

論文の内容の要旨

論文題目 癌抑制遺伝子 Runx3 結合分子の同定と機能解析

指導教官 小俣 政男教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入(進)学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 今村 潤

【研究の背景および目的】

転写因子 RUNX ファミリーは近年、発生・分化・癌化の分野で急速に注目をあびるようになってきている。RUNX ファミリーはヘテロ二量体である PEBP2/CBF の α サブユニットをコードし、三つの分子からなる。RUNX ファミリーはいずれもアミノ末端に近い部位に Runt ドメインと呼ばれる非常によく保存された 128 アミノ酸からなる構造をもっており、この部位で β サブユニットと結合する。ここは DNA 結合部位でもある。また、カルボキシル末端寄りに転写活性化ドメインと抑制ドメインを保持しており、ここで転写活性を調節する。RUNX3 は 415 アミノ酸から成る、約 44kDa の蛋白である。

RUNX ファミリーのうち RUNX1 は成体型造血に必須であり、造血幹細胞はこの遺伝子機能がなければ形成されない。そしてこの遺伝子領域を含む染色体転座や点突然変異が急性白血病の原因となることが報告されている。RUNX2 は骨形成に必須であり、この機能不全は鎖骨頭蓋異形成症を起こす。RUNX3 については長らく機能が明らかでなかったが、2002 年に胃癌の癌抑制遺伝子であることが報告された。しかし、細胞内での役割や活性調節のメカニズムについては依然として不明な点が多い。

近年、生体内の蛋白複合体のコンポーネントを同定できる機能的プロテオミクスの新手法として、異なる特性を持つエピトープタグを直列に連結させた複合体型タグシステムが注目を集めている。今回我々は、2つの affinity タグ (myc および flag) と TEV プロテアーゼによる切断部位を直列につないだ複合体型タグ (MEF タグ) による affinity purification の手法と質量分析計を用いて RUNX3 の新規結合蛋白の同定を行い、その機能解析を行った。

【研究の方法および結果】

(a) MEF タグ法と質量分析による RUNX3 結合分子の同定

RUNX3 の N 末に MEF タグを融合した蛋白発現プラスミド MTF-RUNX3 を作製し、HEK293T 細胞にトランスフェクションした。この細胞抽出液を抗 myc 抗体・抗 Flag 抗体を固相化したビーズとインキュベーションすることで 2 段階精製し、結合分子の affinity purify を行った。そして特異的に結合した蛋白質を電気泳動後、銀染色し、バンドを切り出してプロテアーゼ消化後、ハイブリッド (四重極-飛行時間) 型の質量分析計 (Q-TOF2) にてシーケンスを行った。この結果、新規の宿主側の結合因子として、DNA 修復蛋白である Ku70 および Ku80 を同定した。

(b) 免疫沈降による RUNX3 と Ku70/Ku80 の結合の確認

HEK293T 細胞に MTF-RUNX3 をトランスフェクションし、細胞抽出液を抗 Flag 抗体、抗 Ku70 抗体、抗 Ku80 抗体を用いて免疫沈降を行った。非特異的な蛋白複合体の形成を防ぐためにエチジウムブロマイドを添加した条件で施行した。この結果、RUNX3 と Ku70 および Ku80 が細胞内で複合体を形成していることが確認された。

(c) *in vitro* translation による pull down アッセイ

RUNX3 と Ku70 もしくは Ku80 が直接結合しているか確認するため、ウサギ網状赤血球 lysate で MTF-RUNX3 を *in vitro* translation した。また N 末 His 融合 Ku70 および Ku80 発現プラスミドを作製し、大腸菌で発現・精製し Ni-NTA ビーズに結合した。このビーズをウサギ網状赤血球 lysate で翻訳した蛋白に加えて pull down アッセイを行い、ウェスタンブロットを施行した。Ku70 を結合したビーズを用いたレーンには RUNX3 のバンドを認めたのに対し、Ku80 を結合したビーズおよびコントロールビーズでは認めなかった。このことから、RUNX3 は Ku70 と直接結合しており、Ku80 とは直接結合しないことが明らかとなった。

(d) RUNX3 と Ku70 の結合部位の同定

RUNX3 の Ku70 との結合部位を明らかにするために、RUNX3 の欠失変異体の発現プラスミド MTF-RUNX3(2-155)、MTF-RUNX3(146-415)、MTF-RUNX3(146-275)、MTF-RUNX3(265-415)、MTF-RUNX3 Δ (241-322) を作製した。HEK293T 細胞にこれらのプラスミドをトランスフェクションし、免疫沈降を行った。また、*in vitro* で翻訳した蛋白による pull down アッセイを行った。*in vitro* での pull down アッセイの結果、転写活性化ドメイン (アミノ酸 235-325) の欠失変異体である RUNX3 Δ (241-322) および、転写活性化ドメインを欠く RUNX3(2-155)、一部だけを保持している RUNX3(146-275)、RUNX3(265-415) は Ku70 と結合しなかったのに対

し、転写活性化ドメインの全長を保持している RUNX3、RUNX3 (146-415)は Ku70 との結合が認められた。HEK293T 細胞を用いた免疫沈降では、活性化ドメインを持たない RUNX3 (2-155) および RUNX3 Δ (241-322) も Ku70 と複合体を形成する結果となった。*in vitro*での pull down アッセイの結果から、RUNX3 の Ku70 との結合の責任領域は RUNX3 のアミノ酸 241-321 と考えられた。この部位は RUNX3 の転写活性化ドメインに相当する。HEK293T 細胞を用いた免疫沈降では、転写活性化ドメインを持たない欠失変異体も Ku70 と結合する結果となったが、細胞内では RUNX3 の転写活性化ドメイン以外の領域も介して Ku70 と間接的に結合しているものと推定された。

(e) RUNX3 および Ku70 の細胞内での局在

RUNX3 と Ku70 の細胞内での局在を調べるために、免疫蛍光染色を行った。pcDNA3/Flag-RUNX3 および hKu70-EGFP を同時に COS7 細胞にトランスフェクションし、Flag を赤色に染色した。共焦点顕微鏡で観察したところ、RUNX3 および Ku70 はいずれも核内の核小体を除いた部位に共局在した。

(f) RUNX3 による p21 誘導に対する Ku70 の関与

RUNX1 が p21 のプロモーターに存在するコンセンサス配列に結合し p21 転写を調節することから、RUNX3 が p21 を誘導する可能性があると考え検討した。

HEK293T 細胞に pcDNA3/Flag-RUNX3 をトランスフェクションし、細胞を回収しウェスタンブロットを行ったところ、p21 が誘導された。そこで、p21 レポーターである p21P' を用いたルシフェラーゼアッセイの系で解析した。

MKN45 細胞に Ku70 ノックダウン用の siRNA オリゴを添加し 96 時間後に回収、ウェスタンブロットを行ったところ、内在性の Ku70 がノックダウンされた。この条件下で p21P'、pcDNA3/Flag-RUNX3 もしくは pcDNA3 をトランスフェクションし 48 時間後に回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。コントロールでは RUNX3 により p21 レポーターの活性が 3.37 倍に上昇したのに対し、Ku70 をノックダウンした条件下では 1.44 倍に止まった。この結果より、RUNX3 は p21 の誘導能を持ち、Ku70 はこの作用を増強する可能性があることが示唆された。

(g) RUNX3 の細胞周期に与える作用の解析

RUNX3 が p21 を介して細胞周期を調節するという仮説を検証するため、フローサイトメトリーによる解析を行った。HEK293T 細胞に pcDNA3/Flag-RUNX3 をトランスフェクションし、24・48・72 時間後に回収し、Propidium Iodide で DNA を染色し、蛍光強度を測定した。

いずれの時間においても G2/M 期のピークは低下し、RUNX3 により G1 期における細胞周期の停止が起こることが示された。

【考察】

複合体型タグ (MEF タグ) による affinity purification の手法と質量分析計を用いて、胃癌の癌抑制遺伝子 RUNX3 の結合蛋白として、Ku70 および Ku80 を同定した。Ku70 は分子量 70kDa の蛋白質で、主に核内に局在し、二本鎖 DNA 切断の修復に機能している。Ku80 は分

子量 80kDa の蛋白質で、Ku70 とヘテロダイマーを形成する。このうち RUNX3 と直接結合するのは Ku70 であり、結合部位が RUNX3 の転写活性化ドメインであることを、*in vitro* での pull down アッセイおよび欠失変異体を用いた実験により明らかにした。また、RUNX3 と Ku70 は核内で共局在しており、siRNA オリゴを用いたノックダウンの系での検討により、Ku70 が RUNX3 による p21 の転写を増強する可能性を示唆する結果が得られた。フローサイトメトリーによる解析では、RUNX3 が G1 期における細胞周期の停止を起こすことを示した。

癌抑制遺伝子としての RUNX3 の機能が障害されるのは、これまでのところ、プロモーター領域の methylation もしくは染色体欠損による発現量の低下・消失によると考えられているが、今回我々が得た結果からは、Ku70 による RUNX3 の転写活性化能の調節が p21 を介して細胞周期をコントロールし、癌化に関与している可能性が示唆された。