

転写因子 E2F1 の新規相互作用因子 DDX5 の機能解析

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻 大谷研究室 芳田亮輔

転写因子 E2F は、細胞増殖とがん化抑制に中心的な役割を果たす転写因子である。休止期には、E2F の活性はがん抑制因子 pRB が結合することで抑制されている。細胞に増殖刺激が加わると、その程度に応じて pRB はリン酸化され E2F から遊離することで、E2F は生理的に活性化される。生理的に活性化された E2F は、Cdc6 などの増殖関連遺伝子の発現を誘導し、細胞増殖を促進する。一方で、pRB をコードする RB1 遺伝子の欠損や変異によって pRB の機能欠損が生じると、pRB の制御を外れて活性化された E2F は、ARF や TAp73 などのがん抑制遺伝子の発現を誘導し、がん化を抑制する。これら 2 つの異なる E2F 活性が細胞増殖とがん化抑制を仕分けしていると考えられるが、E2F による細胞増殖とがん化抑制に関わる標的遺伝子発現の仕分け機構の詳細は解明されていない。

8 つある E2F ファミリーメンバーのうちで、E2F1 ががん化抑制に最も重要な役割を担っている。先行研究において、E2F1 の DNA 結合領域および転写活性化領域以外の N 末端領域を欠失させた変異体 E2F1 において、ARF プロモーターの活性化能が著明に減少することが見出された。このことから、E2F1 は、N 末端領域を介して他の因子と相互作用してがん抑制遺伝子を効率的に活性化している可能性が考えられた。そこで、過剰発現させた E2F1 の免疫沈降における共沈と質量解析を用いて E2F1 の新規相互作用因子が探索され、その候補として DEAD box ファミリーに属する DEAD box 5 (DDX5) が同定された。DDX5 は RNA ヘリカーゼとして働くタンパク質として同定され、スプライシングにも関与することが報告されていた。さらに近年の研究より、p53 や核内受容体等の転写因子のコアクチベーターとして機能することが発見された。そこで、DDX5 が E2F1 に対してもコアクチベーターとして機能しているか否かを解析した。その結果、レポーターアッセイでは、ヒト正常線維芽細胞 HFF とがん細胞株 HeLa において、E2F1 による ARF および TAp73 プロモーターの活性化が DDX5 を過剰発現させると増強され、shRNA を用いて内在性 DDX5 をノックダウンすると抑制された。また qRT-PCR を用いて内在性遺伝子に対する影響を解析したところ、レポーターアッセイと同様の結果が得られた。DDX5 による E2F1 の転写活性化能の増強がタンパク質レベルおよび細胞レベルで影響があるか否かをウェスタンブロットティングと FACS を用いて解析した。その結果、DDX5 と E2F1 を共発現させると、E2F1 を単独で発現させたときに比べて、ARF タンパク質の発現およびアポトーシス誘導が増強された。以上のことより、DDX5 は転写因子 E2F1 のコアクチベーターとして働き、E2F1 の転写活性化能を増強することでがん化抑制に貢献している可能性が示唆された。