

7.癌抑制 microRNA 産生調節因子による癌化制御機構の解明

樋口琢磨¹⁾, 戸高寛¹⁾, 森澤啓子¹⁾, 小野正文²⁾, 西原利治²⁾, 玉置信行³⁾,
波多野悦郎³⁾, 竹崎由佳⁴⁾, 花崎和弘⁴⁾, 津田雅之⁵⁾, 坂本修士¹⁾, 谷口武利¹⁾

¹⁾高知大学 総合研究センター分子生物学教室, ²⁾医学部消化器内科学講座,

³⁾京都大学 医学部肝胆膵移植外科, ⁴⁾医学部外科学講座1, ⁵⁾総合研究センター動物資源開発分野

Nuclear Factor 90 (NF90) は転写や mRNA の安定化、microRNA の生合成に関与することが報告されている二本鎖 RNA 結合蛋白質である。我々のこれまでの研究から、肝細胞癌手術検体の癌部では隣接する非癌部と比較し、NF90 が mRNA 及び蛋白質の両レベルにおいて有意に高く発現していることが明らかとなった。また肝細胞癌細胞株において、NF90 を欠損させるとその増殖能が著しく阻害されることがわかった。さらに NF90 が産生制御する microRNA には、癌抑制機能が報告されている miR-7 等が含まれていることも判明している。これらの結果は、NF90 の発現増加により細胞の腫瘍化が促進されることを示唆している。そこで現在、肝細胞癌における NF90 の発現増加機構に着目し、その解明を試みている。

本研究では、肝細胞癌において NF90 が mRNA レベルで高く発現していることから、癌部では NF90 遺伝子の転写が活性化していると予測し、本遺伝子の転写制御機構の解析を行った。まず、肝細胞癌細胞株の Huh7 細胞を用いたリポーターアッセイを行い、NF90 遺伝子の転写調節領域を同定した。さらに、この領域内に存在する細胞周期調節因子 E2F の結合モチーフ配列に変異を導入したレポーターコンストラクトを作製し、変異導入前のもとの転写活性を比較した。その結果、変異を導入したレポーターコンストラクトでは有意な転写活性の減少が見られた。また Huh7 細胞の核蛋白質を用いてこの領域の配列をプローブとしたゲルシフトアッセイを行ったところ、特異的なバンドシフトを検出することができた。さらに E2F1 及び E2F2 の抗体を用いたスーパーシフトアッセイの結果、E2F1 抗体を用いた場合にはバンドの減少が見られ、E2F2 抗体を用いた場合にはバンドのスーパーシフトが見られた。そこで、siRNA を用いて E2F1、E2F2 のノックダウンを行い、これらの因子が内在性の NF90 の発現に影響するかを検証した。その結果、E2F1、E2F2 の両方を欠損させると mRNA レベルで内在性 NF90 の発現が減少することが明らかとなった。本研究の結果から E2F1、E2F2 が NF90 遺伝子の転写調節領域に結合し、本遺伝子の発現を協調しながら制御していると考えられた。