

論文内容の要旨

DNA 損傷によって誘導される新規 RNA 結合タンパク質 D8 の同定と機能解析 (Identification and characterization of D8, a novel RNA-binding protein, induced by DNA damage)

小田 健昭

DNA は生命の根幹をなす遺伝物質であり、細胞を構成するタンパク質の設計図でもあるため、細胞内で最も重要な役目を担う物質の一つと考えられる。DNA は外部からの物理的また化学的な刺激によって損傷を受ける。これらの損傷は結果的に DNA の転座、欠損、点変異などを引き起こし、細胞の形質を変えて、細胞が帰属する組織や個体などに重大な欠陥をもたらすことになる。そのため、細胞はこの DNA 損傷に対する防御反応を備えている。具体的には程度の弱い損傷に対しては細胞周期を止め、損傷箇所を修復する。さらに、損傷が激しい場合、細胞死 (apoptosis) や細胞老化 (senescence) を選択することにより、組織や個体全体の恒常性を保つ。これら DNA 損傷に対する細胞の制御機構は多くの遺伝子による分子基盤によって支えられ、複雑、巧妙に成り立っている。

この分子基盤の主要構成因子の一つが癌抑制遺伝子 p53 である。p53 遺伝子の変異・欠損は約 50%の腫瘍において発見されていて、p53 が正常な腫瘍においても p53 を抑制する MDM2 などが異常亢進していることが明らかになっている。また、p53 遺伝子欠損マウスは高頻度に腫瘍を発生する。p53 は DNA 損傷や酸化ストレスなど外因性のストレスに応答し細胞周期の停止、細胞老化やアポトーシスを誘導することが明らかになっている。癌で見出される p53 の変異は殆どがアミノ酸置換の起こるミスセンス変異であり、その変異が DNA 結合ドメインに集中していることから、p53 の最も重要な機能は標的遺伝子の転写活性化能であることが推測される。p53 の標的遺伝子は大きく分けて 4 種類に分けられる。第 1 に細胞周期を止め損傷を受けた DNA の修復に関与する遺伝子、第 2 にアポトーシスを誘導する遺伝子、第 3 に血管新生や浸潤など癌の悪性化に関連する遺伝子、第 4 に p53 シグナルの制御遺伝子である。p53 は必要に応じた様々な修飾を受けることによって、活性化状態や共役因子を変えて、状況に適した標的遺伝子の発現を誘導する。多くの p53 標的遺伝子が同定されている一方、包括的なゲノム解析などから、未だに明らかになっていない多くの標的遺伝子が存在す

ることが予測されている。そのため、新たな p53 標的遺伝子の同定と機能解析によって、恒常性の制御機構が解明されると期待される。

mRNA の分解制御など遺伝子の転写後調節は遺伝子発現調節機構の一つとして精力的に研究されてきた。近年、miRNA などの低分子 RNA が発見され、シグナル特異的また配列特異的な mRNA の分解制御がさらに注目されている。mRNA の配列特異的な分解制御は mRNA の 3'UTR に依存的であることが多い。AU-rich element (ARE) はその分解を制御する配列として半減期の短い mRNA に見出されている。ARE を含む mRNA は c-myc などの原癌遺伝子から IL-1 などのサイトカインまで多岐にわたる。ARE に結合するタンパク質も数種類発見され、ARE を介した mRNA の分解が組織特異的、シグナル特異的に、複雑に制御されていることが明らかになりつつある。ARE が存在する mRNA として Bim-mRNA が知られている。Bim は BH3-only ファミリーに属し、その遺伝子産物は Bcl2 と直接相互作用することによって、アポトーシスを誘導する。Bim の遺伝子欠損マウスは胸腺細胞の選択に異常が起こり、自己免疫疾患を引き起こす。免疫系における Bim の発現制御にも ARE を介した mRNA が関与していると考えられており、その制御機構が注目されている。

本研究では、p53 依存的に DNA 損傷によって発現誘導される遺伝子として、新規 RNA 結合遺伝子 D8 を同定した。データベース検索の結果、D8 遺伝子産物が N 末端に二つの hnRNP K homology (KH) ドメイン、C 末端に RING フィンガードメインを持つ 569 アミノ酸からなるタンパク質であることが明らかになった。さらに、D8 は線虫からヒトに至るまで高度に保存されていて、脊椎動物では、4 遺伝子からなるファミリーを形成していることが明らかになった。

プロモーターアッセイやクロマチン免疫沈降法など詳細な発現解析の結果、p53 が D8 プロモーターに直接結合し、D8 の転写を活性化していることが明らかになった。p53 は細胞が DNA 損傷を受けることによって活性化されるため、DNA 損傷による D8 の発現制御を検討した。その結果、DNA 損傷を引き起こす様々な薬剤を細胞に添加することによって、D8 の発現が誘導されることが明らかになった。また、siRNA によって p53 の発現を抑制すると、DNA 損傷による D8 の発現誘導が阻害された。これらの結果から、D8 は DNA 損傷によって p53 依存的に発現誘導されると考えられる。さらに、DNA 損傷による D8 の発現誘導には p73 や E2F1 などの転写因子が関与している可能性が示され、D8 の転写制御が複数の転写因子によって複雑に制御されていることが示唆された。

D8 の生体内における機能、特に DNA 損傷によって発現誘導される意義を明らかにするために、培養細胞へ D8 を強制発現し、フローサイトメトリー解析を行った。そ

の結果、D8 を強制発現した細胞ではアポトーシスが起きていることが確認された。そこで次に、p53 や DNA 損傷によるアポトーシス誘導に対する D8 の関与を検証した。siRNA によって D8 の発現が抑制された細胞群では、p53 の強制発現や DNA 損傷によって誘導されるアポトーシス細胞が顕著に減少していた。この結果から、DNA が損傷を受けると活性化した p53 が D8 の発現を誘導することによってアポトーシスを誘導していると考えられ、D8 が DNA 損傷に対する生体の防御機構の中で重要な役割を果たしていることが示唆された。

KH ドメインを欠損させた D8 は細胞増殖の抑制能がほとんどないことから、D8 のアポトーシス誘導能には KH ドメインが重要であると考えられる。D8 によるアポトーシス誘導の機序を明らかにするために、D8 が KH ドメインを介して結合する mRNA の探索を行った。その結果、D8 の強制発現によって Bim の mRNA が安定化していることが見出された。さらに、DNA 損傷が D8 を介して、Bim の発現を促進していることも明らかになった。免疫沈降実験によって、細胞内で D8 と Bim-mRNA が相互作用していることが示唆されたため、この相互作用を *in vitro* においても検証した。Bim-mRNA の 3'UTR には ARE が 8 箇所存在し、そのうち 4 箇所がマウスにおいても保存されている。*in vitro* UV クロスリンクアッセイ及び *in vitro* degradation アッセイの結果、D8 は KH ドメインを介して Bim3'UTR 内の ARE に結合することにより、Bim-mRNA を安定化していることが示唆された。

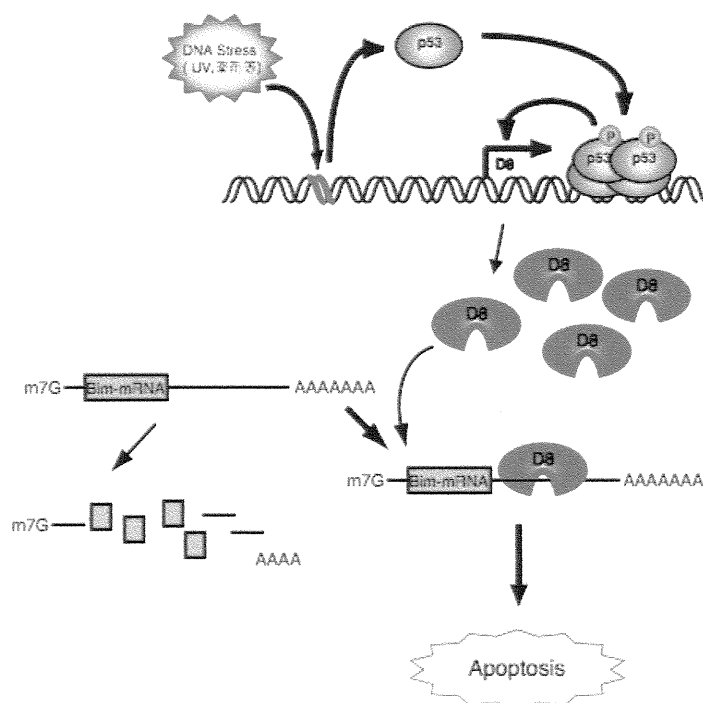
D8 が Bim mRNA を安定化し、Bim の発現を促進していることが明らかになったため、D8 のアポトーシス誘導能への Bim の関与を検証した。siRNA によって Bim の発現が抑制された細胞群では、D8 の強制発現によって誘導されるアポトーシス細胞が顕著に減少していた。D8 が Bim mRNA を安定化することによって Bim の発現を促進し、アポトーシスを誘導していることが明らかになった。

本研究により DNA 損傷のアポトーシス誘導に新規遺伝子 D8 が関与し重要であることが示された。DNA 損傷がアポトーシスを誘導する機構に転写後調節が関与していることを示す報告はわずかであり、本研究によって新たなアポトーシス誘導の制御機構が提示された。

DNA 損傷への応答や p53 シグナル経路に異常が起こると癌が発生することから、D8 も癌抑制遺伝子として機能している可能性があると考えられ、今後、腫瘍などで D8 の欠損や変異が見出される可能性が期待される。また、Bim 遺伝子欠損マウスは胸腺細胞の選択に異常が生じ、自己免疫疾患を発症することが知られており、D8 と免疫系の関与も興味深い。

一方、D8 の発現が今回明らかになった機構以外でも制御されている可能性が示唆さ

れた。D8 の発現を制御する新たな機構を発見することによって、D8 遺伝子の生理的意義についての理解が深まると考えられる。また、D8 の KH ドメインと相互作用する mRNA は Bim 以外にも多数存在しているはずであり、今後網羅的なスクリーニング系を構築する予定である。新たな D8 結合 mRNA の発見によって、未知なる D8 の機能が明らかになる可能性がある。mRNA の分解制御機構については未だ明らかになっていない点も多く、D8 の mRNA 安定化機構の詳細な解析によって、新たな転写後調節の制御機構が明らかになることが期待される。



D8 によるアポトーシス誘導の概略図