

学位論文題名

NF- $\kappa$ B regulates the stability and activity of p73 by inducing its proteolytic degradation through a ubiquitin-dependent proteasome pathway

(NF- $\kappa$ Bによるユビキチン化を介した p73 蛋白の分解と活性の調節機構の解析)

学位論文内容の要旨

<背景及び目的>

p73 はアポトーシス誘導活性を持つ p53 ファミリーに属する核内転写因子である。一方、NF- $\kappa$ B は抗癌剤刺激あるいは放射線照射に起因する DNA 損傷に応答して、極めて早期に活性化される細胞生存因子であるが、細胞の生と死の制御機構における両者の機能的相互作用の有無については不明である。今回、我々は NF- $\kappa$ B が p73 のユビキチン化を亢進させ、プロテアソーム依存性の分解を促進することによって、そのアポトーシス誘導能を制御する機能を持つことを明らかにした。

<材料、方法>

実験には MEF、COS7 および H1299 の 3 種類の細胞株を用いた。培養細胞への遺伝子導入は LipofectoAMINE2000 および FuGENE6 を用いた。内在性の NF- $\kappa$ B を活性化させる目的で、細胞を TNF- $\alpha$  で処理した。p65  $\Delta$  C deletion mutant の作成については、forward primer 5'-TAGAATTCGGGACGATCTGTTTCCCCTCATC-3' と reverse primer 5'-TTCTCGAGTTAAAGGACTGGGGCAGAGGACGG-3' を用いて PCR により増幅した。プライマー配列の下線部分には EcoRI および XhoI の制限酵素部位を導入し、PCR 産物を両制限酵素によって消化し、pCMV-HA 発現プラスミドの当該領域へ導入した。TNF- $\alpha$  で処理した細胞および各種発現プラスミドを遺伝子導入した細胞を用いて、immunoblotting 法、免疫沈降実験、RT-PCR 法、免役染色法、ルシフェラーゼレポーター解析、FACS 解析、コロニーフォーメーションアッセイを駆使することによって NF- $\kappa$ B と p73 の機能的相互作用の解析を行った。

<結果>

NF- $\kappa$ B 複合体を過剰発現させた細胞では、p73  $\alpha$  の蛋白質レベルでの発現減少が容量依存的に検出された。一方で、p73  $\alpha$  の転写レベルでの変化は認められなかった。この現象は p73  $\alpha$  に特異的であり、p53 ファミリーに属する p53、p63  $\alpha$  および p73  $\beta$  では観察されなかった。TNF- $\alpha$  処理により内在性の NF- $\kappa$ B を活性化させることでも同様に内在性の p73  $\alpha$  の蛋白質レベルでの減少が認められたが、転写レベルでの発現量の変化は検出されなかった。さらに、TNF- $\alpha$  処理によって内在性の NF- $\kappa$ B を活性化させた条件下では、野生型の MEF 細胞においては p73  $\alpha$  の蛋白質レベルでの発現低下が認められたが、NF- $\kappa$ B 複合体のサブユニットである p65 をノックアウトした MEF 細胞では p73  $\alpha$  のタンパク質の発現量の変化は観察さ

れなかった。過剰発現系を用いた実験から、NF- $\kappa$ B 複合体の共発現により、ユビキチン化の亢進を伴う p73 の半減期の大幅な短縮が認められた。また NF- $\kappa$ B 複合体による p73 の転写活性ならびにアポトーシス誘導能の顕著な阻害が検出された。以上の実験結果から、NF- $\kappa$ B の活性化に伴う p73 の抑制作用は、転写レベルでの発現調節によるものではなく、ユビキチン/プロテアソーム系を介した分解システムによる可能性が示唆された。一方、免疫沈降実験の結果からは NF- $\kappa$ B 複合体と p73  $\alpha$  との複合体形成は認められず、NF- $\kappa$ B 複合体との結合により p73  $\alpha$  の分解が誘導されている可能性は低いと考えられた。そこで我々は p65 の転写活性化能に着目し、p65 の COOH-末端に存在する TAD (転写活性化ドメイン) を削除し、転写活性化能を消失させた p65  $\Delta$ C を作製した。興味深いことに、野生型の p65 を過剰発現させた細胞では p73  $\alpha$  の分解が検出されたが、p65  $\Delta$ C は p73  $\alpha$  を分解する機能を失っていた。これらの実験結果は NF- $\kappa$ B 複合体によって引き起こされる p73  $\alpha$  の分解は、その転写因子としての活性に依存することが判明した。従って、NF- $\kappa$ B 複合体はその標的遺伝子群の活性化を介して p73 の分解を促進することによって、細胞の生と死を制御する可能性が示唆された

#### <考察>

今回、我々は世界に先駆けて NF- $\kappa$ B がその転写活性化能を介してユビキチン/プロテアソーム依存性の p73 の分解を促進することを明らかにした。従って、DNA 損傷に応答した NF- $\kappa$ B による抗アポトーシス活性は、p73 の選択的分解消化に起因することが示唆された。

DNA 損傷に応答して、非受容体型チロシンキナーゼである c-Abl による p73 のリン酸化を介したその安定化は、p73 の活性化の仕組みの一つである。一方で、c-Abl は I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化を介してその安定性を増加させることによって、NF- $\kappa$ B の核内への移行および活性化を抑制することが示されている。また、シスプラチンによるアポトーシス誘導過程において、NF- $\kappa$ B の転写活性化能の抑制と p73 の安定性が相関していることを示唆する報告も存在する。さらに、DNA 傷害に応答して c-Abl が活性化されると対照的に、TNF- $\alpha$  は c-Abl に影響を与えない。従って、NF- $\kappa$ B による p73 の制御機構に c-Abl が重要な役割を果たしている可能性があり、今後の研究課題となると思われる。

今回、我々は免疫沈降法によって NF- $\kappa$ B 複合体と p73 との共沈を検出することができなかったことから、NF- $\kappa$ B は間接的なメカニズムにより p73 を制御している可能性が示唆された。転写活性化能を欠いた p65  $\Delta$ C を用いた実験から、NF- $\kappa$ B の転写活性化能が p73 の分解に必要であることが示唆された。NF- $\kappa$ B による p73 の分解誘導がユビキチン化を介することから、NF- $\kappa$ B の直接の標的遺伝子群の中に p73 に対する E3 ユビキチンリガーゼをコードする遺伝子が存在する可能性が示唆された。最近、HECT-type の E3 ユビキチンリガーゼの一つである Itch が p73 と結合し、その分解を促進することが報告された。我々の実験結果と同様に Itch は p53 に対しては影響を及ぼさないことも報告された。Itch のプロモーター領域に、予測される NF- $\kappa$ B の結合サイトがいくつか存在するが、我々の予備実験によれば NF- $\kappa$ B の過剰発現あるいは TNF- $\alpha$  処理による NF- $\kappa$ B の活性化は、Itch の発現昂進には結び付かなかった。NF- $\kappa$ B の直接の標的遺伝子群の網羅的解析を用いた新たな p73 の E3 ユビキチンリガーゼの同定が今後の重要な研究課題の一つであると考えられる。

# 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 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

## NF- $\kappa$ B regulates the stability and activity of p73 by inducing its proteolytic degradation through a ubiquitin-dependent proteasome pathway

(NF- $\kappa$ Bによるユビキチン化を介した p73 蛋白の分解と活性の調節機構の解析)

p73 はアポトーシス誘導活性を持つ p53 ファミリーに属する転写因子である。一方、NF- $\kappa$ B は抗癌剤刺激および放射線照射に起因する DNA 損傷に応答して、極めて早期に活性化される細胞生存因子であるが、細胞の生と死の制御機構における両者の機能的相互作用の有無については不明である。本研究では NF- $\kappa$ B と p73 との間の相互作用の解明を目的とした。NF- $\kappa$ B 複合体を遺伝子導入することにより p73  $\alpha$  の蛋白質レベルでの減少を認めたが、転写レベルでの変化は認めなかった。この現象は p53 ファミリーの中でも p73  $\alpha$  に特異的であった。TNF- $\alpha$  により内在性の NF- $\kappa$ B を活性化させることでも内在性の p73  $\alpha$  の蛋白質レベルでの漸減を認め、転写レベルでは変化がなかった。この現象は p65 をノックアウトした MEF 細胞では認めなかったことから、NF- $\kappa$ B 依存性に起こっていることが確認された。過剰発現系の実験から、NF- $\kappa$ B 複合体により、ユビキチン化の亢進を伴う p73 の半減期の短縮が認められた。また NF- $\kappa$ B 複合体により p73 の転写活性能ならびにアポトーシス誘導能の障害が検出された。免疫沈降実験の結果からは NF- $\kappa$ B 複合体と p73  $\alpha$  との間に複合体形成は認められなかった。興味深いことに p65 の C 末端に存在する転写活性化ドメインを削除し、転写活性化能を消失させた p65 $\Delta$ C を強制発現させた場合には p73  $\alpha$  の発現低下は起こらなかった。従って、NF- $\kappa$ B 複合体はその標的遺伝子群の活性化を介して p73 の分解を促進することによって、細胞の生と死を制御する可能性が示唆された。

公開発表にあたり副査の畠山教授より 1) NF- $\kappa$ B により誘導され、p73 をユビキチン化するものの候補の有無について、2) itch のプロモーター領域におけるコンセンサス配列の有無について、3) p73 と結合する蛋白で p73 の分解に関係するものについて、の質問があった。これらの質問に対し 1) ”Itch が p73 の E3 ligase であるという報告を最近認めたので、Itch のプライマーを作製し NF- $\kappa$ B を強制発現した場合と TNF $\alpha$  で活性化させた場合で RT-PCR を

施行したが、残念ながら Itch の mRNA には変化を認めなかった”2) ”Itch のプロモーター領域には、予想される NF- $\kappa$ B のコンセンサス配列がいくつか存在する”3) ”RanBPM が p73 の COOH 末端と結合し、p73 のユビキチン化を阻害し分解を抑制する。p53 の E3 ligase である MDM2 は p73 の NH2 末端に結合し転写活性を抑制することはできるが、ユビキチン化は起こさないことが過去の論文から知られている”との回答があった。

主査の浅香教授より 1) NF- $\kappa$ B のノックアウトマウスの有無、2) TNF $\alpha$  の細胞に与える影響について、3) p73 が抑制されることにより腫瘍の増生につながるか、4) NF- $\kappa$ B と p53 との関係について、の質問があった。これらの質問に対し、1) ”p65 のノックアウトマウスは肝細胞のアポトーシスにより胎生期に死亡してしまう。p50 のノックアウトマウスは外見は正常で、少なくとも 1 年は生存可能だが、ある種の細菌やウイルスに対する免疫系の異常が存在する”2) ”TNF $\alpha$  を処理したことによる細胞死は存在しないことを予備実験として確認した”3) ”p73 が分解されることによりそのアポトーシス誘導能が阻害され、結果的に腫瘍細胞が生存し、腫瘍増生につながると考えられる”4) ”今回の我々の実験からは NF- $\kappa$ B は p53 の安定性にも機能にも影響を及ぼさないという結果を得た。しかし、過去の文献からは、NF- $\kappa$ B が p53 を抑制する、影響を及ぼさない、共にアポトーシスに働くとの様々な報告があり、詳細は不明である”との回答があった。

最後に副査の藤堂教授から、1) 他の NF- $\kappa$ B ファミリーと p73 との関係について、2) p73 の今までの知見、今後の展望について、の質問があった。これらの質問に対し、1) ”NF- $\kappa$ B と p73 の相互作用については現在までほとんど報告が無く、文献的にも考察は難しい。また、今回の実験を行うに当たってまず代表的な NF- $\kappa$ B のヘテロ二量体である p65/p50 をもちいて実験を行ったので、他の NF- $\kappa$ B ファミリーと p73 との関係については今回は検討できなかった”2) ”p73 は p53 と同様に細胞増殖抑制能やアポトーシス誘導能を有している。p73 は p53 と異なりほとんど変異を認めることはなく、細胞内では普段はきわめて発現量が低い。DNA damage が細胞に加わるとその発現量が増加しそのアポトーシス誘導活性が増加する。p73 は p53 と共同して、もしくは単独でアポトーシスを誘導することができる。また変異型の p53 は p73 と結合しその機能を抑制するため、特に p53 の欠失、変異した腫瘍細胞では p53 の代わりとして機能している可能性がある。また p73 が抗ガン剤の耐性に関与しているとの報告もあり、今後のさらなる研究に期待したい”との回答があった。

本論文は、NF- $\kappa$ B 複合体がその標的遺伝子群の活性化を介してプロテアソーム依存性の p73 の分解を促進することによって、細胞の生と死を制御する可能性を示した興味深い報告であり、臨床医学への今後の展開が期待される。

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。