

学位論文題名

Physical Interaction of p73 with c-myc and MM1,
a c-myc Binding Protein, and Modulation of the p73 Function

(c-myc および c-myc 結合タンパク質 MM1 による p73 の機能制御)

学位論文内容の要旨

ヒトの癌の約 50% で失活のみられる p53 は、癌の発生、進展に関係した極めて重要な遺伝子のひとつである。p73 は p53 類似遺伝子として 1997 年に同定された遺伝子であり、現在 p53, p73, p51/p63 が p53 ファミリーを構成している。これら p53 ファミリーはいずれも、アミノ末端より転写活性化領域、塩基配列特異的な DNA 結合領域、および 4 量体形成領域から構成される特徴的な分子構造を持つ。それぞれの領域はファミリー分子間で構造的にも機能的にも保存されており、実際に p73 および p51/63 は、p53 認識配列をプロモーター上に持つ遺伝子群 (p21, MDM2, Bax, cyclin G など) の転写を活性化する能力を持ち、p53 と同様に細胞増殖抑制、ならびに細胞死誘導を引き起こすことが証明されている。一方、p73 は p53 と異なり、スプライシングの違いに起因する様々な変異体をコードすることが報告されている (α , β , γ , δ , ϵ , ζ)。これらのスプライシング変異体は、いずれも p53 ファミリー間で保存された 3 つの機能領域を持つが、カルボキシ末端領域の違いによる構造的な独自性を示す。レポーターアッセイや酵母の two-hybrid system を用いた実験から、それぞれのスプライシング変異体は、標的遺伝子に対する転写活性化能、および p53 との結合能において異なる性質を示すことが報告されているが、生理的条件下におけるそれぞれの変異体間の機能分担、あるいは機能的相違については不明である。また、p73 のカルボキシ末端領域は p53 には存在しない特有の構造であることから、両者における機能的な相違があるとすれば、それはこの p73 に認められるユニークな領域に起因する可能性が考えられる。

われわれは、この p73 に特有の領域に特異的に結合するタンパク質を単離する目的で、ヒト胎児性脳由来の cDNA ライブラリーに対し p73 α のカルボキシ末端領域 (アミノ酸 551-636) を bait (おとりタンパク質) として、酵母の two-hybrid system を用いたスクリーニングを試みた。その結果 c-myc 結合タンパク質の一つとして報告されていた MM1 が同定された。

MBP 融合タンパク質を用いた *in vitro* binding assay、および動物細胞粗抽出液を用いた

免疫沈降法によって p73 α と MM1 との複合体形成が確認された。免疫染色の結果 MM1 は p73 α と細胞核において共存することが判明した。また MM1 との結合は、p53, p73 β および p73 α のカルボキシ末端を欠いた人工的な変異体では認めなかったことから、p73 α に特異的なものと考えられた。さらに、p53 の発現が認められない骨肉腫由来の細胞 SAOS-2 を用いたルシフェラーゼアッセイ、ならびに β -galactosidase assay の結果、両者の相互作用は p73 α の転写活性化能および細胞増殖抑制能を増強する事が判明した。

一方、MM1 は c-myc の転写活性化ドメインに結合し c-myc の転写活性化能を抑制することが報告されている。c-myc は多くのヒト癌で活性化されている転写因子であり、重要な細胞周期促進因子として機能している。従って、MM1 は、c-myc と p73 α 間の何らかの相互作用に関与している可能性が想定された。免疫沈降法および免疫染色の結果、p73 α と c-myc は細胞核内で複合体を形成することが示された。さらにルシフェラーゼアッセイにおいて、c-myc は p73 α の転写活性化能を抑制することが判明した。しかしながら同じmyc ファミリーに属する N-myc では p73 α との物理的ならびに機能的な相互作用は認められなかった。興味深いことに p73 α , c-myc および MM1 を同時に発現させルシフェラーゼアッセイを行ったところ、c-myc により抑制を受けた p73 α の転写活性化能は MM1 により回復、増強された。

以上より p73 α , c-myc および MM1 の三者は相互に複合体を形成することが明らかとなった。機能的には、c-myc の転写活性化能を抑制する MM1 は、一方で p73 α のそれを増強し、c-myc の p73 α に対する転写活性化能の抑制に拮抗的に作用する事がわかった。この知見が、細胞周期や細胞死誘導を制御する分子機構を解明する新たな手掛かりを提供するものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

Physical Interaction of p73 with c-myc and MM1, a c-myc Binding Protein, and Modulation of the p73 Function

(c-myc および c-myc 結合タンパク質 MM1 による p73の機能制御)

p53は、癌の発生、進展に関係した極めて重要な遺伝子のひとつである。p73はp53類似遺伝子として同定された遺伝子であり、現在p53, p73, p51/p63がp53ファミリーを構成している。これらはいずれも、アミノ末端より転写活性化領域、塩基配列特異的なDNA結合領域、および4量体形成領域から構成される特徴的な分子構造を持つ。それぞれの領域はファミリー分子間で保存されており、実際にp73およびp51/63は、p53認識配列をプロモーター上に持つ遺伝子群の転写を活性化する能力を持ち、p53と同様に細胞増殖抑制、ならびに細胞死誘導を引き起こすことが証明されている。一方、p73はp53と異なり、スプライシングの違いに起因する様々な変異体をコードすることが報告されている(α , β , γ , δ , ε , ζ)。これらのスプライシング変異体は、いずれもp53ファミリー間で保存された3つの機能領域を持つが、カルボキシル末端領域の違いによる構造的な独自性を示す。生理的条件下におけるそれぞれの変異体間の機能分担、あるいは機能的相違については不明である。また、p73のカルボキシル末端領域はp53には存在しない特有の構造であることから、両者における機能的相違があるとすれば、それはこのp73に認められるユニークな領域に起因する可能性が考えられる。

われわれは、このp73に特有の領域に特異的に結合するタンパク質を単離する目的で、ヒト胎児性脳由来のcDNAライブラリーに対しp73 α のカルボキシル末端領域(アミノ酸551-636)をbait(おとりタンパク質)として、酵母のtwo-hybrid systemを用いたスクリーニングを試みた。その結果c-myc 結合タンパク質の一つとして報告されていたMM1が同定された。

免疫沈降法によってp73 α とMM1との複合体形成が確認された。免疫染色の結果MM1はp73 α と細胞核において共存することが判明した。ルシフェラーゼアッセイ、ならびに β -galactosidase assayの結果、両者の相互作用はp73 α の転写活性化能および細胞増殖抑制能を増強する事が判明した。

一方、MM1はc-mycに結合しc-mycの転写活性化能を抑制することが報告されている。c-mycは多くのヒト癌で活性化されている転写因子であり、重要な細胞周期促進因子とし

て機能している。従って、MM1は、c-mycとp73 α 間の何らかの相互作用に関与している可能性が想定された。免疫沈降法および免疫染色の結果、p73 α とc-mycは細胞核内で複合体を形成することが示された。さらにルシフェラーゼアッセイにおいて、c-mycはp73 α の転写活性化能を抑制することが判明した。興味深いことにp73 α 、c-mycおよびMM1を同時に発現させルシフェラーゼアッセイを行ったところ、c-mycにより抑制を受けたp73 α の転写活性化能はMM1により回復、増強された。

以上よりp73 α 、c-mycおよびMM1の三者は相互に複合体を形成することが明らかとなった。機能的には、c-mycの転写活性化能を抑制するMM1は、一方でp73 α のそれを増強し、c-mycのp73 α に対する転写活性化能の抑制に拮抗的に作用する事がわかった。この知見が、細胞周期や細胞死誘導を制御する分子機構を解明する新たな手掛かりを提供するものと考えられた。

審査にあたってまず浅香教授からp73、c-mycおよびMM1分子の生体内における相互作用の有無についての質問があった。本論文では強制発現系における実験データを示したが、内因性分子の実験系は確立されておらず今後検討が待たれるとの返答があった。ついで藤堂教授からp73とc-mycの相互作用の発癌における意義についての質問があった。現状では不明な点が多いが関連分子であるp53およびN-mycを含めた検討が解明の手掛かりになるとの見解が示された。さらに守内教授からはp73の*in vivo*での役割、特に神経発生におけるアポトーシス誘導との関わりについての質問があった。神経芽腫におけるp73とアポトーシス誘導に関する文献の引用、自身のデータを示しその可能性につき言及した。この論文がp73とc-mycの相互作用を示した世界で初めての報告であり高く評価された。

審査員一同はこの成果を高く評価し大学院課程における研鑽や取得単位等と併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。