

論文の内容の要旨

論文題目 *Cdh1* promoter as a new target for the action of AEBSF, a potent serine protease inhibitor

和訳 強力なセリンプロテアーゼ阻害剤 AEBSF の新規標的としての

*Cdh1* 遺伝子プロモーター

指導教員 岡山博人教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 ムハマド イシュティアーク (Muhammad ISHTIAQ)

線維芽細胞は、細胞間マトリックスタンパクへの結合（足場）を失うと、細胞周期 G1 期に増殖を停止し、やがて Anoikis と呼ばれる細胞死に至る。以前、複製開始点の活性化に必須な Cdc6 タンパクが分解を受け消失することが、足場消失に伴う G1 期停止機構の一つであることを当研究室で見出したが、最近、足場消失に伴う Cdc6 タンパクの分解がセリンプロテアーゼ阻害剤 AEBSF によって極めて効果的に抑制されることを見出した。その結果、Cdc6 タンパクの分解がセリンプロテアーゼによって行われている可能性が浮かび上がったが、私は、この分解抑制が、M 期/G1 期で Cdc6 をユビキチン化しプロテアゾームでの分解を促す Cdh1-APC 複合体の E3 サブユニットである Cdh1 タンパクの転写プロモーターの抑制によることを見出した。AEBSF は、PMSF に代わるセリンプロテアーゼの安定かつ特異的非可逆的阻害剤として化学合成され、長年その目的に使用されてきた薬剤であるが、近年、特定のストレスによる細胞死に対し強

い抑制効果を発揮することから、このプロセスにセリンプロテアーゼの関与が指摘されてきた。当研究は AEBSF の新しい作用標的の解明に重要な突破口を開くと共に、既成概念を覆し、これらの研究の結論の再検討を迫るものである。

## 結果

### **AEBSF 処理による足場消失に伴う Cdc6 の分解の抑制は、Cdh1 タンパクの消失を伴う**

Cdc6 を強制発現させたマウス胎性線維芽細胞を足場の無いメチールセルロース培地で培養すると 3 6 時間以内に Cdc6 タンパクが消失するが、ほとんどの細胞が G1 期に入って増殖停止する 2 4 時間時に AEBSF を加えて更に培養を続けるとプロテアゾームの阻害剤で抑制したのと近いレベルまでに Cdc6 タンパクのレベルが回復した。この時、足場消失時に Cdc6 タンパクを分解するユビキチン化酵素の一つである Anaphase Promoting Complex の E3 サブユニットである Cdh1 のタンパクが同時に消失していた。

### **Cdh1 の強制発現により AEBSF 処理による Cdc6 の分解抑制は減弱する**

そこで、この AEBSF 効果に対する Cdh1 の強制発現の効果を見たところ、Cdc6 の分解抑制が著しく減弱していた。この結果は、AEBSF 処理による足場消失に伴う Cdc6 の分解の抑制は、当処理によって Cdh1 の発現抑制が引き起こされることによって起こることを示唆している。

### **AEBSF 処理によって *cdc6* の転写産物が減少する**

そこで、メチールセルロース培地で培養中の *cdh1* 遺伝子の転写産物のレベルと

それに対する AEBSF 処理の効果を、定量的 PCR 法を用いて検討した。その結果、72 時間の培養中無添加の場合 *cdh1* 転写産物のレベル若干減少したが、24 時間目で AEBSF を添加したところ、24 時間後に 3 分の 1 に減少しその 24 時間後には元のレベルに回復した。この回復は、AEBSF の水溶液中の半減期が 6 時間であることと矛盾しない。以上の結果は、*cdh1* 遺伝子の転写を抑制するか転写産物を不安定化するかのいずれかによって、AEBSF が足場消失時に起きる Cdc6 タンパクの分解を抑制していることを示唆している。

**AEBSF は、転写開始複合体の形成そのものではなく、転写調節因子によるプロモーターの活性化のステップを標的としている**

次に、*ccd1* 遺伝子プロモーターを単離し、リポータープラスミドに繋ぎ線維芽細胞にトランスフェクトし活性を測定したところ、AEBSF 処理によってプロモーター活性が 1/5~1/10 に低下することが分かった。そこで、欠損変異体の作製しコアプロモーターあるいはエンハンサーを欠損したリポータープラスミドの挿入後、アッセイした結果、AEBSF に対する反応領域は、コアプロモーター領域ではなく上流のエンハンサー領域にあることが判明した。そこで、AEBSF に対して最もよく反応する -297bp~+132bp の *cdh1* 遺伝子プロモーター断片の中の既知のエンハンサーをそれぞれ置換変異によって不活化し、AEBSF に対する反応性を調べたところ、3 個のうち -293bp にある Sp1 部位の変異では、転写活性が著しく低下すると共に AEBSF に対する反応性が完全に消失することが判明した。したがって、この Sp1 部位と重なり合った配列が AEBSF の標的となる転写活性化因子の結合部位であると考えられた。

## 考察

AEBSF は PMSF に代わる安定かつ特異的なセリンプロテアーゼの阻害剤として開発された薬剤である。この薬剤は、これまで細胞ストレスによる細胞死を抑制する作用があることがこれまで報告され、この細胞死の誘導にセリンプロテアーゼ関与している可能性が指摘されてきたが、今回私はこの薬剤が、遺伝子の転写制御を標的にできることを見出した。具体的な標的遺伝子は、細胞周期の G1 期で S 期開始因子の分解を行うことによって G1 から S への進行を制御するユビキチンリガーゼのコアサブユニットをコードする *cdh1* 遺伝子である。プロモーター解析によって AEBSF に対する反応領域は、コアプロモーター領域ではなく上流のエンハンサー領域にあることが判明した。さらにこの反応領域の同定を試みたところ、転写開始点上流 293bp に存在する Sp1 部位と重なった配列が、AEBSF の標的となる転写活性化因子の結合部位であることが判明した。現在、この転写活性化因子の同定には至っていないが、当研究は、この薬剤の新規標的の同定に大きな突破口を開くと共に、ストレス細胞死におけるセリンプロテアーゼの関与の可能性に再検討を迫るものと考えている。