

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590082

研究課題名(和文)がん抑制遺伝子によるETS転写制御因子MEFの発現制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of expression of ETS transcription factor Myeloid elf-1-like factor (MEF) by tumor suppressors

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(薬)・助教

研究者番号：20363525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：Myeloid Elf-1 like factor (MEF) は、ETS 転写因子の1つであり、細胞増殖、分化、免疫など、様々な生命現象を司る興味深い分子である。本研究では、MEFの発現制御機構の全容解明を究極の目的とし、種々の検討を行った。その結果、がん抑制遺伝子p53が、E3リガーゼであるMDM2の発現レベルを転写依存的に亢進し、その結果として、MEFの発現量を減少させることが明らかになった。また、がん抑制遺伝子Rbは、MEFのタンパク質安定性向上を促進することを明らかにした。さらに、MEFの発現量は、低酸素時にHIF1 α を介して転写レベルで調節されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Myeloid elf-1-like factor (MEF) functions as transcriptional factor and plays critical roles in development, cellular differentiation, proliferation, transformation and immune responses. In the present study, we aim to determine the regulatory mechanisms of MEF expression by several cellular factors. First, we demonstrated that tumor suppressor p53 decreases the level of MEF protein through the induction of transcription of MDM2, an E3 ubiquitin ligase. Moreover, the findings also revealed that another tumor suppressor Rb increases the MEF protein level possibly by stabilizing its protein expression. Finally, our data further showed that hypoxia increases both the mRNA and protein levels of MEF through HIF1 α , the main effector molecule of hypoxia. On the whole, the findings revealed in these studies provide a better understanding of how the transcriptional regulator MEF is influenced by tumor suppressors such as p53 and Rb, and by hypoxia-related protein HIF1 α .

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：転写因子 がん抑制遺伝子 MEF 低酸素 HIF1 ETS転写因子

1. 研究開始当初の背景

細胞増殖や細胞周期またアポトーシスをコントロールする分子の制御機構を理解することは、腫瘍形成を導く経路を理解する上で大変重要なステップである。E26 (ETS) 転写因子ファミリーは、細胞増殖や発生、分化、アポトーシスと様々な生命現象を司る重要な転写因子群である。また、いくつかの ETS 転写因子は、腫瘍形成に深く関与する。Myeloid Elf-1 like factor (MEF) は、ETS 転写因子の1つで、1996年に Nimer SD. らのグループによってクローニングされたが、本研究室では、気道における漿液細胞のマーカーである lysozyme の制御因子としてクローニングし (Kai H. et al., *J Biol Chem.* 1999), また、我々は、MEF の標的遺伝子の研究を継続的に行い、多くのことを明らかにしてきた (Suico MA, et al., *BBA*, 2002, Seki Y, Suico MA, et al. *Cancer Res*, 2002, Suico MA, et al. *J Biol Chem*, 2004, Lu Z, Kim KA, Suico MA, et al., *FEBS lett*, 2004, Suico MA, et al., *J Pharmacol Sci*, 2004, Suico MA, et al., *BBRC*, 2004, Koga T, Suico MA, et al., *FEBS lett*, 2005, Suico MA, et al., *BBRC*, 2006, Taura M, Suico MA, et al., *Nucleic Acids Res.*, 2010)。このような研究の背景より、MEF は、細胞増殖、分化、免疫、さらには腫瘍形成と、様々な生命現象を司る興味深い分子であることが明らかとなってきた。したがって、MEF 自身の制御機構を明らかにすることは、細胞生物学的な基礎知見を与えるのみならず、臨床的に重要な知見となり得る。

近年、MEF が ubiquitin E3 ligase である MDM2 の転写制御を介して、がん患者 50% 以上がその変異を持つことで知られるがん抑制遺伝子 p53 の発現を制御するということが報告された (Sashida G, et al., *Mol Cell Biol.* 2009)。そこで、我々は、これまでに培った転写制御研究を背景とし、種々の検討を行った。その結果、p53 が、転写因子 E2F1 への結合を介して、MEF の発現を転写レベルで制御することを世界に先駆けて明らかにした (Taura M, Suico MA, et al., *Nucl Acids Res.* 2010)。これは、MEF と p53 との間にフィードバック機構が存在することを示し、その2分子の重要なつながりを示唆している。しかしながら、がん抑制遺伝子 p53 による MEF の翻訳後発現制御機構の存在、および、がん抑制遺伝子 pRb による MEF の転写制御、翻訳後制御機構の存在についてはこれまで全く明らかでない。また、近年、MEF は、正常幹細胞において、SOX2 の発現を上昇させる働きを有することが明らかにされてきたことから、がん幹細胞においても重要な役割を担う可能性が高いが、その是非は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、MEF の発現制御機構の全容解明を究極の目的とし、がん抑制遺伝子 p53

による MEF の翻訳後発現制御機構の解明、がん抑制遺伝子 pRb による MEF の転写制御、翻訳後制御機構の解明を行う。さらに、がん幹細胞等における、癌抑制遺伝子間相互制御調節の一端を明らかにすることを目的とし、さらに、がん幹細胞に関連深い転写因子 HIF1 と MEF の相互調節機構に着眼し、研究を展開する。

3. 研究の方法

がん抑制遺伝子 p53 による MEF の翻訳後制御機構の解明

これまでの結果より、p53 は、MEF に転写レベルで影響するため、p53 の MEF タンパク質に対する直接的な効果を検討するために、本研究では、HCT116 p53+/+ と HCT116 p53-/- 細胞を用いた MEF 過剰発現系を用いてウェスタンブロットティングを行った。次に過剰発現系で得られたデータを p53 siRNA を用いたノックダウン系、また、p53 特異的活性化剤 nutlin-3 を用いて、HCT116 を含めた様々な細胞で検証した。さらに、p53 の MEF タンパク質に対する効果が、p53 の転写活性を介しているか明らかにするために、DNA 結合領域に変異のある p53 273H 変異体を用いて p53 の DNA 結合領域が必要であるか変異体過剰発現系を用いてウェスタンブロットティングを行った。さらに、p53 と MEF に直接的なタンパク質同士の結合があるか免疫沈降法を用いて調べた。次に、p53 による MEF の安定性低下がどのようなメカニズムで起きているか調べるため、ユビキチン・プロテアソームタンパク質分解系の阻害剤である MG132 を用いて、その影響をウェスタンブロットティングにより検討した。MEF は、ユビキチン E3 ligase である MDM2 により制御されるか否かを検討するため、p53 存在下、非存在下における MEF と MDM2 との結合を免疫沈降法により検討した。

がん抑制遺伝子 pRb による MEF の制御機構の解明

pRb が MEF の発現に影響を及ぼすか HCT116 p53+/+ 細胞に pRb 過剰発現を行い mRNA に対する影響を定量的 RT-PCR 法を用いて、タンパク質に対する影響をウェスタンブロットティングで検討した。その後、pRbsiRNA を用いたノックダウン系により mRNA、タンパク質レベルで検討を行った。さらに、p53 と MEF に直接的なタンパク質同士の結合があるか免疫沈降法を用いて調べた。

がん幹細胞に関連深い転写因子 HIF1 と MEF の相互調節機構

まず、低酸素刺激により MEF の発現量に変化するかどうかについてウェスタンブロッティ

ングにより検討した。次に HIF1 plasmid を用いた過剰発現系を用いて、HIF1 を介した反応であるかについて検証した。さらに、低酸素刺激誘導性の HIF1 を介した MEF の発現上昇は、promoter 活性の上昇に伴って引き起こされるか否かについて、Promoter assay 法、クロマチン免疫沈降法により検討した。

4. 研究成果

がん抑制遺伝子 p53 による MEF の翻訳後制御機構の解明

我々は、これまでの研究で、p53 が E2F1 を介して MEF の転写を負に制御することを明らかにしたが、p53 が MEF の翻訳後制御に関与するかは検討できていない。p53 は、他の転写因子と結合することで、その機能を制御することが知られているため、恒常的に核内に存在する MEF と結合してその機能制御に関わる可能性は十分にある。実際に予備検討を行った結果、p53 欠損細胞である大腸がん細胞 HCT116 p53^{-/-}細胞に MEF と p53 を過剰発現すると、MEF の安定性が下がり、DNA 結合サイト変異体を用いた検討から、p53 は MEF のタンパク質レベルでの安定性を下げること、そしてこの機能には、p53 の転写活性は必要でないことが示された。そこで、本研究では、がん抑制遺伝子 p53 の MEF に与える影響をタンパク質レベルで検証し、詳細なメカニズムを解明する。さらに、p53 活性化剤を処置した際の本制御系の関与を検証することとした。

まず、p53 陽性細胞に比べ、p53 欠損細胞における MEF の発現量は上昇していたことから、p53 は、MEF の蛋白質発現量を負に制御する因子であることが明らかになった。一方、p53 による MEF 蛋白質の発現抑制には、MEF 蛋白質の安定性の変化が関与していることが CHX チェイス実験で明らかになり、p53 は、MEF 蛋白質発現のみならずその機能をも抑制することを見いだした。また、p53 による MEF の発現抑制は、プロテアソーム阻害剤である MG-132 により阻害されたことから、p53 は、MEF 蛋白質のプロテアソーム分解を促進することが明らかになった。最後に、p53 が影響を与えるプロテアソーム分解制御因子である E3 リガーゼのスクリーニングを行い、p53 は、MDM2 の発現レベルを転写依存的に亢進し、その結果として、MEF の発現量を減少させるというユニークなメカニズムが存在することが明らかになった。

次に、MDM2 が MEF と相互作用するか否かについて免疫沈降法を用いて検討した。その結果、MEF はその N 末端配列によって MDM2 と相互作用することが明らかになった。次に MDM2 が MEF の局在に対して与える影響について検討したところ、MDM2 の過剰発現により、細胞質中の MEF の発現量が減少し、結果として、total MEF 発現量が減少すること

を見いだした。このとき、核内の MEF の発現量は MDM2 によって影響を受けないことから、MDM2 は、細胞質中にプールされた、または、核内から細胞質中に移行してきた MEF の発現を特異的に減少させることが明らかになった。最後に、MDM2 による MEF の発現低下における p53 依存性について、p53 正常およびロックアウト細胞を用いた検討を実施した。その結果、p53 ロックアウト細胞において MEF の発現量は上昇したことから、p53 は MEF の負の制御因子であることが改めて確認できた。(投稿準備中)

がん抑制遺伝子 pRb による MEF の転写制御、翻訳後制御機構の解明

これまでの研究により、MEF ががん抑制遺伝子 p53 によって E2F1 の抑制を介して制御されることが明らかになった。次に、p53 とともにがん抑制遺伝子として広く知られ、E2F1 の制御因子としても知られる pRb タンパク質に着目し、pRb が MEF の発現及びその機能制御に関与するか検討した。

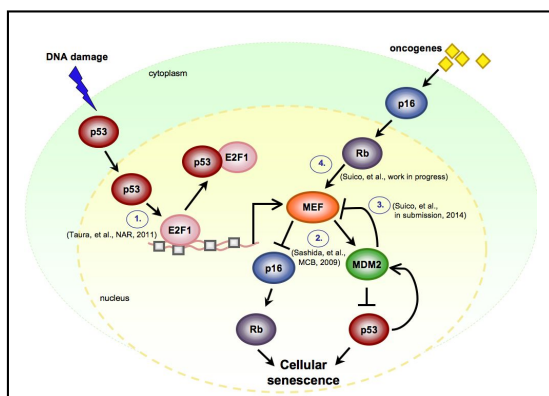
まず、Rb の過剰発現は、MEF の発現量を上昇させることを明らかにした。一方、si-Rb により Rb の発現量を減少させると、MEF の発現量は減少した。CHX chase の結果、Rb の過剰発現は、MEF のタンパク質安定性を上昇させることが明らかになった。しかし、興味深いことに、免疫沈降実験の結果より、Rb は MEF と直接的な相互作用をしていなかったことから、Rb は、何らかの因子を介して、MEF のタンパク質安定性向上に寄与することを明らかにした。

がん幹細胞に関連深い転写因子 HIF1 と MEF の相互調節機構

近年、申請者は、がん抑制遺伝子である p53 が E2F1 への結合を介して Myeloid elf-1 like factor (MEF) の発現を転写レベルで抑制することを見出した (Taura M, Suico MA, et al., *Nucl Acids Res.* 2011)。本研究では、MEF の発現制御機構の全容解明を究極の目的とし、近年、がん幹細胞における転写因子 Hypoxia inducible factor-1 (HIF1) および MEF の関与が示唆されていることに着目した。具体的には、HIF1 および MEF の両分子が相互に作用しているかについての検討を行った。その結果、低酸素刺激は、MEF 発現を mRNA レベル、タンパク質レベルで誘導することが明らかになった。次に、本作用が HIF1 を介した作用であるか否かを検討したところ、HIF1 遺伝子導入量依存的に、MEF の発現量は上昇した。このとき、低酸素刺激誘導性の HIF1 を介した MEF の発現上昇は、promoter 活性の上昇に伴って引き起こされることも明らかになり、実際、HIF1 は、MEF promoter 領域に結合していることを見いだした。

【総括】

研究 の成果より、ETS 転写因子 MEF が、種々の癌抑制遺伝子によって、制御されることを明らかにした。我々は、MEF 自身も癌抑制遺伝子であることを既に報告しており、本報告は、このような癌抑制遺伝子間での相互制御調節の一端を明らかにするものである。また、研究 の結果より、MEF の発現量は、低酸素時に HIF1 を介して転写レベルで調節されることがあきらかになり、今後は、本現象とがん幹細胞の機能維持がどのようにかわりあうのかについて検討していく必要がある。以下の図に、これまでの研究および本研究を通じて明らかにした事象を示す。



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2件)

1. Taura M*, Suico MA*, Koyama K, Komatsu K, Miyakita R, Matsumoto C, Kudo E, Kariya R, Goto H, Kitajima S, Takahashi C, Shuto T, Nakao M, Okada S, Kai H. Rb/E2F1 regulates the innate immune receptor Toll-like receptor 3 in epithelial cells. *Mol Cell Biol.* [査読有] 32, 1581-1590 (2012).(*equal contribution) doi: 10.1128/MCB.06454-11.
2. Taura M*, Suico MA*, Fukuda R, Koga T, Shuto T, Sato T, Morino-Koga S, Okada S, Kai H. MEF/ELF4 transactivation by E2F1 is inhibited by p53. *Nucleic Acids Res.* [査読有] 39, 76-88 (2011).(*equal contribution) doi: 10.1093/nar/gkq762.

〔学会発表〕(計7件)

1. Mary Ann SUICO; Functional interplay of p53 and TLR links immune response and cancer, 日本薬学会第134年会(2014.3.28-30), 熊本
2. K. Omachi: Specific pulse-width mild electrical stimulation induces p53 activation via p38 MAPK and ameliorates LPS-induced inflammatory cytokine response, 15th International congress of immunology

(2013.8.22-27), Milano, ITALY

3. Mary Ann SUICO; p53 regulates the Ets transcription factor MEF/Elf4 via MDM2, 第71回日本癌学会学術総会(2012.9.19-21), 北海道
4. Mary Ann SUICO; p53 regulates the Ets transcription factor MEF/Elf4 via MDM2, ASCB 2012 Annual Meeting (2012.12.15-19), San Francisco, USA
5. Mary Ann SUICO; Mef/Elf4 transactivation by E2F1 is inhibited by p53, 第70回日本癌学会学術総会(2011.10.3-5), 名古屋
6. K. Koyama; The tumor suppressor Retinoblastoma protein positively regulates innate immune receptor Toll-like receptor 3 in epithelial cells, 第34回日本分子生物学会年会(2011.12.13-16), 神奈川
7. R. Fukuda; Protective effects of p53 in a mouse model of progressive hereditary kidney disease Alport syndrome, ASCB 51st Annual Meeting (2011.12.3-7), Denver, USA

〔その他〕

ホームページ等

<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