

## 論文の内容の要旨

論文題目 転写因子 E2F の活性制御に関する研究

氏名 青木 一郎

### 緒言

多細胞生物の細胞数は増殖速度と細胞死の頻度を調節することで厳密に制御されている。この制御が崩壊すると組織が過形成したり収縮したりして、がんや神経変性疾患等を引き起こす。がん細胞では増殖が亢進しており、また細胞死が起こりにくくなっている。この原因となるのが増殖や生存などを正に制御する原がん遺伝子の機能亢進や、細胞死や増殖停止を誘導するがん抑制遺伝子の機能喪失である。がんにおいて最も高頻度に不活性化されているがん抑制遺伝子が p53 と RB(Retinoblastoma)である。転写因子 p53 は DNA 損傷によって活性化すると、下流の遺伝子の転写活性化を介して細胞周期を停止させたり細胞死を誘導したりする。RB はヒト網膜芽細胞腫の原因遺伝子として同定された。RB は細胞周期を負に制御するが、その際に結合して不活性化する標的が転写因子 E2F である。つまり、RB が結合している間は E2F は不活性に保たれ、細胞周期が S 期に近づいて RB が Cyclin-CDK 複合体にリン酸化されると E2F から解離し

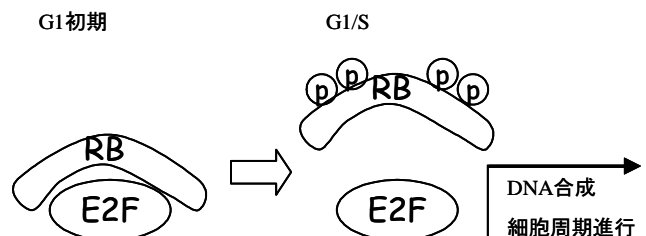


図 1 E2FはG1後期に活性化して標的遺伝子を転写活性化する

E2F が活性化する。

E2F ファミリーには現在 8 種類のメンバーが存在し、おおまかに E2F1 から E2F3 が‘転写活性型’であって、DNA の複製や細胞周期の進行などに関わる遺伝子の発現を調節することで細胞周期を正に制御する。一方で E2F4 から E2F8 が‘転写抑制型’で細胞周期を負に制御すると考えられている。E2F1 は細胞周期を進めるが、予想に反して E2f1 ノックアウトマウスは高頻度のがんを発症すること、およびこのマウス由来の細胞ではアポトーシスが起こりにくいことが報告された。現在 E2F ファミリーのうち E2F1 のみがアポトーシスを誘導すると考えられている。E2F1 は標的遺伝子の転写活性化を介して p53 を活性化するが、p53 非依存的にも細胞死を誘導する。したがって、E2F1 のアポトーシス誘導能だけを特異的に活性化することができれば p53 が不活性化したがんに対する有望な治療戦略となりうると考えられる。

このように多彩な機能を持つ E2F1 の活性を制御するメカニズムを調べることを本研究では目的としている。

### **NEDD8 化は E2F1 の活性を標的遺伝子特異的に制御する**

ユビキチン様タンパク質ファミリーにはユビキチン以外にも SUMO-1, ISG15, NEDD8, Apg12 などが存在する。ユビキチン化がおもにタンパク質分解にはたらくのに対してこれらのタンパク質による修飾は他の様々な機能を持つ。ユビキチン様タンパク質のうち NEDD8 は最もユビキチンと相同性が高い。NEDD8 はユビキチン化と類似したメカニズムによって標的タンパク質へ付加される。ユビキチンの E1 がモノマーなのに対して NEDD8 の E1 は APP-BP1 (amyloid precursor protein binding protein) と Uba3 のダイマーである。NEDD8 の E2 には Ubc12 が知られている。遺伝学的な解析から NEDD8 システムが細胞の増殖や生存、さらには個体の発生に重要であることが示されている。例えば Uba3 ノックアウトマウスは着床前後で胎生致死となる。

NEDD8 化の標的となる分子としては、SCF 複合体の構成因子である Cullin ファミリーなどが報告されている。SCF 複合体は細胞周期の進行などに関わるユビキチンリガーゼ複

合体である。Cullin の NEDD8 化は SCF 複合体への E2 の結合を促進することで SCF 複合体を活性化することが知られている。

また、p53 やそのファミリーである p73 といった転写因子は NEDD8 化されることで不活性化することが報告されている。E2F1 はユビキチンや SUMO-1 といったユビキチン様タンパク質によって修飾されることが知られているので、E2F1 も NEDD8 化によって制御される可能性を検討した。

まず、E2F1 が細胞内で NEDD8 化されるかどうかを調べた。

HEK293T 細胞に His タグの付いた NEDD8 を発現して His タグを吸着する Talon ビーズでプルダウンした後に E2F1 抗体を用いてウェスタンブロットした。すると、His-NEDD8 を発現したときに E2F1 の NEDD8 化を示すラダー状のバンドが検出された (図 2)。したがって、E2F1 は細胞内で NEDD8 化されることがわかった。

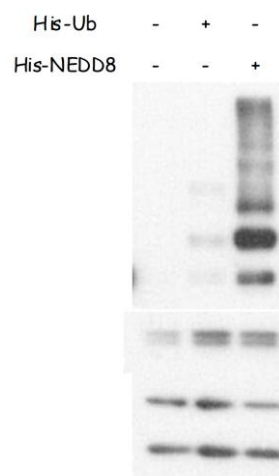


図 2 E2F1 は NEDD8 による翻訳後修飾を受ける

次に、E2F1 の NEDD8 化の意義を検討した。特異的に NEDD8 を基質から切断するシステインプロテアーゼ SENP8 を用いた。SENP8 を発現すると E2F1 の NEDD8 化が消失した (図 3)。E2F1 の NEDD8 化が E2F1 の活性に及ぼす影響を検討するために、レポーターアッセイを行った。E2F1 の標的遺伝子である p73 あるいは E2F2 のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポーターを用いた。p73 レポータープラスミドと共に E2F1 を発現するとレポーターが活性化したが、SENP8 を共に発現すると E2F1 による活性化がさらに増幅された (図 4)。一方で E2F2 レポーターの活性には SENP8 の影響は見られなかった。したがって、E2F1 の NEDD8 化は E2F1 の転写活性を標的遺伝子特異的に負に制御することが示唆された。

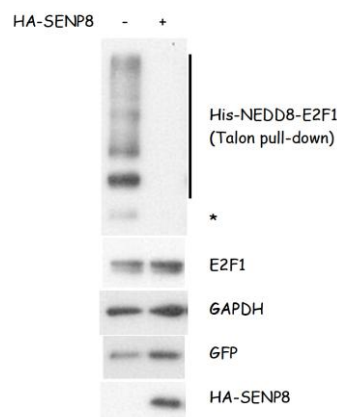


図 3 SENP8 は E2F1 を脱 NEDD8 化する

## まとめとその後の展開

本研究から細胞内で E2F1 が NEDD8 によって翻訳後修飾されること、および E2F1 の NEDD8 化はアポトーシスの促進にはたらく p73 を含む一部の標的遺伝子に対する E2F1 の活性を特異的に抑制する可能性が示唆された。

したがって、E2F1 の NEDD8 は細胞が死ぬことなく増殖している際に E2F1 によるアポトーシスの誘導を抑制している可能性が考えられる。

実際にその後の研究により E2F1 の NEDD8 は E2F1 によって誘導されるアポトーシスを抑制することを示唆する実験結果を得ている。また、

E2F1 は DNA 損傷によるアポトーシスにおいて重要であることが知られている。その後の研究によって E2F1 の NEDD8 化が DNA 損傷によって減少すること、および DNA 損傷による p73

の発現誘導及びアポトーシスに SENP8 が必要であることを示した。これらの結果は DNA 損傷応答に E2F1 の脱 NEDD8 化が重要な役割をはたす可能性を示唆している。さらに、E2F1 の

NEDD8 化が E2F1 による p73 の発現誘導を抑制するメカニズムとして、E2F1 の NEDD8 化は E2F1 と p73 の発現誘導に必要な転写共役因子

である Microcephalin1 (MCPH1) との相互作用を抑制することを示唆する実験結果を得た。また、DNA 損傷によって E2F1 と MCPH1 の相互作用は増加することが報告されているが、この相互作用の増加に SENP8 が必要であることを示した。以上の結果から “DNA 損傷がないときには E2F1 は NEDD8 化されており MCPH1 と解離しているが、DNA が損傷されると E2F1 は SENP8 依存的に脱 NEDD8 化された結果 MCPH1 と相互作用して p73 を転写活性化してアポトーシスを誘導する” というモデルを考えている(図 5)。

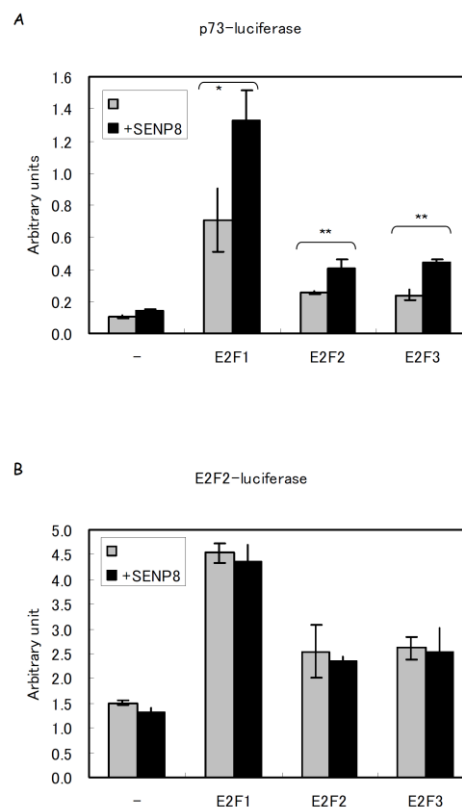


図 4 SENP8 は p73 プロモーターに対する E2F1 の活性を特異的に抑制する

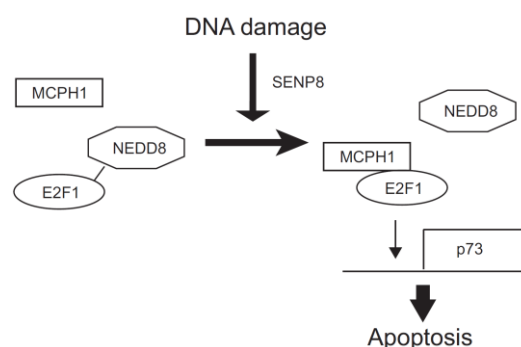


図 5 NEDD8 化による E2F1 の活性制御モデル

を抑制することを示唆する実験結果を得た。また、DNA 損傷によって E2F1 と MCPH1 の相互作用は増加することが報告されているが、この相互作用の増加に SENP8 が必要であることを示した。以上の結果から “DNA 損傷がないときには E2F1 は NEDD8 化されており MCPH1 と解離しているが、DNA が損傷されると E2F1 は SENP8 依存的に脱 NEDD8 化された結果 MCPH1 と相互作用して p73 を転写活性化してアポトーシスを誘導する” というモデルを考えている(図 5)。