

論文の内容の趣旨

論文題目

p53 により発現誘導される 遺伝子 BAI1 の単離と機能解析

白土 敬之

「悪性新生物」は、現在も日本における死亡原因の第 1 位であり、より効果のある医薬品の開発がもっとも望まれている疾患である。現在、抗癌剤として使用されている薬剤の多くは、非特異的に細胞増殖を抑制するものであり、重篤な副作用が問題となっている。癌に特異的に作用する医薬品の開発には、分子生物学的アプローチによる癌の発生、進展過程の基礎研究は必須であり、これらの過程に関与する分子を同定することにより効果的な薬物のスクリーニング系を構築することができる。癌化に関する分子の中でも、p53 遺伝子は、肺癌、大腸癌、乳癌など多くの癌種で高頻度に体細胞変異が認められ、p53 遺伝子の不活性化が癌化のもっとも重要な過程の 1 つである。p53 は転写因子として働き、p53 標的遺伝子の発現制御を介して、細胞周期の制御、DNA 修復、アポトーシスの誘導などの生理機能を持つことが報告されている。しかし、p53 の癌の発生、進展を抑制するメカニズムについては未知の部分が多く残されており、新規 p53 標的遺伝子の単離とその機能解析が必須であると考えられる。

Tokino らは、p53 により発現誘導される遺伝子がゲノム上に p53 蛋白質結合配列を持つことを利用し、p53 により発現誘導される遺伝子を網羅的に単離する方法を開発した。

この方法は、ゲノムに存在する機能的な p53 結合配列を、酵母を用いて網羅的に探索し、その近傍に存在する遺伝子を単離するという方法である。我々は、この方法によって単離された p53 結合配列をプローブとして、新規 p53 標的遺伝子 Brain-specific Angiogenesis Inhibitor 1、BAI1 を単離した。

BAI 遺伝子は、イントロンに p53 結合配列を持ち、p53 が機能的に欠失している glioblastoma 細胞株 T98G において、p53 を導入時に発現誘導が見られ、p53 標的遺伝子であることが確認された。ヒト各組織由来の mRNA を用いた Northern blot 解析の結果、BAI1 遺伝子は脳に特異的に発現していることが判明した。また、我々は BAI1 遺伝子に高い相同性を示す 2 つ遺伝子 BAI2、BAI3 を単離した。これら BAI 遺伝子は 7 回膜貫通型の膜蛋白質をコードしており、既知の 7 回膜貫通蛋白質と比較し、長い細胞外領域と細胞内領域を有していた。この細胞外領域には laminin、fibronectin、heparin などの細胞外マトリックスと結合する TSP-type 1 repeat 配列が存在していた。この TSP-type 1 repeat 配列領域と 7 回膜貫通領域は、BAI 蛋白質間で高い相同性が見られ、これらの領域は BAI 蛋白質の機能に極めて重要な領域であると考えられた。TSP-type 1 repeat 配列については、thrombospondin 蛋白質において、この配列が血管新生を抑制することが報告されている。実際に我々は、BAI1 蛋白質の TSP-type 1 repeat 配列部分の組換え蛋白質を作成し、ラット角膜を用いた血管新生阻害実験を行った。その結果、この組換え蛋白質は bFGF によって誘導される血管新生を劇的に阻害した。また glioblastoma 細胞株で BAI 遺伝子の発現を調べたところ、BAI1 遺伝子と BAI3 遺伝子は、初代培養 astrocyte と比較して幾つかの細胞株で発現の消失・減少が認められた。この結果は、BAI1、BAI3 遺伝子が glioblastoma の発生、進展に抑制的に働いており、これら遺伝子の不活性化が glioblastoma の進展に有利に働く可能性を示唆している。glioma がより悪性な glioblastoma に進展する際に顕著な血管新生を伴うことが知られているが、p53 の変異やその他のメカニズムによる BAI 遺伝子の不活性化が、顕著な血管新生の原因かもしれない。p53 は、細胞周期の制御、DNA 修復、アポトーシスの誘導などの生理機能を持つことが報告されているが、今回の実験より、BAI1 遺伝子の発現誘導を介した血管新生阻害も有していることが明らかとなり、このような多彩な機能により癌抑制遺伝子として機能していると考えられる。

以上のように BAI1 蛋白質の細胞外領域が、血管新生を阻害する活性を持つことが判明した。しかし、BAI 蛋白質は構造から 7 回膜貫通型受容体であり、細胞外からの何らかの刺激を細胞内の分子に伝達する活性も持っている多機能蛋白質である可能性が考えられた。そこで、BAI1 蛋白質細胞内領域と結合する蛋白質を単離することにより、BAI1

蛋白質の機能を推察する目的で、yeast two-hybrid system を用いた実験を行った。その結果、BAI1 蛋白質細胞内領域と結合する分子として 3 つの新規遺伝子、BAP1、BAIAP2、BAP3 が単離された。これら蛋白質は BAI1 蛋白質細胞内領域に結合することが、in vitro の蛋白質結合実験や免疫沈降法により確認された。これら蛋白質の構造的な特徴より、それぞれ以下のような機能を有していると考えられた (図)。BAP1 蛋白質は MAGUK ファミリーに属し、PDZ domain を介した膜蛋白質などのクラスタリングを行っている。BAIAP2 蛋白質は、SH3 domain を介して BAI1 蛋白質に結合し、何らかのシグナルで核へ移行するシグナル伝達物質として機能している。BAP3 は、C2 domain を有しており、Ca²⁺の濃度上昇を感知するセンサー的な働きをしている。これら遺伝子も BAI1 と同様に脳に多く発現しており、特に BAP1 遺伝子と BAIAP2 遺伝子のヒト脳各部位における発現パターンは BAI1 遺伝子と同じであり、神経系の細胞に特異的に発現している neuron-specific gamma enolase(NSE)のパターンと酷似していた。また BAP1 と相同性の高い PSD-95、BAP3 と相同性の高い Munc-13 は、シナプスの機能に関する報告が多数なされている。これらのことから、BAI1 蛋白質は主に神経細胞で発現し、シナプス機能に関与している可能性が示唆された。実際に今回の実験で、ラット胎児より調整した growth cone 画分に BAI1 蛋白質が濃縮されていることが明らかとなった。しかし一方で、初代培養 astrocyte においては、BAI1 遺伝子が発現していることが確かめられており、神経系以外の細胞でも若干発現していると考えられる。また BAI1 蛋白質に存在する TSP-type 1 repeat 配列は、thrombospondin 以外にも UNC-5、F-spondin、semaphorin V などの nerve growth-cone の誘導や軸索の増殖に関与する分子に存在することが報告されている。

COS-7 細胞を用いて一過性に BAI1 発現 vector を導入すると、COS-7 細胞は非常に細い filopodia 様の擬足を伸ばし、劇的に細胞の形態が変化することが判明した。導入するとこのような変化をもたらす遺伝子として、GAP-43 や synaptotagmin が報告されている。これら蛋白質は神経系に発現しており、GAP-43 は BAI1 蛋白質と同様、growth cone 画分に存在する。BAI1 遺伝子導入時に、このような形態変化が起こる理由は不明であるが、BAI1 蛋白質細胞外領域と細胞外マトリックス、BAI1 蛋白質細胞内領域と細胞骨格などの相互作用の結果、filopodia 様の形態変化が起きると考えられた。

これまで述べてきたように、今回の実験で BAI1 について以下のことが明らかとなった。(1) 脳特異的に発現している。(2) mRNA の発現パターンが神経特異的に発現している NSE と同じである。(3) BAI1 蛋白質が growth cone 画分に存在している。(4) nerve growth-cone の誘導や軸索の増殖に関与する分子に存在する TSP-type 1 repeat 配列

を持つ。(5) 神経の機能に重要な役割を担っている MAGUK ファミリー分子 BAP1 と結合する。(6) 細胞質と核に局在する情報伝達分子 BAIAP2 と結合する。(7) シナプスの機能に関与している Munc13、synaptotagmin と相同性のある分子と結合する。(8) COS-7 細胞に一過性に発現させると、synaptotagmin や GAP-43 と同様に filopodia を形成する。これらの結果から BAI1 の機能を類推すると、BAI1 は何らかの外部からの刺激に応答して、細胞間相互作用、細胞外マトリックスとの相互作用を通じた nerve growth-cone の誘導、あるいは神経伝達物質の制御などに関与していることが考えられる。

今回の研究で BAI1 蛋白質は、少なくとも血管新生阻害活性と、神経系の細胞におけるシグナル伝達という 2つの機能を持ち合わせていると考えられた。血管新生阻害作用については、今後 BAI1 遺伝子を用いた癌の遺伝子治療など、臨床応用を目指した研究が必要であると考えられる。また、神経系の細胞における BAI1 遺伝子の機能に関しては、リガンド分子の同定が必須であると考えられ、内因性のリガンド分子を用いた実験が可能になれば、in vivo での BAI 遺伝子の機能解析も可能になると考えられる

今回の研究で得られた知見は、BAI1 の 2つの機能を明らかにしただけでなく、今後の BAI1 の機能解析の方向性を考える上で十分に役立つものであり、今後本研究を土台として更なる研究が行われることが期待される。

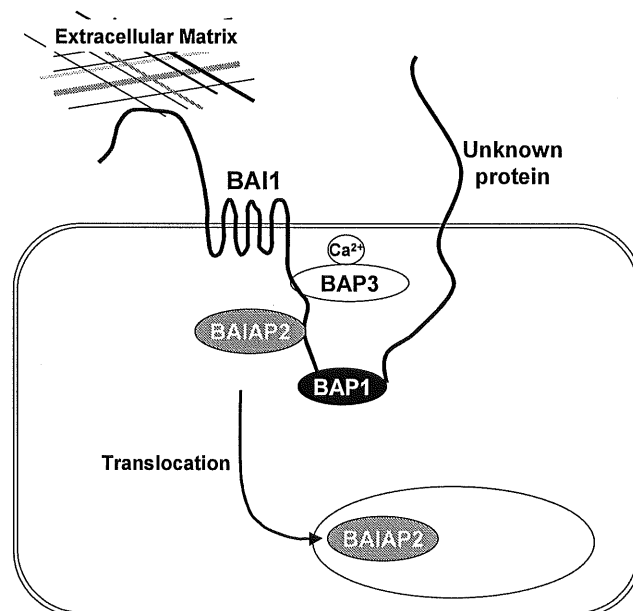


図 細胞における BAI1 蛋白質と相互作用する蛋白質の図