

シクロペンテノン型プロスタグランジンによるGADD45遺伝子発現誘導の解析

Studies on the induction of GADD45 gene expression by cyclopentenone prostaglandin

研究代表者 京都府立医科大学 公衆衛生学教室 助手 高橋 千絵

Research Associate, Dep. of Preventive Med., Kyoto Prefectural Univ. of Med.
Senye TAKAHASHI

The GADD45 gene, a growth arrest and DNA damage induced gene, is transcriptionally activated by cyclopentenone prostaglandin (cyPG). We have already reported that the activation of the GADD45 by cyPG occurs through the promoter region in a p53-independent manner. To investigate the precise region in response to cyPG, we performed mutation analyses of the human GADD45 promoter fused to the luciferase reporter gene. We found that the cyPG-responsive element was involved in the region of -81 base pairs 5'-flanking to the transcription start site. FACS analysis revealed that cyPG induces cell cycle arrest at G2/M phase. Taken together with the reports that GADD45 induces G2/M arrest, we suppose that cyPG activates the GADD45 promoter, which induces cell cycle arrest at G2/M phase.

1. 研究目的

ヒトの癌では癌抑制遺伝子であるp53の50%に変異があることが知られている。GADD45遺伝子はp53によって発現が制御され、細胞の増殖が抑制されたり、紫外線や γ 線等によりDNAが損傷を受けた時に強く発現誘導し、DNAの修復や細胞周期進行阻害に関与していることが知られている。一方、 Δ^{12} -prostaglandin J₂ (Δ^{12} -PGJ₂)やPGA₂等のシクロペンテノン型プロスタグランジン (cyPG) は強い細胞増殖抑制活性や抗腫瘍活性を持つことが知られている。これらのcyPGsによる増殖抑制は細胞周期進行を停止させることに始まるが、その機序についてはほとんど解明されていない。またこれらのcyPGsは細胞分化やストレス時における様々な遺伝子の発現を変化させることも知られている。しかしながら、これら遺伝子発現の変化と細胞増殖抑制の開始及び維持との関連は未だ明らかにされていない。

最近、当該研究室においては、 Δ^{12} -PGJ₂がp53を介さずにGADD45の発現を誘導することを見いだした。このことは、 Δ^{12} -PGJ₂による細胞増殖抑制やさらには抗腫瘍活性の経路を強く示唆するものであり、その詳細な解明は単に Δ^{12} -PGJ₂によるGADD45遺伝子発現誘導の機序の解明にとどまらず、抗腫瘍活性薬物の開発につながると考えている。

そこで、本研究では、cyPGによるGADD45遺伝子発現誘導のメカニズムを解明するべく、GADD45遺伝子のプロモーター上のcyPG反応部位の同定および細胞周期停止のメカニズムについて、検討した。

2. 研究経過

2-1. 方法

細胞増殖

HeLa細胞をまいて24時間後に紫外線をあて、時間経過後の生細胞数をTrypan-Blue testで計測した。

Northern Blot

HeLa細胞にcyPGを添加後、各濃度、各時間における全RNAを回収し、アガロースゲル電気泳動を行いフィルターにプロットした。³²Pラベルしたgadd45 cDNAをプローブにハイブリダイゼーションを行い、イメージングアナライザーで転写誘導を解析した。

プラスミドDNAの構築

約2.5kbのGADD45 promoter領域を含むluciferase plasmidを基に、適当な制限酵素を用いて各promoter-deletion mutantsを作製した。

Transfection及びLuciferase Assay

HeLa細胞をまいて24時間後、luciferase plasmidをリン酸カルシウム法で導入した。24時間後細胞にcyPGsを添加し、さらに24時間後、細胞溶解液を回収しluciferase活性を測定した。活性補正はタンパク量で行った。

FACS

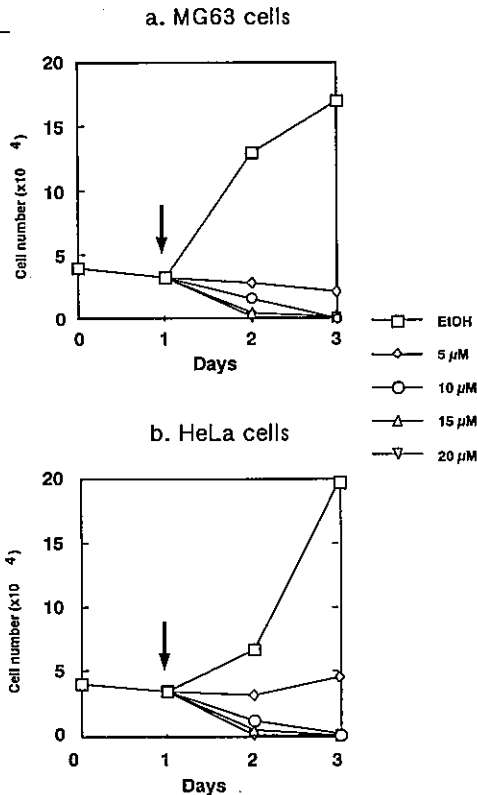
HeLa細胞をまいて24時間後、cyPGを添加し、0、12時間後に細胞を回収し、固定した。蛍光色素でラベル後、解析した。

2.-2. 結果

cyPGによる細胞増殖の抑制

cyPGによる細胞増殖抑制効果を見るために、まずはじめに、cyPGsの一つであり、生合成産物である、 Δ^{12} -PGJ₂を用いて細胞増殖抑制効果を調べた。図1に示すように、MG63細胞(a)及びHeLa細胞(b)に各濃度の Δ^{12} -PGJ₂を添加し、1日後、2日後の細胞数の増減を計測した。その結果、5 μ Mで細胞数の増加は見られず、10 μ Mでは細胞数の減少が認められた。さらに、15 μ M以上の濃度では1日後において既に顕著な減少が見られた。このことから、cyPGがMG63細胞、HeLa細胞において細胞増殖を抑制することを確認できた。

図1



cyPGによるGADD45の転写誘導

当該研究室においては既にcyPGがp53-independentにGADD45を転写レベルで誘導することを見いだしている。その転写誘導において、cyPGの濃度依存性、時間依存性について検討した。

p53が不活化しているHeLa細胞を用いて、各濃度の15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (=15d-PGJ₂, Δ^{12} -PGJ₂のさらなる生体内代謝産物)を添加し、24時間後のRNAを回収し、gadd45 cDNAをプローブとして、ノーザンブロットングを行った(図2-a)。

7.5 μ MでmRNAの顕著な誘導が観察された(約6倍)。10 μ Mでは8.7倍の誘導が見られた。また、時間依存性においては、10 μ Mの15d-PGJ₂を添加し、各時間でRNAを回収し、ノーザンブロットングを行った(図2-b)。その結果、添加後3時間から顕著な誘導が見られ、時間経過とともにその誘導が増強し、48時間後においても誘導は維持されていた。それに比べて、mock-transfectionではほとんど誘導が認められなかった(図2-b)。

これらの結果から、GADD45の転写がcyPGsの濃度依存的に、また、時間依存的に誘導されること、それらの誘導はp53を介さずなされていることが明らかとなった。

図2-a

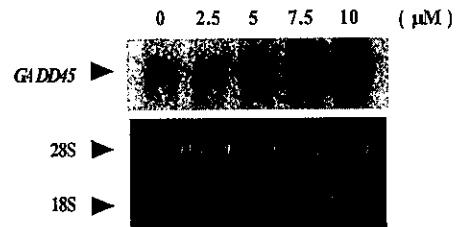
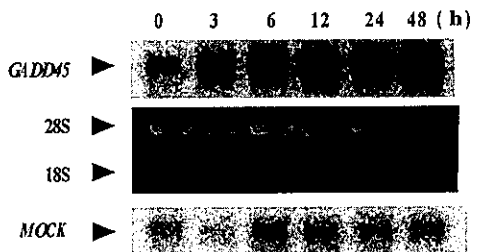


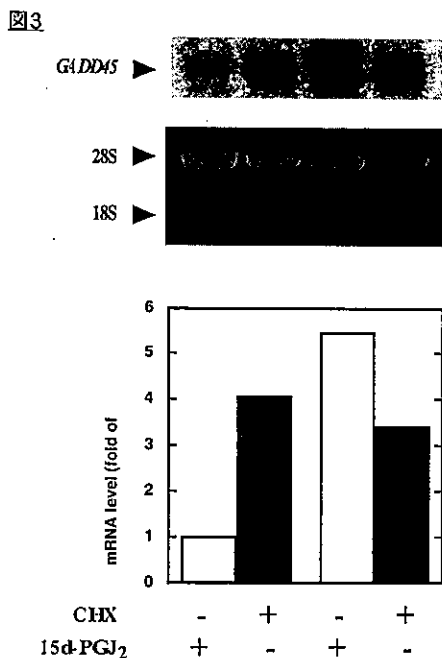
図2-b



cyPGによるGADD45の転写誘導におけるシクロヘキシミドの効果

cyPGによるGADD45の転写誘導に新たなタンパク質合成が必要かどうかを検討した。HeLa細胞に、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド(CHX)を添加し、30分後15d-PGJ₂を添加、さらに6時間インキュベートして、Northern Blotにより転写に与えるCHX添加効果を調べた。

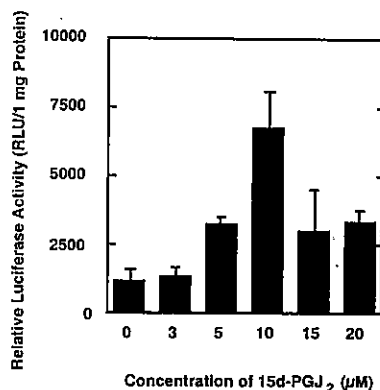
図3に示すように、CHXの添加だけでGADD45の転写が誘導された。15d-PGJ₂によるGADD45転写誘導はCHXにより抑制された。このことは、15d-PGJ₂によるGADD45転写誘導には新たなタンパク質の合成が必要である、即ち、新しく合成されたタンパク質が転写誘導に関与していることを示唆している。



cyPGによるp53非依存的なGADD45 promoterの活性化

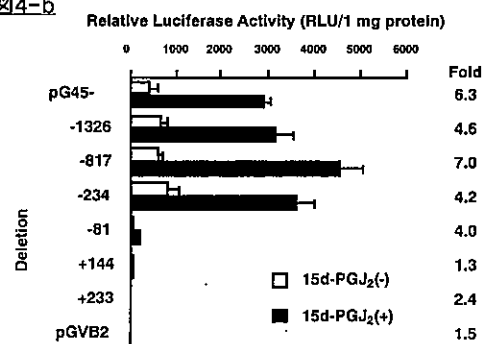
当研究室において既に、cyPGがp53非依存的にGADD45の転写を誘導し、その誘導はpromoterレベルで調節されていることを見いだしている。今回、より詳細にcyPGsに反応するpromoter領域の絞り込みを行った。まず、15d-PGJ₂のpromoter活性化の反応性を見るために、濃度依存的反応性の検討を行った。HeLa細胞にGADD45 promoter-luciferase plasmidを導入し、各濃度の15d-PGJ₂を添加、24時間後の細胞抽出液中のLuciferase活性を測定した。図4-aに示すように、5 μMの15d-PGJ₂より反応性が認められ、10 μMでは約6倍の反応性が見られた。それ以上の濃度では、むしろ反応性は低下した。

図4-a



次に、各種promoter-deletion mutantsを用いて、反応領域の絞り込みを試みた。図4-bに示すように、5'転写開始点より上流約-81bpまでの領域に反応部位があると考えられた。この領域には、我々が既に紫外線による反応部位として決定し論文に投稿中である、Oct-1配列が存在している。このOct-1配列は種を越えて保存している領域であり、クロマチン構造から考えても反応性に富んだ領域であると考えられていることから、cyPGによるGADD45の反応に関与している可能性も高いと考えて、現在、その真偽を検討中である。

図4-b



cyPGの細胞周期に与える効果

cyPGが細胞増殖を抑制することは確認したが、どのようなメカニズムで増殖を抑えるのか、細胞周期に与える効果を検討した。HeLa細胞に15d-PGJ₂を添加し、時間経過後の細胞周期をFACSで解析した。Table1及び図5のように、15d-PGJ₂は細胞をG2/M期で停止させることが判明した。このことは、GADD45が細胞をG2/M期で停止させることと一致している。このことから、15d-PGJ₂はGADD45を発現誘導し、そのことにより細胞がG2/M期で停止しているのではないかと推察された。

図5

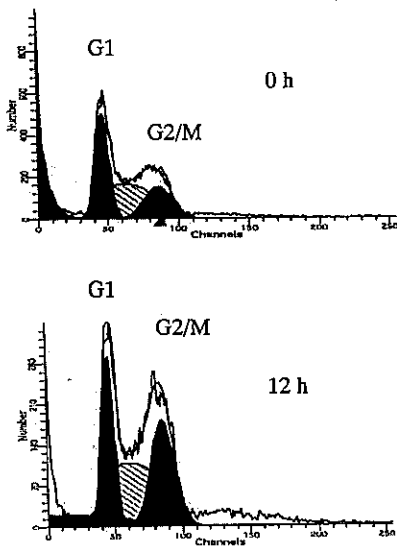


Table 1

	G0/G1(%)	G2/M(%)	S(%)
0 h	37.67	22.64	39.69
12 h	27.71	34.55	37.73

まとめ

cyPGはp53非依存的にGADD45遺伝子の発現を誘導すること、その転写誘導には新たなタンパク合成が必要であることを明らかにした。また、その誘導の作用機序として、GADD45遺伝子プロモーター上の転写開始点より上流-81bpまでの間に反応部位が存在することを明らかにした。cyPGの細胞増殖抑制のメカニズムとして、GADD45誘導による細胞周期のG2/M期での停止が示唆された。

3. 研究成果

cyPGsによるp53非依存的GADD45遺伝子発現誘導の作用機序として、プロモーター活性化による転写誘導であること、また、その反応領域を明らかにした。cyPGによりG2/M期での細胞周期が停止することを初めて明らかにし、細胞増殖抑制のメカニズムとして、GADD45発現誘導がG2/M期での停止を導くのではないかと推察された。

4. 今後の課題と発展

本研究では、cyPGに対するGADD45遺伝子反応領域をある程度絞り込んだが、決定的な反応部位、結合転写因子の同定には至らなかった。今後はこれらの同定を試み、更には詳細な作用機序（転写因子の修飾など）を明らかにする。そして、p53非存在下におけるGADD45の転写活性化をベースにした、薬物開発を目指したい。

5. 発表論文

1. Involvement of the Oct-1 Regulatory Element of the *gadd45* Promoter in the p53-independent Response to UV Irradiation. Takahashi, S., Saito, S., Ohtani, N. and Sakai, T. *in submitted*.