

論文内容の要旨

論文題目：大腸がんにおける遺伝子発現異常とアポトーシス抑制

Aberrant gene expression and apoptosis in colorectal cancer

氏名 谷上 賢瑞

従来の研究により、転写制御プログラムの異常によって、がんの発生・進行がもたらされることが明らかになり、がん抑制遺伝子である p53 や、がん遺伝子である Myc など、個々転写因子についての詳細な知見が蓄積されてきた。そして、1990 年代後半に登場したマイクロアレイ技術により、細胞のがん化の過程で遺伝子発現プロファイルに劇的な変化が生じることが明らかとなってきた。しかし、このような遺伝子発現プロファイルの異常が生じる分子機構やその生理的意義については十分に明らかになっていない。そこで我々は、ヒト大腸がんにおける異常な遺伝子発現の分子機構の解明及びその生理的意義の解明を進めることを目的とした。

【大腸がん発生に関与する転写制御モチーフの同定】

様々なデータベースから、大腸がん発生に関与する転写制御モチーフ群を抽出してくるために次のようなアルゴリズムを考案した。最初のステップで、着目した転写制御モチーフについて全遺伝子のプロモーターデータベースをサーチし、そのモチーフが転写制御を行っているターゲット遺伝子群を予測する。その際、転写因子結合領域の転写制御モチーフは短くまたゲノム中に高頻度に現れるため、擬陽性が非常に多いと考えられる。そこで、転写調節領域は異種間の相同ゲノム領域内で高度に保存された non-coding region に含まれることが多いという特徴を利用した phylogenetic footprinting 法と呼ばれる方法を用い、擬陽性を取り除いた。次のステップで、得られたターゲット遺伝子群の発現データを発現プロファイルから抽出し、その転写制御モチーフの転写活性として予測する。本転写制御モチーフ検出アルゴリズムを大腸がん発生メカニズム予測に適用させるために、制御配列、転写制御モチーフ、遺伝子発現データの三つの統合すべきデータを用意した。制御配列として、Ensembl より、転写開始点から上流 1000bp の配列をダウンロードした。転写制御モチーフとして、TRANSFAC, JASPAR から得られた転写制御モチーフを用意した。また、遺伝子発現データとして、マイクロアレイ実験から得られた大腸がん組織 13 種と正常大腸上皮組織 3 種に対する遺伝子発現プロファイルを用意した。そこで、各モチーフをプロモーター領域上にもつ遺伝子群と、大腸がんにおいて発現が上昇している遺伝子群とのオーバーラップの度合いに基づいて、大腸がんにおいて転写活性の上昇が見られるモチーフを予測した。この解析により、大腸がんの遺伝子発現異常に ETS ファミリーが関与していることを示す結果を得た。

【ETS ファミリーとアポトーシス】

ETS ファミリーが大腸がんのどのような生理機能に関与しているのかを調べるために、HCT116 (p53 +/+) 細胞を用いて ETS ファミリーの発現を抑制したところ、ETS ファミリーの一部がアポトーシスに関与していることが明らかとなった。興味深いことに、その中の一つである EHF の発現は大腸がん組織で亢進しており、その発現を抑制すると、HCT116 (p53 +/+) 細胞では顕著なアポトーシスを起こすが、HCT116 (p53 -/-) 細胞では顕著なアポトーシスは起こさないことが明らかとなった。さらに我々は、EHF が p53 の発現を抑制する活性をもつことを明らかにした。以上の結果より、大腸がん細胞は EHF を高発現することにより、p53 依存的なアポトーシスを回避していると考えられた。

【EHF ターゲット遺伝子 RUVBL1 の同定】

次に、EHF のアポトーシス抑制に重要な標的遺伝子を、マイクロアレイ実験により調べたところ、クロマチンリモデリング複合体の構成因子で、大腸がん細胞で発現亢進していることが知られている RUVBL1 が、EHF によって転写活性化されていることを見出した。マイクロアレイの結果を検証するために、HCT116 細胞を用いて EHF の阻害実験を行い RUVBL1 の発現を確認したところ、EHF の発現抑制によって、RUVBL1 の発現が減少することが明らかとなった。また、EHF の発現が見られない HeLa 細胞において、EHF を強制発現させると、RUVBL1 の発現上昇が見られた。また、大腸がん組織において、RUVBL1 の発現が亢進していることが明らかとなった。

さらに、luciferase assay により、RUVBL1 のプロモーター上にある ETS binding site (EBS) の同定を試みた。結果、RUVBL1 の転写開始点より-342bp (EBS-1)、及び-352bp (EBS-2) にある EBS が EHF による転写活性化に重要であることが明らかとなった。

最後に、EHF が RUVBL1 のプロモーター上に結合するかどうかを ChIP 法により確認した。結果、EHF が RUVBL1 のプロモーター上の EBS-1、EBS-2 を含む領域に結合することが明らかとなった。

以上の結果より、EHF は、RUVBL1 プロモーター上に存在する EBS-1 及び EBS-2 に直接結合することによって、RUVBL1 の転写を正に制御していることが明らかとなった。また、前述の EHF の発現抑制によるアポトーシス誘導は、RUVBL1 を同時に強制発現することにより部分的に抑制されることから、EHF によるアポトーシス回避の機構には標的遺伝子 RUVBL1 の発現亢進が重要であると考えられた。

【RUVBL1 による p53 依存的なアポトーシスへの関与】

RUVBL1 が p53 依存的なアポトーシスに関与しているかを調べるため、各種大腸がん細胞で RUVBL1 の発現を抑制して、アポトーシス細胞の割合を測定した。結果、RUVBL1 の発現を抑制することによって、p53 変異型大腸がん細胞株である DLD-1 細胞、Caco2 細胞では、アポトーシスを起こさなかったが、p53 野生型大腸がん細胞株である RKO 細胞、及び HCT116 (+/+) 細胞では、顕著なアポトーシスが確認された。また、RKO 細胞株において、RUVBL1 及び p53 を同時に発現抑制すると、アポトーシス細胞の割合が減少した。

また、p53 欠失型大腸がん細胞株である HCT116 (-/-) 細胞では、RUVBL1 を発現抑制しても顕著なアポトーシスは確認されなかった。

さらに、RUVBL1 の発現を抑制すると、p53 野生型大腸がん細胞では p53 およびその標的遺伝子 PUMA, BAX などの発現が亢進するが p53 変異型大腸がん細胞では、RUVBL1 の発現を抑制してもこれら p53 標的遺伝子の発現変動は起こさないことが明らかとなった。これらのことより、RUVBL1 は p53 の発現を抑制することにより、p53 を介した大腸がん細胞のアポトーシスを抑制していると考えられる。

【RUVBL1 のヒストン H2B モノユビキチン化を介した p53 の発現制御】

RUVBL1 の発現抑制による p53 の mRNA レベルでの発現上昇が、RNA の安定化によるものなのか、それとも転写活性化によるものなのかを明らかにするために、actinomycin D を用いた、RNA 安定性実験を行った。結果、RUVBL1 の発現を抑制しても、p53 の RNA 安定性に影響は見られなかった。また、RUVBL1 の発現抑制により p53 のタンパク質量に増加が見られる。そこで、RUVBL1 の発現抑制が p53 のタンパク質の安定化に寄与しているのかを調べるために cycloheximide を用いたタンパク質安定化実験を行ったが、RUVBL1 の発現抑制による p53 のタンパク質安定化は確認できなかった。以上の結果より、RUVBL1 の発現を抑制することにより、p53 の転写活性化及び p53 タンパク質増加を引きおこし、結果アポトーシスを誘導している可能性が示唆された。

次に、RUVBL1 による p53 の転写制御が直接行われているのかを調べるために、ChIP assay を用いて RUVBL1 の p53 プロモーター領域への結合を確認した。結果、RUVBL1 は、p53 の転写開始点付近を中心として、翻訳領域にかけて結合していることが明らかとなった。また、翻訳領域での結合は、転写開始点から離れるごとに弱くなり、3'UTR では結合は見られなかった。一方、転写開始点より上流では RUVBL1 の結合は見られなかった。さらに、RUVBL1 が p53 のプロモーター上でどのようなクロマチン制御を行っているかを調べたところ、RUVBL1 の発現を抑制すると、p53 の翻訳領域から 3'UTR にかけてヒストン H2B モノユビキチン化が増加することが明らかとなった。また、RUVBL1 の発現を阻害することによって、ヒストン H2B モノユビキチン化酵素である RNF20/hBRE1 が、p53 の転写開始点にリクルートされることが明らかとなった。最後に、RUVBL1 を発現抑制させて上昇した p53 の mRNA 量は、RNF20 を発現抑制させることによって 3 割ほどに減少することが明らかとなった。これらの結果より、RUVBL1 による p53 の転写制御は、RNF20 依存的事であることが明らかとなった。

【結論】

本研究では、大腸がん発生時における遺伝子発現プロファイルの異常を引き起こす転写因子である EHF を同定し、EHF が直接のターゲット遺伝子である RUVBL1 及びその下流に位置する p53 の機能を制御することによって、アポトーシスを抑制していることを明らかにした。また RUVBL1 が、ヒストン H2B モノユビキチン化を介して p53 の転写制御を行っていることを明らかにし、クロマチンリモデリング因子による新しい転写制御機構の解明

に繋がるものと考えられる。本研究で用いたスクリーニング手法により、遺伝子発現プロファイル及び転写制御モチーフから新規のがん発生経路の同定が可能であることが示され、今後のがん研究に活かされるものであると期待できる。