

ets がん遺伝子群転写因子 E1AF による bax の活性化

学位論文内容の要旨

E1AF は、C 末端側に ETS domain を有する ets がん遺伝子群転写因子で、細胞外基質分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -1, -3, -9 ならびに membrane type 1 MMP (MT1-MMP) の発現を亢進させ、腫瘍細胞の浸潤・転移に関与することが知られている。その一方で、Funaoka らは E1AF が細胞周期制御に関与している p21^{waf1/cip1} の転写を亢進することを報告し、E1AF の機能の多様性を示した。

Bax は BH(bcl-2 homology)ドメインを持つ Bcl-2 ファミリー遺伝子の一つで、がん抑制遺伝子 p53 により転写亢進され、アポトーシスの誘導に働くことが知られている。p53 によるアポトーシスの誘導の際には、Bax がミトコンドリアの外膜の膜電位チャンネルの VDAC に移動し、VDAC チャンネルを開放することでミトコンドリア内のシトクロム C が細胞質中に放出され、カスパー cascades の活性化によるアポトーシスが生じることが Tsujimoto らにより報告された。

今回、著者はがん細胞の浸潤に関与するばかりでなく、細胞周期を停止させる可能性がある E1AF が細胞死に対しても積極的に関与しているのかという点に興味をもち、E1AF による Bax の発現が起こりうるのかについて検索するとともに、がん抑制遺伝子 p53 との関連についても検討した。

bax の転写調節領域の塩基配列 (HSBAX1, Human bax gene, 5' region. U17193) をもとに、ets 結合配列の有無を検索した。bax の転写調節領域には TATA box に加えて 1 個の p53 の完全結合配列と 3 個の不完全配列が存在することが既に報告されている。この TATA box と p53 結合完全配列に加えて 3 カ所の GGAA あるいは GGAT のコアモチーフを有する Ets 結合配列が存在した。

p53 欠損肺がん細胞株 H1299 を使い、CAT (chloramphenicol acetyl transferase) assay を行った。bax CAT reporter plasmid と E1AF の全長

を Cytomegalovirus promoter を有する真核細胞発現ベクター pCMV に組み込んだ pCMVE1AF をリポフェクション法を用いて H1299 細胞に遺伝子導入し、遺伝子導入 48 時間後に cell lysate を抽出した。抽出物に acetyl coenzyme A と ^{14}C chloramphenicol を加えてインキュベートし、プレートクロマトグラフィーで展開後、フィルムに露光した。その結果、bax の転写活性は E1AF の濃度に依存して亢進が認められた。

次いで、E1AF と p53 による bax の転写調節の関連性について検索した。H1299 に E1AF と野生型 p53 を遺伝子導入した CAT assay の結果、野生型 p53 は bax の転写を活性化し、また E1AF と野生型 p53 を共導入することで bax の転写は相乗的に亢進した。一方、p53 の DNA 結合領域である 143 番目の Valine を Alanine に置換した変異型 p53 と E1AF を遺伝子導入した際には、bax の転写活性は逆に減弱した。

CAT assay による in vitro での検索をもとに、細胞内 (in vivo) でも E1AF による Bax タンパクの産生が生じるかどうかを調べるため、Western blotting により検討を行った。

H1299 に pCMVE1AF を遺伝子導入し、48 時間後にタンパクを抽出し、SDS-PAGE 後、ニトロセルロースメンブレンに転写した。抗 Bax マウスモノクローナル抗体を一次抗体とし、HRP 標識抗マウス二次抗体と反応させた後、ケミルミネッセンスによる蛍光発色反応によりフィルムに露光し可視化したところ、E1AF を導入 H1299 細胞では、21kD の Bax タンパクの明瞭なバンドが認められた。

p53 欠失骨肉腫細胞株 Saos2 を用い Growth suppression assay を行った。コントロールベクターである pcDNA3、あるいは E1AF 発現ベクターと、ピューロマイシン耐性遺伝子を持つ pBabepuro を Saos2 に遺伝子導入し、2 日後よりピューロマイシンで導入細胞の選択を行い、2 週間後、クリスタルバイオレットで染色し、コロニー形成能力により細胞増殖抑制効果を判定した。pcDNA3 を導入した Saos2 細胞は多数のコロニーを形成したが、E1AF 導入細胞はごく少数のコロニーが認められたにすぎなかった。

ごく少数のコロニーが認められたにすぎなかった。

bax の転写調節領域の解析により、p53 結合配列や TATA box に加えて ets 結合部位が存在することが明らかになった。そこで、p53 欠失肺がん細胞株 H1299 に、bax reporter plasmid と E1AF 発現ベクターを遺伝子導入し CAT assay を行った。その結果、E1AF 遺伝子の導入により、濃度依存性に bax の

転写活性の亢進が認められた。これは、bax の転写調節領域に存在する ets 結合配列が機能したことを示すものであり、E1AF が単独で bax の発現を誘導し、p53 非依存性の bax の転写活性化が生じたことを意味している。このような mRNA レベルでの bax の発現亢進は、Western blotting によるタンパクレベルの解析によってもその発現が裏付けられ、さらに Growth suppression assay の結果から実際に細胞内で E1AF の発現により細胞死を伴う増殖抑制が生じていることが示された。これまで ets ファミリーが細胞のがん化と関連しているという報告は多いが、ets ファミリーとアポトーシスとの関連についての報告は少ない。今回の検索で E1AF はアポトーシスを誘導する bax の転写を亢進し、タンパクを発現させることが明らかとなった。

H1299 細胞に野生型 p53 と bax reporter plasmid を導入すると bax の転写活性化能の亢進がみられ、さらに E1AF と野生型 p53 の共導入により相乗的な強い発現亢進が認められた。p53 が転写レベルで bax の発現を亢進することは周知の事実であるが、E1AF は野生型 p53 と協調してこの活性をさらに亢進することが示された。p53 は細胞内で恒常的に発現しているが、通常は分解されその機能を発揮することはなく、DNA 障害などのストレス刺激が加わった時に転写レベルでの発現亢進とともに p53 タンパクの安定化が生じ、核に移行し、その下流遺伝子の転写を活性化することが明らかになっている。E1AF はそれ自身で bax を活性化するほかに、野生型 p53 の安定化にも関係しているのかもしれない。いずれにしろ、これらの結果より、E1AF が p53 とともに、bax を介したアポトーシスの誘導に深く関与していることが示唆された。

E1AF は細胞が変異型 p53 を有さない場合には bax の転写活性化を生じ、さらに野生型 p53 による転写をより活性化するが、変異型 p53 と E1AF の共導入では bax の転写活性化は認められず、むしろ bax の転写活性の減弱が認められた。p53 は多くのがんで変異が生じていることが明らかになっている。その変異の多くは DNA 結合領域に生じ、転写因子である p53 がターゲット遺伝子の転写調節領域に結合できなくなることによってがん抑制遺伝子としての機能を果たせない (loss of function) ことにより、細胞がん化が導かれるものと考えられてきた。しかし、最近、変異型 p53 による積極的な悪性形質の獲得機構 (gain of function) があるのではないかとという新たな概念が注目されている。変異型 p53 と E1AF の共導入により bax の転写活性が減弱したことは、変異型 p53 が E1AF のもつ bax の転写活性化機能を積極的に抑制し、がん化を促進させる可能性のあることを示すものと考えられる。E1AF のもつ腫瘍細胞の浸潤活性を増強する機能と細胞周期停止やアポトーシスを誘導するという相反する機能

は、細胞の p53 の状態と関係している可能性があり、今後さらに検索を重ねる必要があるものと思われた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	戸塚靖則
副査	教授	向後隆男
副査	教授	鈴木邦明
副査	助教授	進藤正信

学位論文題名

ets がん遺伝子群転写因子 E1AF による bax の活性化

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

E1AF は、細胞外基質分解酵素であるマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) -1,-3,-9 の転写を亢進させ、腫瘍の浸潤能に直接関与している一方で、p21^{waf1/cip1} の転写を亢進し、細胞の増殖抑制に働くことが報告されている。他方、Bax は BH(bcl-2 homology)ドメインを持つ bcl-2 ファミリー遺伝子の一つで、p53 によりその転写が活性化されアポトーシスを誘導することが知られている。本研究は、上述のように多面性を有する E1AF のアポトーシスに及ぼす影響について Bax 遺伝子/遺伝子産物を対象に検討したものである。

まず、bax の転写調節領域の塩基配列 (HSBAX1、Human bax gene, 5' region.U17193) をもとに、ets 結合配列の有無を検索した。bax の転写調節領域には、TATA box、ならびに既に報告されている 1 個の p53 の完全結合配列と 3 個の不完全配列に加えて、GGAA あるいは GGAT のコアモチーフを有する ets 結合配列が 3 カ所存在することが確認された。そこで、p53 欠損肺癌細胞株 H1299 に、2 μ g の bax CAT reporter plasmid と 0、0.5、1、2、5 μ g の E1AF 発現ベクターを遺伝子導入し、48 時間後に細胞を回収して cell lysate を抽出した。その抽出物を用いて CAT assay を行い、E1AF による bax の転写活性化について検索した。その結果、E1AF 遺伝子の導入により、bax の転写活性は E1AF の濃度依存性に亢進することが認められた。次いで、E1AF と p53 による bax の転写調節の関連性について CAT assay を行い検索した。H1299 に E1AF と p53 (野生型、変異型) を遺伝子導入し、同様に CAT assay を行った結果、野生型 p53 により bax の転写活性化が認められ、さらに E1AF と野生型 p53 の共導入により bax の転写は相乗的に亢進することが示された。一方、変異型 p53 と E1AF を遺伝子導入した際には、bax の転写活性の減弱が認められた。

次に、Western blotting により Bax タンパク発現を検討した。H1299 に、空ベクターである pcDNA3 のみを遺伝子導入したコントロール細胞では、Bax の発現はほとんど認められなかったが、E1AF を導入した H1299 細胞では、21kD の Bax タンパクの明瞭なバンドが認められた。

さらに、p53 欠損骨肉腫細胞株 Saos2 を用いて、growth suppression assay を行った。6 穴ウェルで 50～80%コンフルエントになった Saos2 細胞にコントロールベクターである pcDNA3、あるいは、E1AF 発現ベクター 2.5 μ g と、ピューロマイシン耐性遺伝子を持つ pBabepuro0.5 μ g を FuGENE-6 (Boehringer Mannheim) で遺伝子導入し、48 時間後にピューロマイシンで導入細胞の選択を行い、2 週間培養後、クリスタルバイオレットで染色し、コロニー形成能力により細胞増殖抑制効果を判定した。pcDNA3 のみを遺伝子導入したコントロール細胞では Saos2 細胞は多数のコロニーを形成したのに対し、E1AF 導入細胞ではごく少数のコロニーが認められるにすぎず、CAT assay で明らかになった in vitro での結果は in vivo でも証明され、細胞内で、実際に E1AF の発現により細胞死を伴う増殖抑制が生じていることが確認された。

これらの結果は、E1AF は野生型 p53 とともに、bax を介したアポトーシスの誘導に深く関与していることを示している。なお、変異型 p53 と E1AF の共導入により bax の転写活性が減弱したことは、変異型 p53 が E1AF のもつ bax の転写活性化機能を積極的に抑制し、がん化を促進させる可能性のあることを示しており、E1AF のもつ腫瘍細胞の浸潤活性を増強する機能と細胞周期停止やアポトーシスを誘導するという、相反する機能は、細胞の p53 の状態と関係している可能性があることを示唆するものと考えられた。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、E1AF は野生型 p53 とともに bax を介したアポトーシスの誘導に深く関与していることを明らかにしたこと、ならびに E1AF のもつ腫瘍細胞の浸潤活性を増強する機能と細胞周期停止やアポトーシスを誘導するという、相反する機能は、細胞の p53 の状態と関係している可能性があることことを示した点が高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。