

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	病態制御科学領域 分子生体防御学教育研究分野 氏名 Engler Mate Janos
(論文題目) <b>JDP2 directly regulated by ATF4 and modulates TRAIL sensitivity by suppressing the ATF4-DR5 axis</b> (JDP2 は ATF4 によって直接制御され、ATF4-DR5 経路を抑制することにより TRAIL 感受性を調節する)	
(内容の要旨) <b>【目的】</b> Jun dimerization protein 2 (JDP2)は activator protein-1 (AP-1)ファミリーに属する bZip 型転写因子である。JDP2 は AP-1 抑制性因子として同定されたが、クロマチン制御因子として脂肪細胞や好中球の分化に働くことや、プロゲステロン受容体や Nrf2 のコファクターとして働くことも示されている。我々は以前、U373MG ヒトアストロサイトーマ細胞において ATF4 活性化により JDP2 が発現誘導されることを発見したが、そのメカニズムや ATF4 経路における JDP2 の役割については不明であった。そこで、ヒトがん細胞株をもちいて ATF4 による JDP2 の誘導機構や JDP2 の生理作用について検討をおこなった。 <b>【方法】</b> ヒトがん細胞株として U373MG、HeLa (ヒト子宮頸癌細胞株)、T98G (ヒトグリオーマ細胞株) を用いた。ATF4 の活性化はツニカマイシンあるいはタプシガルジン処理、またはロイシン飢餓でおこなった。JDP2 や ATF4 などの遺伝子発現は reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) により解析した。JDP2 および ATF4 ノックダウンは、それぞれに対する siRNA をトランスフェクションすることによりおこなった。レポーター解析はレポータープラスミドおよび発現プラスミド DNA の細胞への導入によりおこなった。TRAIL 処理後の細胞生存率の測定は CCK-8 キットを用いておこなった。 <b>【結果】</b> HeLa 細胞および U373MG 細胞をツニカマイシンやタプシガルジンで処理することにより JDP2 遺伝子発現が上昇することがわかった。また、siRNA による ATF4 ノックダウンにより、ツニカマイシンによる JDP2 遺伝子発現誘導が ATF4 に依存していることがわかった。ヒト JDP2 遺伝子からは異なった第一エクソンとプロモーターを持つ 4 つのスプライスバリエント (variant 1~4) が発現する。RT-PCR 解析により、variant 3 が ATF4 依存的に誘導されることがわかった。また、遺伝子解析により variant 3 の第一エクソン上流に ATF4 の認識配列 (amino acid response element, AARE) が存在し、哺乳動物種間で保存されていることがわかった。この領域を用いたレポーター解析により、この AARE が ATF4 依存的な JDP2 遺伝子プロモーターの活性化に必須であることも明らかとなった。 また、HeLa 細胞や U373MG 細胞において JDP2 siRNA を用いた JDP2 ノックダウン実験を行ったところ、ATF4 および、その標的遺伝子である ASNS や ATF3 などの発現が有意に上昇することがわかった。また、U373MG 細胞においてはロイシン飢餓による ASNS	

遺伝子発現誘導が JDP2 ノックダウンにより有意に上昇することや、ATF4 による *ASNS* 遺伝子プロモーターあるいは AARE レポーター遺伝子の活性化が、JDP2 の共発現により抑制されることも判明した。

一方、ATF4 はがん細胞にアポトーシスを引き起こす因子である TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) の受容体である Death Receptor 4 および Death Receptor 5 (DR4 および DR5) の遺伝子発現を増強することが知られている。HeLa 細胞において JDP2 をノックダウンすると *DR4*、*DR5* の遺伝子発現が上昇すること、ツニカマイシンによる *DR5* 遺伝子プロモーターの活性化が JDP2 の共発現により抑制されることが判明した。また、HeLa 細胞において JDP2 をノックダウンすると、TRAIL による細胞死誘導がコントロール細胞に比べ有意に増強されることが判明した。同様な現象は T98G でも観測された。

#### 【結論】

JDP2 遺伝子発現はそのプロモーター領域に存在する AARE を介して ATF4 依存的に誘導され、誘導された JDP2 は ATF4 依存的な遺伝子発現誘導の抑制に働くことから、JDP2 は ATF4 経路のネガティブフィードバック制御に関わることが示唆された。また、JDP2 はがん細胞において ATF4 の標的遺伝子の一つである *DR5* の遺伝子発現を抑制し、TRAIL 感受性を低下させることも示唆された。以上のことから、JDP2 ががん細胞において ATF4-DR5 経路を抑制し、TRAIL によるアポトーシスを抑制している可能性が示唆された。