

学 位 論 文 題 名

E1AF, an ets-transcription family member,
interacts with the tumor suppressor p53 resulting
in the activation of the p21 waf1/cip1

(Ets ファミリー転写因子 E1AF は
p53 と相互作用して p21^{waf1/cip1} の転写を活性化する)

学位論文内容の要旨

E1AFはC末端側に Ets domain と呼ばれる DNA 結合 domain をもつ ets ファミリー転写因子で、他の ets family 遺伝子とはアミノ酸配列が大きく異なり、mouse PEA3 の human homologue であることが明らかになった。これまで、E1AFは細胞外基質分解酵素である matrix proteinase-1, -3, -9 の転写を活性化し、がん細胞の浸潤・転移に関係していることが報告されてきた。その一方で、E1AFが cyclin dependent kinase inhibitor である p21 waf1/cip1 の転写を活性化し、細胞周期の停止にはたらくことも報告されている。

p53はヒトがんの50%以上で変異が生じており、その異常ががんの発生と深く関連していることが示唆されているがん抑制遺伝子で、p53は転写因子として target gene の転写調節領域に結合し、さまざまな下流遺伝子の転写活性化に働くことが示されている。p53が活性化する下流遺伝子には、Gadd45などのDNA修復遺伝子や Bax Noxaなどのapoptosis誘導遺伝子があり、細胞がん化の抑制にはたらいっている。p53により転写活性化される遺伝子の一つに、CDK inhibitor である p21があり、これは細胞のG1からS期への移行期に発現し、G1 arrestを生じることが示されている。

今回、E1AFによるp21^{waf1/cip1}の転写活性化機構を、とくにp53との相互作用を中心に

1. p21のプロモーター活性に対して、同様の機能をもつ E1AF と p53 はどのように関係しているのか
2. がん遺伝子として働くことが示されている E1AF に tumor suppressor

としての機能はあるのか
という点について検討を行った。

p21 のプロモーター領域には2カ所の ets 結合配列が存在し、これらはヒト・マウス・ラット間で良く保存されている。p53 の結合サイトも2カ所存在し、これらは ets 結合部位と非常に近接し、一部はオーバーラップしていることが p21 プロモーター領域の解析で明らかになった。このため、p53 と E1AF は cooperative に p21 のプロモーターを活性化する可能性が示唆された。

p53 が欠失しているヒト肺がん細胞株 H1299 を用いた。H1299 に p21 promoter reporter plasmid pWWp-Luc と、E1AF の全長を発現ベクター pcDNA3 に組み込んだ pcDNA-E1AF および p53 の全長を組み込んだ pc53-SN3 を遺伝子導入し、Luciferase assay を行った。その結果、p53 と E1AF はともに p21 プロモーターを活性化するが、両者の共導入ではさらに転写活性の亢進がみられ、p53 と E1AF は協調的に p21 プロモーターを活性化することが示された。

E1AF と同じ ets ファミリーに属する ets1、ets2 でも同様に p53 と協調的な p21 promoter 活性化が起こるかどうかを、同様に検索したが、Ets1 は転写活性化を示さず、p53 との共導入でも E1AF でみられた協調した転写亢進は認められず、Ets2 も同様の結果を示したことから、p53 と協調した p21 プロモーター活性の亢進は E1AF に特異的であることが示唆された。

免疫沈降法により、ets タンパクと p53 の結合について検索した。293 細胞に p53 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを感染させ、その後、E1AF 発現ベクターおよび、ets1、ets2 発現ベクターを遺伝子導入し、両者の結合を検索したところ、E1AF と p53 の結合が確認されたが、ets1、ets 2 との結合はみられなかった。E1AF と p53 タンパクは in vitro translation により合成したタンパクでも結合し、このような結果は、E1AF は p53 が特異的に結合していることを示していた。

NIH3T3 細胞にアデノウイルス E1A 遺伝子と活性化 ras 遺伝子を導入し、ここに p53 あるいは E1AF 発現ベクターを co-transfection し、E1AF の tumor suppressor 活性を colony formation assay で検討した。その結果、E1AF は p53 と同様に E1A+Ras で形成されたコロニーの数を減少させ、tumor suppressor 活性をもつことが明らかになった。

本研究で、E1AF は p53 と相互作用し、協調的に p21 の転写を亢進することが明らかになった。このような p53 との相互作用は、他の ets1、ets 2 では認められず、E1AF に特有のものであった。G1-S への entry に

は活性化された Cyclin/CDK による Rb タンパクのリン酸化が重要な役割を演じている。リン酸化された Rb はポケットタンパクである E2F を release し、この E2F が細胞周期を回転させる。E1AF はがん抑制遺伝子 p53 と相互作用し、p21 の転写を亢進することによって cyclin/CDK を不活性化し、結果的に Rb のリン酸化を阻害し、cell cycle arrest を導くものと考えられた。

このような E1AF による G1 期における cell cycle arrest が、今回示された E1AF の tumor suppressor activity と深く関連しているものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 向 後 隆 男
副 査 教 授 戸 塚 靖 則
副 査 教 授 田 村 正 人
副 査 助 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

E1AF, an ets-transcription family member,
interacts with the tumor suppressor p53 resulting
in the activation of the p21 waf1/cip1

(Ets ファミリー転写因子 E1AF は
p53 と相互作用して p21^{waf1/cip1} の転写を活性化する)

審査は、審査員全員出席の下に口頭試問により行われた。論文審査の概要は、以下の通りである。

最初に申請者から提出論文の要旨の説明があった。

E1AF は C 末端側に Ets domain と呼ばれる DNA 結合 domain をもつ ets ファミリー転写因子で、これまで、E1AF は matrix proteinase の転写を活性化し、がん細胞の浸潤・転移に関係していることが報告されてきた。その一方で、E1AF が cyclin dependent kinase inhibitor である p21^{waf1/cip1} の転写を活性化し、細胞周期の停止にはたらくことも報告されている。

p53 はヒトがんの 50%以上で変異が生じており、その異常ががんの発生と深く関連していることが示唆されているがん抑制遺伝子で、p53 は転写因子としてさまざまな下流遺伝子の転写活性化に働いており、p53 により転写活性化される遺伝子の一つに、CDK inhibitor である p21 がある。

今回、E1AF による p21^{waf1/cip1} の転写活性化機構を、とくに p53 との相互作用を中心に検討を行った。

p53 が欠失しているヒト肺がん細胞株 H1299 に p21 promoter reporter plasmid pWWp-Luc と、E1AF の全長を発現ベクター pcDNA-E1AF および p53 の全長を組み込んだ pc53-SN3 を遺伝子導入し、Luciferase assay を行った。その結果、p53 と E1AF はともに p21 プロモーターを活性化するが、両者の共導入ではさらに転写活性の亢進がみられ、p53 と E1AF は協調的に p21 プロモーターを活性化

することが示された。この p53 と協調した p21 の転写亢進は E1AF と同じ ets ファミリーに属する ets1、ets2 では認められず、E1AF に特異的であることが示唆された。免疫沈降法により、ets タンパクと p53 の結合について検索したところ、E1AF と p53 の結合が確認されたが、ets1、ets 2 との結合はみられなかった。NIH3T3 細胞にアデノウイルス E1A 遺伝子と活性化 ras 遺伝子を導入し、ここに p53 あるいは E1AF 発現ベクターを co-transfection し、E1AF の tumor suppressor 活性を colony formation assay で検討した。その結果、E1AF は p53 と同様に E1A+Ras で形成されたコロニーの数を減少させ、tumor suppressor 活性をもつことが明らかになった。

本研究で、E1AF は p53 と相互作用し、協調的に p21 の転写を亢進することが明らかになった。このような p53 との相互作用は、他の ets1、ets 2 では認められず、E1AF に特有のものであった。G1 S への entry には活性化された Cyclin/CDK による Rb タンパクのリン酸化が重要な役割を演じている。リン酸化された Rb はポケットタンパクである E2F を release し、この E2F が細胞周期を回転させる。E1AF はがん抑制遺伝子 p53 と相互作用し、p21 の転写を亢進することによって cyclin/CDK を不活性化し、結果的に Rb のリン酸化を阻害し、cell cycle arrest を導くものと考えられた。

このような E1AF による G1 期における cell cycle arrest が、今回示された E1AF の tumor suppressor activity と深く関連しているものと思われた。

申請者による研究要旨説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な試問事項は、以下の通りである。

1. E1AF がアデノウイルスの初期遺伝子である E1A 以外の転写活性化にも関わっているのか？
2. E1AF と他の ets ファミリー遺伝子との機能の違い
3. E1AF の正常組織・細胞における発現
4. E1AF のがん遺伝子としての役割
5. Tumor suppressor としてはたらく際の機構
6. 今回用いた細胞の p53 の status
7. p53 と E1AF および他の ets ファミリー遺伝子の結合部位

いずれの質問についても明快な回答が得られ、さらに研究を発展させる方向性についても申請者の理解が十分であることが示された。

本研究は転写メカニズムの解明にあたって、転写因子の相互作用が重要であることを明らかにし、さらに E1AF のようながん遺伝子がある条件下ではがん抑制遺伝子としてはたらくという現象を明らかにした点が重要な意味をもっており、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。