

細胞内情報伝達変換器分子の
ゲノムストレス応答性制御を担う
RhoGDI β の研究

県立広島大学大学院

総合学術研究科

生命システム科学専攻

博士論文

平成 30 年 3 月

(2018 年)

藤原 守

【目次】

| | |
|---|----|
| 要旨 | 5 |
| 第1章 緒言 | 7 |
| 第2章 RhoGDI β のゲノムストレス応答性動態解析結果 | |
| 2.1 研究背景 | 12 |
| 2.2 材料と方法 | 13 |
| 2.3 結果 | 14 |
| 2.4 まとめと考察 | 16 |
| 第3章 Δ N-RhoGDI β の強制発現による細胞の増殖や生存に関する形質の変更 | |
| 3.1 研究背景 | 18 |
| 3.2 材料と方法 | 19 |
| 3.3 結果 | 21 |
| 3.4 まとめと考察 | 26 |
| 第4章 Δ N-RhoGDI β の強制発現による細胞運動に関する形質の変更 | |
| 4.1 研究背景 | 28 |
| 4.2 材料と方法 | 29 |
| 4.3 結果 | 31 |
| 4.4 まとめと考察 | 38 |
| 第5章 Δ N-RhoGDI β と分子スイッチである RhoGTPase との関係 | |
| 5.1 研究背景 | 40 |
| 5.2 材料と方法 | 41 |
| 5.3 結果 | 43 |
| 5.4 まとめと考察 | 47 |

| | |
|--|----|
| 第 6 章 ΔN -RhoGDI β の Cdc42 阻害効果がもたらす生理作用 | |
| 6. 1 研究背景 | 49 |
| 6. 2 材料と方法 | 50 |
| 6. 3 結果 | 51 |
| 6. 4 まとめと考察 | 53 |
| 第 7 章 総括 | 54 |
| 引用文献 | 58 |
| 謝辞 | 65 |
| 業績書 | 66 |

【付録】

発表論文

【英語題名】

Investigation of the role of genotoxic stress-induced RhoGDI β cleavage in human cervical carcinoma (HeLa) cell line

【略語一覧】

Rho: Ras homolog family member proteins

GTP: Guanosine-5'-triphosphate

GDP: Guanosine-5'-diphosphate

GDI: guanine nucleotide dissociation

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GAP: GTPase-activating protein

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS: Fetal Bovine Serum

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

Cdc42: Cell Division Cycle 42

Rac1: Rac Family Small GTPase 1

SDS: sodium dodecyl sulfate

ECL: enhanced chemiLuminescence

【要旨】

本研究では、放射線被曝によるゲノムストレスで起こる不都合な生体応答現象を回避させるような分子創薬を最終目的とし、それに関係した細胞内シグナル伝達経路の研究を行った。特に、細胞増殖や細胞運動、細胞骨格の制御に中心的な役割を担っている細胞内情報伝達の変換器分子（分子スイッチ）である RhoGTPase ファミリーに注目し、その制御因子のひとつである RhoGDI β によるゲノムストレス応答時での制御様式を解明することを目指した。

RhoGDI β は、分子スイッチである RhoGTPase、特に Rac1 の制御因子として知られる。また、この分子は、ヒトのがん進展における転移関連分子として知られる。更に、その分子内に、放射線などで誘発されるアポトーシスで活性化する 3 型カスパーゼによって切断されるサイトを持つ。

第 1 章では、緒言として背景と目的を述べる。

第 2 章では、RhoGDI β のゲノムストレス応答性動態解析結果を述べる。

RhoGDI β はその分子内に活性化 3 型カスパーゼによる切断サイトが存在する。そこで、本研究では、RhoGDI β の活性化 3 型カスパーゼによる切断産物（N 末欠失型 RhoGDI β 、 Δ N-RhoGDI β ）が、ゲノムストレスに曝された後に、アポトーシスに陥った細胞で発現しているのかどうかについて、ヒト子宮がん由来 HeLa 細胞で確かめた。その結果、驚くべきことに、 Δ N-RhoGDI β は、放射線照射されて生き残っている細胞内で長期間（144 時間以上）発現が持続していた。

第 3 章では、 Δ N-RhoGDI β の強制発現による細胞の増殖や生存に関する形質の変更について述べる。

Δ N-RhoGDI β の強制発現実験を行った。その結果、細胞の増殖能に大きな変更は無かった。また、アポトーシス感受性は増大傾向にあったものの、顕著では無かった。すなわち、RhoGDI β は、3 型カスパーゼの活性化によって起こる細胞死とは直接関係せず、他の細胞機能のシグナル・メディエーターであろうと考えられた。

第 4 章では、 Δ N-RhoGDI β の強制発現による細胞運動に関する形質の変更について述べる。

Δ N-RhoGDI β が高発現した細胞では、細胞の形態、特にアクチン束の形成がコントロールと比較して低下していたが、ランダムな細胞運動能に大きな変更は観察されなかった。そこで、方向性のある細胞運動能について、試験管内での epithelial wound-healing assay を行った。その結果、 Δ N-RhoGDI β が高発現した細

胞では、著しい方向性のある細胞運動能の阻害が起こっていた。

第5章では、 ΔN -RhoGDI β が分子スイッチである RhoGTPase とどのように関係しているのかについて述べる。

細胞分画と免疫沈降法により、RhoGDI β が細胞膜画分で Rac1 と結合しているのに対して、 ΔN -RhoGDI β は、細胞膜画分以外に、細胞質や細胞核に分布し、Cdc42 と結合していることを見出した。また、Cdc42 活性を阻害した。すなわち、RhoGDI β は、細胞膜で Rac1 を阻害する因子として働いているが、ゲノムストレスにより切断された後、細胞内で大きく分布を変更させて、Cdc42 を阻害する因子として働くことがわかった。

第6章では、 ΔN -RhoGDI β の Cdc42 阻害効果をもたらす生理作用について述べる。

Cdc42 は、細胞の極性を制御する分子スイッチとして認識されている。この活性の阻害は、方向性のある分裂や運動が阻害される。また、ハエの研究から、Cdc42 阻害によって、方向性を失った細胞がアポトーシスで失われた細胞を埋める増殖（代償性増殖）を誘導するシグナル経路を活性化することが知られている。そこで、本研究では、 ΔN -RhoGDI β の高発現によって、放射線によるアポトーシスで誘導される代償性増殖が活性化するかどうかを確かめた。その結果、 ΔN -RhoGDI β の高発現では、Cdc42 が阻害されて代償性増殖が促進することがわかった。

第7章では、本研究の総括を述べる。

分子スイッチ RhoGTPase の制御因子である RhoGDI β は、Rac の阻害因子として働いているが、ゲノムストレスでアポトーシスに至らず生存した細胞内で ΔN -RhoGDI β が蓄積し、Cdc42 阻害因子として働く。その結果、ゲノムストレスを受けた生存細胞は、細胞極性を喪失し、代償性増殖の誘導が起こることが示された。このシグナル経路は、特に、RhoGDI β 発現の高い癌腫で機能していると考えられる。放射線治療を受けた場合、生存細胞では ΔN -RhoGDI β の発現によって無秩序な細胞運動が起こり、代償性増殖の誘導により再増殖（再発）へのシグナル伝達経路として機能する可能性が示唆される。RhoGDI β の発現を下げるような作用のある物質の探索は、放射線治療の効果を高めることに繋がるかも知れない。

第 1 章 緒言

アポトーシスは、細胞傷害性ストレスによって DNA または他の損傷を含む細胞を処理する重要な生体防御機構である[1-4]。このメカニズムは、傷害を受けた組織から影響をされた細胞の排除をもたらし、同時に、組織のホメオスタシスを回復および維持するためには、細胞死に応答する代償性増殖の促進が必要とされる[5-8]。がん組織では、増殖とアポトーシスとの間の平衡が不均衡であり、アポトーシスの抑制は腫瘍の増殖に寄与する[4, 9-11]。放射線療法または化学療法などの細胞傷害性治療の後、代償性増殖は腫瘍が持続するために重要であり、癌の進行および拡大において非常に重要な因子である。しかし、プロセスの根底にあるメカニズムはまだ解明されていない[12-14]。多くのアポトーシスにおいて、実行因子であるカスパーゼ、3 型カスパーゼの活性化は必須であり、標的タンパク質の切断に関与している[15, 16]。3 型カスパーゼの活性化は、多くのヒト細胞傷害性抗癌療法において検出されている[17-19]。最近の一連の研究により、カスパーゼ活性化が細胞傷害性プロセスだけでなく腫瘍の再増殖および拡大にも関与することが知られてきた[20-25]。活性化した 3 型カスパーゼの多くの細胞標的は、ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼなどの機能的に不活性化されたタンパク質または細胞死プロセスを促進するカスパーゼ活性化 DNase などの活性化タンパク質のいずれかと同定されている[26]。しかしながら、これらの細胞内の 3 型カスパーゼ基質の中でも、多数のタンパク質が細胞自殺プロセスを直接媒介するために必要ではないことが知られている[27, 28]。下流の標的および経路またはそれらの機能的役割は、アポトーシス細胞において部分的に記載されているが、これらの基質のより多くの正確な生理学的役割および様々な細胞応答における作用機序は完全には明らかにされていない[29-32]。これらの基質および経路の証明は、細胞死に応答して起きる 3 型カスパーゼによって誘導される腫瘍増殖の機構的基礎を確立し、腫瘍の拡大のための新しい 3 型カスパーゼ特異的標的を開くであろう。

Rho ファミリーの GTPase は、多様な変化する環境条件に適切に応答するために、様々な細胞型で複数の機能的活性を發揮する[33]。このタンパク質ファミリーは、ヒトにおいて 22 のメンバーを含んでおり、Rac、Cdc42、Rho および他のサブファミリーに細分される[34]。これらの Rho GTPase によって生成される経路は、遺伝子転写の制御、細胞周期の進行、細胞形態および細胞運動性を含む複数の機能を有する[35-38]。その中で、Cdc42 は細胞極性のマスターレギュレーターであると認識されている[33, 39-41]。細胞内でのその局所的集中および活性

化は、遊走中の前後の極性を決定し、有糸分裂中の分裂軸の向きも決定する[42-44]。Cdc42 ベースの極性複合体の損失は、細胞の極性破壊を導く[45-48]。このような混乱した状況下では、アポトーシスによって誘導される代償性増殖は、極性細胞よりも激しい[49]。Rho GTPase の活性は、下流シグナリングを促進する活性化因子として作用する guanine nucleotide-exchange factors (GEF) および不活性化因子として作用する GTPase-activating proteins (GAP) を介した不活性 (GDP 結合) および活性 (GTP 結合) フォームのサイクリングによって制御される[50]。このような GEF および GAP が触媒する GDP/GTP サイクリング活性は、別のレベルの調節で Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) によって制御され、それは他のスモール G プロテインファミリーには一般的に見られない特徴的である[51]。Rho GDI ファミリーには、RhoGDI α 、RhoGDI β 、RhoGDI γ の 3 つのメンバーが存在している[52]。それらは Rho GTPase を細胞膜から引っこ抜き、それらを GDP 形態 (不活性形態) で細胞質内に保持することによって働きを阻害する[51]。したがって、RhoGDI タンパク質は、RhoGTPase を不活性形態で維持するための重要な役割を有する。それらの阻害活性は、発現レベル、細胞内局在、および結合パートナーのスペクトルに依存する可能性が高い[53]。RhoGDI ファミリーの 3 つのメンバーのうち、RhoGDI α はほとんどの組織で普遍的に発現するが、RhoGDI β と RhoGDI γ はそうではない[54]。RhoGDI γ は、脳、膵臓、肺、腎臓および精巣のような特定の組織において低いレベルで発現される[55, 56]。RhoGDI α および RhoGDI γ とは異なり、RhoGDI β は造血細胞および上皮細胞で高度に発現され、優先的に Rac1 と相互作用する[40, 57, 58]。以前の研究では、3 型カスパーゼ活性化の結果として現れる RhoGDI β の N 末端切断形態である Δ N-RhoGDI β は、放射線誘発アポトーシス細胞において発現されることが示され、それらのアポトーシス細胞で細胞質および核の両方に局在しているようであった[59]。 Δ N-RhoGDI β の異所的過剰発現は、死の刺激に応答してアポトーシスを加速することが報告されている[60]。しかし、RhoGDI β 切断の調節がアポトーシス細胞死を調節する可能性についてはほとんど知られていない。さらに、RhoGDI β の切断および再分布が細胞内の Rho GTPase に影響するか否かは確実ではない。

この論文では、3 型カスパーゼ活性化によって連続的に産生され、照射後に生存細胞に蓄積される Δ N-RhoGDI β が Cdc42 と相互作用することを実証した。さらに、 Δ N-RhoGDI β を発現する HeLa 細胞の詳細な解析により、 Δ N-RhoGDI β が、

代償性増殖の促進を含む極性関連細胞機能を制御する Cdc42 シグナル伝達のための新たな 3 型カスパーゼ下流ドミナントネガティブレギュレーターであるという証拠を提供する。

第 2 章 RhoGDI β のゲノムストレス 応答性動態解析

2. 1 研究背景

腫瘍抑制タンパク質 p53 が正常に機能しているマウス胸腺リンパ腫細胞において、放射線誘発アポトーシスの間に活性化された 3 型カスパーゼによって RhoGDI β が切断されることが示されている[59]。 Δ N-RhoGDI β の発現は一過性であり、時間経過が細胞死プロセスと一致したため、p53 依存性アポトーシス細胞死を調整または促進する可能性があった。しかし、以前に、照射を受けて生き残った再増殖細胞において Δ N-RhoGDI β の発現の増加を発見している。本研究では、DNA 損傷後の上皮細胞における Δ N-RhoGDI β の役割を解明しようとした。

2. 2 材料と方法

2. 2. 1 細胞

HeLa 細胞（ヒト子宮頸部癌由来細胞）を用いた。HeLa 細胞は、全て DMEM（dulbecco's modified eagle medium : GIBCO 社）に 10%牛胎児血清（Biosciences 社）を添加した培地で、37°C、CO₂ 濃度 5%の条件のインキュベーターで培養した。

2. 2. 2 放射線照射

細胞に、0.5mA の Al プラス 0.5mm の Cu フィルターを備えた 4mA で動作する X 線発生器（135kVp）を用いて、Victoreen ionizing chamber によって測定して 0.5Gy/分の線量率の放射線を室温で照射した。

2. 2. 3 免疫ブロット法

培養した細胞や、組織サンプルは、SDS-sample buffer（25mM Tris-HCl pH 6.8、5% glycerol, 2.5% 2-mercaptoethanol, 1% SDS, protease inhibitor cocktail (Sigma 社)）を用い、氷上中で、10 秒を 3 回ソニケーションし、タンパク質抽出をした。そして 4°C、1 分間 15,000rpm で遠心し、その上清のタンパク質濃度を Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad 社) を用いて決定し、サンプルが 20 μg 量になるように SDS-sample buffer で調整し、100°Cで 3 分間熱処理を行った後、12% SDS-ポリアクリルアミドゲルで泳動した。泳動後は、Immobilom-P membrane (Millipore 社) にタンパク質を転写させた。その後、メンブレンを 1 次抗体で反応させ、2 次抗体と反応させた後、ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham 社) を使って、X 線フィルムに感光させ、タンパク質の発現を調べた。1 次抗体には、抗 RhoGDIβ 抗体（C 末端領域認識抗体）(sc-6047, Santa Cruz Biotechnology 社) と抗 ΔN-RhoGDIβ 抗体 (#97A1015, Active Motif 社) と抗活性型 caspase-3 抗体 (Asp175) (#9660, Cell Signaling Technology 社) と抗 RhoGDIα 抗体 (sc-360, Santa Cruz Biotechnology 社) を用いた。2 次抗体には、HRP 標識した抗ラビット、抗マウスもしくは抗ゴート抗体 (Amersham Biosciences 社) を用いた。

2. 3 結果

はじめに、照射を受けた後に再増殖してきた p53 欠損 HeLa 細胞における ΔN -RhoGDI β の発現レベルを調べた。C 末端領域に対する抗 RhoGDI β 抗体を用いた分離した死んだ細胞の除去によって集められた付着している生きた細胞からの細胞溶解物のイムノブロット分析は、野生型の完全長 RhoGDI β が照射後に有意に発現が上方に制御されたことを明らかにした (図.1A)。同時に、21kDa の切断型 RhoGDI β タンパク質も検出された (図.1A)。このタンパク質は、N 末端切断領域に対する抗 ΔN -RhoGDI β 抗体を用いたイムノブロッティングにより ΔN -RhoGDI β として同定された (図 1B)。全長 RhoGDI β および ΔN -RhoGDI β の両方の発現は、放射線に曝された生存細胞において持続的に発現され、3 型カスパーゼの活性化を伴った (図 1C)。両方のタンパク質の高発現レベルは、少なくとも照射後 6 日間にわたって連続的に検出された。一方、RhoGDI α の発現は照射による影響を受けず、切断も検出されなかった (図 1D)。

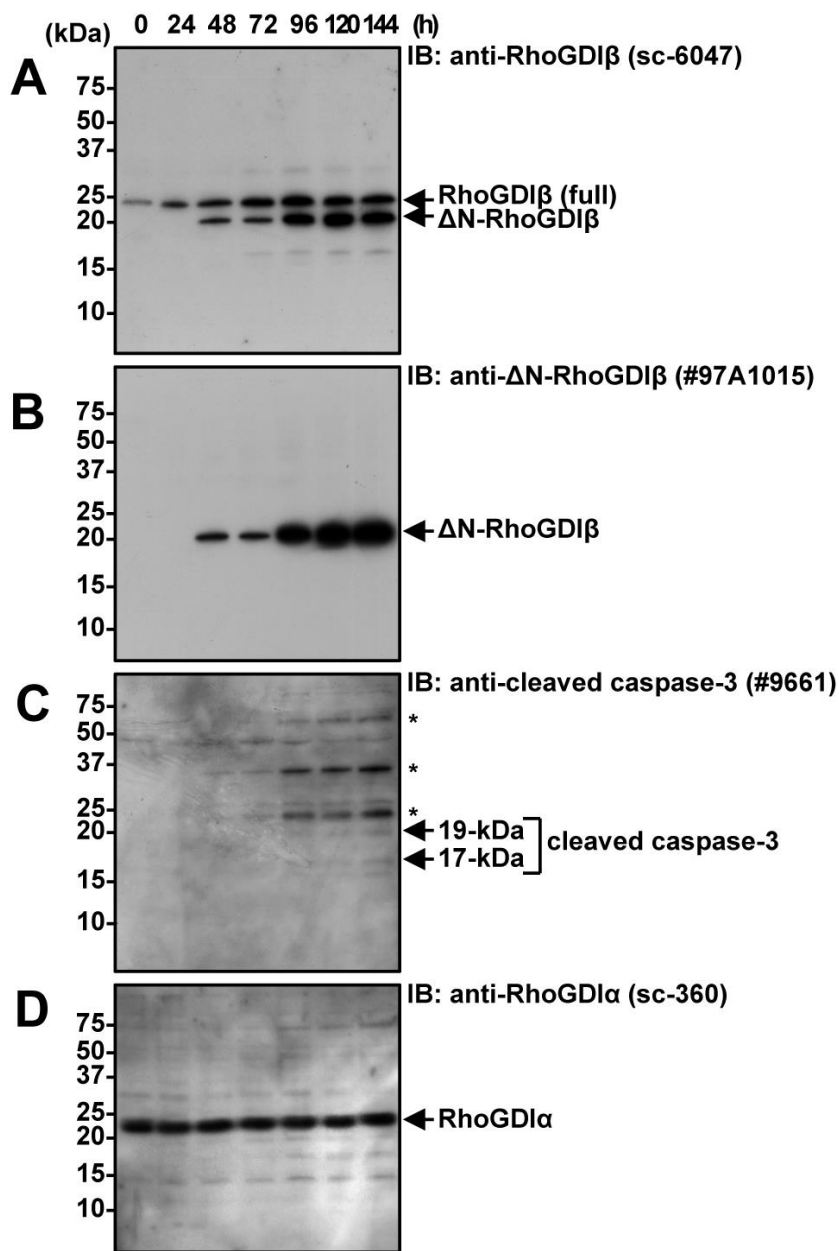


図 1. 生存している HeLa 細胞における切断された RhoGDI β (Δ N-RhoGDI β) の蓄積

抗 RhoGDI β 抗体 (A)、抗 Δ N-RhoGDI β 抗体 (B)、抗切断 3 型カスパーゼ抗体 (C) および抗 RhoGDI α 抗体 (D) を用いた免疫ブロットにより細胞溶解物を分析した。(C) において、活性化された 3 型カスパーゼ断片は 17-19kDa とされ、放射線誘発性の非標準的な高分子量活性化 3 型カスパーゼ複合体はアスタリスクとして示されている。

2. 4 まとめと考察

C末認識抗体ではバンドは2本検出され、下のバンドが Δ N-RhoGDI β である。上のバンドは全長 RhoGDI β であり、放射線照射によって発現増加しており、長時間 144 時間、続いている。下のバンドである Δ N-RhoGDI β の発現は、放射線照射により出現し、長時間 144 時間、続いている。これらの発現は全て、放射線照射後に生き残っている細胞で起こっている。また、照射後の Δ N-RhoGDI β の長期発現が p53 から独立して起こっており、放射線で損傷した生存細胞において継続することを示す。

第3章 ΔN -RhoGDI β の強制発現による細胞の増殖や生存に関する形質の変更

3. 1 研究背景

2章で示された $\Delta\text{N-RhoGDI}\beta$ の継続的な発現は、活性化された3型カスパーゼの下流で機能するようである。そこで $\Delta\text{N-RhoGDI}\beta$ が核内のアポトーシスの細胞死を調節しているかどうかを調べるために、 $\Delta\text{N-RhoGDI}\beta$ を発現する細胞を作製することを試みた。

また、 $\Delta\text{N-RhoGDI}\beta$ の異所性発現を有するクローンは、生き残った細胞においてアポトーシスに敏感でなくなる可能性があるため、HeLa細胞での一過性トランスフェクションにおける全長 $\text{RhoGDI}\beta$ または切断 $\Delta\text{N-RhoGDI}\beta$ の効果を調べた。

3. 2 材料と方法

3. 2. 1 細胞

HeLa 細胞（ヒト子宮頸部癌由来細胞）を用いた。HeLa 細胞は、全て DMEM（dulbecco's modified eagle medium : GIBCO 社）に 10%牛胎児血清（Biosciences 社）を添加した培地で、37°C、CO₂ 濃度 5%の条件のインキュベーターで培養した。

3. 2. 2 細胞クローニングによる全長の RhoGDI β や Δ N-RhoGDI β の高発現細胞の樹立

ヒト子宮頸部癌 HeLa 細胞へ Xpress を付加した全長の RhoGDI β や Δ N-RhoGDI β 、もしくはコントロールベクターを Lipofectamin2000 (Invitrogen 社) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後 24 時間後に G418 を処理し、コロニーを形成させた。そのコロニーを 20 個以上選び出し、それらの細胞から SDS-sample buffer (25mM Tris-HCl pH 6.8、5% glycerol,2.5% 2-mercaptoethanol、1%SDS) を用いてタンパク質を抽出し、タンパク質発現を免疫ブロットで調べた。Xpress タグのついたタンパク質が高発現していたコロニーをプールし、それを目的のタンパク質が高発現している安定発現細胞とした。

3. 2. 3 免疫ブロット法

培養した細胞や、組織サンプルは、SDS-sample buffer (25mM Tris-HCl pH 6.8、5% glycerol,2.5% 2-mercaptoethanol、1%SDS、protease inhibitor cocktail (Sigma 社)) を用い、氷上中で、10 秒を 3 回ソニケーションし、タンパク質抽出をした。そして 4°C、1 分間 15,000rpm で遠心し、その上清のタンパク質濃度を Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad 社) を用いて決定し、サンプルが 20 μ g 量になるように SDS-sample buffer で調整し、100°Cで 3 分間熱処理を行った後、12% SDS-ポリアクリルアミドゲルで泳動した。泳動後は、Immobilom-P membrane (Millipore 社) にタンパク質を転写させた。その後、メンブレンを 1 次抗体で反応させ、2 次抗体と反応させた後、ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham 社) を使って、X 線フィルムに感光させ、タンパク質の発現を調べた。1 次抗体には、抗 RhoGDI β 抗体 (C 末端領域認識抗体) (sc-6047, Santa Cruz Biotechnology 社) と抗 Δ N-RhoGDI β 抗体 (#97A1015, Active Motif 社) と抗活性型 caspase-3 抗体 (Asp175) (#9660, Cell Signaling Technology 社) と抗 RhoGDI α 抗体 (sc-360, Santa

Cruz Biotechnology 社) を用いた。2 次抗体には、HRP 標識した抗ラビット、抗マウスもしくは抗ゴート抗体 (Amersham Biosciences 社) を用いた。

3.2.4 アポトーシスアッセイ

アポトーシスアッセイは以前に Hori らが行った方法で[61]、Annexin V-Alexa Fluor 568 (Roche Applied Science 社) 染色によって決定され、TMR red (Roche Applied Science 社) を用いた TUNEL アッセイによっても確認された。

3.2.5 3 型カスパーゼ活性

メーカーの指示に従って、Colorimetric CaspACE Assay System (Promega 社) を用いて 3 型カスパーゼ活性を測定した。

3.2.6 増殖曲線

倍加時間は、 $\Phi 35\text{mm}$ シャーレに 1×10^5 個ずつ細胞を播種し、経時的に細胞カウントを行い、作成した増殖曲線の対数増殖期から算出した。

3.2.7 統計

定量値を出すために全ての実験は、独立して 3 回行った ($n=3$)。値の差は、t 検定 (Welch's t-test) によって解析した。P 値は 0.05 より小さい時有意とみなした。

3. 3 結果

HeLa 細胞を、全長 RhoGDI β または切断 Δ N-RhoGDI β (図 2A) の発現ベクターでトランスフェクトし、安定なクローンを単離した (図 2B)。

意外にも、ステイブルクローンは、同じ頻度で両方のトランスフェクトした細胞から得られた。すべてのクローンにおいて細胞増殖に変化はなく (図 2C)、倍加時間でも同様の結果を得た (図 2D)。

そして、一過性に発現された場合 (図 3)、全長 RhoGDI β トランスフェクト細胞およびコントロールと比較して、トランスフェクション後 48 時間で AnnexinV 陽性細胞が統計的に有意に増加した ($P < 0.05$ および $P < 0.01$)。

(図 4A)。しかし、早期のアポトーシスマーカーである AnnexinV 染色は、細胞死の誘導を正確には示さない。したがって、TUNEL 染色 (後期アポトーシスの指標) によってアポトーシス細胞死を再び調べた。このデータは、 Δ N-RhoGDI β トランスフェクト細胞と完全長 RhoGDI β トランスフェクト細胞またはコントロールとの間のトランスフェクション後 48 時間までに、TUNEL 陽性細胞に統計的に有意な差異がなかったことを示す。

(図 4B)。また、これを確認するために、 Δ N-RhoGDI β の一過性トランスフェクション後の 3 型カスパーゼ活性化を調べた。予想通り、活性化 3 型カスパーゼは Δ N-RhoGDI β トランスフェクション後に検出されなかった。

(図 4C および図 5)。

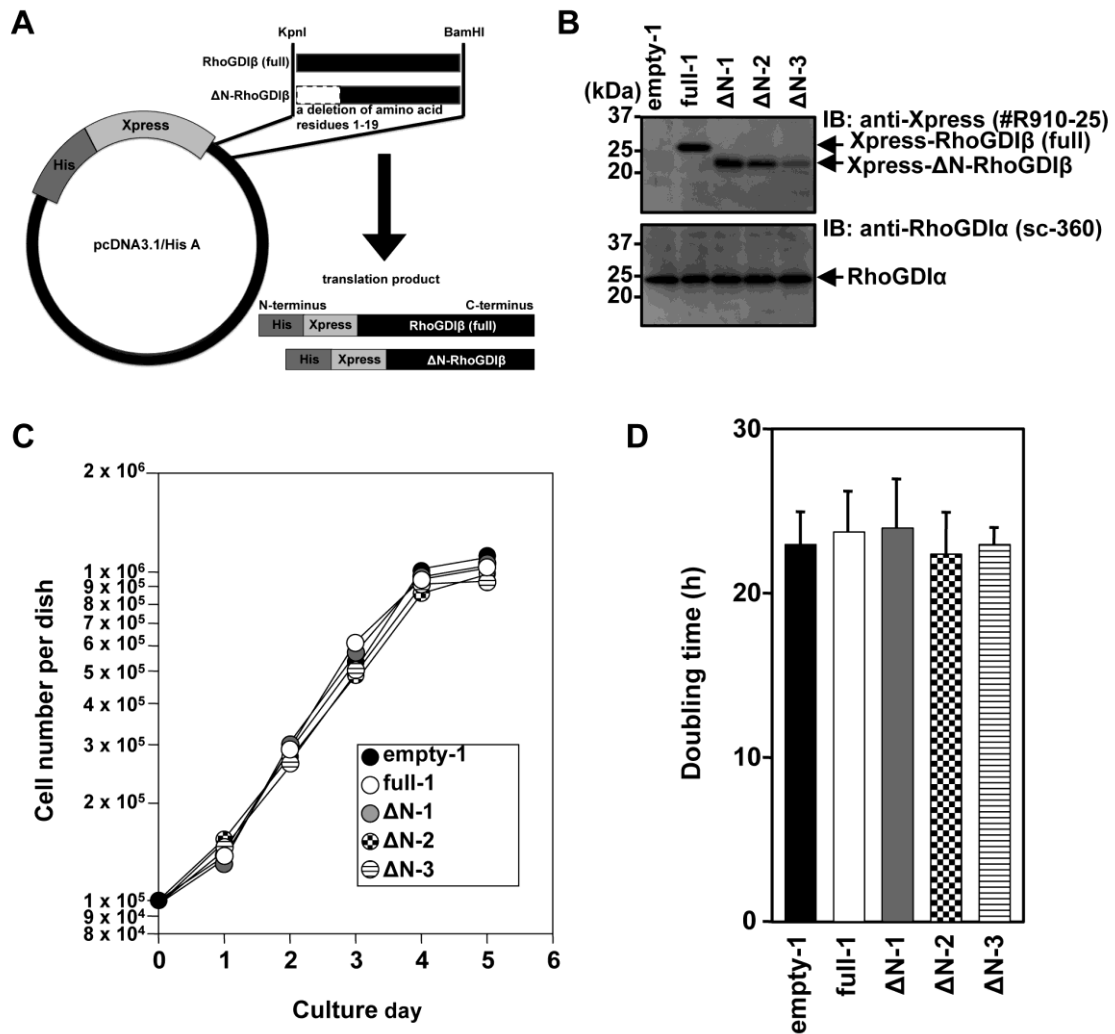


図 2. HeLa 細胞における Δ N-RhoGDI β の安定した発現が細胞増殖に及ぼす影響。

- (A) 完全長 RhoGDI β および短縮 Δ N-RhoGDI β をコードする発現プラスミド。
 (B) コントロール細胞 (empty-1)、Xpress タグ付き完全長 RhoGDI β 発現細胞 (full-1)、および Xpress タグ付き Δ N-RhoGDI β 発現細胞 (Δ N-1、 Δ N-2 および Δ N-3) の発現の、抗 Xpress および抗 RhoGDI α 抗体を用いた免疫ブロット法による確認。
 (C) empty-1、full-1、 Δ N-1、 Δ N-2 および Δ N-3 細胞の増殖曲線。
 (D) empty-1、full-1、 Δ N-1、 Δ N-2 および Δ N-3 細胞の集団倍加時間。

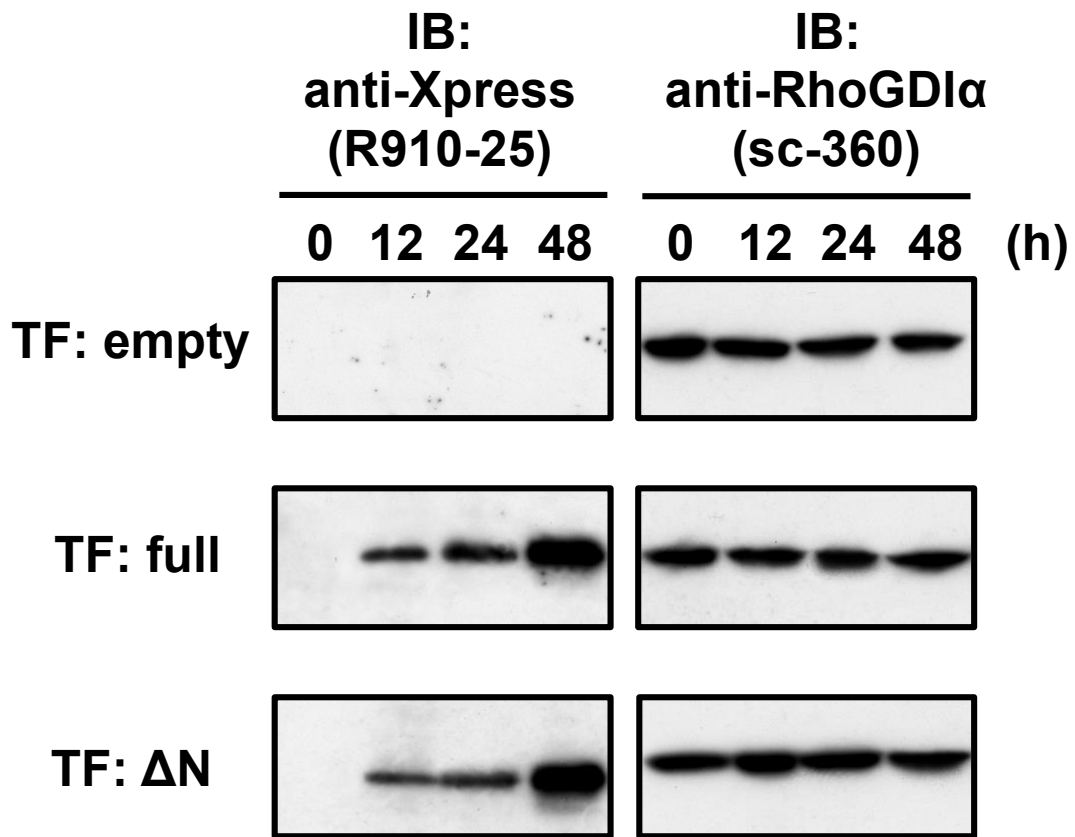


図 3. HeLa 細胞における Xpress タグ付き完全長 RhoGDI β および Xpress タグ付き Δ N-RhoGDI β の一過性発現。

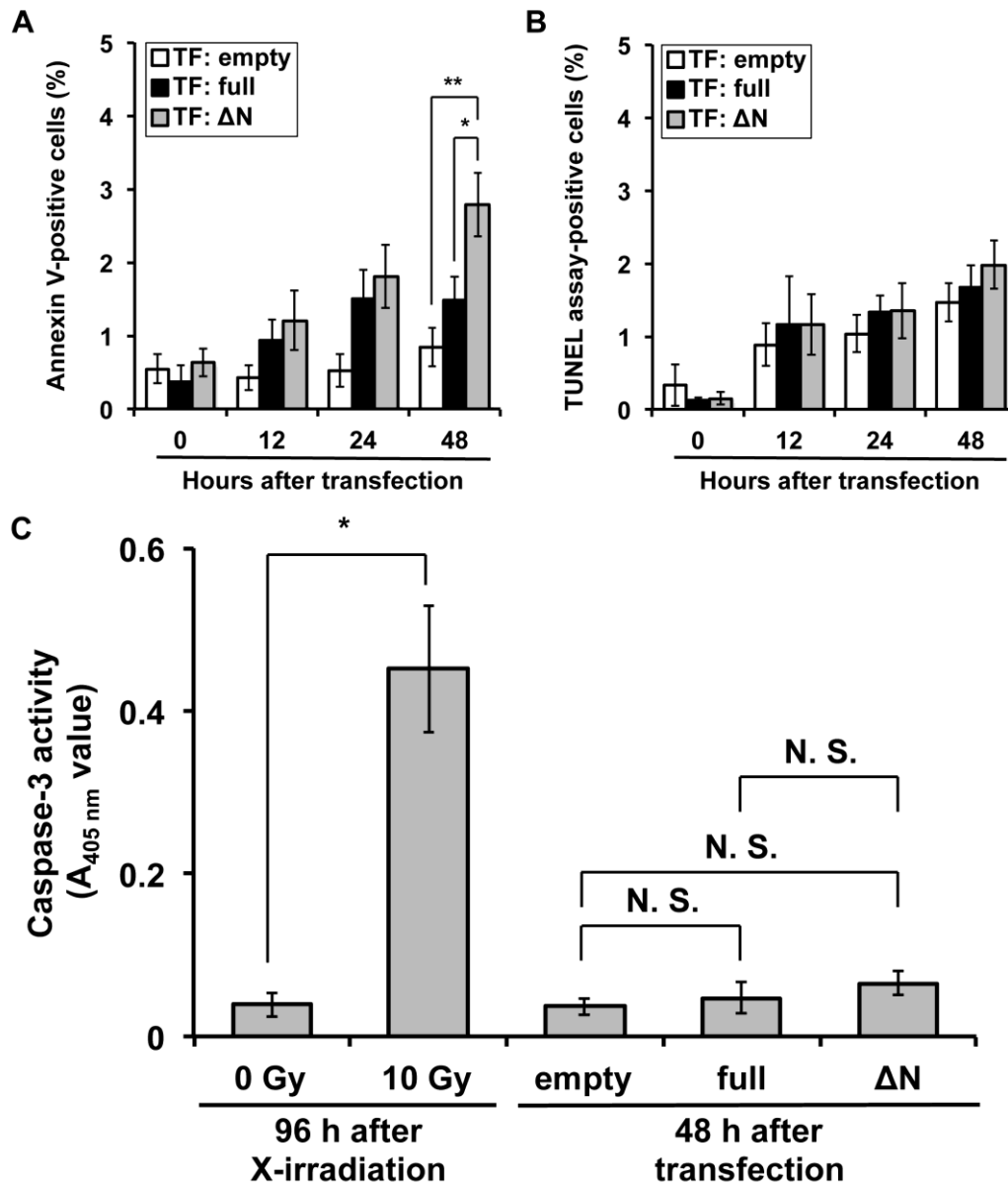


図 4. アポトーシスに対する HeLa 細胞における ΔN -RhoGDI β の一過性発現の効果。

(A) AnnexinV 染色によるアポトーシスの誘導の評価。全長 RhoGDI β (TF: Full) および ΔN -RhoGDI β (TF: ΔN) およびコントロールベクター (TF: empty) を細胞にトランスフェクトした。

(B) (A) と同じサンプルを用いた TUNEL 染色によるアポトーシスの誘導の評価。

(C) (A) の同じサンプルを用いた Colorimetric CaspACE Assay System による 3 型カスパーゼ活性の測定。

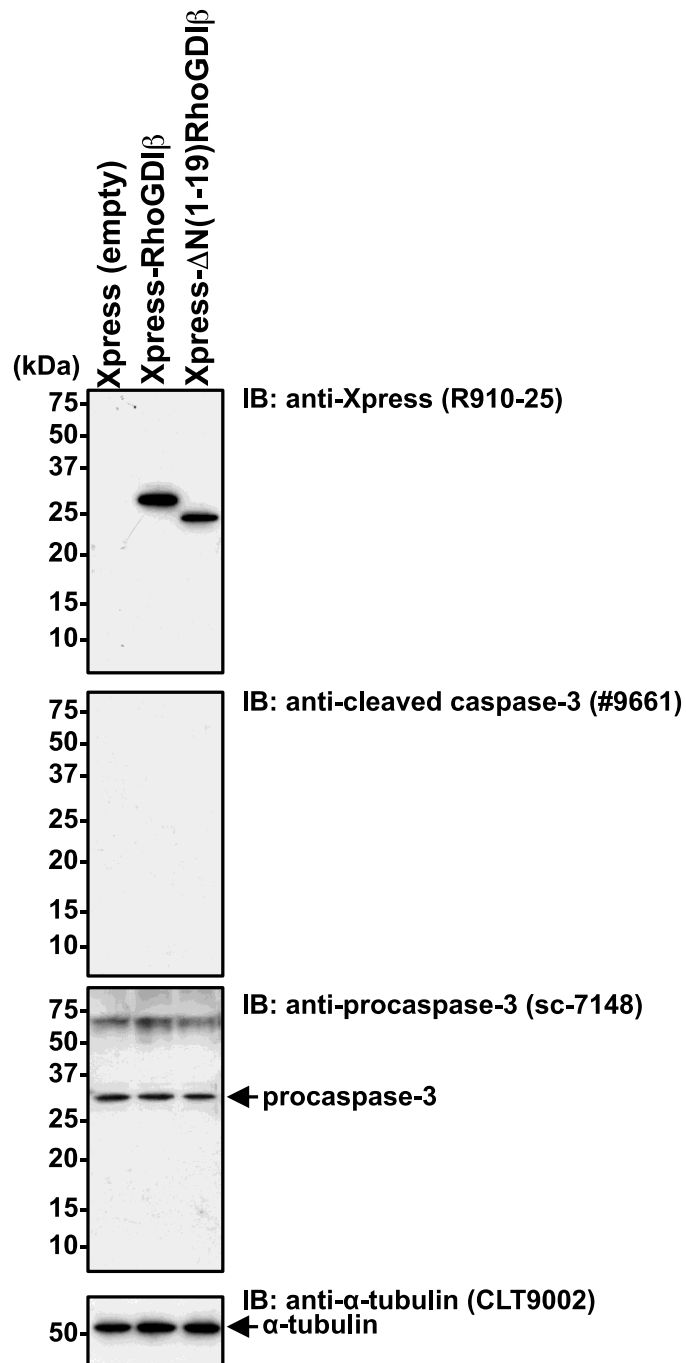


図 5. empty ベクターコントロール細胞 (Xpress (empty))、Xpress タグ付き全長 RhoGDI β 発現細胞 (Xpress-RhoGDI β (full))、および Xpress タグ付き N-末端欠失 RhoGDI β 発現細胞 (Xpress- Δ N (1-19) RhoGDI β) からの抽出サンプルにおける 3 型カスパーゼ発現の分析。

3. 4 まとめと考察

非切断型の野生型 RhoGDI β についても、 Δ N-RhoGDI β についても、その発現が細胞増殖に大きな影響を与えなかった。切断型の Δ N-RhoGDI β の強制発現により、先行論文[60]では、 Δ N-RhoGDI β がアポトーシスによる細胞死の実行に対して積極的な働きがあるかも知れないという指摘があったものの、以前より、非切断型に変異させた遺伝子の導入でアポトーシス感受性が変更しないという主張もあり、議論がわかれていたが、今回の結果は、 Δ N-RhoGDI β の安定した発現が細胞死を誘導できないことを示す。また、 Δ N-RhoGDI β がアポトーシス細胞死および 3 型カスパーゼ活性化の両方に直接関与しないと結論する。

第4章 Δ N-RhoGDI β の強制発現 による細胞運動に関する形質の変更

4. 1 研究背景

第3章より、 ΔN -RhoGDI β の発現は細胞増殖およびアポトーシスに明らかな影響を及ぼさないことがわかったので、次は細胞移動におけるその役割を調べることにした。そのために、導入遺伝子の異所的発現を伴う前述の HeLa ステイブルクローンを用いた。そして、 ΔN -RhoGDI β により wound edge の細胞分裂の方向が変化するかを調べた。

4. 2 材料と方法

4. 2. 1 細胞

HeLa 細胞（ヒト子宮頸部癌由来細胞）を用いた。HeLa 細胞は、全て DMEM（dulbecco's modified eagle medium : GIBCO 社）に 10%牛胎児血清（Biosciences 社）を添加した培地で、37°C、CO₂ 濃度 5%の条件のインキュベーターで培養した。

4. 2. 2 レーザー走査共焦点顕微鏡を用いた間接免疫蛍光法

細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、Triton X-100 で透過処理し、ウシ血清アルブミンでブロックし、適切な一次抗体および適当な Alexa Fluor 488 または 568 結合二次抗体と共にインキュベートした[58]。ローダミンファロイジンおよび 40,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) も、それぞれ、F-アクチンおよび DNA を染色するために用いた。

4. 2. 3 細胞のランダムな移動に対する速度の測定

増殖培養において、個々の細胞のランダムな移動をデジタルで記録し、各細胞の移動速度を測定した[62]。各細胞を 180 時間観察し、平均運動速度を計算した。各実験につき 10 以上の細胞が測定され、3 回の独立した実験が行われた。

4. 2. 4 ワウンドヒーリングアッセイ

インビトロスクラッチアッセイとしても知られているワウンドヒーリングアッセイは、記載された通りに行った (Liang ら、2007)。F-アクチンを観察するために、細胞を創傷した後に 48 時間培養したものを固定し、40,60-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI) (Life Technologies 社) およびローダミンファロイジン (Life Technologies 社) で染色した。同時に、間接免疫蛍光染色を、モノクローナル抗 Xpress 抗体 (#R910-25、Life Technologies 社) および Alexa488 結合抗マウス抗体 (Life Technologies 社) を用いて行った。

4. 2. 5 wound edge における細胞分裂の方向の測定

コンフルエントな細胞群を機械的に創傷した後、48 時間培養し、固定した。DAPI 染色を行うと同時に、モノクローナル抗-g-チューブリン抗体 (GTU-88、Sigma-Aldrich 社) および Alexa Fluor 488 結合抗マウス抗体 (Life Technologies 社)

またはポリクローナルウサギ抗ペリセントリン抗体 (PRB-432C、Covance 社) および Alexa Fluor 568 結合抗ウサギ抗体 (ライフテクノロジーズ (Life Technologies 社) を用いて間接免疫蛍光染色を行った。各染色の組み合わせにおいて、異なるサンプルが使用された。wound edge での細胞分裂の方向を、FV1000D レーザー走査顕微鏡 (Olympus 社) 下で、wound edge およびその付近の 10 個以上の中期細胞 (合計 30 個) で観察し、これを 3 つの異なる実験によって測定した。

いくつかの実験では、発現している Xpress タグ付き全長 RhoGDI β および Δ N-RhoGDI β の細胞内局在を、DAPI 染色と同時にモノクローナル抗 Xpress (# R910-25、Life Technologies 社) および Alexa Fluor 488 結合抗マウス抗体 (Life Technologies 社) またはポリクローナルウサギ抗ペリセントリン抗体 (PRB-432C、Covance 社) および Alexa Fluor 568 結合抗ウサギ抗体 (Life Technologies) を用いた間接免疫蛍光染色を行うことにより観察した。

4. 3 結果

両方の導入遺伝子を発現する細胞は、放射線照射された対照細胞を比較すると生理学的に同等なレベルで発現する (図 6)。指数関数的に増殖する培養では、empty ベクター (empty-1) を発現する細胞と比較して、個々の細胞のランダムな移動が両方のクローン (full-1 および $\Delta N-1$) で阻害され、両クローンは同様の阻害効果を有した。(図 7) 一方、ワウンドヒーリングアッセイによって測定された方向性の細胞移動は、empty-1 および full-1 と比較して $\Delta N-1$ において有意に阻害された (図 8))。

コンフルエントな細胞培養において単層を引っ掻いた後に、我々は wound edge に位置する有糸分裂中期細胞に注目をした。これらの細胞の細胞分裂の方向は、(図 9A) に模式的に示すように、2つのマーカー、すなわち、チューブリンおよびペリセントリンを使用することによって測定した。これらの2つのタンパク質は、微小管の核形成および組織化において相互作用する役割を果たしている一体的な中心体タンパク質である (図 10A)。ここでは、独立した実験における方向の測定のために、各マーカーをそれぞれ別に使用した。g-チューブリンおよびペリセントリンを用いて測定した細胞分裂の方向は、empty のコントロールおよび全長 RhoGDI β および ΔN -RhoGDI β 発現クローンの3つのグループについてプロットした (図 9B および図 10B)。F 検定は、empty ベクタートランスフェクション HeLa 細胞と比較して、全長 RhoGDI β 発現細胞で wound edge に対する方向性遊走の変動が増加し、 ΔN -RhoGDI β 発現細胞ではさらに増加していることを示した。ローズプロットは、図 5C および補足図 S5C にも示されている。さらに、交互に定義された方向をそれぞれの細胞でプロットし、結果を t 検定によって確認した (図 11)。

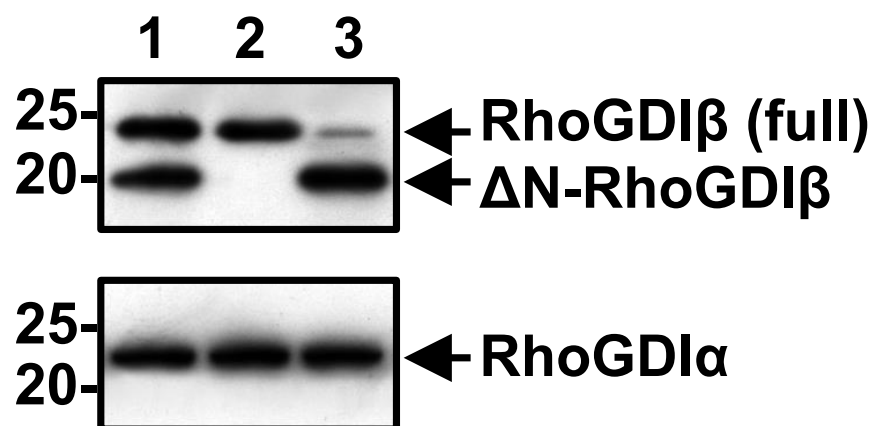


図 6. 安定したクローンにおける導入遺伝子の発現レベルの確認。放射線照射したコントロール細胞（レーン 1）、未照射 full-1（レーン 2）および未照射 ΔN-1（レーン 3）。

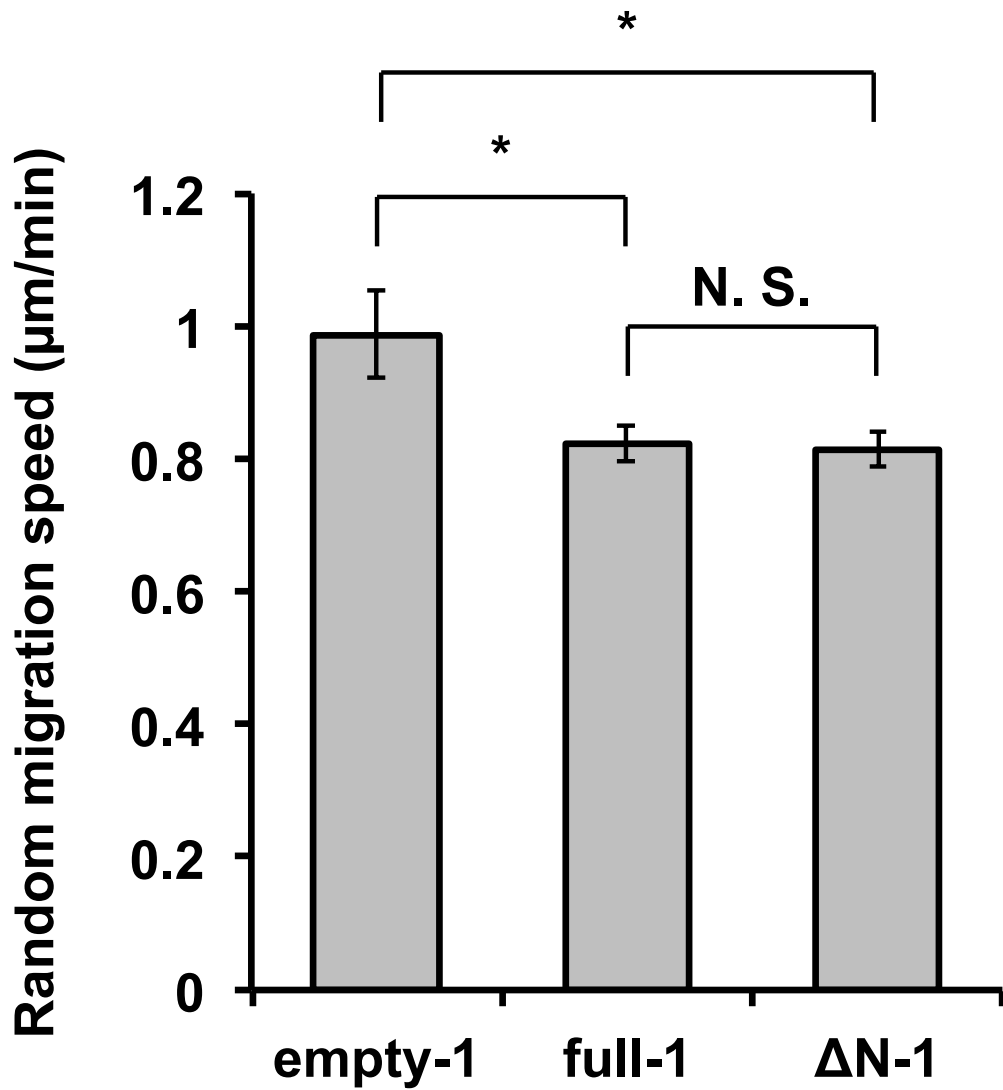


図 7. HeLa 細胞において、N-RhoGDI β の安定した発現が細胞のランダム移動に及ぼす影響。

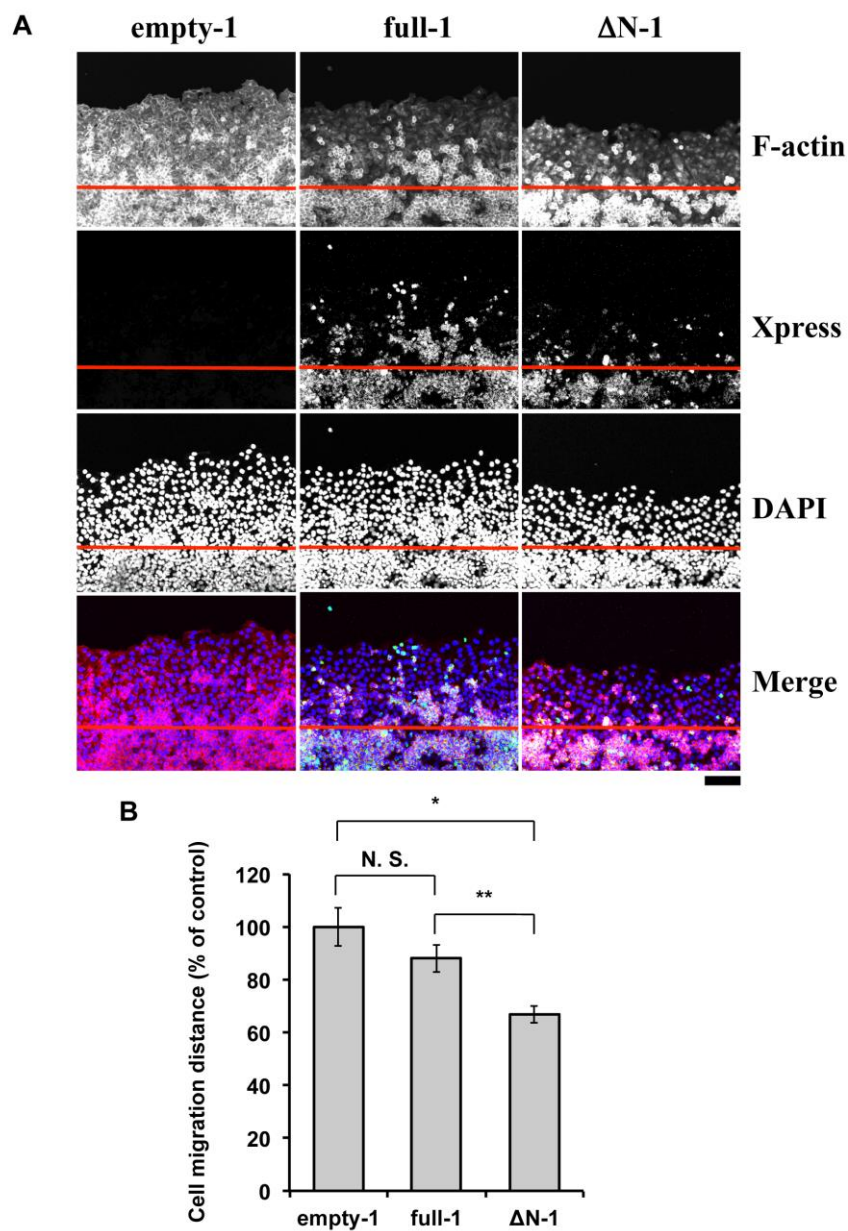


図 8. HeLa 細胞における方向性のある細胞運動に対する全長 RhoGDI β および Δ N-RhoGDI β 発現の効果。

(A) ワウンドヒーリングアッセイによる、コントロールベクター導入細胞 (empty-1)、Xpress タグ付き完全長 RhoGDI β 発現細胞 (full-1) および Xpress タグ付き Δ N-RhoGDI β 発現細胞 (Δ N-1) の方向性細胞移動の分析。スケールバーは 200 μ m。

(B) empty-1、full-1、および Δ N-1 についてのワウンドヒーリングアッセイの定量的データ。

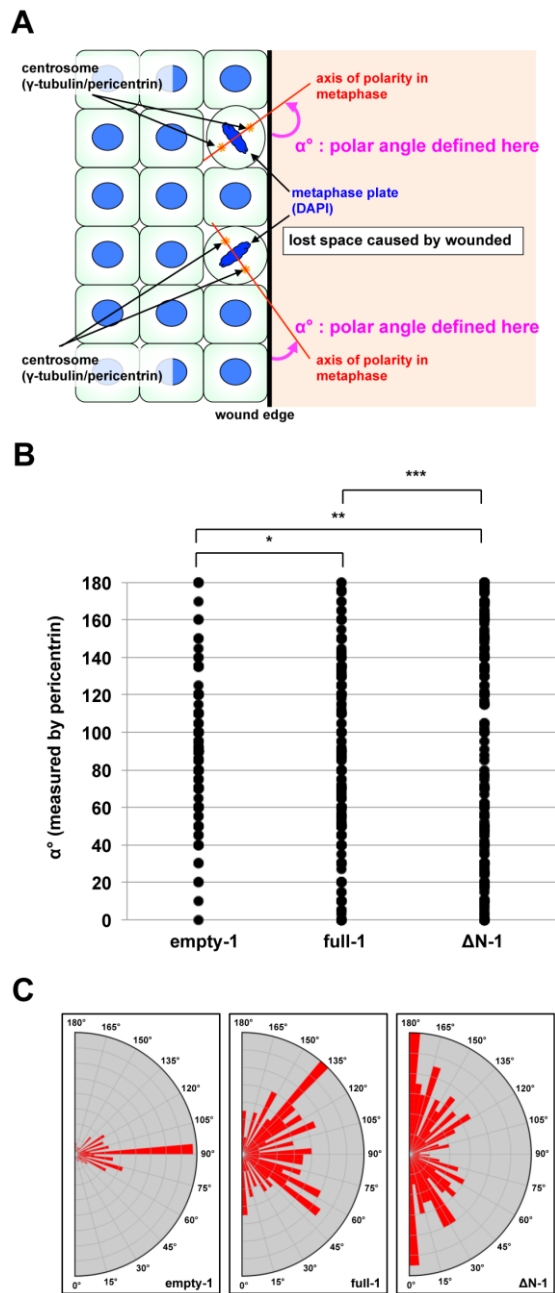


図 9. wound edge における細胞分裂の方向。

(A) wound edge における細胞分裂の方向の概略図。

(B) empty-1、full-1、および ΔN -1 における DAPI およびペリセントリン染色によって測定された極角 (α°)。

(C) (B) のローズプロット。

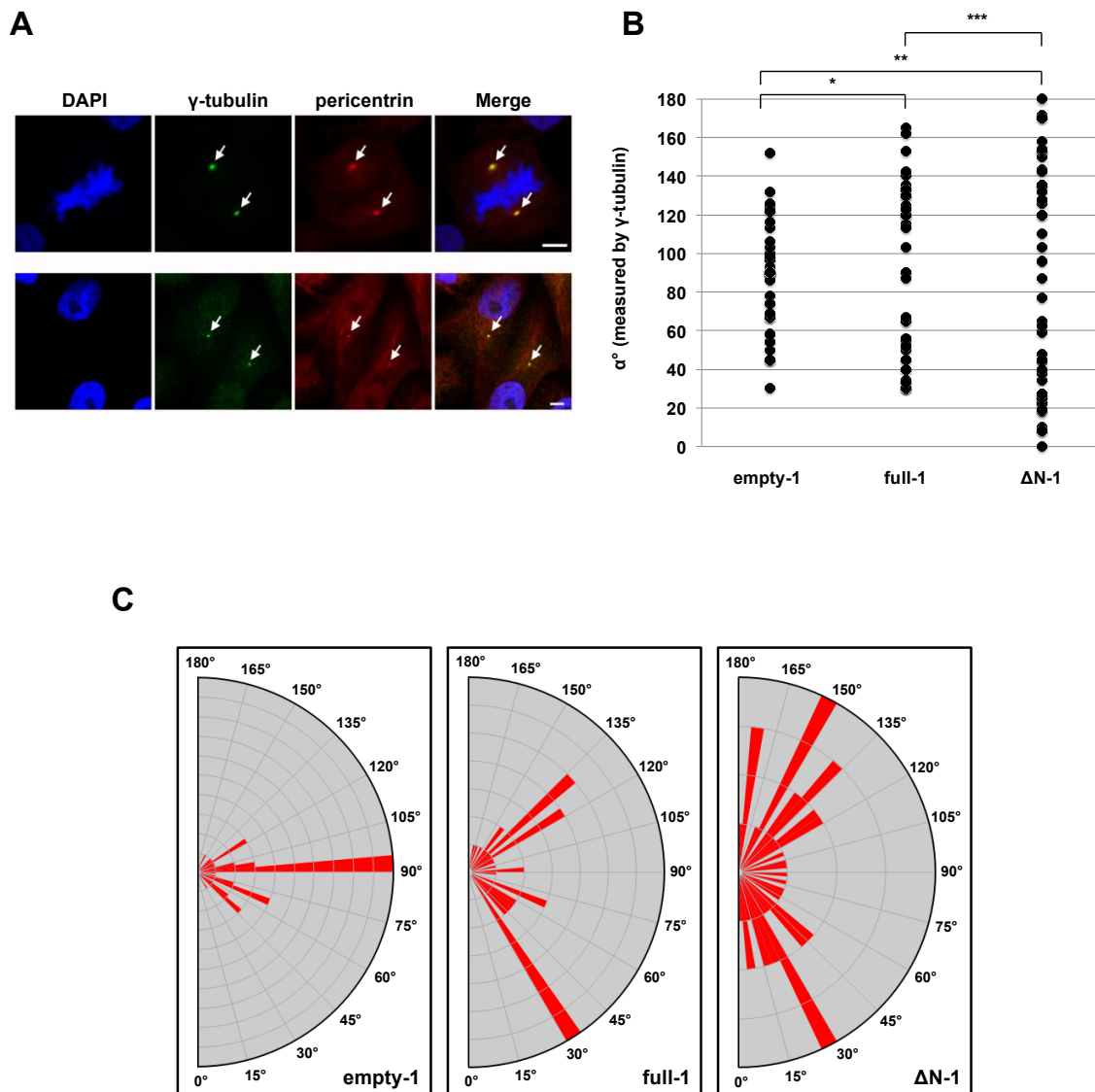


図 10. wound edge における細胞分裂の方向。

(A) 中期 (上のパネル) および間期 (下のパネル) における DAPI、 γ -チューブリン、およびペリセントリンの免疫蛍光染色。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。

(B) empty-1、full-1、および $\Delta\text{N-1}$ における DAPI および γ -チューブリン染色によって測定された極角 (α°)。

(C) (B) のローズプロット。

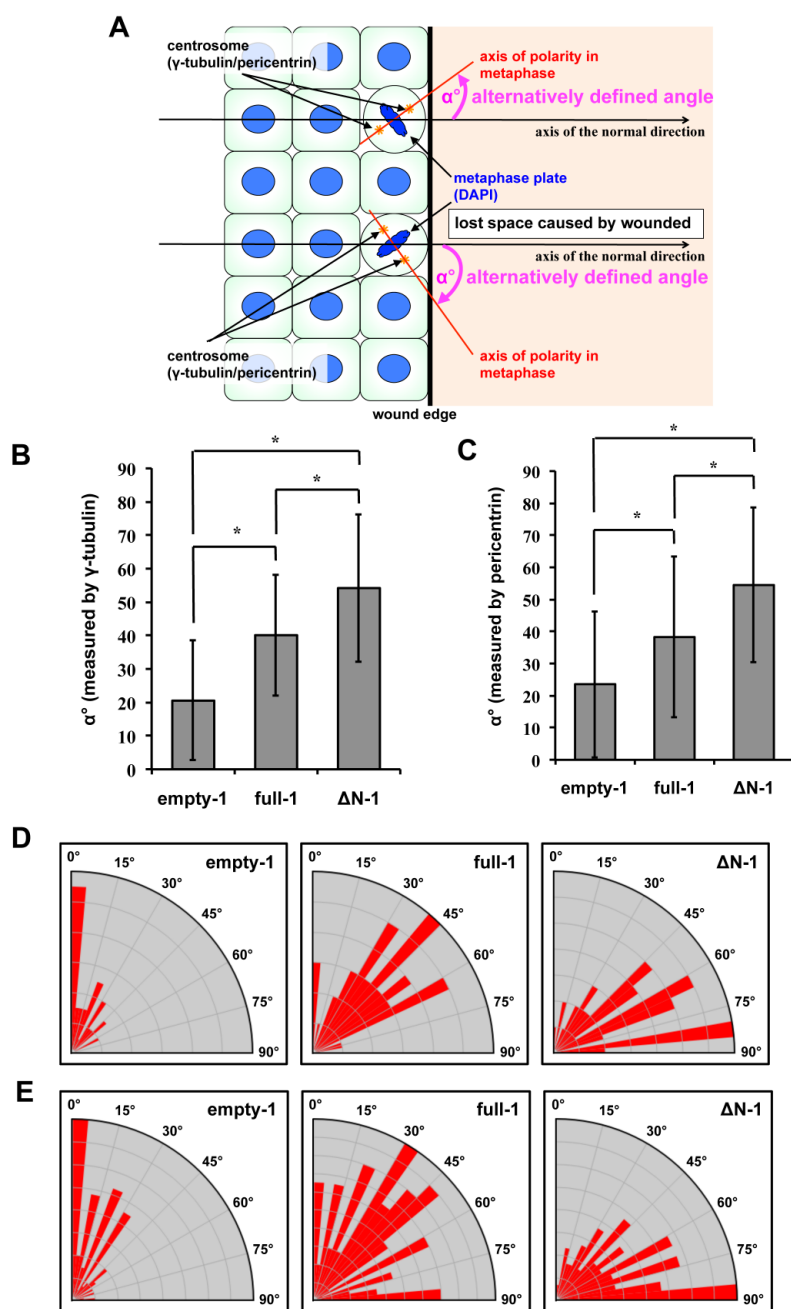


図 11. wound edge における細胞分裂の方向。

(A) wound edge における細胞分裂の方向の概略図。

(B) DAPI および γ -チューブリン染色によって測定された極角 (α°)。

(C) DAPI およびペリセントリン染色によって測定された極角 (α°)。

(D) (B) のローズプロット。

(E) (C) のローズプロット。

4. 4 まとめと考察

3章にて、 ΔN -RhoGDI β および全長 RhoGDI β が発現している細胞で細胞の増殖に差異がないことを明らかにしていた。4章での結果から、ランダムな細胞運動は、 ΔN -RhoGDI β 強制発現によって、少しの低下を観察したものの、有意差は確認出来なかった。一方、*in vitro* ワウンドヒーリングアッセイの結果、RhoGDI β 強制発現においても ΔN -RhoGDI β 強制発現においても、方向性のある細胞運動能の低下が観察された。また、RhoGDI β 強制発現よりも ΔN -RhoGDI β 強制発現の方が、方向性のある細胞運動能の低下は著しかった。leading edge の分裂細胞で、その分裂の角度の乱れが、RhoGDI β 強制発現においても ΔN -RhoGDI β 強制発現においても、見られた。角度の乱れは、RhoGDI β 強制発現においてよりも ΔN -RhoGDI β 強制発現において、大きく見られた。 ΔN -RhoGDI β は細胞増殖に影響しないが、wound edge における方向性のある細胞分裂に大きく影響を与えることがわかった。

第 5 章 Δ N-RhoGDI β と分子スイッチ である RhoGTPase との関係

5. 1 研究背景

第5章では、 ΔN -RhoGDI β が分子スイッチである RhoGTPase とどのように関係しているのかについて述べる。 ΔN -RhoGDI β が有糸分裂時の方向性の運動の制御に関わる生化学的機構を同定するために、 ΔN -RhoGDI β と Rho GTPase との間の相互作用を調べることにした。Rho ファミリーの GTPase は、多様な変化する環境条件に適切に応答するために、様々な細胞型で複数の機能的活性を発揮され[33]、Rac、Cdc42、Rho などのサブファミリーに細分される[34]。第5章ではその Rac、Cdc42、Rho と ΔN -RhoGDI β との相互作用を調べる。そのために、第2、第3、第4章で使用してきた安定発現クローンを用いて、完全長 RhoGDI β および ΔN -RhoGDI β の細胞内局在を調べた。

5. 2 材料と方法

5.2.1 細胞

HeLa 細胞（ヒト子宮頸部癌由来細胞）を用いた。HeLa 細胞は、全て DMEM（dulbecco's modified eagle medium : GIBCO 社）に 10%牛胎児血清（Biosciences 社）を添加した培地で、37°C、CO₂ 濃度 5%の条件のインキュベーターで培養した。

5.2.2 タンパク質分画および免疫ブロット法

細胞タンパク質分画法は TBSN-buffer（20mM Tris-HCl pH8.0、150mM NaCl、1mM EDTA pH8.0、5mM EGTA pH8.0、0.5mM Na₃VO₄）20 μ l を用いて、可溶性画分および不溶性画分を得た。1mM PMSF、0.5%NP-40、Protease Inhibitor Cocktail（P8340、Sigma-Aldrich 社）および Phosphatase Inhibitor Cocktail 1（P2850、Sigma-Aldrich 社）および Nuclear Extraction Kit（Active Motif 社）を用いて核画分および界面活性剤可溶性細胞質核画分および界面活性剤不溶性ペレット画分を得た。分画したサンプルを SDS-sample buffer（25mM Tris-HCl pH 6.8、5% glycerol,2.5% 2-mercaptoethanol、1%SDS、protease inhibitor cocktail（Sigma 社））と混合し、100°Cで 3 分間熱処理を行った後、12% SDS-ポリアクリルアミドゲルで泳動した。泳動後は、Immobilom-P membrane（Millipore 社）にタンパク質を転写させた。その後、メンブレンを 1 次抗体で反応させ、2 次抗体と反応させた後、ECL Western Blotting Detection Reagent（Amersham 社）を使って、X 線フィルムに感光させ、タンパク質の発現を調べた。1 次抗体には、抗 Xpress 抗体（#R910-25, Life Technologies 社）、抗 RhoA 抗体（sc-179, Santa Cruz Biotechnology 社）、抗 Rac1 抗体（R56220, BD Transduction Laboratories 社）、抗 Cdc42 抗体（sc-87, Santa Cruz Biotechnology 社）抗 α -tubulin 抗体（CLT9002, Cedarlane 社）を用いた。2 次抗体には、HRP 標識した抗ラビット、もしくは抗マウス抗体（Amersham Biosciences 社）を用いた。

5.2.3 免疫沈降法

界面活性剤可溶性核画分を免疫沈降分析に使用した。洗浄した抽出物を、プロテイン A Dynabeads（Life Technologies 社）にカップリングしたモノクローナル抗 Xpress 抗体とともにインキュベートした。ビーズを洗浄し、適切な抗体を用いた免疫ブロット法のために処理をした。

5.2.4 Cdc42 活性測定

細胞内活性 Cdc42 は、G-LISA Small G-Protein Activation Assay Biochem キット (Cytoskeleton 社) を使用して製造者の指示に従って定量した。

5. 3 結果

TBSN (+) 緩衝液を用いて分画した場合、外因的に発現する全長 RhoGDI β が界面活性剤可溶性画分に主に見出された (図 12A、レーン 11 (Full-1 / TBSN / S) およびレーン 12 (Full-1 / TBSN / I))。この界面活性剤可溶性 RhoGDI β は、細胞質画分に主に存在し、Nuclear Extraction Kit を用いて分画したとき、核画分にもわずかに存在した (図 12A、レーン 13 (full-1 / Nuc) レーン 14 (full-1 / Nuc.Ext./N)、およびレーン 15 (full-1 / Nuc.Ext./P))。免疫蛍光染色により、以前に観察されたように[58]、完全長の RhoGDI β の局在が細胞の分裂中期において、中心体で検出されたことが明らかになった。中心体は、上記の免疫プロットデータに例示されるように、外因性に発現する完全長 RhoGDI β がわずかに存在する核膜 (界面活性剤可溶性核画分) と密接に関連しているため、この結果は驚くべきことではない (図 12A、レーン 14 (full-1 / Nuc.Ext./N))。これと比較して、 Δ N-RhoGDI β は、Nuclear Extraction Kit を用いて分画した場合に、より多量に界面活性剤可溶性核画分中に検出された。(図 12A、レーン 16 (Δ N-1 / TBSN / S)、レーン 17 (Δ N-1 / TBSN / I) レーン 18 (Δ N-1 / Nuc.Ext./C) レーン 19 (Δ N-1 / Nuc.Ext./N) およびレーン 20 (Δ N-1 / Nuc.Ext./P))。また、 Δ N-RhoGDI β の中心体局在は、免疫蛍光染色によって確認した。(図 14)。このように、N 末端切断は、RhoGDI β の洗剤可溶性核画分への局在を増加し、有糸分裂中により効率的な中心体局在化をもたらす可能性もある。同時に、RhoGTPase、RhoA、Rac および Cdc42 の細胞内局在を調べた。これらの RhoGTPase の細胞内分画には完全長 RhoGDI β または Δ N-RhoGDI β の発現は影響を与えなかったが、Nuclear Extraction Kit を用いて分画した場合、RhoA より界面活性剤可溶性核画分中に Rac および Cdc42 がより豊富に検出された (図 12A)。次に、 Δ N-RhoGDI β と RhoGTPase との相互作用について検討した。界面活性剤可溶性核画分 Δ N-RhoGDI β が RhoA、Rac および Cdc42 と直接相互作用するかどうかを決定するために、共免疫沈降および免疫プロット法を行った。図 12B に示すように、抗 Xpress 抗体によって、Xpress タグのついた Δ N-RhoGDI β を用いて共免疫沈降を行った場合 Cdc42 との共免疫沈降は確認できたが、他の RhoGTPase とは共免疫沈降しなかった (図 12B、IP : 抗 Xpress)。この相互作用は、抗 Cdc42 抗体を用いた免疫沈降実験によっても確認された (図 12B、IP : 抗 Cdc42)。次いで、全長 RhoGDI β および Δ N-RhoGDI β を外因的に発現する細胞における Cdc42 の活性レベルを評価した。Cdc42 活性型である GTP 結合 Cdc42GTPase の量を測定されたとき、活性は Δ N-RhoGDI β

の発現によって抑制されていた(図 13A)。Cdc42 の過剰発現は、完全長 RhoGDI β によって誘導される抑制を克服することができたが、 Δ N-RhoGDI β によって誘導される抑制を克服することはできなかった(図 13B)。

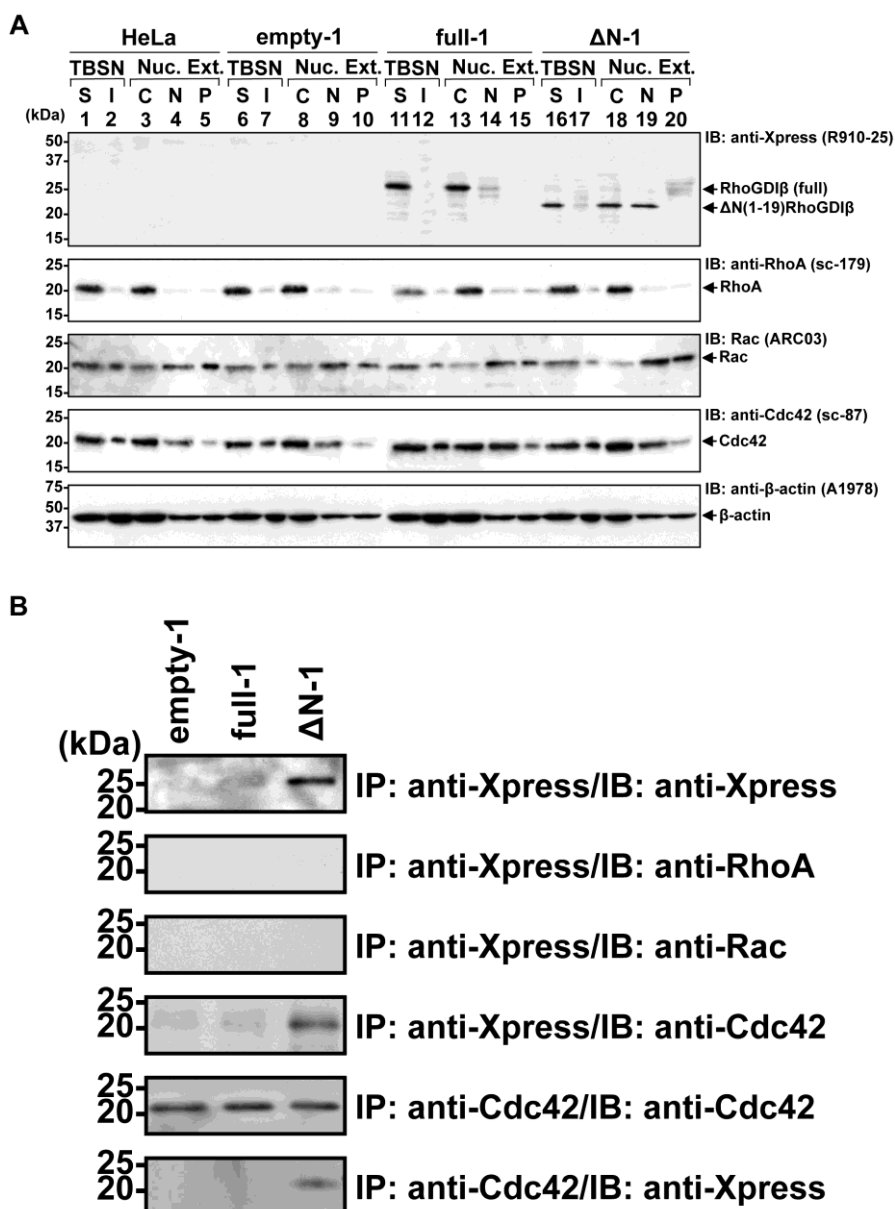


図 12. ΔN-RhoGDIβ の細胞内局在と RhoGTPase との結合。

(A) 細胞内分画および免疫ブロット法による RhoGDIβ と RhoGTPase の細胞内局在。 レーンはそれぞれ、TBSN 緩衝液可溶性 (レーン S) および不溶性 (レーン I) 画分、または界面活性剤可溶性細胞質 (レーン C)、核 (レーン N) および界面活性剤不溶性ペレット (レーン P) 画分。

(B) RhoGDIβ と RhoGTPase との相互作用。 界面活性剤可溶性核画分に分画した細胞溶解物を使用。 抗 Xpress 抗体または抗 Cdc42 抗体のいずれかで免疫沈降させ、抗 Xpress、抗 RhoA、抗 Rac、および抗 Cdc42 抗体で免疫ブロット法を行った。

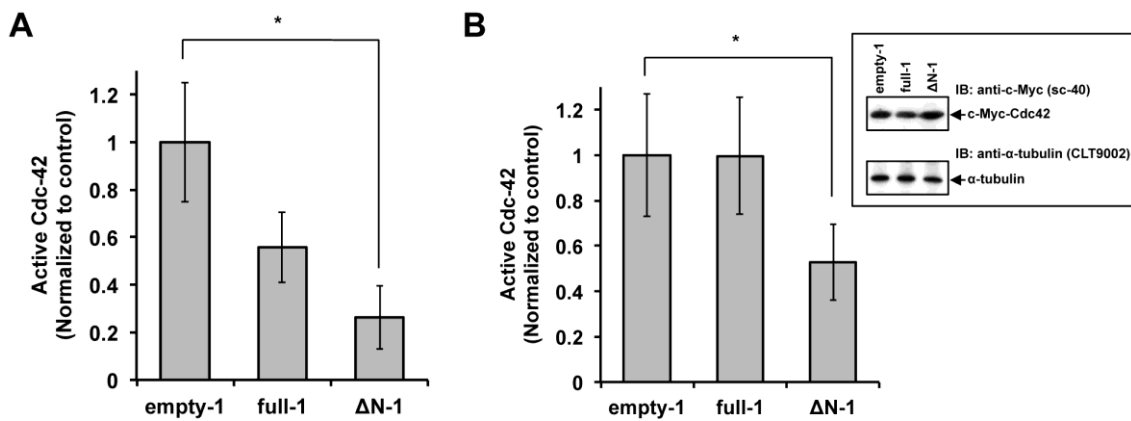


図 13. ΔN-RhoGDIβ による Cdc42 活性への影響。

(A) empty-1、full-1、および ΔN-1 における活性 Cdc42 の全レベル。

(B) empty-1、full-1、および ΔN-1 に外因性の Cdc-42 が存在する時の活性 Cdc42 の全レベルに及ぼす影響。

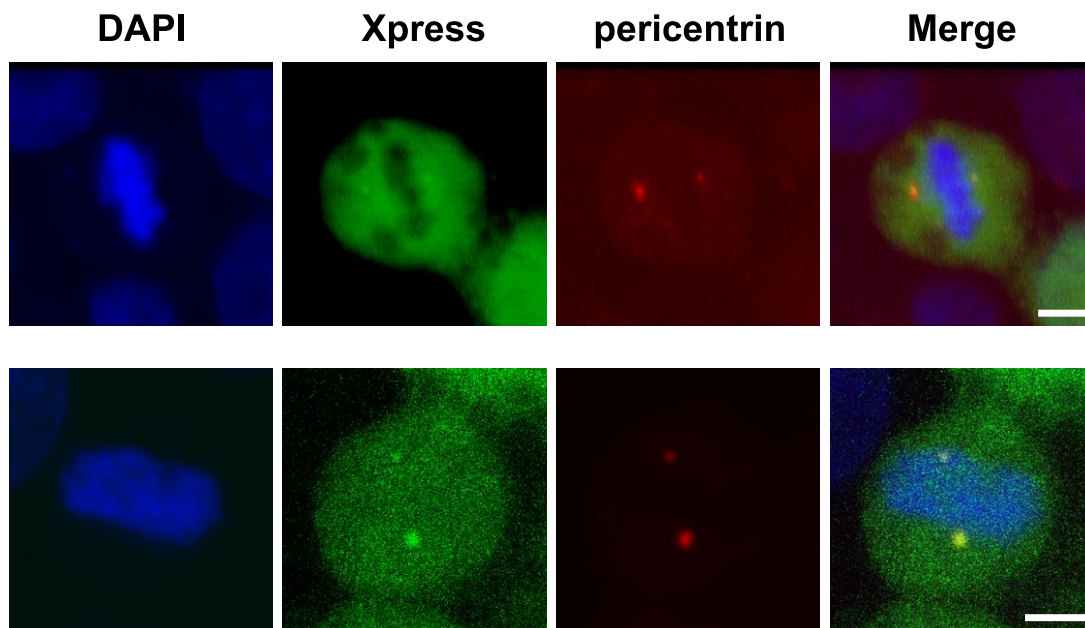


図 14. full-1 および ΔN-1 の中期における DAPI 染色による Xpress およびペリセントリンの免疫蛍光染色。スケールバーは 10 μm。

5. 4 まとめと考察

非切断型の野生型 RhoGDI β は主に細胞膜上で Rac1 の阻害効果を担う分子である。 Δ N-RhoGDI β は、N 末欠失によって、細胞膜との親和性が下がり、細胞全体に分布を大きく変える。この検討は、以前に当該研究室で行われており、たんぱく質二次元電気泳動解析により、RhoGDI β は細胞膜に主に存在するが、 Δ N-RhoGDI β は細胞膜以外にも、細胞質（サイロゾール）、ミトコンドリア（膜画分）、そして細胞核（膜画分）にも広く分布することがわかっている。この研究で、RhoGDI β は、N 末欠失型となって、 Δ N-RhoGDI β が Cdc42 と結合することがわかった。また、 Δ N-RhoGDI β は優先的に（ドミナントネガティブの様式で）Cdc42 を阻害していることがわかった。

第6章 Δ N-RhoGDI β の Cdc42 阻害効果 がもたらす生理作用

6. 1 研究背景

第 5 章の結果より、 ΔN -RhoGDI β がドミナントネガティブ的に Cdc42 を阻害していることがわかった。Cdc42 は、細胞の極性を制御する分子スイッチとして認識されている[33, 39-41]。この活性の阻害は、方向性のある分裂や運動が阻害される[45-48]。また、ハエの研究から、Cdc42 阻害によって、方向性を失った細胞がアポトーシスで失われた細胞を埋める増殖（代償性増殖）を誘導するシグナル経路を活性化することが知られている。

そこで、第 6 章では ΔN -RhoGDI β 発現が照射後の代償増殖を促進するかどうかを調べた。empty-1 および ΔN -1 のコンフルエントな細胞培養物を、0Gy または 10Gy の放射線照射を行った。

6. 2 材料と方法

6. 2. 1 細胞

HeLa 細胞（ヒト子宮頸部癌由来細胞）を用いた。HeLa 細胞は、全て DMEM（dulbecco's modified eagle medium : GIBCO 社）に 10%牛胎児血清（Biosciences 社）を添加した培地で、37°C、CO₂ 濃度 5%の条件のインキュベーターで培養した。

6. 2. 2 レーザー走査共焦点顕微鏡を用いた間接免疫蛍光法

細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、Triton X-100 で透過処理し、ウシ血清アルブミンでブロックし、適切な一次抗体および適当な Alexa Fluor 488 または 568 結合二次抗体と共にインキュベートした (Jiang ら、2013)。ローダミンファロイジンおよび 40,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) も、それぞれ、F-アクチンおよび DNA を染色するために用いた。

6. 2. 3 RhoA 活性測定

細胞内活性 RhoA は、G-LISA Small G-Protein Activation Assay Biochem キット (Cytoskeleton 社) を使用して製造者の指示に従って定量した。

6. 2. 4 放射線照射

細胞に、0.5mA の Al プラス 0.5mm の Cu フィルターを備えた 4mA で動作する X 線発生器 (135kVp) を用いて、Victoreen ionizing chamber によって測定して 0.5Gy/分の線量率の放射線を室温で照射した。

6. 3 結果

培養は持続的に維持した。そして、放射線照射約 144 時間後、修復不能な DNA 損傷を受けた細胞がアポトーシスした後、生き残った残りの接着している $\Delta N-1$ 細胞は、代償性増殖を受けることをリン酸化 H3 ヒストンの染色で測定した (図 15 図 8A および B)。同時に、増殖シグナルの指標としての活性 RhoA が $\Delta N-1$ 細胞においてアップレギュレートされた (図 15 図 8C)。

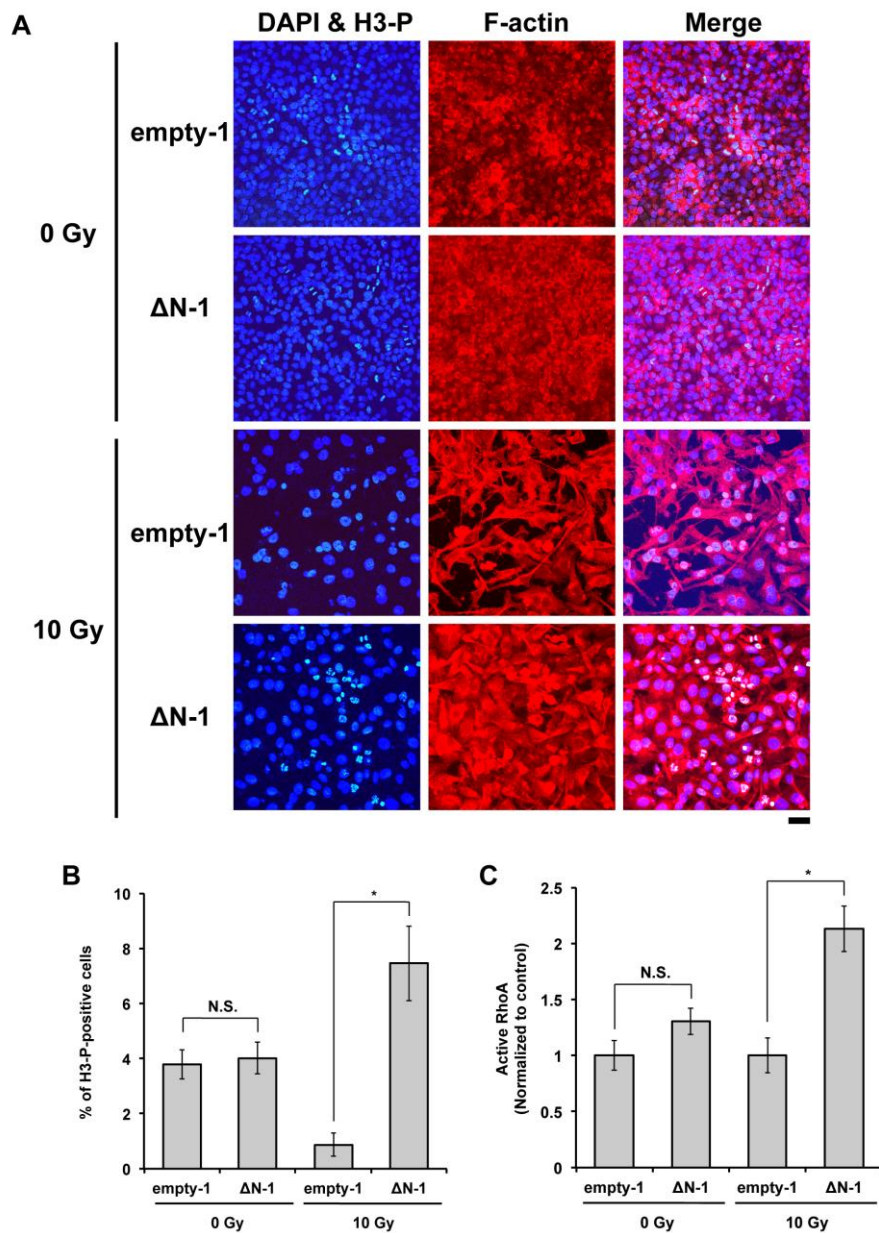


図 15. ΔN -RhoGDI β 発現は、照射後の代償増殖を促進する。

(A) 0 Gy または 10 Gy の放射線に曝露した 144 時間後の empty-1 および ΔN -1 細胞。DNA (青色)、リン酸化 H3 ヒストン (緑色)、F-アクチン (赤色) の共焦点免疫蛍光局在。スケールバーは 50 μ m。

(B) 0 Gy または 10 Gy の放射線に曝露した 144 時間後の empty-1 および ΔN -1 細胞中のリン酸化 H3 ヒストンポジティブ細胞の定量値。

(C) 0 Gy または 10 Gy の放射線に曝露した 144 時間後の empty-1 および ΔN -1 細胞における活性 RhoA の定量値。

6. 4 まとめと考察

放射線照射後に再増殖をしている細胞でリン酸化 H3 ヒストンをマーカーとしてどれ程再増殖しているのかを見た。リン酸化 H3 ヒストンはマイトティックマーカーである。そうすると、 ΔN -RhoGDI β を高発現させた場合に、代償性の増殖が誘導されることがわかった。このことから RhoGDI β が切断された際に現れると切断産物が、放射線照射後に生き残っている細胞で発現増加し、その後のゲノムダメージを受けた細胞で Cdc42 を抑制し、また代償性の増殖を促進すると考えられる。これは腫瘍においてアポトーシスを起こした後に、再増殖をしてくる際、 ΔN -RhoGDI β がそれを助けていると考えられる。

第7章 総括

過去の研究で、3型カスパーゼの活性化がアポトーシスの遂行の根底にあるメカニズムであると考えられてきた[15, 16, 26]。3型カスパーゼのいくつかの標的は、細胞死プロセスを増殖させる重要な機能を有し、アポトーシス特異的な形態学的変化が3型カスパーゼによって切断された生成物によって誘導される[27]。また、3型カスパーゼによって切断される多くの細胞内調節タンパク質および構造タンパク質は、細胞死を促進する細胞機能の障害に関連している[29]。一方、機能獲得型変化を伴う切断されたタンパク質は、ほとんど特徴づけられていないままである[16]。同様に、3型カスパーゼによって切断されるが機能的に明らかに無関係なタンパク質は、バイスタンダーとして分類することができる[30]。まだ特徴づけられていないアポトーシスまたはアポトーシス関連の3型カスパーゼの基質がどのように関与するかを理解に加えて、生化学的および細胞生物学的分析は、切断された基質のアポトーシスに関連する機能的役割を確立するための必須である。

アポトーシスの刺激に応答した3型カスパーゼの活性化の結果として、N末端でのRhoGDI β の切断は Δ N-RhoGDI β 断片を産生することは以前に観察されている[59, 63-65]。アポトーシスの間の Δ N-RhoGDI β の役割を明らかにするために、かなりの研究努力がなされている。非切断変異体(D19A) RhoGDI β を発現する細胞におけるアポトーシスに対する防護の失敗に基づいて、RhoGDI β 切断は、アポトーシスに無関係なバイスタンダー効果であるとみなされてきた[66]。しかし、プロテアソーム阻害剤PSI (Z-Ileu-Glu (OtBu) -Ala-Leu-CHO) およびスタウロスポリンを用いた実験で、 Δ N-RhoGDI β を発現する造血細胞のアポトーシス感受性の増加が報告された[60]。対照的に、強制発現は、第3章で述べたように、アポトーシス誘導および3型カスパーゼ活性化に影響を与えなかった(図2、図4、図5)。従って、 Δ N-RhoGDI β は明らかに、アポトーシス促進の機能を持っておらず、活性化された3型カスパーゼのバイスタンダー産物として現れることがわかった。

アポトーシス細胞死の実行するためのマスタースイッチである3型カスパーゼの活性化は放射線療法などの細胞傷害性癌治療の間の細胞死の中心的決定因子として働く[67-69]。細胞死に本質的な役割を果たすにもかかわらず、3型カスパーゼ活性化は、放射線による組織損傷後の腫瘍細胞の再増殖に寄与するといういくつかの証拠がある[20]。腫瘍再増殖を促進する際の3型カスパーゼ活性化の重要な役割は、切断された3型カスパーゼのレベルが癌患者の予後不良に関

連するという観察によって支持される[70]。本論文では、細胞死に関連しない新しい機能、アポトーシス損傷組織内の生存細胞による組織リモデリングに重要な役割を果たす可能性があることを提案する。

増殖を補償することに最終的に寄与する RhoGDI β の機能的活性化のメカニズムは、結果として生き残った腫瘍細胞を癌の伝播に導く (図 9)。RhoGDI β は細胞膜に局在する[57]。N 末端領域が 3 型カスパーゼによって切断されると、 Δ N-RhoGDI β は細胞膜から細胞内可溶性画分および核に部分的に再分布する[59]。以前の報告[59]と一致して、第 5 章で述べたように、 Δ N-RhoGDI β の細胞内再分布が、放射線に曝露された生存細胞において観察されたことを示した (図 12)。また、第 2 章で述べたように、 Δ N-RhoGDI β がそのような生き残った細胞において高度にアップレギュレートされていることを見出した (図 1)。そして第 6 章では、 Δ N-RhoGDI β は、 Δ N-RhoGDI β を過剰発現する細胞において Cdc42 ドミナントネガティブに阻害することを示した (図 13)。切断されていない (野生型) RhoGDI β は、Rac1 阻害剤としての Rac1 と優先的に相互作用することが知られている[40, 57, 58]。したがって、細胞内再分布と結合パートナーのスイッチングは 3 型カスパーゼ活性化の下流の現象であり、結果として RhoGDI β の結合パートナーは、N-末端切断の結果として Rac1 から Cdc42 に変化すると考えられている。また、Cdc42 は細胞極性を制御することが知られている[33, 39]。そのドミナントネガティブ阻害は、細胞極性の喪失を誘発する[45-48]。さらに、Cdc42 は、アポトーシス誘導性の代償性増殖を導く[71]。要約すると、RhoGDI β は、細胞死プロセスの増殖において重要な機能を有する 3 型カスパーゼ基質ではなく、3 型カスパーゼによって誘導されるその切断後に Cdc42 に対するドミナントネガティブ阻害剤として作用する。この阻害は、方向性のある細胞遊走を阻害し、アポトーシスに応答して細胞増殖を促進する。

今回第 6 章で述べたようにで、 Δ N-RhoGDI β を発現する生き残った細胞において RhoA の活性化も見いだした (図 15)。この活性化は、放射線照射後に生き残った細胞の細胞増殖と関連している可能性が高いが、 Δ N-RhoGDI β がこの効果に直接寄与する可能性は低い。第 3 章および第 6 章の結果から、 Δ N-RhoGDI β の発現増加は非曝露条件下で細胞増殖および RhoA 活性化を誘導しない (図 2 および図 15C)。したがって、 Δ N-RhoGDI β は RhoA の活性化因子ではない。興味深いことに、分裂停止後の非増殖性上皮を用いた以前の研究は、Cdc42 の枯渇が RhoA 活性化をもたらすことを示した[49]。放射線照射された細胞は、有糸分裂

後の非増殖期の状況に似ている細胞周期で停止するので、我々の実験で観察されるように Cdc42 阻害によって RhoA 活性化が誘発される可能性がある。しかし、RhoA 活性化の詳細な機構の解明は依然として困難である。

結論として、RhoGDI β は転移抑制因子として作用する[72, 73]が、放射線治療後に 3 型カスパーゼによって生成された切断産物は、転移抑制メカニズムとしての細胞極性が排除され、放射線傷害細胞において代償性増殖効果が生じる。RhoGDI β は上皮癌において過剰発現しており、その過剰発現は、細胞傷害性癌治療の結果としての転移性伝播に関連する上記の素因のある事象を引き起こす可能性がある。

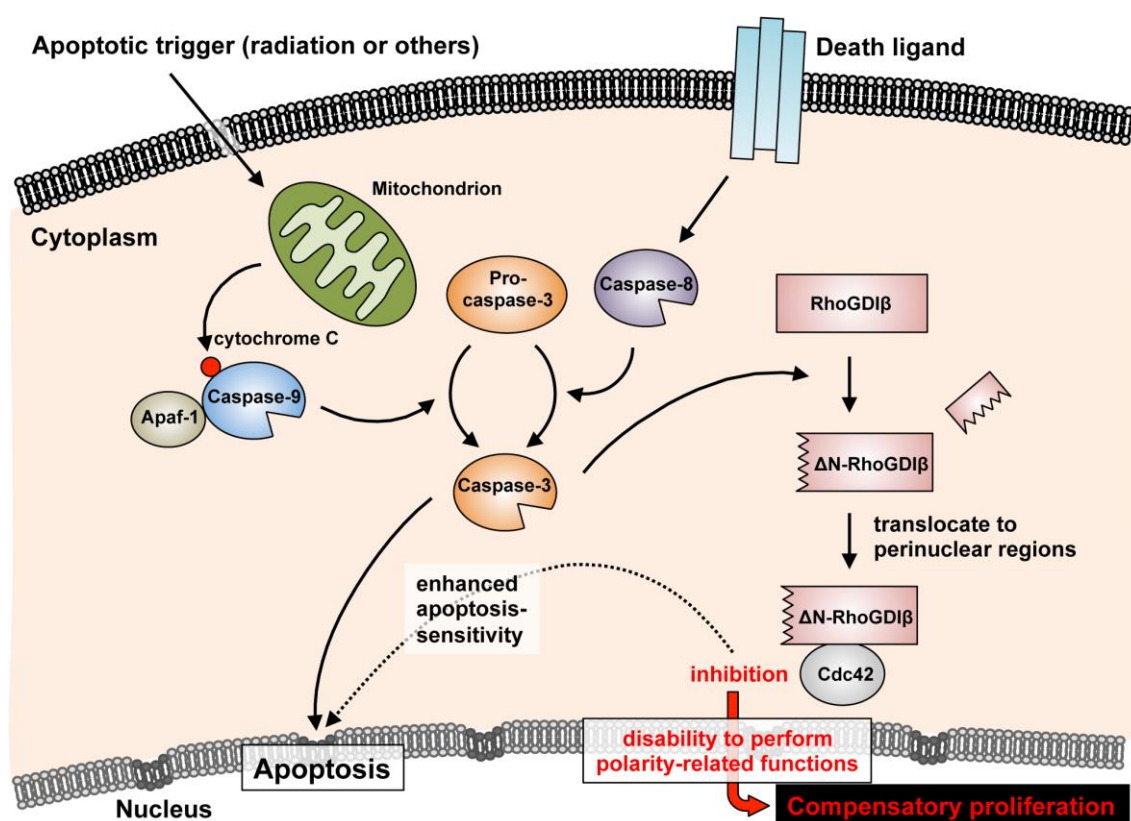


図 16. アポトーシスに起因する極性関連機能遂行能力の喪失を調節するための作業モデル。放射線または他のアポトーシス刺激は、3 型カスパーゼを活性化させる。RhoGDI β は、活性化された 3 型カスパーゼによって切断され、その結果生成物である Δ N-RhoGDI β が細胞内に蓄積され、細胞質および核に移行する。 Δ N-RhoGDI β はドミナントネガティブに Cdc42 を阻害し、この阻害の結果として、極性関連機能が破壊され、それにより代償性増殖を活性化させる。

【引用文献】

- [1] J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British journal of cancer* 26 (1972) 239-257.
- [2] A.H. Wyllie, J.F. Kerr, A.R. Currie, Cell death: the significance of apoptosis, *International review of cytology* 68 (1980) 251-306.
- [3] T. Rich, R.L. Allen, A.H. Wyllie, Defying death after DNA damage, *Nature* 407 (2000) 777-783.
- [4] W.P. Roos, A.D. Thomas, B. Kaina, DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology, *Nature reviews. Cancer* 16 (2016) 20-33.
- [5] Y. Fan, A. Bergmann, Apoptosis-induced compensatory proliferation. The Cell is dead. Long live the Cell!, *Trends in cell biology* 18 (2008) 467-473.
- [6] Y. Fan, A. Bergmann, Distinct mechanisms of apoptosis-induced compensatory proliferation in proliferating and differentiating tissues in the *Drosophila* eye, *Developmental cell* 14 (2008) 399-410.
- [7] F.A. Martin, A. Perez-Garijo, G. Morata, Apoptosis in *Drosophila*: compensatory proliferation and undead cells, *The International journal of developmental biology* 53 (2009) 1341-1347.
- [8] B. Mollereau, A. Perez-Garijo, A. Bergmann, M. Miura, O. Gerlitz, H.D. Ryoo, H. Steller, G. Morata, Compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation: a need for clarification, *Cell death and differentiation* 20 (2013) 181.
- [9] G.I. Evan, K.H. Vousden, Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer, *Nature* 411 (2001) 342-348.
- [10] D.R. Green, G.I. Evan, A matter of life and death, *Cancer cell* 1 (2002) 19-30.
- [11] V. Labi, M. Erlacher, How cell death shapes cancer, *Cell death & disease* 6 (2015) e1675.
- [12] M. Vidal, R.L. Cagan, *Drosophila* models for cancer research, *Current opinion in genetics & development* 16 (2006) 10-16.
- [13] F. Chen, JNK-induced apoptosis, compensatory growth, and cancer stem cells, *Cancer research* 72 (2012) 379-386.
- [14] I. Waghmare, A. Roebke, M. Minata, M. Kango-Singh, I. Nakano, Intercellular cooperation and competition in brain cancers: lessons from *Drosophila* and

- human studies, *Stem cells translational medicine* 3 (2014) 1262-1268.
- [15] W.C. Earnshaw, L.M. Martins, S.H. Kaufmann, Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, *Annual review of biochemistry* 68 (1999) 383-424.
- [16] D.R. McIlwain, T. Berger, T.W. Mak, Caspase functions in cell death and disease, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5 (2013) a008656.
- [17] R.S. Wong, Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 30 (2011) 87.
- [18] S. Fulda, Targeting apoptosis for anticancer therapy, *Seminars in cancer biology* 31 (2015) 84-88.
- [19] B. Kim, S.K. Srivastava, S.H. Kim, Caspase-9 as a therapeutic target for treating cancer, *Expert opinion on therapeutic targets* 19 (2015) 113-127.
- [20] Q. Huang, F. Li, X. Liu, W. Li, W. Shi, F.F. Liu, B. O'Sullivan, Z. He, Y. Peng, A.C. Tan, L. Zhou, J. Shen, G. Han, X.J. Wang, J. Thorburn, A. Thorburn, A. Jimeno, D. Raben, J.S. Bedford, C.Y. Li, Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy, *Nature medicine* 17 (2011) 860-866.
- [21] L. Galluzzi, O. Kepp, G. Kroemer, Caspase-3 and prostaglandins signal for tumor regrowth in cancer therapy, *Oncogene* 31 (2012) 2805-2808.
- [22] K. Boland, L. Flanagan, J.H. Prehn, Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3, *Cell death & disease* 4 (2013) e725.
- [23] P. Mao, L. Smith, W. Xie, M. Wang, Dying endothelial cells stimulate proliferation of malignant glioma cells via a caspase 3-mediated pathway, *Oncology letters* 5 (2013) 1615-1620.
- [24] A.L. Donato, Q. Huang, X. Liu, F. Li, M.A. Zimmerman, C.Y. Li, Caspase 3 promotes surviving melanoma tumor cell growth after cytotoxic therapy, *The Journal of investigative dermatology* 134 (2014) 1686-1692.
- [25] S. Shalini, L. Dorstyn, S. Dawar, S. Kumar, Old, new and emerging functions of caspases, *Cell death and differentiation* 22 (2015) 526-539.
- [26] A.G. Porter, R.U. Janicke, Emerging roles of caspase-3 in apoptosis, *Cell death and differentiation* 6 (1999) 99-104.
- [27] U. Fischer, R.U. Janicke, K. Schulze-Osthoff, Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates, *Cell death and differentiation* 10

- (2003) 76-100.
- [28] C. Schwerk, K. Schulze-Osthoff, Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation, *Biochemical pharmacology* 66 (2003) 1453-1458.
- [29] A.U. Luthi, S.J. Martin, The CASBAH: a searchable database of caspase substrates, *Cell death and differentiation* 14 (2007) 641-650.
- [30] J.C. Timmer, G.S. Salvesen, Caspase substrates, *Cell death and differentiation* 14 (2007) 66-72.
- [31] D. Demon, P. Van Damme, T. Vanden Berghe, J. Vandekerckhove, W. Declercq, K. Gevaert, P. Vandenabeele, Caspase substrates: easily caught in deep waters?, *Trends in biotechnology* 27 (2009) 680-688.
- [32] E.D. Crawford, J.E. Seaman, A.E. Barber, 2nd, D.C. David, P.C. Babbitt, A.L. Burlingame, J.A. Wells, Conservation of caspase substrates across metazoans suggests hierarchical importance of signaling pathways over specific targets and cleavage site motifs in apoptosis, *Cell death and differentiation* 19 (2012) 2040-2048.
- [33] S. Etienne-Manneville, Cdc42--the centre of polarity, *Journal of cell science* 117 (2004) 1291-1300.
- [34] A. Boureux, E. Vignal, S. Faure, P. Fort, Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes, *Molecular biology and evolution* 24 (2007) 203-216.
- [35] S.J. Heasman, A.J. Ridley, Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies, *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (2008) 690-701.
- [36] S.T. Sit, E. Manser, Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton, *Journal of cell science* 124 (2011) 679-683.
- [37] M. David, D. Petit, J. Bertoglio, Cell cycle regulation of Rho signaling pathways, *Cell cycle* 11 (2012) 3003-3010.
- [38] S. Hanna, M. El-Sibai, Signaling networks of Rho GTPases in cell motility, *Cellular signalling* 25 (2013) 1955-1961.
- [39] H.O. Park, E. Bi, Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond, *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 71 (2007) 48-96.
- [40] Y. Wu, K. Moissoglu, H. Wang, X. Wang, H.F. Frierson, M.A. Schwartz, D.

- Theodorescu, Src phosphorylation of RhoGDI2 regulates its metastasis suppressor function, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009) 5807-5812.
- [41] R. Mayor, S. Etienne-Manneville, The front and rear of collective cell migration, *Nature reviews. Molecular cell biology* 17 (2016) 97-109.
- [42] E.K. Kieserman, J.B. Wallingford, In vivo imaging reveals a role for Cdc42 in spindle positioning and planar orientation of cell divisions during vertebrate neural tube closure, *Journal of cell science* 122 (2009) 2481-2490.
- [43] B. Woods, C.C. Kuo, C.F. Wu, T.R. Zyla, D.J. Lew, Polarity establishment requires localized activation of Cdc42, *The Journal of cell biology* 211 (2015) 19-26.
- [44] H.W. Yang, S.R. Collins, T. Meyer, Locally excitable Cdc42 signals steer cells during chemotaxis, *Nature cell biology* 18 (2016) 191-201.
- [45] G. Kesavan, F.W. Sand, T.U. Greiner, J.K. Johansson, S. Kobberup, X. Wu, C. Brakebusch, H. Semb, Cdc42-mediated tubulogenesis controls cell specification, *Cell* 139 (2009) 791-801.
- [46] L.M. McCaffrey, J. Montalbano, C. Mihai, I.G. Macara, Loss of the Par3 polarity protein promotes breast tumorigenesis and metastasis, *Cancer cell* 22 (2012) 601-614.
- [47] H. Wan, C. Liu, S.E. Wert, W. Xu, Y. Liao, Y. Zheng, J.A. Whitsett, CDC42 is required for structural patterning of the lung during development, *Developmental biology* 374 (2013) 46-57.
- [48] Z.B. Wang, Z.Z. Jiang, Q.H. Zhang, M.W. Hu, L. Huang, X.H. Ou, L. Guo, Y.C. Ouyang, Y. Hou, C. Brakebusch, H. Schatten, Q.Y. Sun, Specific deletion of Cdc42 does not affect meiotic spindle organization/migration and homologous chromosome segregation but disrupts polarity establishment and cytokinesis in mouse oocytes, *Molecular biology of the cell* 24 (2013) 3832-3841.
- [49] S.J. Warner, G.D. Longmore, Cdc42 antagonizes Rho1 activity at adherens junctions to limit epithelial cell apical tension, *The Journal of cell biology* 187 (2009) 119-133.
- [50] J. Cherfils, M. Zeghouf, Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs, *Physiological reviews* 93 (2013) 269-309.
- [51] R. Garcia-Mata, E. Boulter, K. Burridge, The 'invisible hand': regulation of RHO

- GTPases by RHOGDIs, *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (2011) 493-504.
- [52] B. Olofsson, Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling, *Cellular signalling* 11 (1999) 545-554.
- [53] T. Ota, M. Maeda, M. Okamoto, M. Tatsuka, Positive regulation of Rho GTPase activity by RhoGDIs as a result of their direct interaction with GAPs, *BMC systems biology* 9 (2015) 3.
- [54] A. Dovas, J.R. Couchman, RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities, *The Biochemical journal* 390 (2005) 1-9.
- [55] G. Zalzman, V. Closson, J. Camonis, N. Honore, M.F. Rousseau-Merck, A. Tavitian, B. Olofsson, RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG, *The Journal of biological chemistry* 271 (1996) 30366-30374.
- [56] C.N. Adra, D. Manor, J.L. Ko, S. Zhu, T. Horiuchi, L. Van Aelst, R.A. Cerione, B. Lim, RhoGDIgamma: a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1997) 4279-4284.
- [57] T. Ota, M. Maeda, S. Sakita-Suto, X. Zhou, M. Murakami, T. Takegami, M. Tatsuka, RhoGDIbeta lacking the N-terminal regulatory domain suppresses metastasis by promoting anoikis in v-src-transformed cells, *Clinical & experimental metastasis* 23 (2006) 323-334.
- [58] Y.S. Jiang, M. Maeda, M. Okamoto, M. Fujii, R. Fukutomi, M. Hori, M. Tatsuka, T. Ota, Centrosomal localization of RhoGDIbeta and its relevance to mitotic processes in cancer cells, *International journal of oncology* 42 (2013) 460-468.
- [59] X. Zhou, S. Suto, T. Ota, M. Tatsuka, Nuclear translocation of cleaved LyGDI dissociated from Rho and Rac during Trp53-dependent ionizing radiation-induced apoptosis of thymus cells in vitro, *Radiation research* 162 (2004) 287-295.
- [60] M.R. Choi, M. Groot, H.C. Drexler, Functional implications of caspase-mediated RhoGDI2 processing during apoptosis of HL60 and K562 leukemia cells, *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 12 (2007) 2025-2035.

- [61] M. Hori, T. Miki, M. Okamoto, F. Yazama, H. Konishi, H. Kaneko, F. Shimamoto, T. Ota, A. Temme, M. Tatsuka, The detergent-soluble cytoplasmic pool of survivin suppresses anoikis and its expression is associated with metastatic disease of human colon cancer, *PloS one* 8 (2013) e55710.
- [62] M. Tatsuka, S. Jinno, M.K. Owada, T. Kakunaga, A digital image processing system for quantitating dynamic morphology in cultured mammalian cells, *Experimental cell research* 185 (1989) 342-352.
- [63] S. Na, T.H. Chuang, A. Cunningham, T.G. Turi, J.H. Hanke, G.M. Bokoch, D.E. Danley, D4-GDI, a substrate of CPP32, is proteolyzed during Fas-induced apoptosis, *The Journal of biological chemistry* 271 (1996) 11209-11213.
- [64] A. Rickers, E. Brockstedt, M.Y. Mapara, A. Otto, B. Dorken, K. Bommert, Inhibition of CPP32 blocks surface IgM-mediated apoptosis and D4-GDI cleavage in human BL60 Burkitt lymphoma cells, *European journal of immunology* 28 (1998) 296-304.
- [65] F. Essmann, T. Wieder, A. Otto, E.C. Muller, B. Dorken, P.T. Daniel, GDP dissociation inhibitor D4-GDI (Rho-GDI 2), but not the homologous rho-GDI 1, is cleaved by caspase-3 during drug-induced apoptosis, *The Biochemical journal* 346 Pt 3 (2000) 777-783.
- [66] R.J. Krieser, A. Eastman, Cleavage and nuclear translocation of the caspase 3 substrate Rho GDP-dissociation inhibitor, D4-GDI, during apoptosis, *Cell death and differentiation* 6 (1999) 412-419.
- [67] D. Coelho, V. Holl, D. Weltin, T. Lacornerie, P. Magnenet, P. Dufour, P. Bischoff, Caspase-3-like activity determines the type of cell death following ionizing radiation in MOLT-4 human leukaemia cells, *British journal of cancer* 83 (2000) 642-649.
- [68] X.H. Yang, S. Edgerton, A.D. Thor, Reconstitution of caspase-3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to radiation therapy, *International journal of oncology* 26 (2005) 1675-1680.
- [69] X. Feng, L. Tian, Z. Zhang, Y. Yu, J. Cheng, Y. Gong, C.Y. Li, Q. Huang, Caspase 3 in dying tumor cells mediates post-irradiation angiogenesis, *Oncotarget* 6 (2015) 32353-32367.
- [70] Q. Hu, J. Peng, W. Liu, X. He, L. Cui, X. Chen, M. Yang, H. Liu, S. Liu, H. Wang, Elevated cleaved caspase-3 is associated with shortened overall survival

in several cancer types, *International journal of clinical and experimental pathology* 7 (2014) 5057-5070.

- [71] S.J. Warner, H. Yashiro, G.D. Longmore, The Cdc42/Par6/aPKC polarity complex regulates apoptosis-induced compensatory proliferation in epithelia, *Current biology : CB* 20 (2010) 677-686.
- [72] J.J. Gildea, M.J. Seraj, G. Oxford, M.A. Harding, G.M. Hampton, C.A. Moskaluk, H.F. Frierson, M.R. Conaway, D. Theodorescu, RhoGDI2 is an invasion and metastasis suppressor gene in human cancer, *Cancer research* 62 (2002) 6418-6423.
- [73] T. Ota, M. Maeda, S. Suto, M. Tatsuka, LyGDI functions in cancer metastasis by anchoring Rho proteins to the cell membrane, *Molecular carcinogenesis* 39 (2004) 206-220.

【謝辞】

本学位論文をまとめるにあたり、終始多大なるご指導・ご教授を賜りました県立広島大学生命環境学部生命化学科の達家雅明教授に厚く御礼申し上げます。

また、大変お忙しい中、副査として本学位論文へのご高見を賜るとともに、ご教示を頂きました県立広島大学生命環境学部生命化学科の齋藤靖和教授、県立広島大学生命環境学部生命化学科の小西博昭教授、県立広島大学生命環境学部生命化学科の菅裕准教授に心より感謝いたします。

そして、本研究遂行に際し多くのご協力を承りました金沢医科大学総合医学研究所生命科学研究領域腫瘍生物研究分野の太田隆英先生、県立広島大学生命環境学部生命化学科ゲノム制御システム生物学研究室の皆さん、同研究室の卒業生の皆さんに深く感謝の意を表します。

【発表論文等の業績】

論文発表

1. Fujiwara M, Okamoto M, Hori M, Suga H, Jikihara H, Sugihara Y, Shimamoto F, Mori T, Nakaoji K, Hamada K, Ota T, Wiedemuth R, Temme A, Tatsuka M.
Radiation-Induced RhoGDI β Cleavage Leads to Perturbation of Cell Polarity: A Possible Link to Cancer Spreading.
J Cell Physiol. 2016, 231(11), 2493-505.
2. Ota T, Jiang YS, Fujiwara M, Tatsuka M.
Apoptosis- independent cleavage of RhoGDI β at Asp19 during PMA- stimulated differentiation of THP- 1 cells to macrophages.
Mol Med Rep. 2017, 15(4), 1722-1726.
3. Wiedemuth R, Klink B, Fujiwara M, Schröck E, Tatsuka M, Schackert G, Temme A.
Janus face-like effects of Aurora B inhibition: antitumoral mode of action versus induction of aneuploid progeny.
Carcinogenesis. 2016, 37(10), 993-1003.
1. 達家雅明, 藤原守, 岡本茉佑美, 堀正人, 杉原由佳, 直原寛, 仲尾次浩一, 濱田和彦, 菅裕, 嶋本文雄.
RhoGDI β を分子標的とした応用生命科学の可能性.
生命環境学術誌. 2016, 8, 1-12.

学会発表

1. 藤原守, 太田隆英, 達家雅明
ハイポキシア環境下における紡錘体チェックポイント制御異招来のメカニ
ズム
第 24 回日本がん転移学会学術集会・総会, 大阪, 2015.7.
2. 太田隆英, 藤原守, 達家雅明
マクロファージの放射線誘発アポトーシスにおける RhoGDI β の役割
第 24 回日本がん転移学会学術集会・総会, 大阪, 2015.7.
3. 藤原守, 太田隆英, 達家雅明
3 型カスパーゼ切断変様 RhoGDI β の細胞極性関連形質への影響
第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2015.10.
4. 太田隆英, 藤原守, 達家雅明
RhoGDI の細胞内局在は細胞腫により異なる
第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2015.10.
5. 藤原守, 牛衛夢宇, 有留和輝, 菅裕, 仲尾次浩一, 濱田和彦, 太田隆英, 達家
雅明
3 型カスパーゼ切断型 N 末欠失 RhoGDI β の細胞極性関連形質制御機構研
究
第 12 回神戸ワイン城シンポジウム, 神戸, 2015.12.
6. 牛衛夢宇, 有留和輝, 福島広之, 藤原守, 達家雅明
RhoGDI β の分子進化論的考察
第 12 回神戸ワイン城シンポジウム, 神戸, 2015.12.

7. 藤原守, 太田隆英, 達家雅明
3型カスパーゼ切断型 RhoGDIbeta 研究: アポトーシス誘導代償性増殖との
関連
第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会, 鳥取, 2016.7.
8. 藤原守, 太田隆英, 達家雅明
3型カスパーゼによる腫瘍再増殖機構: 電離放射線誘導性変様 RhoGDIbeta
の関与
第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016.10.
9. 藤原守, 土井捺実, 牛衛夢宇, 有留和輝, 太田隆英, 達家雅明
RhoGDIβ による放射線応答シグナルの解明
第 13 回神戸ワイン城シンポジウム, 神戸, 2016.12.
10. 土井捺実, 藤原守, 牛衛夢宇, 有留和輝, 太田隆英, 達家雅明
3型カスパーゼ依存的代償性増殖誘導シグナル分子としての RhoGDIβ 機
能の解析
第 13 回神戸ワイン城シンポジウム, 神戸, 2016.12.
11. 有留和輝, 藤原守, 牛衛夢宇, 土井捺実, 野下俊朗, 嶋本文雄, 太田隆英, 達
家雅明
紅茶による発がん抑制効果の機構解析
第 13 回神戸ワイン城シンポジウム, 神戸, 2016.12.

12. 藤原守, 太田隆英, 達家雅明

RhoGDIbeta を介したがん細胞集団でのアポトーシス誘発補償性増殖による進展機構

第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会, 大阪, 2017.7.

13. 藤原守, 土井捺実, 太田隆英, 達家雅明

変様型 RhoGDIbeta : 電離放射線全身照射のバイオマーカーとしての有用性

第 76 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017.10.

14. 藤原守, 土井捺実, 國松優喜, 藤裏航平, 達家雅明

電離放射線照射後に出現する変様型 RhoGDIbeta の機能解析とその被曝検査への応用

三朝・人形峠 Seminar, 鳥取, 2017.11.