568**, 33–39 (2004).
- 3) Brooks A. L., *Radiat. Res.*, **164**, 454–461 (2005).
- 4) Hall E. J., *Int. J. Radiat. Biol.*, **80**, 327–337 (2004).
- 5) Mothersill C., Seymour C., *Mutat. Res.*, **568**, 121–128 (2004).
- 6) Redpath J. L., *Cancer Metastasis Rev.*, **23**, 333–339 (2004).
- 7) Suzuki K., Kodama S., Watanabe M., *Cancer Res.*, **61**, 5396–5401 (2001).
- 8) Shadley J. D., Afzal V., Wolff S., *Radiat. Res.*, **111**, 511–517 (1987).
- 9) Sasaki M. S., *Int. J. Radiat. Biol.*, **68**, 281–291 (1995).
- 10) Yoon S., Seger R., *Growth Factors*, **24**, 21–44 (2006).
- 11) Kastan M. B., Bartek J., *Nature*, **432**, 316–323 (2004).
- 12) Lane D., Crawford L., *Nature*, **278**, 261–263 (1979).
- 13) Linzer D. I. H., Levine A. J., *Cell*, **17**, 43–52 (1979).
- 14) Chen P. L., Chen Y. M., Bookstein R., Lee W. H., *Science*, **250**, 1576–1580 (1990).
- 15) Eliyahu D., Michalovitz D., Eliyahu S., Pihasi-Kimhi O., Oren M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 8763–8767 (1989).
- 16) Finlay C. A., Hinds P. W., Levine A. J., *Cell*, **57**, 1083–1093 (1989).
- 17) May P., May E., *Oncogene*, **18**, 7621–7636 (1999).
- 18) Oren M., Reich N. C., Levine A. J., *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 443–449 (1982).
- 19) Kastan M. B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B., Craig R. W., *Cancer Res.*, **51**, 6304–6311 (1991).
- 20) Lu X., Lane D. P., *Cell*, **75**, 765–778 (1993).
- 21) Kastan M. B., Zhan Q., El-Deiry W., Carrier F., Jacks T., Walsh W. V., Plunkett B. S., Vogelstein B., Fornace A. J., *Cell*, **71**, 587–597 (1992).
- 22) Khanna K. K., Lavin M. F., *Oncogene*, **8**, 3307–3312 (1993).
- 23) Canman C. E., Wolf A. C., Chen C. Y., Fornace A. J., Kastan M. B., *Cancer Res.*, **54**, 5054–5058 (1994).
- 24) Siliciano J. D., Canman C. E., Taya Y., Sakaguchi K., Appella E., Kastan M. B., *Genes Dev.*, **11**, 3471–3481 (1997).
- 25) Banin S., Moyal L., Khostravi R., Shieh S.-Y., Taya Y., Anderson C. W., Chessa L., Smorodinsky N. I., Prives C., Shiloh Y., Ziv Y., *Science*, **281**, 1674–1677 (1998).
- 26) Canman C. E., Lim D. S., Cimprich K. A., Taya Y., Tamai K., Sakaguchi K., Appella E., Kastan M. B., *Science*, **281**, 1677–1679 (1998).
- 27) Suzuki K., Kodama S., Watanabe M., *J. Biol. Chem.*, **274**, 25571–25575 (1999).
- 28) Bakkenist C. J., Kastan M. B., *Nature*, **421**, 499–506 (2003).
- 29) Zhou B. B., Elledge S. J., *Nature*, **408**, 433–439 (2000).
- 30) Jackson S. P., *Carcinogenesis*, **23**, 687–696 (2002).
- 31) Bakkenist C. J., Kastan M. B., *Cell*, **118**, 9–17 (2004).
- 32) Lukas J., Bartek J., *Cell*, **118**, 666–668 (2004).
- 33) Blenis J., *Cancer Cells*, **3**, 445–449 (1991).
- 34) Lukas J., Lukas C., Bartek J., *DNA Repair*, **3**, 997–1007 (2004).
- 35) O’Driscoll M., Jeggo P. A., *Nat. Rev. Genet.*, **7**, 45–54 (2006).
- 36) Jeggo P. A., Lobrich M., *Cell Cycle*, **4**, 359–362 (2005).
- 37) Amundson S. A., Lee R. A., Koch-Paiz C. A., Bittner M. L., Meltzer P., Trent J. M., Fornace Jr. A. J., *Mol. Cancer Res.*, **1**, 445–452 (2003).
- 38) Ding L. H., Shingyoji M., Chen F., Hwang J.

- J., Burma S., Lee C., Cheng J. F., Chen D. J., *Radiat. Res.*, **164**, 17–26 (2005).
- 39) Thompson D. M., Gill G. N., *Cancer Surv.*, **4**, 767–788 (1985).
- 40) Hunter T., Cooper J. A., *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 897–930 (1985).
- 41) Schlessinger J., *Trends. Biochem. Sci.*, **13**, 443–447 (1988).
- 42) Little J. B., *Oncogene*, **22**, 6978–6987 (2003).
- 43) Morgan W. F., *Oncogene*, **22**, 7094–7099 (2003).
- 44) Coates P. J., Lorimore S. A., Wright E. G., *Mutat. Res.*, **568**, 5–20 (2004).
- 45) Kadhim M. A., Moore S. R., Goodwin E. H., *Mutat. Res.*, **568**, 21–32 (2004).
- 46) Mothersill C., Seymour C. B., *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 158–164 (2004).
- 47) Hall E. J., Hei T. K., *Oncogene*, **22**, 7034–7042 (2003).
- 48) Suzuki K., Ojima M., Kodama S., Watanabe M., *Oncogene*, **22**, 6988–6993 (2003).