

学位論文の要旨

tob・*caf1* 遺伝子欠損マウスを用いた癌化抑制機構及び精子形成機構の解析

- Functional analysis of Tob and Caf1 by gene targeting in mice -

指導教官 山本雅教授

東京大学大学院医学系研究科

病因・病理学専攻

博士後期課程

平成11年4月進学

中村能久

序

細胞増殖・分化時には、増殖・分化シグナル伝達系、細胞周期調節機構、転写調節系、DNA監視・修復機構など、各経路に関わる蛋白質群の機能が厳密に制御されることが必要である。

Tob は受容体型チロシンキナーゼの下流に位置するシグナル伝達分子として見出され、*BTG1*、*BTG2/PC3/TIS21*、*BTG3/ANA*、*PC3B*、*Tob2* からなる細胞増殖抑制蛋白質ファミリー (*TOB/BTG* ファミリー) の構成分子である。*TOB/BTG* ファミリー蛋白質はそれぞれ独立に同定され、構造的及び機能的側面において以下に示す3つの類似点を示す。(1) アミノ末端側約120アミノ酸で互いに相同性があり、その中でも20アミノ酸からなる2つの領域で特に相同性が高い。(2) これらの遺伝子産物を細胞に過剰発現させると増殖を抑制する。(3) *HoxB9* や *Smad* 等の転写調節因子との相互作用がみられ、またアミノ末端側の相同領域において転写調節複合体因子 *Caf1* (*CCR4 associated factor 1*) と会合する。

近年、当研究室において、(A) *tob* 遺伝子欠損マウスでは、加齢に伴い、肺、肝臓、リンパ腫等で高頻度に腫瘍形成が見られる、(B) 増殖因子刺激後、*MAPK* ファミリーの *Erk1*、*2* により *Tob* がリン酸化され、そのリン酸化状態の *Tob* は増殖抑制能を失う、等を明らかにしてきた。しかしながら、*Tob* が関与する癌抑制機構や細胞増殖抑制機構、及び生理機能の解

明には至っていない。そこで本研究では、それらの解明を目的として、以下の二点について研究を進めた。

- (I) *tob* 遺伝子欠損マウスを用い、Tob の機能について個体・分子レベルで解析する。
- (II) TOB/BTG ファミリー蛋白質共通の会合分子ある Caf1 に注目し、*caf1* 欠損マウスを作製し、解析する。

(I) Tob による癌抑制及び細胞増殖抑制機構

Tob 欠損による癌発症機構を明らかにする為、*tob* 遺伝子欠損胚線維芽細胞の解析を行った。マウス胚線維芽細胞は 3T3 法に従って細胞継代を続けることにより、一定の細胞非増殖期間を経て不死化（細胞株樹立）する。Tob 欠損マウス由来胚線維芽細胞では、野生型と比べ、少ない継代数で不死化することがわかり、また不死化後は増殖速度が有意に速く、細胞分裂の接触阻止に低感受性であることが明らかになった。野生型マウスと Tob 欠損マウスでの胚線維芽細胞の不死化に要する時間の相違が、染色体の構造変化（二次的な影響）に起因することを想定し、継代数の少ない時期（継代数 4）における染色体の構造観察を行った。その結果、染色分体切断や染色分体交換、四放射状配置等の染色体異常を有する細胞の数が Tob 欠損マウスで有意に増加していることが確認された。野生型と Tob 欠損マウス胚線維芽細胞の間に見られる異常細胞数の差は、変異原物質である diethylnitrosamine(DEN)の存在化の培養条件において更に増える。これらの結果は、Tob が染色体の安定化にも寄与していることを示唆する。

Tob の細胞増殖抑制の機構を探る為、Tob によって発現が調節される遺伝子を Tob 欠損マウス由来胚線維芽細胞を用いた (loss of function) 系、及びアデノウイルスにより Tob を EBC1 細胞に強制発現させた (gain of function) 系を用い、DNA-microarray 法によって解析した。その結果、細胞周期関連遺伝子 (*cyclin D1*、*p21^{waf/cip1}*) や DNA 修復遺伝子 (*Rad52*) 等が Tob の制御下にあることが示唆された。Tob 欠損マウスの肝臓においても、*cyclin D1* の顕著な発現上昇が認められたことから、Tob は生体内において *cyclin D1* の調節因子であることが示唆された。一方で、Tob は *p21^{waf/cip1}* の発現を p300 と協調的に誘導することを明らかにした。*p21^{waf/cip1}* は細胞周期の G1-S 期進行時には、p53 非依存的な経路によって遺伝子誘導されることが報告されているが、その発現調節に Tob が関与していることを見出した。

次いで、人癌発症と Tob との関わりを明らかにすることを試みた。その為に、*tob* 遺伝子

の変異の探索を 50 例の人癌組織を用いて行ったが、変異を見出すことはできなかった。その一方で、人肺癌組織における *tob* 遺伝子の発現を RT-PCR 法を用い、同患者の正常肺組織との比較を行った結果、18 例中 13 において、*tob* 遺伝子の発現が 4.7-87.3% (平均 30.1%) に減少していることが明らかになっている。また、人肺癌由来細胞株においても、*tob* 遺伝子の発現低下が高頻度に観察されることがわかった。そこで、*tob* 遺伝子の発現低下が見られる人肺癌由来細胞株 (A549、EBC1) を 5-aza-2'-deoxycytidine 処理をした結果、*tob* 遺伝子の発現上昇が見られ、*tob* 遺伝子の発現低下に DNA のメチル化が関係していることが明らかになった。

以上の結果から、細胞増殖抑制能を有する Tob は、細胞増殖制御遺伝子の発現調節や染色体の安定化に関わることが明らかとなった。

(II) *caf1* 遺伝子欠損マウスを用いた精子形成機構の解析

転写調節複合体因子である Caf1 は、TOB/BTG ファミリーメンバーとアミノ末端側の相同領域を介して結合する。しかしながら、その相互作用の生理的意義は明らかではない。Caf1 の機能解析を行うことにより、TOB/BTG ファミリー蛋白質の機能を異なる側面から考察することを目的とし、*caf1* 遺伝子欠損マウス (Caf1 欠損マウス) を作製し、解析した。

Caf1 欠損マウスは、*caf1* 遺伝子座に LacZ を置換することにより作製した。Caf1 欠損マウスは、メンデルの法則に従い生まれ、見かけ上、正常に生育する。更に、雌 Caf1 欠損マウスは、受精・出産能を有する。しかしながら、雄 Caf1 欠損マウスは、受精能力を有さないことが明らかになった。精子解析の結果、雄 Caf1 欠損マウス由来の精子は、その数が極端に減少し、また観察される精子も運動能の低下、及び形態異常を示すことがわかった。この異常は形態学的な観察から、(1) 精子形成過程と (2) Sertoli 細胞の形態異常に依存することが分かった。

遺伝子欠損マウスにおいて、不妊になる表現型を示すものが幾つか報告されている。中でも、エストロゲン・レセプター、レチノイン酸・レセプター等の核内レセプターの欠損により、精子形成に支障をきたすものが報告されている。一方で、(1) 酵母 Caf1 は転写調節因子 CCR4 と会合し、巨大な転写複合体を形成していることが知られ、(2) 哺乳類においては、エストロゲン・レセプターと相互作用し、転写調節に関与するという報告がなされている。核内レセプターのコファクターとして働く分子はしばしば、核内レセプターに共通して作用することが知られている。そこで、Caf1 と他の核内レセプターとの相互作用を想定し、物

理的な結合能について調べた。興味深いことに、Caf1 は RXR α 、RXR β 、RXR γ 、RAR α 、VDR のうち、RXR β のみと特異的に結合することが明らかになった。RXR ファミリーは DNA 結合領域 (C/D 領域) では ~92–95%、リガンド結合領域 (AF-2 領域) では ~86–87% の相同性を持つ一方、アミノ末端側に位置する恒常的転写活性化領域 (AF-1 領域) の相同性は極めて低く、ファミリー分子間の個性を担っていると考えられている。Caf1 と RXR β の結合領域を調べたところ、Caf1 は RXR β の AF-1 領域特異的に結合することが明らかになった。

次に、Caf1 が RXR β のコファクターとして転写調節に関わっているかを、RXR の response element を用いて解析したところ、NIH3T3 を用いた場合、Caf1 単独の強制発現では RXR β の転写調節に影響を与えないが、Tob、Tob2 との共存下において転写活性を正に制御することが明らかになった。Caf1 と Tob との転写活性の相乗効果については、GAL4 の DNA 結合領域と Caf1 との融合蛋白質 (GAL4-Caf1) を用いた、GAL4-Caf1 による GAL4-DNA 結合配列に対する転写活性化能を測定することにより更に評価した。その結果、Tob の存在下で GAL4-Caf1 が転写活性化能を有することが明らかになった。このことは Caf1 と Tob は協調的に働き、転写を正に制御する活性を有することを意味し、RXR β への転写促進能においても同様の機構が存在し得ることを示唆する。

RXR β は精巣内 Sertoli 細胞及び Leydig 細胞に発現が高く、*rxr β* 遺伝子欠損マウスは Sertoli 細胞に不飽和脂肪酸の蓄積等の異常が認められ、精子運動能の低下、及び精子形態異常を示すことが報告されている。一方で、Caf1 の精巣内における発現部位を抗 β -gal 抗体を用いた免疫染色法により解析したところ、Sertoli 細胞、Leydig 細胞そして一部の Spermatogonia に強く発現することが明らかとなった。これらから Caf1 と RXR β が精巣内の体細胞 (Sertoli 細胞及び Leydig 細胞) で機能し、精子形成に関わると考えられる。

以上の結果から、Caf1 は RXR β に対する特異的なコファクターとして Tob ファミリー分子と共に働き、また、精細胞分化・精子形成に重要な役割を担うと結論した。

本研究では、Tob と Caf1 が協調して細胞の増殖・分化を制御する機構について、個体・分子レベルでの解析を通して、新たな知見を得るに至った。