

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	白井 友香理
論文題目	DDX5による低酸素誘導性転写因子HIF-1の活性増強機構の解析と下流遺伝子の同定		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>固形腫瘍の内部には、血管から十分な酸素が供給されない低酸素領域が存在する。低酸素環境に対する細胞の適応応答を担う転写因子として低酸素誘導性因子hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) が同定されている。HIF-1はαサブユニット (HIF-1α) とβサブユニット (HIF-1β) で構成されるヘテロ二量体の転写因子で、がんの浸潤・転移、血管新生、治療抵抗性などを正に制御する遺伝子の発現を転写段階で誘導する。故にHIF-1の阻害によってがんの悪性を抑制できると期待されているが、未だ十分な治療効果を発揮する薬剤が上市されていないのが現状である。これまでに多岐に亘るHIF-1活性制御機構が報告されているが、依然としてその全容は解明されておらず、新たな治療戦略を確立する障壁となっている。そこで本研究で申請者は、新規HIF-1活性化因子の同定と作用機序の解明に取り組んだ。</p> <p>はじめに申請者は、低酸素環境下で培養したヒト子宮頸がん由来細胞からタンパク質を抽出し、抗HIF-1β抗体による免疫沈降で共沈降したタンパク質を質量分析法で解析した。その結果、HIF-1βの新規相互作用タンパク質として、DEAD-box RNAヘリカーゼファミリーに属するDEAD-box helicase 5 (DDX5) を同定した。次に共免疫沈降したタンパク質を対象にしたウェスタンブロッティング (coIP-WB法)、およびタンパク質間相互作用を解析するスプリットルシフェラーゼ相補アッセイを実施し、DDX5がHIF-1αやHIF-1βと複合体を形成していることを示した。次にHIF-1活性を解析するレポーターアッセイを通じて、DDX5がHIF-1活性を増強することを明らかにした。DDX5によるHIF-1活性制御機構として、DDX5がHIF-1αタンパク質の安定性や、HIF-1αとHIF-1βの発現量に影響を及ぼさないことを明らかにした。その一方で、coIP-WB実験とスプリットルシフェラーゼ相補アッセイを通じて、HIF-1αとHIF-1βのヘテロ二量体形成をDDX5が増強することを見出した。さらに、HIF-1認識配列hypoxia responsive element (HRE) を対象にしたChIP-qPCR解析により、DDX5がHIF-1αのHREへのリクルートを増強する活性を持つことを明らかにした。RNAヘリカーゼ活性を欠失させたDDX5点変異体 (DDX5-K144N) を用いて同様の実験を実施した結果、DDX5のヘリカーゼ活性はHIF-1活性の増強に必要なではないことが確認された。そして最後に、低酸素環境下でDDX5依存的に発現誘導される遺伝子を同定するため、DDX5 KO細胞を用いてRNA-seq解析を実施した結果、lipocalin 2 (LCN2) やtransient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) などのがん関連遺伝子サブセットが同定された。</p> <p>以上のように本研究で申請者は、低酸素環境下でDDX5がHIF-1α-HIF-1βヘテロ二量体形成を増強し、HREへのリクルートを促進することで、一部のがん関連遺伝子サブセットの発現を誘導することを明らかにした。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

低酸素刺激に対する細胞の適応応答は、主に低酸素誘導性転写因子 hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) によって制御されている。数百にも及ぶHIF-1標的遺伝子の発現誘導には、HIF-1と他の活性化補助因子との相互作用が必要であり、かつ当該因子の違いが、いずれの遺伝子サブセットを発現誘導するかを決定づけると考えられている。しかし、その分子基盤には不明な点が多い。HIF-1は腫瘍内低酸素領域でがん細胞の悪性形質と治療抵抗性を誘導することが知られているため、HIF-1活性化機構の解明により新たな治療法の確立につながると期待されている。

この様な状況下で申請者は、新規のHIF-1活性化補助因子としてDEAD-box helicase 5 (DDX5) を同定し、その作用機序とその制御下にある遺伝子群を明らかにした。具体的には、共免疫沈降実験と質量分析を通じて、HIF-1 β と複合体を形成するタンパク質としてDDX5を同定した。そしてHIF-1活性をモニターするためのレポーターアッセイや、スプリットルシフェラーゼ相補試験により、DDX5がホモ二量体を形成することや、HIF-1 α およびHIF-1 β の各々とDDX5が結合すること、さらにはDDX5がHIF-1 α -HIF-1 β ヘテロ二量体の形成を促進することを明らかにした。また、HREを対象に実施したクロマチン免疫沈降実験により、DDX5がHIF-1 α のHREへのリクルートを増強し、HIF-1活性を亢進することを見出した。DDX5の変異体を活用して、DDX5のRNAヘリカーゼ活性はHIF-1の活性化に不要であることを明らかにした。そして最後に、低酸素環境下でDDX5依存的に発現誘導される遺伝子を同定するために、DDX5 KO細胞を用いてRNA-seq解析を実施し、lipocalin 2 (LCN2) やtransient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) をはじめとするHIF-1制御下の一部のがん関連遺伝子サブセットの発現が、DDX5依存的に低酸素環境下で増強されることを見出した。

以上のように申請者は、これまで未知であった「DDX5によるHIF-1活性化機構」を明らかにした。また、「低酸素刺激に応じてHIF-1依存的に発現誘導される遺伝子サブセットを決定づける分子機構」の理解を大きく前進させた。HIF-1ががん治療における標的として認識されている状況下、DDX5とHIF-1の協働を阻害することによって、特定のHIF-1下流がん関連遺伝子サブセットの発現を抑制できる可能性を示唆する研究成果である。

本論文は優れた論理構成によって一貫性を持って記載されており、申請者の生命科学に関する高度で幅広い学識、酸素生物学と腫瘍生物学分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解と発展に繋がる新しい発見を示す内容となっている。以上のことから、本論文を博士(生命科学)の学位論文として高い価値があるものと認めた。

なお、令和6年2月1日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日