

癌抑制遺伝子産物による遺伝子発現制御ネットワークの網羅的解析

●田中 信之¹⁾ ◆飛梅 圭²⁾ ◆佐藤（織田）恵理¹⁾

1) 日本医科大学老人病研究所免疫部門

〈研究の目的と進め方〉

個々の遺伝子の発現は、その発現制御を担う複数の転写制御因子の作用によって、時間的・空間的に厳密に制御されている。一つの遺伝子のみを見てもそのプロモーター領域には数多くの転写因子結合部位があり、様々な転写因子の組み合わせによって、発現が制御されていることは言うまでもない。これら転写制御因子自身も、また複数の転写制御因子によって発現が制御されており、それ自身によるフィードバック制御を介した微調整性システムも含めて、全体として複雑な転写制御ネットワークを形成している。従って、細胞がある一定の状態に有るときには、その状態を保つ為に転写因子群が一定のバランスを保ってこの制御網を定常状態に保ち、一方、様々な外的・内的変動に伴って細胞が応答する時には、その応答に必要な転写制御因子群が活性化され、全体としての制御網は異なった状態でお互いのバランスを保ちながら、必要な遺伝子群の発現を誘導（あるいは抑制）していると考えられる。この、遺伝子制御ネットワーク全体の解明に向けてのアプローチにはいくつかの方法はあるものの、個々の遺伝子発現のみを解析しては、膨大な労力と時間が必要となる。そこで、これに対するアプローチとして、網羅的な発現遺伝子の解析を進展させ、種々の細胞応答における変化、それに関係する個々の転写因子を高発現させるあるいは欠失させたときの変化を網羅的に解析し、全体としての遺伝子発現のパターンの変化を解析することにより、その根底に有る制御回路全体を明らかにすることを考えている。この方法を進めて、さらに遺伝子発現の制御ネットワークの部分的な破綻がいかに疾患に関わってくるかを解析する。

本研究は、遺伝子発現制御ネットワークの網羅的解析とその制御破綻による病態解明への応用であり、その代表として、転写制御因子p53とRb/E2F-1系の転写制御ネットワークを明らかにし、その制御系の破綻によって起こることが知られているアポトーシスの誘導や癌化という現象に対してアプローチしていくことを目的とする。種々の癌遺伝子の導入によりRb系の制御（Rbは転写因子E2F-1に結合しその転写活性を抑制する）が破綻した細胞はp53によるアポトーシスが起こるが、Rb系の制御破綻がいかにしてp53と協調してアポトーシスを引き起こすかは明らかではない。更に、このp53の機能欠損とRb制御系の破綻が強調して細胞が癌化することは周知のことであるものの、p53系とRb系の転写制御ネットワークの相互作用については、明らかではない。そこで、マイクロアレイ法を用いてp53によって発現誘導される遺伝子、Rb系の制御が破綻したときの発現が変化する遺伝子、p53とRb系の両者によって制御される遺伝子を網羅的に解析することで、p53とRb系の転写制御ネットワークの全体像を明らかにすると共に、この制御系の破綻がいかにして癌化に結びつくかを解明する。

〈研究開始時の研究計画〉

既に、Rb欠損MEF、p21欠損MEF、E2F-1高発現MEF、

正常MEFにアデノウイルスベクターを用いてp53を発現させる、ないしアドリマイシンによってDNA損傷を加える等の刺激を与え、経時的にmRNAを採取して、マイクロアレイ解析を行い、多くの既知ないし新規のp53標的遺伝子に加えて、正常MEFではほとんど誘導がかからないのに対して、Rb欠損MEF及びE2F-1高発現MEFではp53によって著明に誘導される一群の標的遺伝子を同定している（p53の新規標的遺伝子の候補として約180種類が挙がった）。現在、これらの候補遺伝子に対して、RNAプロット法を用いて実際に誘導されるのかの確認とRb系の制御破綻による影響を確認している。この解析を更に推し進めて、p53標的遺伝子群をその発現様式によって分類する。同時に、E2F-1欠損MEFに対しても同じ解析を行なう。E2F-1を欠損すると細胞増殖に不利であって、癌化は抑えられるのではないかと考えられたにもかかわらず、E2F-1欠損マウスは腫瘍を発生しやすくなった。この事から考えても、Rbによる転写抑制作用、特にHDACによるクロマチンレベルでの抑制が、癌化の抑制に重要であると考えられ、このマウス細胞を用いてその制御ネットワークを解析する。2) Rb及びヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）と結合できない変異Rbをアデノウイルスにより強制発現させ、それによって起こるクロマチンレベルでの転写抑制を1)と同様の方法で解析する。同時に、これらの細胞に放射線や抗癌剤といったストレスを加え、その応答の変化を調べる。3) 正常MEF及びp53欠損MEFに、c-myc, Ha-ras, cyclin D1を発現させることで、発現パターンに変化の見られる遺伝子群を分類する。4) 上記のクラスター解析の結果得られた候補遺伝子を、更にRNAプロット法を用いて解析し、結果が正しいものかを確認する。

以上の解析を行なうことで、①p53によって誘導される遺伝子群、②Rbによって転写抑制される遺伝子群、③Rbによって抑制がかかるとp53による誘導が起こらない遺伝子群、④E2F-1によって誘導されるもののRbによるヒストン脱アセチル化による抑制が重要でない遺伝子群等が分類出来、それによって両者の制御系の重なり程度、それぞれの制御系の広がりや推測するとともに、経時変化を追うことで、制御回路を立体的に組み立てることを考えている。同時に、種々の癌遺伝子がどの程度にこの両者の制御系を破綻させるか、それが多段階発癌のどの位置に相当し、癌化の引きがねとなるかを明らかにすることが出来ると考えている。

〈研究期間の成果〉

上記の目的でcDNAマイクロアレイ法を用いて解析を進めていく過程で、p53の新たな標的遺伝子を同定した。この遺伝子産物は、複合型ユビキチンリガーゼE3のサブユニットであるcullin3と結合して基質特異的なアダプター分子として機能する分子であることを見出しており、同時にyeast two-hybridによりこの分子の標的となって分解される蛋白も同定している。これまで、p53が癌を抑制する機構において、p53による遺伝子発現の誘導によ

る新たな蛋白の合成が重要であると考えられていたが、我々の解析からp53による特異的な蛋白(群)の分解も重要ではないかという新たな機構を見出した。次に、癌化に伴うp53自身の制御に関しての研究を行った。癌化の過程では多くの癌遺伝子の活性化が段階的に起こるが、大腸癌の多段階発癌モデルやマウスの実験的皮膚発癌の系を始めとする多くの結果から、p53遺伝子の変異は癌化の後期、即ち良性の腫瘍が悪性化する段階で起こることが多いと推測されている。従って、癌化の初期過程では我々の研究の主テーマである癌遺伝子活性化に対してのp53の監視機構を逃れるために何らかのp53活性を低下させるシグナルが関わっているのではないかと想像されるが、そのことに関してあまり報告はない。これに関して、胃癌、肺癌、膵臓癌等多くの癌細胞で恒常的に活性が亢進しているHedgehogシグナルがp53の分解を促進する現象を初めて発見した。この現象は、Hedgehogシグナルを活性化させる分子によって起こり、Hedgehogシグナルの最終標的である転写因子Gli群の活性を抑制する分子(SuFu)によって解除された。同時に、p53自身にはHedgehogシグナルによりユビキチン化の亢進が観察された。そこで、その分子機構を解析した結果、p53の分解に関わるユビキチンリガーE3であるMdm2を介することを明らかにした。実際、Hedgehogシグナルの活性化によりMdm2の機能であるp53タンパクの核から細胞質への排出が亢進するとともに、p53とMdm2の結合が増加する現象が観察された。同時に、Mdm2を活性化すると報告されている特定部位のリン酸化の亢進がHedgehogシグナルによって観察された。更には、Hedgehogシグナルを活性化することで、DNA損傷に伴うp53タンパクの蓄積が部分的に抑制され、アポトーシスの誘導が低下することを見出した。Hedgehogシグナルがいろいろな種類の癌で恒常的に亢進していることを考えると、これらの結果はいかにしてp53の監視を逃れて癌化が起こるのかという癌化のメカニズムを考えるうえで重要な発見であると考えている。

〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究は我々が独自に行ったものであり、関連する他の報告は存在していない。従って、当該分野の研究でも先端的なものと考えている。一方、これに関する研究は、現在論文を投稿している所であり、反響に関しては今後明らかになると考えている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

マイクロアレイ解析の結果、多くのp53の新規標的遺伝子、p53とRbによって制御されている遺伝子等の同定をしている。しかしながら、全ての遺伝子に関して発現を解析して発現制御系全体像を明らかにするにはまだ多くの時間が必要である。今後は更に解析を進めていきたい。

〈今後の課題〉

今回の結果から、p53は多くのタンパクを誘導するとともに、幾つかの特異的なタンパクを分解していることを明らかにした。このような現象を同定したことは初めてであり、p53の癌抑制機能を考えるうえでも重要であると考えている。今後は、同定した分子による癌化の抑制機構を明らかにしていくと共に、この機構に関与する分子を更に同定・解析していくことで、p53による癌抑制機構の全体像を明らかにしていきたいと考えている。同時に、我々はHedgehogシグナルがMdm2の活性化を介

してp53を分解することを初めて見出した。Hedgehogシグナルに関しては、この系のシグナル伝達分子であるPatchedやsmoothenedの変異が皮膚癌や脳腫瘍の一部で報告されていたが、最近になって胃癌、肺癌、食道癌等多くの癌でシグナルの恒常的な亢進が観察されている。従って、これらの解析を進めていくことによって、「いかにしてp53の監視機構を逃れて癌遺伝子が活性化した細胞が癌細胞へと変化していくのか」に関する分子機構を解析していくことで癌化及び癌抑制の分子機構の全体像が明らかになっていくのではないかと考えている。これらの解析に加えて、多くの新たな知見を見出しており、p53がどのような機構で癌化を抑制しているのかという問題と、p53の監視機構を逃れていかにして癌化が起こるのかという問題に挑んでいきたいと考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

研究機関(平成15年度)に発表した論文は、以下の通りである。

Shibue, T., Takeda, K., Oda, E., Tanaka, H., Murasawa, H., Takaoka, A., Morishita, Y., Akira, S., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2003). Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev* 17, 2233-2238.