

学位論文題名

アデノウイルスのがん遺伝子産物 E4orf6 による
BNIP3 のアポトーシス活性の抑制

学位論文内容の要旨

アデノウイルス E4orf6 (E4 open reading frame6) は E1A とともに細胞をトランスフォームし、ヌードマウスで腫瘍が形成できるため、E4orf6 はがん細胞の悪性化に関わっているウイルスタンパクであると考えられている。E4orf6 はがん抑制遺伝子産物 p53 とその関連タンパク p73 に結合し、p53 と p73 のもつアポトーシス誘導能や転写活性化能を抑制することがこれまでに報告されている。

本研究は Bcl-2 ファミリーの pro-apoptotic メンバーで、アポトーシス誘導能を持つ BNIP3 に対して E4orf6 がどのような影響を与えるかについて調べた。

1) E4orf6 による BNIP3 のアポトーシス誘導能の抑制

E4orf6 の BNIP3 のアポトーシス活性に対する影響を調べるため、ヒト胎児腎細胞である 293 細胞を用いて Cell death assay と DNA fragmentation assay を行った。その結果 Cell death assay において E4orf6 は BNIP3 の誘導するアポトーシスを濃度依存性に抑制した。また DNA fragmentation assay においても BNIP3 が誘導するアポトーシス活性を E4orf6 が抑制することが示された。これらの結果から E4orf6 は BNIP3 のアポトーシス誘導能を抑制することが明らかになった。

2) E4orf6 は BNIP3 のミトコンドリアへの局在を阻害する

BNIP3 の細胞死促進機能には C 末端領域の膜貫通ドメインを介してミトコンドリアに局在することが必要である。そこで E4orf6 が BNIP3 のアポトーシス活性を抑制するために、BNIP3 のミトコンドリア局在を変化させるかどうかを検討した。293 細胞に E4orf6 と BNIP3 を発現させ、免疫蛍光法で細胞内の局在を調べたところ、E4orf6 は BNIP3 のミトコンドリアへの局在を変化させ、BNIP3 が細胞質内に拡散していた。また E4orf6 は核-細胞質間をシャトルする機能を持つため、核と細胞質の両方に存在するが、E4orf6 と BNIP3 を共発現させた際には E4orf6 は核外に移行し、両タンパクの局在は一致していた。これらの結果は E4orf6 が BNIP3 のミトコンドリア局在を変化

させることを意味している。

3) E4orf6 の機能には Nuclear Export Signal が必要である

E4orf6 の N 末端領域には leucine-rich nuclear export signal (NES) と呼ばれる機能ドメインが存在し、E4orf6 が核から細胞質へ運搬されるのに必要である。そこで E4orf6 の NES ドメインに substituted mutation を挿入し、この mutant (E4orf6 NES(-)) の機能変化について調べた。293 細胞に E4orf6 NES(-) を発現させ、免疫蛍光法で細胞内の局在を調べたところ、E4orf6 NES(-) は核内にとどまり、BNIP3 のミトコンドリア局在を変化させなかった。さらに Cell death assay および DNA fragmentation assay による検討の結果、E4orf6 NES(-) は BNIP3 のアポトーシス誘導に対する明らかな抑制効果を示さず、E4orf6 の BNIP3 に対する機能には NES を含む領域が必須であることが示唆された。

4) E4orf6 は BNIP3 と結合しその結合には NES が重要である

次に E4orf6 と BNIP3 の *in vivo* での結合を免疫沈降法を用いて調べた。293 細胞に HA-BNIP3 と E4orf6 を発現させ、抗 HA モノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、ウェスタンブロット法で E4orf6 の共沈が確認された。コントロールとして Normal Rabbit Serum で免疫沈降したものでは E4orf6 は共沈しなかった。さらに GST タグシステムを用いて *in vitro* translation した wild-type の E4orf6 および E4orf6 NES(-) と GST-BNIP3 の *in vitro* での結合を調べた結果、wild-type の E4orf6 が GST-BNIP3 に結合したのに対し、E4orf6 NES(-) は GST-BNIP3 に結合しなかった。これらの結果より、E4orf6 は BNIP3 と *in vivo* でも *in vitro* でも結合し、この結合には E4orf6 の NES を含む領域が必要であることが示された。

5) 結論

Bcl-2 ファミリータンパク BNIP3 のアポトーシス誘導能を E4orf6 が抑制し、その機能には E4orf6 の NES を含む領域が必要であった。E4orf6 は核外に輸送され、ミトコンドリアに局在している BNIP3 の分布を変化させたが、この機能にも E4orf6 の NES に BNIP3 への結合が重要であることが今回の研究で明らかになった。NES を含む E4orf6 の N 末端領域はがん細胞の悪性化に重要な役割を果たすことがこれまでにわかっており、これらの結果は E4orf6 は腫瘍を悪性化するときに BNIP3 をターゲットにして細胞中で相互作用していることを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐 野 英 彦
副 査 教 授 向 後 隆 男
副 査 教 授 田 村 正 人
副 査 助 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

アデノウイルスのがん遺伝子産物 E4orf6 による BNIP3 のアポトーシス活性の抑制

審査は向後、田村、進藤および佐野審査員全員が出席のもとに、申請者に対し提出論文の内容と、それに関連する学科目について口頭試問によって行われた。提出論文の概要と審査の内容は以下の通りである。

E4orf6 (E4 open reading frame 6) はアデノウイルスの新しいがん遺伝子産物で、E4orf6 が発現しているがん細胞はヌードマウスで腫瘍が形成できるため、E4orf6 はがん細胞の悪性化に関わっているタンパクであると考えられている。E4orf6 にはこれまでがん抑制遺伝子産物 p53 とその関連タンパク p73 が結合し、E4orf6 はそれらのもつアポトーシス誘導能や転写活性化能を抑制することが報告されている。本研究は、p53 を介さないアポトーシスの経路で E4orf6 がどのような役割を演じているかを明らかにすることを目的に行った。

【方法】

ヒト胎児腎細胞をアデノウイルスの E1A+E1B 領域でトランスフォームした 293 細胞に E4orf6 あるいは変異型 E4orf6 を Bcl-2 ファミリーメンバーである BNIP3 と共に発現させ、BNIP3 のアポトーシス誘導能に対する E4orf6 の影響を解析した。次いで E4orf6 および変異型 E4orf6 による BNIP3 の細胞内での局在の変化について形態的に観察した。さらに E4orf6 と BNIP3 の結合を免疫沈降法と GST システムを用いて *in vivo* および *in vitro* で検討した。

【結果と考察】

Cell death assay と DNA fragmentation assay で解析した結果、E4orf6 は BNIP3 の誘導するアポトーシスを抑制した。両タンパクを発現させた 293 細胞では、ミトコンドリアに局在していた BNIP3 が細胞質中に拡散した。E4orf6 の核外輸送に必要な Nuclear Export Signal(NES)領域にアミノ酸置換を挿入した変異型 E4orf6 を用いて同様の実験を行ったところ、変異型 E4orf6 は核のみに存在し BNIP3 の局在を変化させず、BNIP3 誘導アポトーシスを抑制しなかった。さらに E4orf6 と BNIP3 は *in vivo* および *in vitro* で結合したが、変異型 E4orf6 と BNIP3 の結合は認められなかった。以上の結果より、E4orf6 は BNIP3 と結合することによってそのミトコンドリア局在を変化させ、アポトーシス誘導を阻害し、この機能には E4orf6 の NES が必要であることが明らかになった。

本研究の結果、E4orf6 は Bcl-2 ファミリーメンバーの pro-apoptotic molecule と直接結合し、アポトーシスを抑制する機能も有していることが示された。また本研究は、ウイルスのもつタンパクの核外輸送がアポトーシスの抑制に直接関与していることを示す最初の報告である。本研究で明らかになったように E4orf6 が BNIP3 に結合できることから、BNIP3 は二つのアデノウイルスがん遺伝子産物 (E1B 19k-Da、E4orf6) の標的になっている。p53 も同様にアデノウイルス E1B 55-kDa と E4orf6 の標的として知られており、複数のウイルスがん遺伝子が標的とする BNIP3 も p53 同様、細胞ががん化される際に抑制されなければならない重要な遺伝子産物である可能性がある。NES を含む E4orf6 の N 末端領域はがん細胞の悪性化に重要な役割を果たすことがこれまでにわかっており、本研究の結果は E4orf6 は腫瘍を悪性化するときに BNIP3 の機能を抑えていることを示唆している。

次いで、各審査員から申請者に対して、本論文の内容とそれに関連する項目について質問が行われた。いずれの質問についても申請者から明快な回答が得られた。本研究は E4orf6 と相互作用する細胞側のタンパクとその機能を明らかにすることで、E4orf6 による発がん、腫瘍の悪性化のメカニズム解明に大きく寄与するものである。また今後この研究結果ががんの遺伝子治療に役立つ可能性もあり、生物学および医歯学の発展に貢献する研究である。よって博士（歯学）の学位授与に値すると認められた。