

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20790068  
 研究課題名（和文） 癌抑制遺伝子 p53 による ETS 転写因子 MEF の発現制御の分子基盤  
 研究課題名（英文） Molecular Basis of the regulation of ETS transcription factor MEF expression by tumor suppressor gene p53

研究代表者  
 スイコ・メリー・アン・ソテン（SUICO MARY ANN SOTEN）  
 熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
 研究者番号：20363525

研究成果の概要（和文）：ETS 転写因子 MEF は、病原微生物を分解する抗菌ペプチドや免疫系の活性化を制御するサイトカインの発現調節を担う一方、造血幹細胞の自己増殖や NK 細胞などの自然免疫担当細胞の分化を担う、極めて広範囲に自然免疫系を制御する転写因子である。本研究では、MEF の発現に対する癌抑制遺伝子 p53 の影響を検討した。その結果、p53 は、MEF の転写活性化因子として新たに同定した転写因子 E2F1 を抑制することにより、MEF の発現を間接的に抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：MEF is one of the ETS transcription factors which regulates a diverse range of innate immune molecules including antibacterial peptides, cytokines and innate immune cell progression. In the present study, we investigated the role of tumor suppressor gene p53 in the regulation of MEF expression. We demonstrate that p53 directly binds to E2F1 and inhibits E2F1 binding to MEF promoter, thereby suppressing MEF transcription.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬理学，MEF，ETS，p53，E2F，p21

## 1. 研究開始当初の背景

MEF は 663 アミノ酸からなる ETS 転写因子で、分化・免疫・癌制御の分野において重要な役割を果たしている。これまで、我々は、

MEF が X 染色体上に存在し、癌細胞において DNA のメチル化により発現が抑制されている癌抑制遺伝子であることを明らかにした (Seki Y, Suico MA et al. *Cancer Res.*, 2002)。

また、我々は、世界に先駆けて MEF のドメイン-機能解析および翻訳後修飾解析を行い、MEF による自然免疫関連分子 (Lysozyme, GM-CSF, beta-defensin) の遺伝子発現制御に関する研究を追求してきた (Kai H et al. *J. Biol. Chem.* 1999; Suico MA et al. *B.B.A.* 2002; Lu Z et al. *B.B.R.C.* 2003; Suico MA et al. *B.B.R.C.* 2004; Suico MA et al. *J. Pharmacol. Sci.* 2004; Lu Z et al. *FEBS Lett.* 2004; Suico MA et al. *J. Biol. Chem.* 2004; Suico MA et al. *B.B.R.C.* 2006). さらに、我々は、MEF それ自身の遺伝子発現制御機構に着目し、MEF 遺伝子の promoter 領域をクローニングし、その発現制御機構の解明を行った。その結果、MEF 遺伝子の転写制御に重要な promoter 領域は、転写開始部位より上流約 1 kbp であることが明らかにし、その制御に転写因子 SP1 が重要な役割を果たすことを見いだした (Koga T, Suico MA [equal first author] et al. *FEBS Lett.*, 2005). しかしながら、MEF の多様な機能およびその重要性が明らかにされる一方で、MEF それ自身の遺伝子発現制御機構に関しては、未だ不明な点が多い。

このような背景のもと、最近、我々は、MEF それ自身の遺伝子発現制御機構のさらなる解明を目的とし、近年その多様な標的遺伝子の転写調節により様々な生理機能の制御を行っていることが明らかになってきた転写因子 p53 に着目し、MEF 遺伝子発現における p53 の影響を検証した。その結果、*in vivo*(p53 +/- マウス)および *in vitro*(HCT116 p53-/-)における p53 の欠損および発現低下は、内因性 MEF 遺伝子の発現量を顕著に増加させることを見いだした。また、p53 遺伝子導入及び内因性 p53 活性化により MEF 発現が減少することが示され、p53 の有無により MEF 及び標的遺伝子の発現が減少することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、p53 による MEF 発現制御機構ならびに自然免疫系 (腫瘍免疫系および上皮免疫系) の制御機構の解明を究極の目的とし、種々の検討を実施する。具体的には、p53 による MEF 遺伝子の抑制機構の詳細を *in vitro* で検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

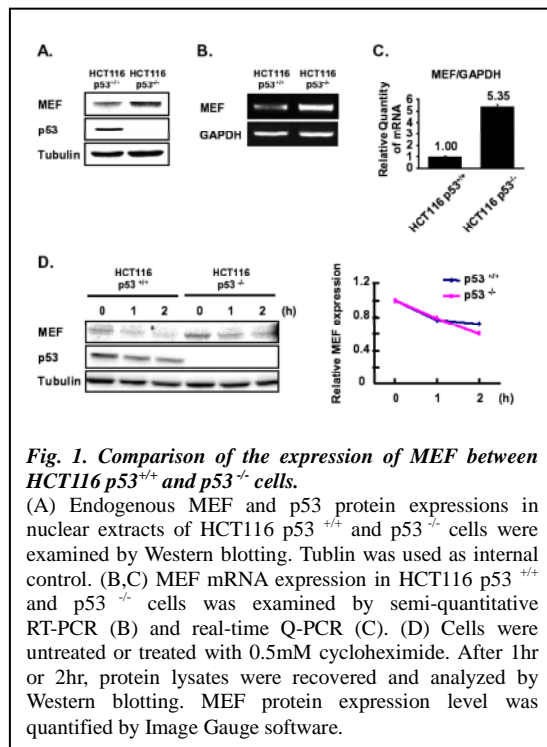
MEF プロモーター上に確認されている SP1 および E2F の転写因子結合サイトに変異を導入した MEF プロモーターコンストラクトを作製し、Luciferase Assay により MEF プロモーター活性を測定することにより、p53 による抑制機構に寄与する転写因子を

明らかにする。抑制に寄与する転写因子同定後は、クロマチン免疫沈降法により、MEF プロモーター上への結合の有無および結合親和性の変化を検証する。最後に、SP1 に関しては p53 との相互作用を、免疫沈降法 (IP) または GST-pull down assay により確認し、E2F に関しては p21 欠損細胞株を用いて検討する。なお、野生型 HCT116 細胞または p53-/-HCT116 細胞、p21-/-HCT116 細胞は既に取り得し、培養法を確立しており、MEF プロモーターコンストラクトおよび p53 発現プラスミド、プロモーター変異導入法は、これまで本研究室にて十分検討したものをを用いる (Suico MA et al. *B.B.A.* 2002; Lu Z et al. *B.B.R.C.* 2003; Suico MA et al. *B.B.R.C.* 2004; Lu Z et al. *FEBS Lett.* 2004)。

## 4. 研究成果

### (1) p53 欠損による MEF 発現量への影響

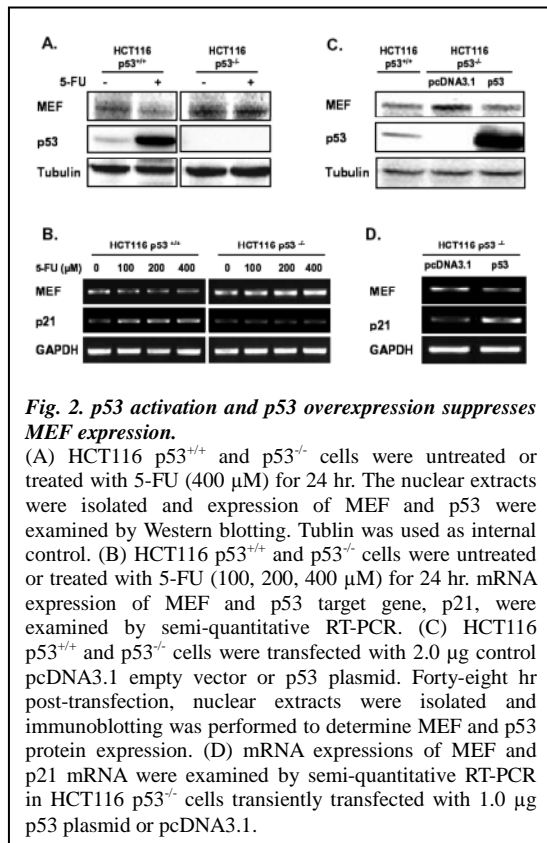
p53 による MEF 発現量への影響を検討するために、HCT116 およびその p53 欠損細胞における MEF 発現量を比較した。その結果、MEF タンパク質および mRNA 発現量が p53 欠損により増加することが示された (Fig. 1A, B)。Q-PCR により定量的に mRNA 発現量を比較した結果、p53 欠損によって MEF mRNA が 5 倍上昇した (Fig. 1C)。また、p53 の MEF タンパク質安定性への影響を検討するために、cycloheximide によりタンパク質新規合成を停止させ、経時的な MEF タンパク質発現量を比較し、定量した。その結果、p53 の欠損に



よる MEF タンパク質安定性への影響は見られなかった (Fig. 1D). 以上より, p53 は MEF の転写を抑制することにより, 発現量を低下させることが示された.

(2) 内因性 p53 活性化および p53 活性化の MEF 発現量に対する影響

(1)より, p53 ノックアウトにより MEF タンパク質および mRNA 発現量が増加することから, p53 は MEF の転写を負に制御することが示唆された. そこで更に, p53 の MEF 発現量に対する影響を検討するために, 5-FU による内因性 p53 活性化および p53 過剰発現による MEF 発現量への影響を検討した. 5-FU による p53 活性化は, p53 タンパク質発現量および p21 mRNA 発現量の増加により確認した. その結果, 5-FU 処理により MEF タンパク質および mRNA 発現量が減少した. 一方, p53 欠損細胞では, MEF 発現量に対する 5-FU 処理の影響が消失した (Fig. 2A, B). 次に, HCT116 p53 欠損細胞に p53 を過剰発現し, MEF 発現量に対する影響を検討した. その結果, p53 過剰発現により MEF タンパク質および mRNA 発現量が減少することが示された (Fig. 2C, D). 以上より, 内因性 p53 活性化および p53 過剰発現により MEF タンパク質および mRNA 発現量が減少することから, p53 は MEF の転写を負に制御することが確認された.

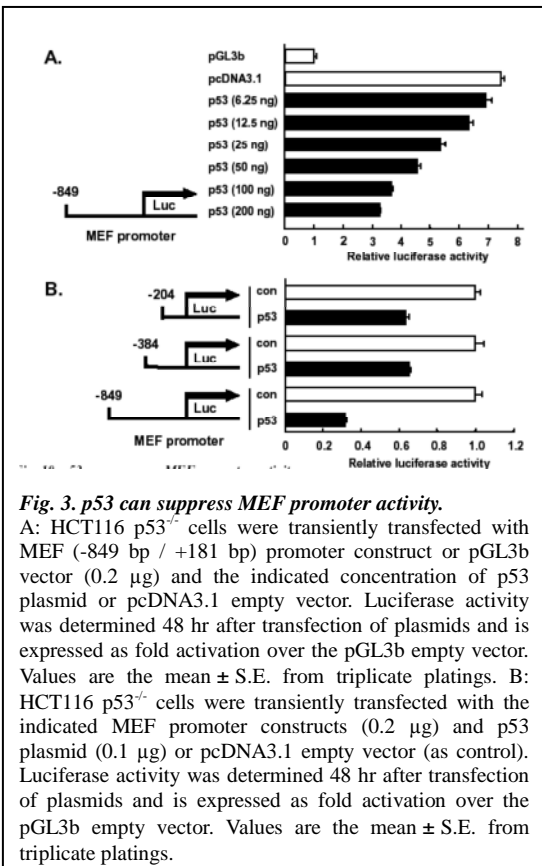


**Fig. 2. p53 activation and p53 overexpression suppresses MEF expression.**

(A) HCT116 p53<sup>+/+</sup> and p53<sup>-/-</sup> cells were untreated or treated with 5-FU (400 μM) for 24 hr. The nuclear extracts were isolated and expression of MEF and p53 were examined by Western blotting. Tubulin was used as internal control. (B) HCT116 p53<sup>+/+</sup> and p53<sup>-/-</sup> cells were untreated or treated with 5-FU (100, 200, 400 μM) for 24 hr. mRNA expression of MEF and p53 target gene, p21, were examined by semi-quantitative RT-PCR. (C) HCT116 p53<sup>+/+</sup> and p53<sup>-/-</sup> cells were transfected with 2.0 μg control pcDNA3.1 empty vector or p53 plasmid. Forty-eight hr post-transfection, nuclear extracts were isolated and immunoblotting was performed to determine MEF and p53 protein expression. (D) mRNA expressions of MEF and p21 mRNA were examined by semi-quantitative RT-PCR in HCT116 p53<sup>-/-</sup> cells transiently transfected with 1.0 μg p53 plasmid or pcDNA3.1.

(3) MEF プロモーター活性に対する p53 の影響

(2)までの結果より, p53 は MEF mRNA 発現を抑制することが示されたことから, 次に MEF プロモーター活性に対する p53 の影響を, MEF プロモーターコンストラクト (pGL3b/MEFp(-849 bp)) を用いて Luciferase assay により検討した. その結果, p53 の用量依存的に MEF プロモーター活性が抑制されることが示された (Fig. 3A). 更に, p53 による MEF プロモーター活性抑制に重要な領域を同定するために, 異なる長さの MEF プロモーターを含む MEF プロモーターコンストラクト (pGL3b/MEFp(-849, -384, -204 bp)) を用いて Luciferase assay により検討した. その結果, 全ての長さの MEF プロモーターにおいて, p53 による MEF プロモーター活性の抑制が確認された (Fig. 3B). 最も長さの短い -204 bp の MEF プロモーター領域の活性も抑制された. 以上より, 少なくとも p53 は -204 bp の MEF プロモーター領域に作用し, MEF の転写活性を負に制御することによって MEF 発現量を抑制することが示唆された.



**Fig. 3. p53 can suppress MEF promoter activity.**

A: HCT116 p53<sup>-/-</sup> cells were transiently transfected with MEF (-849 bp / +181 bp) promoter construct or pGL3b vector (0.2 μg) and the indicated concentration of p53 plasmid or pcDNA3.1 empty vector. Luciferase activity was determined 48 hr after transfection of plasmids and is expressed as fold activation over the pGL3b empty vector. Values are the mean ± S.E. from triplicate platings. B: HCT116 p53<sup>-/-</sup> cells were transiently transfected with the indicated MEF promoter constructs (0.2 μg) and p53 plasmid (0.1 μg) or pcDNA3.1 empty vector (as control). Luciferase activity was determined 48 hr after transfection of plasmids and is expressed as fold activation over the pGL3b empty vector. Values are the mean ± S.E. from triplicate platings.

(4) MEF の発現を制御する新規転写活性化因子 E2F1 の同定

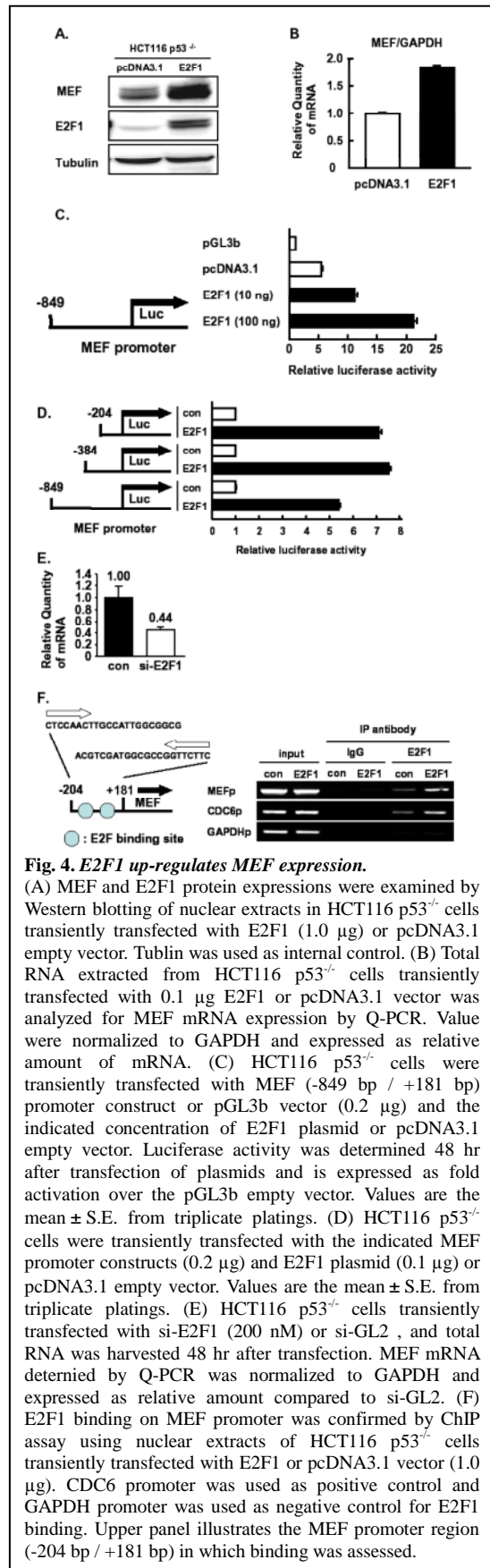
MEF promoter 配列を確認したところ、p53 による MEF 転写抑制機構に、転写因子 E2F1 の関与が推測された。そこで本項では、MEF 発現量に対する E2F1 の影響を検討した。はじめに、E2F1 の過剰発現による MEF 発現量に対する影響を Western blotting および Q-PCR により検討した。その結果、MEF タンパク質および mRNA 発現量が増加することが示された (Fig. 4A, B)。次に、MEF プロモーター活性に対する E2F1 の影響を Luciferase assay により検討した。その結果、E2F1 は -849 bp の MEF プロモーター活性に対して用量依存的にそのプロモーター活性を増加させた (Fig. 4C)。更に、異なる 3 種類の長さの MEF プロモーター活性に対しても、その全てのプロモーター活性を増加させることが示された (Fig. 4D)。従って、E2F1 は、MEF の転写活性化を誘導し、その発現量を増大させる転写活性化因子であることが明らかになった。更に、ChIP assay により、実際に E2F1 が MEF プロモーターに結合していること (Fig. 4F)、si-E2F1 による E2F1 ノックダウンにより MEF mRNA 発現量が減少すること (Fig. 4E) が示されたことから、E2F1 を MEF の新規転写活性化因子として同定した。

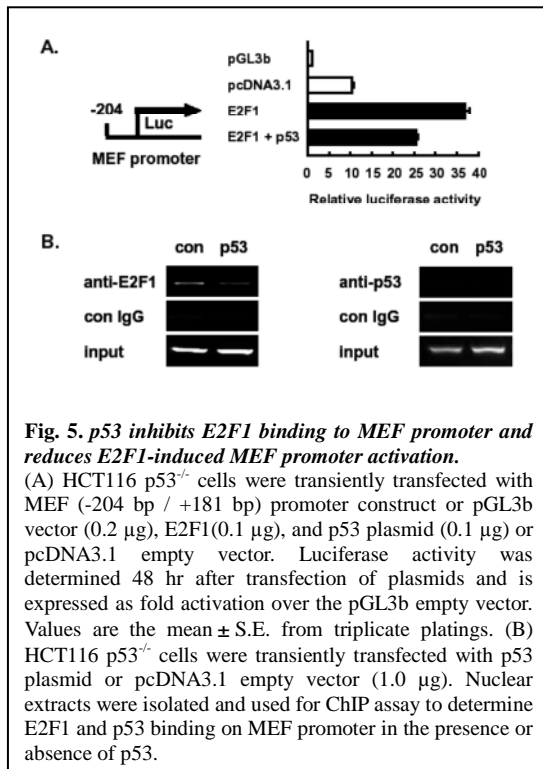
(5) p53 による E2F1 依存的転写活性化抑制機構

(4) より、MEF の転写因子として新たに E2F1 を同定した。そこで本項では、これまで確認されている p53 による MEF の転写抑制は、転写活性化因子 E2F1 依存的転写活性の抑制に起因しているか否か検証した。MEF プロモーター活性に対する E2F1 と p53 の影響を確認した結果、E2F1 により誘導された MEF プロモーター活性を p53 が抑制することが示された (Fig. 5A)。更に、ChIP assay を用いて、E2F1 の MEF プロモーターへの結合に対する p53 の影響を検討した。その結果、p53 過剰発現により E2F1 の MEF プロモーターへの結合が抑制された (Fig. 5B)。また、p53 の MEF プロモーターへの結合を確認した結果、in silico 解析からの予測通り、p53 の MEF プロモーターへの結合は見られなかった。

以上より、p53 は、E2F1 の MEF プロモーターに対する結合を抑制することにより、MEF の転写活性を抑制することが示唆され

た。





これまでのMEFに関する研究は、血球系、上皮系細胞における機能解析、すなわち、MEFがターゲットとする遺伝子群をどのように調節するかに着目した解析が中心であった。本研究の特色は、MEFそれ自身が、どのように発現調節を受けているのかという点に着目した点にある。MEFは、自然免疫の最前線に位置する上皮細胞においては、Lysozymeやbeta-defensinなどの抗菌ペプチドやGM-CSFなどのサイトカインの産生を促し、NK細胞においては、傷害活性因子perforinの発現を促進する。したがって、MEFの発現制御機構に着目した研究は、免疫制御の観点からも重要である。また、本研究の独創的な点は、癌抑制遺伝子であるp53が自然免疫のキーレギュレーターであるMEF遺伝子の発現を制御していることを明らかにする点である。これまで本申請者が明らかにしたように、MEF遺伝子の発現制御には、転写因子SP1が重要であるが(Koga T, Suico MA et al. *FEBS Lett.*, 2005), SP1は生体内のさまざまな組織で恒常的に発現する転写因子であり、遺伝子発現制御における特異性を発揮するには、何らかの協調因子が必要である。p53の有無でMEFの発現量が変化するという基礎検討の結果を考慮すると、MEFの制御に重要なSP1活性をp53が制御している可能性は高い。しかしながら、一般に知られるp53の標的遺伝子は、DNA修復、細胞周期停止、アポトーシス促進、血管新生抑制、老化・加齢、エネルギー代謝調節などに関するも

のが多く免疫系への寄与を明らかにする報告は極めて少ない。したがって、本研究の成果は、p53の新規機能を提唱するものであり、p53と自然免疫応答に関する新たな研究領域を切り開くものであると思われる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計15件)

- Miyata M, Sato T, Mizuguchi M, Nakamura T, Ikemizu S, Nabeshima Y, Susuki S, Suwa Y, Morioka H, Ando Y, Suico MA, Shuto T, Koga T, Yamagata Y, and Kai H. Role of the glutamic acid 54 residue in transthyretin stability and thyroxine binding. *Biochemistry* 49: 114-23 (2010). [査読有]
- Manabu Taura, R. Fukuda, Mary Ann Suico, Ayaka Eguma, Tomoaki Koga, Tsuyoshi Shuto, Takashi Sato, Saori Koga Morino and Hirofumi Kai, TLR3 induction by anticancer drugs potentiates poly I:C-induced tumor cell apoptosis. *Cancer Sci.* in press (2010) [査読有]
- Mariko Oba, Mary Ann Suico, Saori Morino, Shuichiro Yano, Takashi Matsuno, Tomoaki Koga, Takashi Sato, Tsuyoshi Shuto, Hirofumi Kai, Modified Mild Heat Shock Modality Attenuates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *J. Surg. Res.* in press (2010) [査読有]
- Susuki S, Sato T, Miyata M, Momohara M, Suico MA, Shuto T, Ando Y, Kai H. The endoplasmic reticulum-associated degradation of transthyretin variants is negatively regulated by BiP in mammalian cells. *J Biol Chem.* 284: 8312-8321 (2009) [査読有]
- Takuya Sugahara, Tomoaki Koga, Keiko Ueno-Shuto, Tsuyoshi Shuto, Eriko Watanabe, Maekawa A., Kitamura K., Tomita K., Ai Mizuno, Takashi Sato, Mary Ann Suico, and Hirofumi Kai. Calreticulin positively regulates the expression and function of epithelial sodium channel. *Exp. Cell Res.* 315: 3294-300 (2009) [査読有]
- Hirofumi Kai, Mary Ann Suico, Saori Morino, Tatsuya Kondo, Mariko Oba, Mikiko Noguchi, Tsuyoshi Shuto, Eiichi Araki, A novel combination of mild electrical stimulation and hyperthermia: general concepts and applications (review). *Int. J. Hyperthermia* 25, 655-660 (2009) [査読有]
- Mary Ann Suico, Atsushi Tanaka, Tsuyoshi Shuto, Hirofumi Kai, The expression of antimicrobial peptide

- lysozyme is increased by treatment with silver nanoparticle (Atomyball S®) in mammalian epithelial cells *J. Health Sci.* 55, 456-462 (2009) [査読有]
8. Yasuaki Hashimoto, Tsukasa Okiyoneda, Kazutsune Harada, Keiko Ueno, Takuya Sugahara, Atsushi Yamashita, Tsuyoshi Shuto, Mary Ann Suico, and Hirofumi Kai. Phosphatidic acid metabolism regulate the intracellular trafficking and retrotranslocation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochem. Biochim. Acta* (Mol. Cell Res.) 1783, 153-162 (2008) [査読有]
  9. Susuki S., Ando Y., Sato T., Nishiyama M., Miyata M., Suico MA., Shuto T., Kai H., Multi-elemental analysis of serum and amyloid fibrils in familial amyloid polyneuropathy patients. *Amyloid* (The Journal of Protein Folding Disorders) 15: 108-116, (2008) [査読有]
  10. Oba M., Yano S., Shuto T., Suico M.A., Eguma A., and Kai H. Interferon-gamma down-regulated Hsp27 and enhances hyperthermia-induced tumor cell death in vitro and tumor suppression in vivo. *Int. J. Oncol.* 32:1317-1324(2008) [査読有]
  11. Okiyoneda T., Niibori A., Harada K., Kohno T., Michalak M., Duszyk M., Wada I., Ikawa M., Shuto T., Suico M.A., Kai H. Role of calnexin in the ER quality control and productive folding of CFTR; differential effect of calnexin knockout on wild-type and DF508 CFTR. *Biochem. Biochim. Acta* (Mol. Cell Res.) 1783: 1585-94 (2008) [査読有]
  12. Takashi Furuta, Tsuyoshi Shuto, Shogo Shimasaki, Yuko Ohira, Mary Ann Suico, Dieter C Gruenert and Hirofumi Kai. DNA demethylation-dependent enhancement of toll-like receptor-2 gene expression in cystic fibrosis epithelial cells involves SP1-activated transcription. *BMC Mol Biol.* 9: 39, (2008) [査読有]
  13. Manabu Taura, Ayaka Eguma, Mary Ann Suico, Tsuyoshi Shuto, Tomoaki Koga, Kensei Komatsu, Takefumi Komune, Takashi Sato, Hideyuki Saya, Jian-Dong Li and Hirofumi Kai, p53 regulates TLR3 expression and function in human epithelial cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 28: 6557-67 (2008) [査読有]
  14. Saori Morino, Mary Ann Suico, Tatsuya Kondo, Erika Sekimoto, Shuichiro Yano, Tomoko Matsuda, Takashi Matsuno, Tsuyoshi Shuto, Eiichi Araki, and Hirofumi Kai. Mild Electrical Stimulation Increases Ubiquitinated Proteins and Hsp72 in A549 Cells via Attenuation of Proteasomal Degredation. *J Pharmacol Sci.* 108,222-226 (2008) [査読有]
  15. Saori Morino, Tatsuya Kondo, Kazunari Sasaki, Hironori Adachi, Mary Ann Suico, Erika Sekimoto, Tomoko Matsuda, Tsuyoshi Shuto, Eiichi Araki, and Hirofumi Kai. Mild Electrical Stimulation with heat shock ameliorates insulin resistance via enhanced insulin signaling. Increases Ubiquitinated Proteins and Hsp72 in A549 Cells via Attenuation of Proteasomal Degradation. *PLoS ONE* 3(12):e4068 (2008) [査読有]
- [学会発表](計1件)
1. A. Eguma: p53 Regulates TLR3 Expression and Function in Human Epithelial Cell Lines, The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting (2008.12.13-7) Moscone Convention Center, San Francisco, USA
- [その他]  
ホームページ <http://www.molmed730.org/>
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
スイコ・メリー・アン・ソテン (SUICO MARY ANN SOTEN)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号: 20363525