

氏名	たかぎ しんじ 高木 慎二
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第512号
学位授与の日付	平成15年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	がん抑制遺伝子産物 p53 と相同性の高い p73 の機能解析

論文調査委員	(主査) 教授 下遠野邦忠	教授 伊藤信行	教授 川崎敏祐
--------	------------------	---------	---------

論文内容の要旨

1997年に、p73 はがん抑制遺伝子産物 p53 と構造的に相同性の高い分子として同定され、選択的スプライシングにより p73 α , β の2つのアイソフォームが存在することが報告された。p53 タンパク質は転写因子であり、UV やアクチノマイシン D などによる DNA 損傷に応答してタンパク質の安定化が起こる。この活性化した p53 は p21 (WAF1) など細胞周期停止に関与する遺伝子群や p53 AIP-1 Noxa などアポトーシス誘導に関与する遺伝子群を転写誘導する。p53 遺伝子はすべてのがんの50%以上で変異が認められ“ゲノムの守護神”として知られる。一方、p73 の遺伝子座は神経芽細胞腫をはじめとする種々のがん細胞において頻繁に欠失が認められる 1p36 領域に存在することから、細胞周期の調節や発がんとの関連が予想された。p73 は培養細胞内に過剰発現させるとアポトーシスを誘導することが知られるが、種々のがん細胞における p73 遺伝子変異は稀であり、p73 が、がん抑制遺伝子産物がどうかについては不明である。

近年の研究報告によると、がんは複数の宿主遺伝子の変異により発生すると考えられている。肝癌においても 1p36 領域が欠失していることが知られていたため、p73 が肝癌発症に関与している可能性が考えられた。

そこで著者は p73 の機能解析をおこない、p73 の転写活性化制御機構および p73 と p53 との機能的相違に関する以下の新知見を得た。

【第1章】

新しい p73 スプライシングバリエントの同定

乳癌由来細胞株 MCF-7 細胞から抽出した poly (A)-RNA より RT-PCR 法を用いて p73 cDNA をクローニングしたところ、今までに報告されている p73 α と β に加えて、さらに新しい2種類の異なる cDNA を見出した。これらは、C 末端領域のナミノ酸配列の異なるタンパク質をコードしていることが明らかとなり、それぞれ p73 γ , p73 ϵ と命名した。p73 γ の cDNA はエクソン11が、p73 ϵ はエクソン11と13が各々選択的スプライシングにより除去されていた。

次に、p53 結合配列を持つ転写プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポータープラスミドに対する4種の p73 スプライシングバリエントの効果を培養細胞において検討した。p73 β が最も転写活性化能が高く、ついで p73 γ , α , ϵ の順に転写活性化能が低下した。これらのことから、p73 には先に報告された p73 α , β 以外にスプライシングバリエントが存在し、その転写活性化能は C 末端領域のアミノ酸配列の違いにより異なることが明らかになった。

【第2章】

p73 スプライシングバリエント間相互作用による転写活性制御

p53 はその分子内に存在する多量体形成領域を介してホモオリゴマーを形成する。p73 にもその多量体形成領域が保存されており、p73 がスプライシングバリエント間でホモ・ヘテロの複合体や p53 との複合体を形成することが予想された。今回、免疫沈降実験により分子間の相互作用について検討したところ、各 p73 スプライシングバリエントは細胞内でホモ・ヘテロの複合体を形成することがわかった。しかしながら、4種の p73 バリエントと p53 との相互作用は認められなかつ

た。

p73 β と p73 α とを細胞内に発現させたときの p53 結合配列を持った転写プロモーターに対する転写活性は、p73 β 単独のときのそれよりも抑制されていた。第 1 章の研究過程で、著者は p73 α の C 末端領域を欠失した変異体の転写活性は野生型 p73 α のそれと比較して上昇することを見出し、p73 α の C 末端領域は転写を抑制する領域であると考えた。p73 β は p53 結合配列を持った転写プロモーターを強く活性化するが、p73 α の多量体形成領域を含む C 末端領域 (316~636a. a.) を培養細胞内に発現させると容量依存的に p73 β の転写活性は抑制された。しかしながら、多量体形成領域を欠いた p73 α の C 末端領域 (424~636a. a.) を発現させた場合には、p73 β の転写活性は抑制されなかった。このことは p73 α の多量体形成領域を含む C 末端領域が、p73 β と複合体を形成することで転写活性化を抑制していることが考えられた。これらのことから、p73 はスプライシングバリエーション間で、ホモ・ヘテロの相互作用を介して転写活性を調節していることが示唆された。

【第 3 章】

p73 α による p53 結合配列を持たない転写プロモーターの活性化

p53 は、p53 結合配列を持たない細胞性およびウイルス性の転写プロモーターに対して抑制的に働くことが知られている。著者は、第 1 章の研究過程で p73 α を培養細胞内に発現させるとインターフェロン β の基本転写プロモーターを含むレポータープラスミドから誘導されるレポーター遺伝子産物ルシフェラーゼの活性を p53 とは逆に誘導することを見出した。

最近、p53 とは逆に p73 α が B 型肝炎ウイルス (HBV) のプロモーターを活性化することが報告された。また、p53 が転写抑制する insulin-like growth factor I receptor (IGF-I-R) 遺伝子プロモーターを p73 α は転写活性化することが報告された。そこで著者は、p73 α が基本転写プロモーターに対して影響を与えるのではないかと考え、いくつかの p53 結合配列を持たない最小転写プロモーターを用いて、この現象が転写レベルでみられる現象か、および p73 のどの領域を必要とするのかについて検討した。

p73 α , γ , ϵ は p53 結合配列を持たない転写プロモーターの下流に組み込んだルシフェラーゼ活性を誘導した。しかしながら、p73 β にはそのような活性は認められなかった。また RNase Protection Assay 法および RNA トランスフェクション法を用いることで、この現象は転写レベルで起きている可能性が考えられた。p73 α の欠失変異体を用いることで、この現象には p73 の転写活性化領域である N 末端領域を必要とはせず、p73 の C 末端領域が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

本研究の結果は、p73 の転写制御の解明に対する有用な知見であるとともにそのホモログである p53 との機能的相違を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

1997年に、p73 はがん抑制遺伝子産物 p53 と構造的に相同性の高い分子として同定され、選択的スプライシングにより p73 α , β の 2 つのアイソフォームが存在することが報告された。p53 タンパク質は転写因子であり、UV やアクチノマイシン D などによる DNA 損傷に反応してタンパク質の安定化と共に活性化が起こる。この活性化した p53 は p21 (WAF1) など細胞周期停止に関与する遺伝子群や p53 AIP1, Noxa などアポトーシス誘導に関与する遺伝子群を転写誘導する。p53 遺伝子はすべてのがんの 50% 以上で変異が認められ “ゲノムの守護神” として知られる。一方、p73 の遺伝子座は神経芽細胞腫をはじめとする種々のがん細胞において頻りに欠失が認められる 1p36 領域に存在することから、細胞周期の調節や発がんとの関連が予想された。p73 は培養細胞内に過剰発現させるとアポトーシスを誘導することや p53 の標的遺伝子である p21 を転写誘導することが知られていたが、その機能や転写因子としての転写活性制御機構は未知であった。本論文は、p73 の転写活性化制御機構についての解析をおこなったものであり、得られた成果は以下の通りである。

MCF-7 細胞から抽出した poly (A)-RNA より RT-PCR 法を用いて p73 cDNA をクローニングしたところ、今までに報告されている p73 α と β に加えて、さらに新しい 2 種類の異なる cDNA を見出した。これらは選択的スプライシングにより生じ、C 末端領域のアミノ酸配列の異なるタンパク質をコードしており、それぞれ p73 γ , p73 ϵ と命名した。ヒト正常組織における p73 α , β , γ , ϵ の mRNA 発現を検討し、発現パターンは各組織間で異なることを示した。p53 結合コンセン

サス配列を持つ転写プロモーターに対する4種のp73 スプライシングバリエントの効果を培養細胞において検討したところ、p73 β の転写活性化能が最も高く、ついでp73 γ 、 α 、 ϵ の順に転写活性化能が低下することを明らかにした。またDNA沈降アッセイ法により、p73バリエントはp53結合コンセンサス配列に結合する可能性が示唆された。さらに、間接免疫蛍光法によりp73 γ および ϵ はp53と同様に主に核内に存在していることを明らかにした。プロモーター領域にp53結合配列を持つp21、MDM2およびBAX遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポータープラスミドを用いてレポーターアッセイをおこなうことにより、転写活性化においてp73バリエントは、各遺伝子プロモーターに対して特異性を持つことを明らかにした。

p53はその分子内に存在する多量体形成領域を介してホモオリゴマーを形成する。p73にもその多量体形成領域が保存されている。そこで免疫沈降実験により分子間の相互作用について検討したところ、各p73スプライシングバリエントは細胞内でホモ・ヘテロの複合体を形成することがわかった。しかしながら、4種のp73バリエントとp53との相互作用は認められなかった。p73 β とp73 α を細胞内に発現させたときのp53結合配列を持った転写プロモーターに対する転写活性化能は、p73 β 単独のときのそれよりも抑制されていた。p73 β とは相互作用しないp73 α の多量体形成領域を欠いた変異体はp73 β の高い転写活性化能を抑制しなかった。p73 α と同様にp73 ϵ もp73 β の高い転写活性化能を抑制したが、p73 γ は抑制しなかった。またp73 α およびp73 ϵ のc末端に存在する同一のアミノ酸配列からなる領域が転写抑制領域であることを示した。これらのことから、本研究においてp73はスプライシングバリエント間で、ホモ・ヘテロの相互作用を介して転写活性を調節していることを提唱した。

p53は、p53結合配列を持たない種々の細胞性およびウイルス性の転写プロモーターに対して抑制的に働くことが知られる。そこで、p53結合配列を持たない転写プロモーターに対して、p73がどのような影響を及ぼすかを検討した結果、p73 α はp53結合配列を持たない転写プロモーターの下流に組み込んだルシフェラーゼ活性を誘導したが、p73 β にはそのような活性は認められなかった。またRNase Protection Assay法およびRNAトランスフェクション法を用いることで、この現象は転写レベルで起きている可能性が考えられた。p73 α の欠失変異体を用いることで、この現象にはp73の転写活性化領域であるN末端領域を必要とはせず、p73のC末端領域が重要な役割を果たしていることを明らかにした。これらのことからp73 α にはp53とは異なった機能および転写活性化制御機構が存在することが予想された。

以上の研究は、p73の転写活性はスプライシングバリエントの発現パターンや発現量により複雑に調節されていることを示したものである。また、p73の転写制御機構の解明とともに、そのホモログであるp53との機能的相違を示唆するものと考えられる。これらはp73の機能を知るうえでの重要な基礎情報を提供し得るものである。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成15年2月24日論文内容とそれに関する口頭試問をおこなった結果合格と認めた。