

学 位 論 文 題 名

機能的結合を介した NFBD1/MDC1による
p53依存性アポトーシスの制御

学位論文内容の要旨

【目的と背景】

NFBD1/MDC1 (以下 NFBD1) は 1996 年、ヒト骨髓球系幼弱細胞株である KG1 細胞由来の cDNA ライブラリースクリーニングにより発見された。NFBD1 は 2089 アミノ酸で構成され、N 末端に FHA(forkhead-associated)ドメイン、C 末端に BRCT(BRCA1 carboxyl terminus)ドメインを有している。一般的に FHA ドメインおよび BRCT ドメインはリン酸化蛋白の結合に重要な役割を果たす事が報告されており、いずれも DNA 損傷時に DNA 修復や複製に関与する遺伝子にコードされている。また、NFBD1 の N 端側には ATM のリン酸化基質として知られている SQ-TQ cluster 配列が存在し、実際に NFBD1 も ATM によりリン酸化されることが報告された。中川原らは 2000 年に NFBD1 が核内転写因子であり、抗アポトーシス機能を有する事を報告した。最近、NFBD1 は DNA 損傷時、特に DNA 二本鎖切断の際に DNA 修復複合体である MRN complex 等を DNA 損傷部にリクルートする事が報告された。また、中川原らの報告同様、NFBD1 の抗アポトーシス機能に関する幾つかの報告は認められたが、その詳細なメカニズムは不明であった。一方、p53 は癌抑制遺伝子の一つで、様々な細胞ストレスに応答して、時にアポトーシス機能を発揮することが知られている。今回、DNA 損傷に際し NFBD1 と p53 の関連性を評価し、細胞生理に与える影響を検討した。

【方法と結果】

野生型 p53 を持つ A549 細胞をトポイソメラーゼ II 阻害剤であり、DNA2 本鎖切断を惹起するアドリアマイシンで処理し、アドリアマイシン依存性アポトーシスの誘導過程における、各遺伝子の蛋白及び mRNA レベルでの発現変化を Immunoblotting 及び RT-PCR にて評価した。その結果、NFBD1 は蛋白及び mRNA レベルで発現の低下を認めた。一方、p53 は Ser-15 のリン酸化に伴う蛋白の安定化が認められ、その標的遺伝子の発現誘導も観察された。また、NFBD1 が直接アドリアマイシン依存性アポトーシスに影響を与えるかを検討する目的で A549 細胞に NFBD1 を過剰発現後、アドリアマイシンで処理し Immunoblotting にて評価した。NFBD1 の過剰発現に伴い p53 は Ser-15 のリン酸化阻害に伴う発現レベルの低下が認められ、同時に p53 標的遺伝子の発現誘導阻害も認められた。さらに A549 細胞に NFBD1 を過剰発現した際の細胞生存率を MTT assay で検討したところアドリアマイシンに対する感受性の低下が認められた。これらより NFBD1 は p53 のリン酸化阻害により、そのアポトーシス機能を阻害している可能性が示唆された。次に NFBD1 と p53 の複合体形成の有無を免疫沈降法で検討した。HEK293T 細胞の内在性の NFBD1 と p53 の免疫沈降実験では NFBD1

と p53 との複合体形成が確認された。さらに NFBD1 との結合に必須の領域を同定する目的で p53 の欠失変異体を用い、NFBD1 との免疫沈降実験を行った。その結果、アミノ末端を欠く p53 の変異体は NFBD1 に対する結合活性を失っていた。従って NFBD1 との複合体形成には転写活性化ドメインを含むアミノ末端が重要であると考えられた。次に、p53 との結合に関与する領域を同定する目的で NFBD1 の変異体を作製し in vitro pull-down assay を行った。その結果、NFBD1 は、主に BRCT ドメインを介して p53 と結合している事が示唆された。次に、NFBD1 の p53 活性化能に対する効果を検討するため、p53 の下流遺伝子である p21^{WAF1}、BAX のプロモーターを用いたルシフェラーゼ・レポーターアッセイを行った。結果、NFBD1 の用量依存性に p53 の転写活性化能の抑制が認められた。又、この現象が実際に細胞の生死に関与しているかを検討する目的で p53 と NFBD1 を共発現し、MTT assay で細胞の生存率を検討した。NFBD1 の用量依存性に生存率の回復を認め、NFBD1 は p53 の転写活性化能に影響を与え、これは細胞生理制御に関与していると考えられた。

【考察】

NFBD1 は DNA 修復複合体である MRN complex 等を DNA 二本鎖切断部ヘリクルートするメディエーターであり、DNA repair に関与する遺伝子である事は既に報告されているが、内在性 NFBD1 に対する RNAi により抗癌剤感受性が増すという報告も散見され、その抗アポトーシス機能も注目されていた。しかし、その分子生物学的なメカニズムに関しては不明であった。今回の実験から NFBD1 は p53 転写活性化能阻害に引き続いた p53 依存性アポトーシスの抑制に関与している事が示唆された。また、この抑制機構は NFBD1 の BRCT ドメインが p53 のアミノ末端に結合し、セリン 15 のリン酸化阻害及び蛋白の安定化阻害に起因するものと考えられた。A549 細胞をアドリアマイシンで処理した際、p53 は翻訳後修飾としてセリン 15 のリン酸化を受け、蛋白の安定化を認めたが NFBD1 は相反して消失していった。この相反関係は免疫染色による細胞内局在評価でも再現されており p53 依存性アポトーシスに対する NFBD1 の関与を想像させる結果であった。実際に A549 細胞に NFBD1 を過剰発現した後、アドリアマイシン処理を行った場合、その感受性は低下しており、NFBD1 の p53 依存性アポトーシス抑制機能を示唆した。DNA 損傷時、p53 は N 末端のセリン 15 がリン酸化され、安定化する事が知られている。実際に、このセリン 15 をアラニンに置換すると p53 の DNA 損傷における転写活性化能は低下する報告があり、セリン 15 のリン酸化が細胞の生死に深く関与していると考えられている。通常 p53 の N 末端には E3 ユビキチンライゲースである MDM2 が結合しており、その蛋白量をコントロールしているが、DNA 損傷時には ATM のシグナルにより、これが解離し p53 のセリン 15 のリン酸化および安定化が起これと言われている。我々が行った結合実験では NFBD1 はこのセリン 15 を含む p53 の N 末端に、その BRCT ドメインを介して結合していた。したがって NFBD1 の BRCT ドメインが p53 へのリン酸化シグナルをブロックしている可能性を示唆するものと考えられた。また、NFBD1 が MDM2 と BRCT ドメインを介して結合、安定化している結果も得ており、今後、p53 の安定化阻害に MDM2 を介したユビキチネーションの関与を検討する必要があると考えられた。

【結語】

本研究により NFBD1 は p53 依存性アポトーシスの制御に関与し、DNA 損傷時に、細胞の生死における key regulator となっている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 田 中 一 馬

学 位 論 文 題 名

機能的結合を介した NFBD1/MDC1による p53依存性アポトーシスの制御

Nuclear Factor with BRCT Domain 1 (NFBD1)/MDC1 は核内転写因子であり,抗アポトーシス機能を有することが報告されており,最近 DNA 損傷時に DNA 修復複合体である MRN complex 等を DNA 損傷部にリクルートすることも報告された.NFBD1 の抗アポトーシス機能に関しては幾つかの報告が認められるが,その詳細なメカニズムは不明であった.一方,p53 は癌抑制遺伝子の一つで,様々な細胞ストレスに応答して,時にアポトーシス機能を発揮することが知られている.今回,DNA 損傷に際し NFBD1 が p53 依存性アポトーシスに与える影響を検討した.申請者のグループは野生型 p53 を持つ A549 細胞をアドリアマイシンで処理し,アポトーシスの誘導過程における,各遺伝子の蛋白及び mRNA レベルでの発現変化をウエスタンブロット法及び RT-PCR にて評価した.その結果,NFBD1 は蛋白及び mRNA レベルで発現の低下を認めた.一方,p53 は Ser-15 のリン酸化,安定化が認められ,その標的遺伝子の発現誘導も観察された.また, A549 細胞に NFBD1 を過剰発現後,アドリアマイシンで処理しウエスタンブロット法で検討したところ NFBD1 の過剰発現に伴い p53 は Ser-15 のリン酸化阻害に伴う発現レベルの低下が認められ,同時に p53 標的遺伝子の発現誘導阻害も認められた.さらに A549 細胞に NFBD1 を過剰発現した際の細胞生存率を MTT assay で検討したところアドリアマイシンに対する感受性の低下が認められた.これらより NFBD1 は p53 のリン酸化阻害により,そのアポトーシス機能を阻害している可能性が示唆された.HEK293T 細胞の内在性の NFBD1 と p53 の免疫沈降実験では NFBD1 と p53 との複合体形成が確認された.さらに NFBD1 との結合に必須の領域を同定する目的で p53 の欠失変異体を用い,NFBD1 との免疫沈降実験を行った.その結果,NFBD1 との複合体形成には転写活性化ドメインを含むアミノ末端が重要であると考えられた.次に,p53 との結合に関与する領域を同定する目的で NFBD1 の変異体を作製し in vitro pull-down assay を行った.その結果,NFBD1 は、主に BRCT ドメイ

ンを介して p53 と結合していることが示唆された。次に、NFBD1 の p53 活性化能に対する効果を検討するため、p53 下流遺伝子のプロモーターを用いたルシフェラーゼ・レポーターアッセイを行った。結果、NFBD1 の用量依存性に p53 の転写活性化能の抑制が認められた。p53 と NFBD1 を共発現し、MTT assay で細胞の生存率を検討したところ、NFBD1 の用量依存性に生存率の回復を認め、NFBD1 は p53 の転写活性化能に影響を与え、これは細胞生理制御に関与していると考えられた。本研究により NFBD1 は p53 依存性アポトーシスの制御に関与し、DNA 損傷時に細胞の生死における key regulator となっている可能性が示唆された。

口頭発表に際し、副査の畠山教授より NFBD1 と p53 mutant との結合の有無、NFBD1 の癌遺伝子としての可能性、NFBD1 の BRCT ドメインの機能に関する質問があった。これに対して申請者は p53 の 15 番目のセリンをアラニンに変換した場合、NFBD1 との結合力が増す事は確認しているが p53 の変異が多い DNA binding domain との結合力に関しては未検討であること、NFBD1 は癌遺伝子としての可能性が高いこと、NFBD1 の BRCT ドメインは BRCA1 等と複合体を形成し、細胞周期にも関与している可能性があることを回答した。次いで副査の田中教授より NFBD1 の細胞周期に与える影響、DNA 修復困難な場合に NFBD1 の発現低下を司る因子についての質問があった。これに対して、NFBD1 が細胞周期 G2/M に与える影響は確認されなかったこと、NFBD1 の発現は ATM の下流遺伝子である何らかの転写因子が司っている可能性が高い旨を回答した。さらに主査の浅香教授より NFBD1 のトランスジェニックマウス、ノックアウトマウスの検討の有無、NFBD1 の臨床応用についての質問があった。これに対し申請者は、マウスでの実験は現在継続中であること、臨床応用に関しては、更なる臨床検討が必要である旨を回答した。

本研究は p53 依存性アポトーシスに対する NFBD1 の機能を初めて明らかにしたものであり、今後の更なる研究の蓄積により癌治療への臨床応用が期待される。

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取得単位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。