

Adenovirus E4orf6/7 activates ASPP1, which induces apoptosis

(アデノウイルスE4orf6/7はASPP1を活性化し、アポトーシスを誘導する)

学位論文内容の要旨

【本研究の意義および目的】有害刺激は細胞の代謝に異常をきたし、細胞に生じた変化が大きい場合には細胞死が起こる。有害刺激による細胞死は多細胞生物が生命を維持していく上で重要な意義を有する。有害刺激に対する細胞の反応として知られるアポトーシスは遺伝子によってプログラム化された細胞死であり、p53 遺伝子を中心とした細胞死のメカニズムが詳細に研究されている。しかし、個々の有害刺激を出発点としたメカニズムの詳細についてはまだ解明されていない部分が多い。

アデノウイルス (Ad) 初期遺伝子 E4orf6/7 は Ad 初期遺伝子 E1A と同様、細胞に p53 依存的アポトーシスを誘導する。E1A は転写抑制因子 RB によって不活化されている転写因子 E2F-1 の遊離を促進する。RB から遊離した E2F-1 は単独でも遺伝子プロモータに結合できるが、E4orf6/7 の存在下ではプロモーター上で安定化され、下流遺伝子の転写をさらに促進する。アポトーシスの誘導に必要な E4orf6/7 の機能領域は E2F-1 の安定化に必要な領域である E4orf6/7 タンパクの C 末領域と一致することから、E4orf6/7 が E2F-1 の安定化を介して p53 依存的アポトーシスを誘導することが示唆されている。

ASPP1 (apoptosis-stimulating protein of p53) は近年、p53 依存的アポトーシスの誘導に関わる因子として同定された ASPP ファミリーに属する遺伝子である。ASPP1 遺伝子の上流には複数の E2F-1 結合部位が存在し、E2F-1 が ASPP1 の転写を増加させることがこれまでに示されている。ASPP1 は E1A の遺伝子導入によっても発現が促進される。このことから、RB により不活化されている E2F-1 は E1A の作用により遊離され、ASPP1 を転写活性化してアポトーシスを誘導していることが示唆される。

p53 依存的アポトーシスに重要と考えられる E4orf6/7 の標的遺伝子はこれま

でに同定されていない。しかし、E4orf6/7 は E2F-1 を安定化することから、E2F-1 結合部位を有する ASPP1 プロモーターからの転写調節を介して p53 依存的アポトーシスを誘導していることが推察される。本研究では ASPP1 が E4orf6/7 の標的遺伝子であるという仮説の真偽を明らかにする目的で分子生物学的解析をおこなった。

【実験方法、結果および考察】ヒト Ad 5 型 E4orf6/7 のアポトーシス活性は、過去にげっ歯類の細胞に E4orf6/7 を発現する組み換えアデノウイルスを感染させることにより示されている。ヒト細胞に対する E4orf6/7 のアポトーシス活性を DNA の分解により検出する目的で、5%ウシ胎仔血清を添加したダルベッコ変法イーグル培地でヒト由来 293T 細胞を培養し、Ad 初期遺伝子 E1A12S、E4orf6/7 を発現するプラスミドをリポフェクション法により導入し、遺伝子導入 24 時間後に抽出したゲノム DNA をアガロース電気泳動法により解析した。E4orf6/7 の DNA 分解能はアポトーシス誘導活性が示されている E1A12S よりも高かった。また、E4orf6/7 と E1A12S をともに導入した細胞では単独で導入した細胞よりもさらに強い DNA 分解がみられた。

E4orf6/7 により誘導された 293T 細胞の DNA 分解がアポトーシスの結果であることを示す目的で、アポトーシスの分子マーカーである PARP の分解をウエスタンブロット解析により検索した。すべてのサンプルで非分解型 PARP (116kDa) が検出され、E4orf6/7 と E1A12S を導入した細胞ではアポトーシス細胞の存在を示す、分解型 PARP (85kDa) のシグナルが検出された。

E4orf6/7 による E2F-1 の発現調節と細胞内局在を明らかにするためにおこなったウエスタンブロット解析では、E4orf6/7 導入 293T 細胞での E2F-1 の発現増加が認められた。また、発現が誘導された E2F-1 は核に局在することが見出された。

E4orf6/7 導入 24 時間後の細胞全抽出液中に含まれる ASPP1 をウエスタンブロット解析で検出したところ、コントロールと比較して、E4orf6/7 導入細胞において ASPP1 の発現増加が認められた。E4orf6/7 による ASPP1 の発現促進能が E4orf6/7 分子のどの領域にあるのかを明らかにするため、一連の変異型 E4orf6/7 を 293T 細胞に導入して検索したところ、C 末領域を保存した変異型 E4orf6/7 の導入で ASPP1 の発現が促進され、C 末領域を欠失した E4orf6/7 では ASPP1 の明らかな発現促進が見られなかった。E4orf6/7 の ASPP1 発現促進ドメインは

E2F-1活性化ドメインであるE4orf6/7のC末領域と一致することが示された。

ASPP1 は、微量が核近辺の細胞質に局在することが知られているが、細胞核内で p53 の転写調節機能を助けてアポトーシスを誘導するためには、ASPP1 の発現促進に加え、ASPP1 タンパクが核内部に局在する必要があると考えられる。E4orf6/7 の導入により発現を誘導した ASPP1 の細胞内局在を明らかにする目的で免疫蛍光染色を行った。コントロールでは ASPP1 の核近辺細胞質領域での局在は検出限界以下であったが、E4orf6/7 導入細胞では ASPP1 の著明な核局在を認めた。変異型 E4orf6/7 による ASPP1 の発現促進と核局在について検索したところ、C 末領域を保存した E4orf6/7 変異株の導入細胞では野生型 E4orf6/7 導入細胞と同様に ASPP1 の発現促進と核局在がみられ、C 末領域を欠失した E4 変異株の導入細胞では ASPP1 の発現促進が検出限界以下であり、ASPP1 の核局在は評価困難であった。

細胞質における局在が報告されているASPP1がアポトーシス刺激によってどのように核へ移行するかの詳細はこれまで報告されていない。そこでE4orf6/7がASPP1を核に移行させる直接的因子の候補になりうるかどうかを検討する目的で、E4orf6/7のASPP1結合能を免疫沈降法により検索したところ、E4orf6/7はE2F-1との結合を示すのみならず、ASPP1とも結合することが示された。E4orf6/7のASPP1結合能はASPP1の核への移行あるいは核内部での遺伝子転写促進に関わるE2F-1との共同作用に重要である可能性が示唆された。

以上の結果は次のように要約できる。

- ・ E4orf6/7をp53野生型ヒト細胞293Tに発現させるとDNA分解とPARP分解が引き起こされた。
- ・ E4orf6/7はE2F-1の発現とASPP1の発現を増加させた。
- ・ E4orf6/7により発現が誘導されたASPP1は核局在を示した。
- ・ ASPP1の発現亢進と核局在にはE4orf6/7のC末領域が重要であった。
- ・ E4orf6/7にASPP1との結合能が認められた。

【結論】 以上の結果から、E4orf6/7によるアポトーシスの誘導にはE4orf6/7とそのC末領域のE2F-1の安定化機能、これに伴うASPP1の発現亢進とASPP1の核局在が重要であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	中村太保
副査	教授	進藤正信
副査	教授	柴田健一郎
副査	准教授	安田元昭

学位論文題名

Adenovirus E4orf6/7 activates ASPP1, which induces apoptosis

(アデノウイルスE4orf6/7はASPP1を活性化し、アポトーシスを誘導する)

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。以下に、論文の要旨と審査の内容を述べる。

アデノウイルス (Ad) 初期遺伝子 E4orf6/7 は Ad E1A 同様、p53 依存的アポトーシスを誘導する。E1A は転写抑制因子 RB で不活化されている転写因子 E2F-1 の遊離を促進する。RB から遊離した E2F-1 は遺伝子プロモーターに結合するが、E4orf6/7 存在下ではプロモーター上で安定化され、下流遺伝子の転写をさらに促進する。アポトーシス誘導に必要な E4orf6/7 機能領域は E2F-1 安定化に必要な E4orf6/7 蛋白の C 末領域と一致し、E4orf6/7 が E2F-1 安定化を介して p53 依存的アポトーシスを誘導することが示唆されている。

ASPP1 は p53 依存的アポトーシス誘導に関わる遺伝子である。ASPP1 遺伝子上流には E2F-1 結合部位が存在し、E2F-1 が ASPP1 転写を促進することが知られている。E1A 導入は ASPP1 の発現を促進するが、RB で不活化されている E2F-1 が E1A により遊離され、ASPP1 を転写活性化してアポトーシスを誘導していることが示唆されている。

E4orf6/7 は E2F-1 を安定化することから、E2F-1 結合部位を有する ASPP1 プロモーターからの転写調節を介して p53 依存的アポトーシスを誘導していることが推察される。本研究では ASPP1 が E4orf6/7 の標的遺伝子であるという仮説の真偽を明らかにする目的で分子生物学的解析をおこなった。

【実験方法、結果および考察】 E4orf6/7 のアポトーシス活性を検出する目的で、5%FBS 添加 DMEM 培地で 293T 細胞を培養し、Ad E1A12S、E4orf6/7 発現プラスミドをリポフェクション法で導入し、導入 24 時間後のゲノム DNA をアガロース電気泳動法により解析し

たところ、E4orf6/7 の DNA 分解能はアポトーシス誘導活性が示されている E1A12S よりも高かった。

アポトーシス分子マーカーPARP の分解をウエスタン法により検索したところ、E4orf6/7 と E1A12S を導入した細胞でアポトーシスを示す分解型 PARP が検出された。

E2F-1 発現の調節と細胞内局在をウエスタン法で検索したところ、E4orf6/7 導入 293T 細胞の E2F-1 発現増加が認められ、E2F-1 の核局在が見出された。

E4orf6/7導入後のASPP1 発現をウエスタン法で検出したところ、E4orf6/7導入細胞においてASPP1発現増加が認められた。ASPP1発現促進に関わるE4orf6/7の機能領域同定のための解析では、C末領域を保存した変異型E4orf6/7導入でASPP1の発現が促進され、C末領域欠失変異株ではASPP1の発現促進が見られなかった。

E4orf6/7 導入により発現を誘導した ASPP1 の細胞内局在を免疫蛍光染色法で検索したところ、E4orf6/7 導入細胞で ASPP1 の著明な核局在を認めた。C 末領域を保存した E4orf6/7 変異株の導入細胞では野生型 E4orf6/7 導入細胞と同様に ASPP1 発現促進と核局在がみられ、C 末領域を欠失した E4 変異株の導入細胞では ASPP1 の発現促進が検出限界以下であり、ASPP1 の核局在は評価困難であった。

E4orf6/7がASPP1を核に移行させる直接的因子の候補になりうるかどうかを検討する目的で、E4orf6/7のASPP1結合能を免疫沈降法により検索したところ、E4orf6/7はASPP1と結合することが示された。E4orf6/7のASPP1結合能はASPP1の核移行あるいは核内部での遺伝子転写促進に関わるE2F-1との共同作用に重要である可能性が示唆された。

【結論】E4orf6/7によるアポトーシス誘導にはE4orf6/7とそのC末領域のE2F-1の安定化機能、これに伴うASPP1の発現亢進とASPP1の核局在が重要であると考えられた。

以上の論文内容の説明に引き続き、論文及び関連分野についての質疑応答がなされた。

主な質問事項は

1. E2Fとは細胞蛋白質か
2. ASPP1とは何か
3. E4orf6/7はASPP1の転写が必要か
4. DNAの断片化の電気泳動像について
5. E4orf6/7のカスパーゼ活性を調べたか
6. PARPの断片化機構について
7. ASPP1とp53との関係について
8. E4orf6/7とE1Aの抗体は何を使用したか

9. なぜE4orf6/7のC末端領域が必要なのか

10. 免疫沈降法の重要性

などであった。

これらの質問に対して申請者から適切かつ明快な回答が得られた。また、関連分野についても十分な学識を有していると審査員一同が認めた。

したがって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。