博士（歯 学） 佐 藤 健 彦

学 位 論 文 題 名

アデノウイルスE1Aによる
ヒトetsがん遺伝子群転写因子E1AFの転写抑制

(Negative feedback regulation between Adenovirus E1A and E1AF, an ets-oncogene family transcription factor)

学位論文内容の要旨

ヒトアデノウィルスは現在少なくとも41種の血清型が同定され、ヒトでは呼吸器系感染性疾患などの病原ウィルスであることに加え、げっ歯類細胞をがん化できるため、これまでがん発生のモデルとして研究されてきた。アデノウィルスは初期転写遺伝子群E1～E4と後期転写遺伝子群L1～L5を発現し、初期転写遺伝子はウィルスが細胞に感染後最初に発現する遺伝子で宿主細胞内の環境を整える役割をもっている。一方、後期転写遺伝子群は主にウィルス構造タンパクをコードしておりウィルスの増殖・複製に関係している。

初期転写遺伝子であるE1Aはウィルスが細胞に感染すると初期転写遺伝子群のなかでも最初に発現するウィルスタンパクで、その構造にCR1、CR2、CR3の3つの保存領域を持っている。E1Aはがん抑制遺伝子産物pRbファミリー(pRb、p130、p107)とCR2領域で結合し、pRbを不活化し、細胞周期を開始し強制的にS期に移行させ細胞増殖を引き起こすことが知られている。さらにE1Aはp53を不活化する機能をもつE1Bと協調してげっ歯類細胞をがん化することが知られている。アデノウイルス5型E1Aにはスプライシングパターンの違いにより243Rと289Rの二つのアミノ酸型が存在しE1A-289Rはアデノウィルス DNA複製のためのタンパクをコードしている他のE2、E4領域のアデノウィルス転写因子の転写活性因子として主に機能し、E1A-243Rは細胞周期を制御せず、直接細胞遺伝子と相互作用することでc-myc、cdc-2、hsp70などの細胞DNAの合成を引き起こすことが示されている。その一方で、E1Aは単独では腫瘍細胞の悪性形質の抑制にはたらくことが示され、このE1Aによって引き起こされる腫瘍抑制機構にはE1AのCR2領域とCR1を含むN末端領域が主要な役割を担っていることが知られている。E1AのCR2領域は

apoptosis を引き起こすが、E1A の N 末端領域は血管新生を抑制することにより腫瘍の形成を抑制していることが示されており CR2 領域および N 末端領域は異なる生物学的活性によって腫瘍抑制に効果をあらわすことが示されている。

E1AF は ets ファミリーに属する転写因子で、ets ドメインは ets がん遺伝子群に特有の機能配列で helix-turn-helix 構造を持ち、これまでに E1AF はヒト染色体の 17q21 にコードされていること、複数の MMPs の転写を活性化し口腔扁平上皮がん細胞や非小細胞性肺がん細胞の浸潤性増殖と深く関わっていること、ヒト乳がん細胞株に E1AF を遺伝子導入すると浸潤型に変異することやアンチセンス E1AF を口腔がん細胞株に導入すると MMPs の転写活性を抑制することによって口腔がん細胞の浸潤活性を抑えることが知られている。さらに、がん細胞の分散因子(scatter factor)である肝細胞増殖因子(HGF)によるがん細胞の浸潤の際にも E1AF の発現亢進が認められており、がん細胞の浸潤性増殖と深く関わっていることが示唆されている。

アデノウイルス E1A の転写を亢進する転写因子として同定された E1AF の転写が E1A によって抑制されるという現象の解明を行う目的で検索を行った。その結果、E1A は E1AF のプロモーター活性を抑制することが示され、この抑制には E1AF 転写調節領域の-1800～-1498bp と-359～-296bp の領域が重要であることが示された。E1AF の転写調節領域の塩基配列を検討した結果、-1800～-1498bp には転写因子 Sp1 と PEA3/E1AF の結合モチーフが、-359～-296bp には AP-2 の結合モチーフが存在することが明らかになった。AP-2 転写因子は、SV40 と human metallothionein II a の転写調節領域に含まれる特異的な結合領域を用いた affinity chromatography によって HeLa 細胞から分離された転写因子で、その結合モチーフは CCCCAGGC の GC rich elements であることがわかっている。転写因子である AP-2 は細胞周期抑制因子である $p21^{WAF/CIP}$ の転写調節領域の転写開始部位上流-121～-95(AP-2 DNA-binding site)に結合することによって p21 を活性化することや、悪性黒色種の発生や進展に関与するチロシンキナーゼ受容体遺伝子 c-kit や腫瘍細胞の浸潤や転移に関連する MCAM/MUC18 の発現を抑制し、腫瘍抑制因子として機能していることが知られている。その一方で、EGF レセプター関連膜結合型 185kDa のチロシンキナーゼである HER-2/neu を活性化し悪性転化との関連性、および転写遺伝子の発現プログラムや細胞成長や細胞死のバランスを制御しているということが示されている。さらに、E1A は転写因子 AP-2 を標的として Type III 72kDa collagenase promoter を抑制することが示され、この際 E1A は転写因子 AP-2 と複合体を形成することによってその機能を抑制されることが報告されている。この機構は p300 非依存性であることが知られており、本研究における E1A と E1AF の関係においても AP-2 と p300 および E1A の関連が強く示唆された。

Sp1 は転写因子 Sp1～4 からなる Sp ファミリーの一つで、GC-rich 配列と GT/A-rich 配列に同等の親和性を持ち結合することができ、標的遺伝子によって転写活性化にはたらく場合と転写抑制にはたらくことがあることが示されている。

p300 は、E1A の CR1 を含む N 末端領域に結合するタンパクとして最初に同定され、転写のアダプターとして転写の活性および抑制に働くことが知られている。神経堤由来細胞株 PC12 細胞を NGF(Nerve growth factor)により分化させる際、p300 と Sp1 の相互作用により $p21^{waf1/cip1}$ プロモーターが活性化するという報告があり、p300 に結合する E1A は Sp1 とも相互作用する可能性がある。

E1AF の転写抑制にはたらく E1A の機能ドメインを明らかにするために E1A mutant 発現ベクターを用いて検索した結果、E1A の CR1 を含む N 末端領域の重要性が明らかになった。E1A の CR1 を含む N 末端領域は p300 との結合領域であり、p300 は CBP (CREB[cAMP-responsive element-binding protein] binding protein) と高い相同性を持つ転写の co-factor で転写制御の中心的な役割を担っている。TFⅡB や RNA polymerase Ⅱ holoenzyme は p300/CBP と相互作用して転写が活性化され、Ets1 と Ets2 は p300/CBP をリクルートすることで MMP の転写を亢進することが報告されている。その一方で、p300/CBP は E1A の CR1 を含む N 末端領域に結合し E1A による形質転換を阻止されることが示されている。E1A による E1AF の転写抑制に転写因子 AP-2、Sp1 と転写のコファクターp300/CBP を介した制御機構が存在することが考えられた。

がん抑制遺伝子 p53 はその転写産物の一つである MDM2 によって転写が抑制されることが知られている。この MDM2 と p53 のネガティブフィードバック機構によって p53 の過剰な産生が抑制されていると考えられている。本研究において E1A の転写を活性化する転写因子として同定された E1AF が E1A によってその転写が抑制され、p53/MDM2 と同様のネガティブフィードバック機構が存在することが示唆された。アデノウィルスがヒト細胞に感染直後に E1A は一過性に発現しその後発現が低下することが知られている。E1A は自己の複製に必要なウイルス遺伝子を活性化するとともに、細胞遺伝子の転写を調節しウイルスにとって都合のよい環境に感染細胞を変化させるが、E1A 単独では細胞死の誘導など増殖に不必要な現象を引き起こすため、このような抑制機構が存在していることが考えられた。本研究ではこの E1A-E1AF の調節機構に関して E1AF の Sp1、AP-2 の結合領域を含む転写調節領域および E1A の p300 の結合領域である N 末端から CR1 を含む領域が必要であることが示されたが、その相互関係についての詳細は未だ不明であり、今後さらに研究が必要であると思われる。

今回の検索結果により、E1A は E1AF の転写抑制をすることが明らかになった。さらに、E1A は E1AF だけでなく PEA 3 ファミリーである ERM、ER81 による転写

活性も抑制したことは、このE1Aによる転写抑制機能が普遍的なものであることを意味しており、その抑制機構にp300が関与していることを強く示唆するものであった。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　福　田　　　博
副　査　　教　授　　向　後　隆　男
副　査　　教　授　　戸　塚　靖　則
副　査　　助教授　　進　藤　正　信

学 位 論 文 題 名

アデノウイルスE1Aによる
ヒトetsがん遺伝子群転写因子E1AFの転写抑制

(Negative feedback regulation between Adenovirus E1A and E1AF, an ets-oncogene family transcription factor)

審査は向後、戸塚、進藤、および福田審査員全員が一堂に会し、口頭で行った。まず、申請者から提出論文の内容の説明を受けた。概要は以下の通りである。

論文の概要

アデノウィルス (Ad) は二本鎖の直鎖状 DNA がんウイルスで、げっ歯類の細胞に対して腫瘍原性を持つことから腫瘍発生のモデルとして研究されてきた。Ad E1A は宿主細胞に感染後最初に発現される初期転写遺伝子であり、がん抑制遺伝子産物 pRB と結合しそれらの機能を抑制することや、p53 の機能を抑制する E1B と共にげっ歯類細胞をがん化することが知られている。

E1AF は Ad5 型 E1A 遺伝子の転写調節領域に結合するヒト細胞の転写因子としてクローニングされた ets がん遺伝子群転写因子である。ets がん遺伝子は ETS ドメインと呼ばれる DNA 結合配列を持ち、現在約 30 種類以上の関連遺伝子が同定されている。その後、E1AF は mouse PEA3 のヒトホモローグでヒト ERM、マウス ER81 とともに ets がん遺伝子群の中で PEA3 グループを形成していることが示されている。

申請者らはこれまでに、E1AF が複数の MMP の転写を亢進し口腔扁平上皮がん細胞や非小細胞性肺がん細胞の浸潤活性の亢進と深く関わっていることを報告してきた。さらに、口腔がん細胞株 HSC3 において Ad12 型 E1A の導入により E1AF の mRNA の発現が抑制されることを見いだした。今回、E1AF によって転写活性が亢進する Ad E1A が E1AF の転写を抑制しているその調節機構について検索した。

ヒト非小細胞性肺がん細胞株 H1299 にルシフェラーゼレポータープラスミドを遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイで転写調節におけるAd E1AとE1AFの関係について調べたところ、Ad E1AによるE1AFの転写の抑制にはAd E1AのN末端からCR1を含む領域が必要であること。また、E1AFの転写開始点上流-1800～-1498 と-359～-296 の領域がこの Ad E1A による E1AF の抑制機構に関係していることが示された。

がん抑制遺伝子 p53 はその転写産物の一つである MDM2 によって転写が抑制されることが知られており、この MDM2 と p53 のネガティブフィードバック機構によって p53 の過剰な産生が抑制されていると考えられている。本研究において E1A の転写を活性化する転写因子として同定された E1AF が Ad E1A によってその転写が抑制されることが示され、p53-MDM2 と同様のネガティブフィードバック機構が存在することが示唆された。アデノウイルスがヒト細胞に感染直後に E1A は一過性に発現しその後発現が低下することが知られている。E1A は自己の複製に必要なウイルス遺伝子を活性化するとともに、細胞遺伝子の転写を調節し感染細胞をウイルスにとって都合のよい環境へと変化させるが、E1A 単独では細胞死の誘導など増殖に不必要な現象を引き起こすため、このような抑制機構が存在していることが考えられた。本研究では Ad E1A による ets がん遺伝子群転写因子 E1AF の転写の抑制には、E1AF の転写調節領域の-1800～-1498 と-359～-296 に存在する AP-2、Sp1、PEA3 の結合モチーフが関与している可能性があること、さらに Ad E1A の CR1 領域に結合することが知られている転写のコアクチベーターである p300 の関与が示唆された。しかし、その相互関係についての詳細は未だ不明であり、今後さらに研究が必要であると思われる。

次いで、各審査委員から申請者に対し、本論文の内容とそれに関連する事項について種々の質問が行われた。主な質問は以下の通りである。

・アデノウイルスにおいて、E1A と E1AF のネガティヴフィードバック機構の存在する意味はどう考えるのか。
・E1A が一過性に発現しその後、徐々に低下するがこれはどのようなことが考えられるか。
・現時点での問題点と今後の展望について。

これらの質問に対して申請者は明快に説明し、申請者が本研究を中心に関連領域について十分な知識を有していると認められた。
本研究から、
1.アデノウイルス E1Aの転写を亢進させるヒト細胞の転写因子として同定されたE1AFが、E1AによりIその転写活性が抑制されたことは、 E1A と E1AF の間にネガティヴフィードバック機構が存在することが示唆された。
2. その際、E1AF の転写調節領域に存在する AP-2 や Sp1 の結合配列が影響を及ぼす可能性が

あることが考えられた。

３．E1A の CR1 を含む N 末端領域がこの抑制機構に重要なことから CR1 に結合することが知られている転写のコファクターp300 の重要性が示唆された。

以上のことが明らかになったことが高く評価された。

これらのことより、申請者は博士（歯学）を授与するに値するものと判断された。