

学位論文題名

Paired-like homeoprotein ESXR1 acts as
a sequence-specific transcriptional repressor
of the human *K-ras* gene

(ヒト *K-ras* 遺伝子特異的転写リプレッサーとしての
paired-like ホメオ蛋白 ESXR 1 に関する研究)

学位論文内容の要旨

我々が新規に単離・同定した ESXR1 は、精巣に特異的に発現する 406 アミノ酸からなるヒト paired-like ホメオドメイン含有蛋白質である。全長 65-KDa の ESXR1 は細胞内で蛋白分解によりホメオドメインを含む酸性アミノ酸に豊富な N 末側断片 (45-KDa) ならびに繰り返し領域を含むプロリンに富んだ C 末側断片 (20-KDa) に切断される。これまでの解析から、全長 ESXR1 ならびに ESXR1 C 末側断片は細胞質に局在し、分裂期サイクリンの分解を抑制することにより M 期細胞周期停止を誘導し、細胞の増殖を抑制することが示されている。一方、ホメオドメインを含む ESXR1 N 末側断片は核内に局在するが、その生理機能は明らかにされていない。一般に paired-like ホメオドメインは、P3 配列として知られる回文塩基配列 5'-TAATNNNATTA-3' に特異的に結合することが知られている。ESXR1 N 末側断片は、酸性アミノ酸に豊富でホメオドメインを有し核内に限局することから、多くの他のホメオ蛋白と同様に、転写制御に関与することが推察された。そこで、本研究では転写制御因子としての ESXR1 N 末断片の役割について検討を行った。

まず、CASTing アッセイ、ゲルシフトアッセイならびにルシフェラーゼレポーターアッセイを用い、ESXR1 がホメオドメインを介して P3 配列特異的に結合し近傍のプロモーターからの mRNA 転写を抑制することを見い出した。次に DNA マイクロアレイを用いたゲノム網羅的 mRNA 発現解析から、ヒト *K-ras* 遺伝子が ESXR1 の標的遺伝子の 1 つであることを見い出した。そこで、U2-OS ヒト骨肉腫細胞に ESXR1 ないし ESXR1- Δ C を誘導発現させたところ、K-Ras 発現レベルの著しい低下を認めた。リアルタイム PCR により、ESXR1 による K-Ras 発現低下が *k-ras* mRNA の減少に起因することを確認した。つぎに、ESXR1 が *K-ras* の転写を抑制するメカニズムを検討し、ヒト *K-ras* 遺伝子第 1 イントロン内に P3 コンセンサス配列である 5'-TAATGTTATTA-3' 配列が存在することを見い出した。さらに、ゲルシフトアッセイ、ルシフェラーゼレポーターアッセイおよびクロマチン免疫沈降実験から、この配列が *K-ras* 遺伝子発現のリプレッサー *cis* エlement (repressor element of *K-ras* : REK) として働くことを示すとともに、ESXR1 N 末側断片が REK 配列に結合し *K-ras* 転写を抑制することを明らかにした。ま

た、*K-ras* 遺伝子変異を有するヒト大腸癌細胞 SW 480 細胞、HCT 116 細胞やヒト胃癌細胞 AGS 細胞に ESXR1 N 末側断片を発現させたところ、K-Ras 蛋白の発現低下ならびにそれに伴う癌細胞の増殖抑制が観察された。一方、*K-ras* 遺伝子変異を持たないヒト骨肉腫細胞 U2-OS 細胞やヒト胃癌細胞 MKN 28 細胞に ESXR1 N 末側断片を発現させたところ、K-Ras 発現レベルの低下を認める一方、癌細胞の増殖抑制は認められなかった。

本研究では、蛋白分解の結果生じる ESXR1 N 末側断片の転写標的遺伝子としてヒト *K-ras* を同定した。ESXR1 N 末側断片はヒト *K-ras* 遺伝子の第 1 イントロン内に存在する P3 配列“TAATGTTATTA” に結合することにより *K-ras* の mRNA 転写を抑制する。成人ヒト組織において ESXR1 mRNA は精巣特異的に発現することから、ESXR1 が精子形成において重要な役割を有することが推察される。多くの体細胞系列では *K-ras* はハウスキーピング遺伝子として構成的に発現する。一方、雄性生殖細胞の精子形成過程において、*K-ras* mRNA の発現レベルが劇的に変化することが報告されている。我々の研究成果は、ESXR1 が ESXR1 C 末側断片を介して M 期細胞周期停止を誘導し第一減数分裂の進行を抑制する一方、ESXR1 N 末側断片が雄性生殖細胞のステージ特異的な分化に必要とされる遺伝子群の発現を転写レベルで制御し、その後の ESXR1 の発現低下が、*K-ras* 遺伝子の転写活性を介して第一減数分裂の再開と進行を誘導する可能性を示唆している。本研究を通して、蛋白分解により一つの蛋白質から全く異なる生物活性を発揮する二つの機能的ペプチドが生じることが明らかにされた。蛋白分解が、複数の機能分子を同時に生成する結果、異なる生物現象を時間的・空間的に協調・統合・制御させるための役割を担っている可能性が示唆される。

K-ras 遺伝子の機能獲得型変異 (gain-of-function mutation) は、ヒト癌においてもっとも頻繁に認められる遺伝子変化の 1 つであり、膵臓癌の 70~90%、結腸直腸癌の 50%、肺癌の 20~50% に検出される。*K-ras* 遺伝子変異を有する癌において、構成的活性化型 K-Ras 蛋白質の存在は、腫瘍の形成過程や形質転換した細胞の癌形質維持に必須と考えられている。*K-ras* 遺伝子変異を有する癌において、構成的活性化型 K-Ras の存在は腫瘍の形成過程や形質転換した細胞の癌形質維持に不可欠である。この事実をもとに、farnesyl-transferase inhibitors、antisense oligonucleotides、ribozymes や siRNAs のような Ras の活性を抑制する様々な技術が開発されてきた。我々の研究結果は、構成的活性化型 K-Ras を抑制する新たな分子生物学的手段として ESXR1 を位置づけるものである。*K-ras* は個体発生に必要不可欠な遺伝子であり、*K-ras* 遺伝子欠損マウスは肝臓の欠損や貧血を伴い胎生致死となるが、他の臓器・組織の形成は正常に進行する。さらにキメラマウスの解析から、機能的 K-Ras 非存在下でも多くの細胞系列が問題なく増殖・分化できることが証明されている。これら一連の観察から、K-Ras 活性の喪失は他の Ras ファミリー分子 (H-Ras, N-Ras) により機能的に代償されるものと推察される。遺伝子や蛋白を癌細胞特異的に導入・発現させるシステムが存在しない現時点において、K-Ras の機能抑制が正常細胞の増殖・分化に重大な障害を引き起こさないという事実は、ESXR1 を用いる癌の遺伝子治療・蛋白治療が構成的活性化型 K-Ras 蛋白を有する多くのヒト癌に対し広く適応可能なことを示唆している。

学位論文審査の要旨

主査 教授 志田 壽 利
副査 教授 秋田 弘 俊
副査 教授 近藤 哲
副査 教授 島山 昌 則

学位論文題名

Paired-like homeoprotein ESXR1 acts as a sequence-specific transcriptional repressor of the human *K-ras* gene

(ヒト *K-ras* 遺伝子特異的転写リプレッサーとしての paired-like ホメオ蛋白 ESXR 1 に関する研究)

K-ras 遺伝子の機能獲得型変異 (gain-of-function mutation) はヒト癌においてもっとも高頻度に認められる癌遺伝子変異であり、変異 *K-ras* 遺伝子から作られる構成的活性型 K-Ras 蛋白は細胞の癌化プロセスのみならず、一旦癌化した細胞の癌形質維持に必要な不可欠な要素となる。申請者らが単離した ESXR1 は paired-like ホメオボックスを有する新規ヒト遺伝子であり、その産物である 65 キロダルトン (KDa) の ESXR1 ホメオ蛋白は細胞内で蛋白分解により N 末側のホメオドメインを有する 45KDa 断片ならびに C 末側のプロリンに富んだ繰り返し配列からなる 20KDa 断片にプロセスされる。生成された 20KDa 断片は細胞質に局在する一方、45KDa 断片は核内に移行する。26S プロテアソームの機能を抑制することによりサイクリン A ならびにサイクリン B の分解を抑制する結果、M 期 prophase における細胞周期停止を誘導することが明らかにされている。これに対し、核移行する N 末側 45KDa 断片の生物学的役割はこれまでまったく明らかにされていない。

本論文において、学位申請者はホメオドメインを含む N 末側 45KDa 断片に焦点を絞りその機能解析を進めた。まず CASTING アッセイならびにゲルシフトアッセイを用いて、この 45KDa 断片が TAATNNNATTA (N は任意の塩基) で知られる P3 配列に特異的な DNA 結合活性を有することを明らかにした。さらに、SV40 プロモータールシフェラーゼを用いたレポーターアッセイにより、P3 配列に結合した ESXR1 45KDa 断片が近傍に存在するプロモーター活性を抑える転写リプレッサーとして機能することを明らかにした。次に、DNA マイクロアレイを用いたゲノム網羅的ヒト遺伝子発現解析から、ESXR1 の転写標的遺伝子のひとつとして *K-ras* を同定した。Real time PCR 法、ゲルシフト法ならびにクロマチン免疫沈降法を用い、ESXR1 がヒト *K-ras* 遺伝子の第一イントロン

内に存在する TAATGTTATTA 配列 (repressor element of *K-ras*: REK と命名) に特異的に結合し、この DNA-蛋白結合を介して *K-ras* 遺伝子からの mRNA 転写が抑制されることを見出した。一方、*K-ras* 遺伝子変異を有する癌において、構成的活性型 K-Ras の発現は癌細胞の癌形質維持に必須と考えられている。そこで、ESXR1 の 45KDa N 末断片をコードする cDNA を発現ベクターに挿入し、種々のヒト癌細胞に異所性発現させる系を樹立した。その結果、ESXR1 N 末断片は変異型 *K-ras* 遺伝子を有する癌細胞の増殖を特異的に抑制する一方、*K-ras* 遺伝子変異を持たない癌細胞の増殖にはまったく影響を与えないことが明らかになった。ESXR1 による *K-ras* 変異癌細胞の増殖抑制は変異型 *K-ras* 発現ベクターを導入・発現することにより解除された。これらの実験結果から、ESXR1 は *K-ras* 特異的な転写リプレッサーとして機能しその mRNA さらには蛋白発現を抑制すること、その結果 ESXR1 は変異 *K-ras* 遺伝子を保有する癌細胞の増殖を選択的に阻止することが明らかになった。

口頭発表に際し、秋田教授から酵母細胞において ESXR1 がクローニングされた理由—特に ESXR1 が酵母細胞に対するヒトサイクリン E の致死効果を中和する機構、*K-ras* の以外のヒト遺伝子発現に対する ESXR1 の影響ならびに癌治療に向けての ESXR1 臨床応用の具体的な方法論について、近藤教授から膀胱癌細胞に対する ESXR1 の効果、マウスにおける ESXR1 を用いた癌治療実験の現状ならびに dormancy を考慮した難治癌治療法への展望に関して、また畠山 (昌則) 教授から生殖系悪性腫瘍における癌抑制遺伝子としての ESXR1 の役割、癌—胎児抗原としての ESXR1 の発現メカニズムに関する質問が出された。申請者は自らの実験結果ならびに文献による考察を引用し、これらの質問に対し概ね妥当に解答した。

ESXR1 は世界で初めて明らかにされた *K-ras* 遺伝子に対する転写リプレッサーである。この発見は *K-ras* 遺伝子変異を基盤に発生する膀胱癌 (全膀胱癌の 70-90%)、肺癌 (全肺癌の 20-50%) などの難治癌に対し、ESXR1 蛋白製剤、ESXR1 遺伝子製剤を用いた革新的な治療法の開発につながることで期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。