

井川特別研究室

Ikawa Laboratory

特別招聘研究員 井川 洋二
IKAWA, Yoji

当研究室では、p53 がん抑制遺伝子ファミリー (p53, p73, p51/p63) の一員である p51/p63 (以下 p63 と記す) の生理機能の解明を中心課題として研究を実施している。p63 は皮膚、四肢、顎顔面の組織形成に必須の遺伝子で、再生可能な上皮組織の基底細胞で特異的に発現しており、頭頸部扁平上皮がんなどにおいて高発現が検出されるが、p63 の発現や機能の分子機構には不明の点が多い。p63 タンパク質は細胞の核内で遺伝子発現を調節することにより細胞増殖や分化を制御していると考えられ、p63 遺伝子の組織特異的な発現機構、合成された各 p63 アイソフォームの安定性や活性の調節機構、標的となる遺伝子群などの解明が必要である。本年度は遺伝子発現に焦点を定めて実験を行い、p63 の 2 つのプロモーターのうち、 ΔN 型の発現誘導因子について新しい知見を得るとともに、p63 の標的遺伝子として新たに *MFGE8* を同定した。

1. p63 発現誘導機構の解析 (井川, 富盛)

ゼブラフィッシュでは BMP (Bone Morphogenic Protein) の刺激により細胞内 Smad4 が活性化を受けて p63 プロモーターに作用することが明らかになっているが、ヒトを含めて他の生物ではどのようなシグナル伝達や転写因子により p63 遺伝子が誘導や制御を受けているかについての解析は進んでいない。そこでヒト p63 遺伝子の TA 型および ΔN 型のプロモーター領域約 1.9 kbp を PCR 法により単離したところ、p53 や NF-Y, Myb, MyoD, SMAD などの結合可能配列の存在が明らかになった。これらの因子は、細胞のがん化や分化、体形成に関与する分子であり、これらの因子により p63 遺伝子が制御を受ける可能性が高いことから転写誘導機構を中心に分子生物学的な解析を行った。p63 の TA 型と ΔN 型を発現している咽頭由来の扁平上皮がん細胞 (FaDu) ヒト肝腫瘍細胞 HepG2 などを用いたルシフェラーゼ (Luc) レポーター・アッセイにより TA 型および ΔN 型のどちらの配列においても内在性の因子により転写活性化が確認できた。欠変異を作成し同様に解析を行うと TA 型のプロモーターでは、段階的に活性化が減少し、更なる解析を必要としたが、 ΔN 型のプロモーターでは、単離した約 1.9 kbp の配列のうち 1.9 から 1.6 kbp の配列が p63 転写誘導に重要であることが分かった。さらにこれらの配列には、SMAD 結合配列が存在していたことから、SMAD3, 4, 5 遺伝子を導入し、 ΔN 転写活性化を同様に検討したところ、SMAD3 を導入したもので高い発現誘導が見られた。また TA 型にプロモーターでは SMAD3, 4, 5 の導入による活性化は見られなかった。これらの結果から、p63 遺伝子の ΔN 型アイソフォームの転写誘導には SMAD3 が作用することが強く示唆されるとともに、TGF- β によるシグナル伝達が p63 遺伝子発現に関与する可能性が考えられる。

2. p63 の標的遺伝子の検索 (加藤, 奥山 *1, 渡辺 *2)

Milk fat globule EGF-factor 8 (MFGE8) は乳汁脂肪滴の主要タンパク質成分で、分泌型接着因子であるが、初期には乳がんマーカー lactadherin として同定され、最近の報告ではマウスで特異的に産生される MFG-E8 の L 型はマクロ

ファージがアポトーシス細胞を貪食する際の細胞間結合をもたらし重要な分子と考えられている。免疫組織染色を実施したところ、正常皮膚や皮膚がん組織における MFG-E8 の局在が p63 と重なっており、ヒト *MDGE8* 遺伝子のコード領域上流に複数の p53 および p63 結合可能配列の存在が確認されたことから、p63 による *MFGE8* 遺伝子発現の誘導についてさらに検討した。まず、テトラサイクリンによる発現誘導系で p63 を高レベル発現させると *MFGE8* の mRNA レベルが上昇した。次に *MFGE8* のプロモーター領域約 2 kbp をクローニングして塩基配列を確認後、Luc ベクターに連結し、p53, p63 アイソフォーム発現ベクターとともに各種細胞に導入してトランス活性化アッセイを実施した。また p63 応答配列決定のため、種々の欠損変異体や点変異体を作成し、p63 による転写誘導への影響を調べた。その結果、TAp63 γ が -370 に存在する p53 結合コンセンサス配列を、 ΔN p63 γ は -27 に存在する配列 (HS4/5) を主な標的として作用し、*MFGE8* 遺伝子の転写を誘導し得るという結果が得られた。さらに、クロマチン免疫沈澱法 (ChIP) によって、p63 タンパク質の HS2/3 配列を含む領域への結合が確認された。上皮細胞における MFG-E8 の機能は明らかではないが、当研究室においてインテグリン $\alpha 3$ や MFG-E8 といった接着因子が p63 によって誘導されていることが分かり、組織形成やがん細胞の増殖・転移における p63 の機能を考える上で興味深い。

3. p63 による細胞の機能制御 (井川, 加藤)

扁平上皮がんにおいて高頻度に見られる p63 高発現の医学的・生物学的意義に関する知見を得るため、p63 を抑制した場合の細胞形質の変化について検討した。p63 の高レベル発現を維持して増殖している咽頭由来の扁平上皮がん細胞株 FaDu に化学合成 small interfering RNA (siRNA) を一過性に導入するか、short hairpin RNA 発現ベクターを導入後薬剤耐性により選択するなどし、細胞の形態変化、増殖能、細胞外マトリクス (ECM) 上の移動能などについて検討した。p63 タンパク質の完全な抑制には至っていないが、細胞形態の変化、細胞間接触および移動能への抑制

的な効果が観察された。p63 が細胞-細胞, 細胞-ECM の相互作用の誘導に関与していることが示唆された。

*1 研修生, *2 共同研究員

The research in Ikawa Laboratory aims to understand functions of p63 (also termed p51), a member of the tumor suppressor p53 gene family, in skin, limb and craniofacial development. In fiscal year 2004, we obtained new insights about p63 in the three subjects as described below.

1. Transcriptional regulation of the p63 gene

Approximately 2 kbp sequences upstream of the TA and ΔN coding regions of p63 were cloned and tested whether their promoter activities were affected by SMAD3, -4 or -5 by reporter assays. Results showed that SMAD3 activates the ΔN promoter, but not the TA promoter, suggesting that the ΔN isoform transcription is controlled through the TGF- β signaling.

2. Determination of target genes of p63

MFGE8 encoding milk fat globule EGF-factor 8, a secretory adhesion protein, was newly identified as a gene trans-activated by p63 in epithelial cells. The most potent TA isoform (TAp63 γ) and its ΔN variant (ΔN p63 γ) seemed to use distinct *cis*-elements matching the p53-binding consensus sequences in the *MFGE8* promoter region.

3. Cellular biological functions controlled by p63

By transfection of small interfering RNA or short hairpin RNA expression vector, we suppressed the high-level p63 protein synthesis in a squamous carcinoma cell line. Preliminary results indicated that the level of p63 affects cell morphology, cell-cell and cell-basement attachment and migration.

Staff

Head

Dr. Yoji IKAWA

Members

Dr. Iyoko KATOH

Dr. Yoshiya TOMIMORI

Visiting Members

Dr. Tatsuya WATANABE (Kyoritsu Univ. Pharm.)

Trainees

Mr. Takeshi OKUYAMA (Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoritsu Univ. Pharm.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Katoh I., Tomimori Y., Ikawa Y., and Kurata S.: "Dimerization and processing of procaspase-9 by redox stress in mitochondria", *J. Biol. Chem.* **279**, 15515–15523 (2004).

*

Kurata S., Okuyama T., Osada M., Watanabe T., Tomimori Y., Sato S., Iwai A., Tsuji T., Ikawa Y., and Katoh I.: "p51/p63 controls subunit α_3 of the major epidermis integrin anchoring the stem cells to the niche", *J. Biol. Chem. (Web)* (<http://www.jbc.org/>) **279**, 50069–50077 (2004). *

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Tomimori Y. and Ikawa Y.: "Splenic erythroid cells induced by Friend virus polycythemic strain (FVp) show constitutive JAK1 activation to alter EPOR-STK/RON signaling for acute erythroid expansion", 16th Int. Workshop on Retroviral Pathogenesis, Montreal, Canada, Oct. (2004).

Tomimori Y. and Ikawa Y.: "Primary friend cells show constitutive JAK1 activation to alter EPOR-STK/RON signaling", Seminar at Department of Biochemistry, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA, Oct. (2004).

Tomimori Y. and Ikawa Y.: "Current interpretation of constitutive JAK1 activation in polycythemic Friend Virus (FVp) pathogenesis", 11th West Coast Retrovirus Meet. of the Cancer Research Institute, Palm Springs, USA, Oct. (2004).

Tomimori Y. and Ikawa Y.: "Primary friend cells show constitutive JAK1 activation to alter EPOR-STK/RON signaling", Seminar at Department of Developmental Biology, Institut Pasteur, Paris, France, Nov. (2004).

Watanabe T., Totsuka R., Miyatani S., Kurata S., Katoh I., Kobayashi S., and Ikawa Y.: "Expression of the long and short forms of MFG-E8 in mouse keratinocytes in development and carcinogenesis", AACR Special Conf. on Regulation of Cell Death in Oncogenesis, Waikoloa, USA, Jan. (2005).

Ikawa Y.: "Current understanding of Friend virus pathogenesis", Department of Biochemistry and Molecular Biology Seminar at The University of Georgia, Athens, USA, Feb. (2005).

Ikawa Y.: "Mouse hetero-crossing often narrows QTL to facilitate searching for the gene responsible for a common disease", 8th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conf., (Center for Biologics Evaluation and Research and others), Bethesda, USA, Feb. (2005).

Ikawa Y.: "Current understanding of Friend virus pathogenesis", Seminar at Georgia Institute of Technology, Atlanta, USA, Mar. (2005).

(国内会議)

奥山健, 加藤伊陽子, 富盛賀也, 井川洋二, 小林静子: "p51/p63 による細胞接着因子 MFG-E8 の発現誘導", 第 63 回 日本癌学会学術総会, 福岡, 9–10 月 (2004).

倉田俊一, 富盛賀也, 井川洋二, 吉田裕樹, 加藤伊陽子: “ミトコンドリア内カスパーゼ-9の活性化により開始される酸化ストレス応答アポトーシス”, 第63回日本癌学会学術総会, 福岡, 9-10月(2004).

加藤伊陽子, 奥山健, 富盛賀也, 井川洋二, 畑隆一郎, 倉田俊一: “扁平上皮癌細胞で発現されるp51/p63による細胞接着因子の誘導”, 第63回日本癌学会学術総会, 福岡, 9-10月(2004).

倉田俊一, 富盛賀也, 井川洋二, 吉田裕樹, 加藤伊陽子: “Activation of pre-existing procaspase-9 inside the mitochondria by oxidative stress: an apoptosis-inducing mechanism independent of Apaf-1”, 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月(2004).

学会大会, 横浜, 10月(2004).

井川洋二: “Friend ウイルス病原性の解析”, 大阪大学医学部セミナー, 吹田, 10月(2004).

井川洋二: “Friend 病発症の分子機構”, 筑波大学大学院人間総合科セミナー, つくば, 11月(2004).

今道慎也, 大場美奈子, 安西弘子, 井川洋二, 天沼宏, 渥美忠男: “ES細胞からのリンパ球系・骨髄球系共通前駆細胞株の樹立”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).

富盛賀也, 加藤伊陽子, 奥山健, 井川洋二: “p51/p63 遺伝子プロモーター領域の解析”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).