

厚生労働科学研究費補助金

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

HIV-1 制御遺伝子を標的とした新規抗ウイルス剤開発

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 酒井 博幸

平成17（2005）年4月

目 次

| | |
|--|----|
| I. 総括研究報告書 | |
| HIV-1 制御遺伝子を標的とした新規抗ウイルス剤開発 | 1 |
| 酒井博幸 | |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. HIV-1 制御遺伝子による Wnt/ β カテニン経路制御の機能解析 | 7 |
| 土方誠 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 11 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 12 |

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
総括研究報告書

HIV-1 制御遺伝子を標的とした新規抗ウイルス剤開発

主任研究者 酒井 博幸 京都大学ウイルス研究所・助教授

研究要旨

本年度の研究では、Vpr の作用に関わる因子との相互作用に関して生化学的、および生物学的な解析を行った。その結果、Vpr の中央 30 アミノ酸程度の領域と hAXIN の C 末 100 アミノ酸程度の領域が相互作用していることが分かった。更にこの相互作用がこの領域のペプチド断片で阻害されることを見出した。また hAXIN の過剰発現により Vpr によるアポトーシス誘導と細胞周期停止機能が抑制されることが示された。Vpr と相互作用する因子として他に nucleophosmin M (NPM, 別名 B23) を同定している。NPM はリボソームの生合成、および centrosome (中心体) の複製などに機能している。Vpr の発現により、NPM は核膜周辺に蓄積し核仁への局在が弱まることが確認された。NPM の過剰発現により Vpr による細胞周期停止効果が減弱した。Nef による CD4 発現抑制のウイルス複製における意義を検討したところ、Nef の CD4 発現制御機能が欠失し重感染が成立すると、感染性ウイルスの産生が減少することが見出された。このことは Nef による重感染阻害はウイルスの増殖性を維持する上で重要な機能を果たしていることを示している。

酒井 博幸 京都大学ウイルス研究所・助教授
土方 誠 京都大学ウイルス研究所・助教授

同定することで、効果的な抗HIV活性を持つプロドラッグが開発されると期待できる。更に、この新規抗ウイルス剤を既存のHAART法に取り入れることで、より効果的にHIV-1の複製を抑えることが可能となる。

A. 研究目的

我が国においてHIV-1感染者数の増加は大きな社会的問題であり、啓蒙活動などによる感染拡散の防止とともに、エイズ発症を抑える治療法の開発が急務となっている。HIV-1に感染した場合の治療法としては現在のところHAART法が主流であるが、それでもなお薬剤耐性変異ウイルスの出現が確認されており、より効果的な治療法を考案する必要がある。そのためには新規の作用標的を持った薬剤を開発し、多面的にウイルスの複製を抑制することが重要である。

この研究課題では新規抗ウイルス剤の標的として、ウイルス固有の遺伝子でありエイズ発症に重要であることが多く報告されているVprとNefに着目している。これらの遺伝子機能を阻害する化合物を

HIV-1の制御遺伝子産物の中で、Vprは【ウイルスDNAの核移行】【細胞周期制御】【アポトーシス制御】など多彩な生物活性を持つことが知られている。またNefに関しても【シグナル伝達経路の改変】【CD4発現抑制】【ウイルス感染性増強】【アポトーシス制御】などの機能が報告されている。これらの制御遺伝子の機能は感染個体内でのエイズ発症に重要な機能を果たしている。このことは弱毒型生ワクチンの有力な候補として、Nefなどの制御遺伝子欠失HIV-1が有望視されていたことから明らかである。しかし、生ワクチンの実現には病原性復帰体の出現などのリスクが考えられ実用化には至っていない。そこで、HIV-1の制御遺伝子機能を標的とした新規抗ウイルス剤

の開発が期待される。生化学的な情報にもとづいてプロドラッグをデザインする手法は、今後現れると考えられる新興感染症への対応においても重要であると考えられる。

B. 研究方法

この研究課題においては新規抗エイズ薬開発に向けて、HIV-1 の制御遺伝子である Vpr と Nef の機能を標的とする。平成 16 年度は以下の方法で研究を進めた。

【Vpr】 Vpr と hAXIN の相互作用を介した Wnt/ β -catenine 経路の制御機構について生化学的な解析を加え、分子レベルでの研究の基盤を確立する。

(1) Vpr と hAXIN の結合に関わる、機能ドメインを同定する。これは機能阻害化合物をデザインあるいは選定する上での重要な情報を与えるものである。in vivo での結合実験としては、hAXIN を Vpr 結合因子として同定するのに用いた yeast two hybrid 法を利用した。in vitro での解析においては、GST 融合タンパクとして大腸菌で発現させた Vpr に対して、in vitro でタンパク合成した hAXIN の断片の結合性を調べる手法を用いた。

(2) Vpr による Wnt/ β -catenine 経路の活性化が細胞機能に影響することは十分に考えられる。その機能と Vpr に関して知られている既知の活性 (G2/M 細胞周期停止、アポトーシス誘導) との関連を調べる。Vpr による細胞周期停止活性とアポトーシス誘導活性を評価するには HeLa 細胞と CV1 細胞の 2 種類の細胞を用いた。hAXIN の発現ベクターは秋山徹博士 (東大) より分与していただいたものを利用した。hAXIN の発現を補うことによって Vpr の生物機能に影響があるかを FACS やアポトーシスの評価を行うことで検討した。

(3) 細胞内での局在性の評価を行う。Vpr はその N 末部分に FLAG エピトープタグを付加した。このタグ付加が Vpr の局在性や機知の生物機能に影響し

ないことは予め確認してある。hAXIN に関しては市販の抗 AXIN 抗体を利用した。ただしこの場合にバックグラウンドのシグナルが若干高いので、hAXIN の N 末領域に DsRed 標識を付加したのも併用した。局在性に関してはこの標識が影響しないことは確認した。

【Nef】 Nef による CD4 発現抑制のウイルス複製における意義を検討する。

Nef の発現が、細胞表面での CD4 発現の抑制に寄与することに関しては既に多くの報告があり、我々も Vpu と Nef の機能を解析し、Vpu に細胞内の CD4 発現を強く抑制する機能があり、Nef には細胞表面に発現している CD4 を特異的に減少させることを見いだしている。この細胞表面の CD4 発現低下は、HIV の重感染を抑制することがわかったが、そのウイルス複製への効果は不明であった。そこで、HIV-1 ウイルス複製実験を行い、CD4 の発現抑制とウイルス感染性の関連を検討した。重感染に対しては CD4 陽性の T 細胞株を用いて、以下のような手法を用いた。(1) 細胞にまずレトロウイルスベクターを用いて Nef を導入したものと、導入していないものを用意した。この各細胞に Nef 領域にオワンクラゲのルシフェラーゼ遺伝子を導入した HIV-1 を感染させた。この状態でウイルスの産生量と、産生されたウイルスの感染価を評価した。次に Env 領域にホタルのルシフェラーゼ遺伝子を導入したウイルスを感染させた。この重感染に用いたウイルスは Env を欠失しているので、先のウイルスに感染している細胞に重感染した場合のみに感染性ウイルスを産生する。重感染後に産生された各ウイルスの感染性をそれぞれに対応したルシフェラーゼ反応液で解析した。(2) 細胞に予め Env 領域にホタルのルシフェラーゼ遺伝子を導入したウイルスを感染させた。このウイルスは Nef に関して野生型のものの変異型を用意した。次に Nef 領域にオワンクラゲのルシフェラーゼ遺伝子を導入した tat 欠損ウイルスを感染させた。最初に感染させたウイ

ルスか重感染が成立しない限り Env が欠失しているために感染性を有しない。また後で感染したウイルスは Tat が欠損しており、先に感染しているウイルスから Tat が trans に補われない限り感染性粒子を産生しない。得られたウイルスを CD4 陽性の細胞に感染させ、ホタルルシフェラーゼとオワンクラゲルシフェラーゼを別に評価して、重感染のウイルス感染性への影響を調べた。

(倫理面への配慮)

この研究課題では個体間の遺伝情報や資質の差などを対象としておらず、人権擁護上の問題となる状況は生じない。また動物実験や感染者を対象とした解析も行わないために、倫理面においても研究遂行上、問題はないと考えている。ウイルスの感染標的として、プライマリーの T 細胞やマクロファージを用いることもあるが、これらは京都府赤十字血液センターにおける献血のパフィーコートから回収する。この材料に関しては適切な契約に基づき採取し、個人情報などの機密は確保されている。今年度の研究ではヒト由来のプライマリー細胞は利用していない。

ただし、HIV-1 という病原ウイルスを扱うことから、年度毎に大学の「病原体取り扱い規定」に基づいた審査を受け、研究者の安全性の確保と同時に、第三者に対しても研究の安全性を示すことが出来るように努めている。

C. 研究成果

【Vpr の機能を標的とした研究】

[1] hAXIN との相互作用

平成 16 年度の研究では、特に Vpr の機能に関する解析を進めることが出来た。Vpr にはウイルスのプレインテグレーション複合体 (PIC) の核移行、細胞周期の G2/M 期での停止、更に apoptosis 誘導など、多くの生物機能が報告されており、更にエイズ発症にも重要であることが知られている。既に我々は Vpr が hAXIN

と結合することを見出している。hAXIN は Wnt/ β カテニン経路の制御に関わる因子で、種々の遺伝子発現を介して細胞の分化や活性化を調節している。

今年度はまず、Vpr-hAXIN 相互作用のインターフェーズを同定した。Vpr においては中央の 30 アミノ酸程度の領域が必要であり、hAXIN に関しては C 末の 100 アミノ酸程度の領域が関与していることが分かった。更にこの相互作用がこの領域のペプチド断片で阻害されることを見出した。

Vpr の示す生物機能の中で、特に細胞周期調節と apoptosis 誘導に関して、hAXIN の関与を検討した。Vpr の発現は、多くの細胞で強い G2/M 期細胞周期停止と apoptosis 誘導を起こすが、hAXIN の過剰発現によりそれらの機能が一部阻害されることが示された。Vpr の示す効果と、リポーター実験で検討した β カテニンの活性化状態に相関が認められ、Vpr が Wnt/ β カテニン経路を制御して生物機能の一部を発現している可能性が示された。

先の阻害活性のあるペプチドでも、hAXIN の過剰発現と同様の効果が得られたことから、Vpr-hAXIN の相互作用を阻害する分子が、抗エイズ薬の重要な候補と期待される。

[2] NPM との相互作用

Vpr と相互作用する因子として、nucleophosmin M (NPM, 別名 B23) を同定している (未発表データ)。NPM は核仁に局在しており、リボソームの生合成に関与している。また、NPM は centrosome (中心体) の複製にも機能しており、広く細胞の代謝や複製において重要な働きを示すと考えられている。Vpr の発現により、NPM は核膜周辺に蓄積し核仁への局在が弱まることが確認された。この時、NPM の過剰発現を行うと核仁への局在性が復元され、同時に Vpr による G2/M 期細胞周期停止効果が減弱した。RNAi による NPM の発現抑制は、G2/M 期細胞周期停止を誘導することが報告さ

れており、Vpr の生物機能に NPM との相互作用が関与している可能性が示された。

更に NPM は centrosome の複製を制御しており、NPM の機能異常は染色体の aneuploidy (異数性) を亢進することが報告されている。Vpr の発現でも apoptosis を逃れた CV1 細胞などで aneuploidy が確認されることから (未発表データ)、Vpr-NPM 相互作用は細胞の代謝のみでなく、染色体分配にも関与していると考えられた。正常細胞では aneuploidy は apoptosis などにより除去されることを考えると、Vpr による apoptosis 促進に染色体分配異常が関わっている可能性も示唆された。

以上、Vpr-NPM 相互作用に関しては更に継続して解析し、その相互作用が抗エイズ薬の標的として期待出来るものかどうかを検討したい。

【Nef の機能を標的とした研究】

Nef の研究については以前我々のグループで、Nef による細胞表面の CD4 発現抑制が、ウイルスの感染性維持と重感染阻害の効果を示すことを報告している。この重感染の阻害が HIV-1 の複製や感染性にどのように寄与しているかを検討した。

予め選択マーカーを持つ HIV-1 を感染させておき、そこに種々の変異 HIV-1 を重感染させて、マーカーを持つ HIV-1 の産生や感染性を評価したところ、先に感染したウイルスが nef 欠損型の場合、重感染の効率が 3 倍程度増加することが分かった。また重感染が成立すると感染性ウイルスの産生が減少することが見出された。このことはウイルスによる重感染阻害機能はウイルスの活発な増殖性を維持する上で重要な役割を果たしていることを示している。しかし、特に HIV-1 では重感染による組換えウイルスの出現が多く報告されており、稀に起こる重感染が HIV-1 の生存に有利に働くことが示唆されている。細胞の種類や状態によって Vpu や Nef が抑制されており、そこではウイルス産生よりも潜伏化や組換えウイ

ルス出現の可能性が亢進している可能性も考えられる。今後更に種々の細胞系を利用して、Nef と Vpu の機能を検討したい。

D. 考察

Vpr の機能に関しては、ここで取り上げた細胞周期の停止機能、およびアポトーシスの誘導の他に、ウイルスゲノム RNA から合成したウイルス DNA (これを含む DNA-タンパク複合体をプレインテグレーション複合体と呼ぶ) を細胞質から核内へ移行させる際にも機能することが知られている。細胞周期の停止に関しては、ウイルス遺伝子の発現が G2 期に活性化されるという報告や、細胞寿命の延長によるウイルス産生の持続、また最近ではウイルス初期感染性が高くなるという意義が報告されている。アポトーシスに関しては、感染細胞が死滅することはウイルス複製には有利ではないが、周辺の細胞に対して傷害を与え、エイズ発症に寄与している可能性がある。プレインテグレーション複合体の核内以降に関しては、特に静止期の T 細胞や単球細胞、分化したマクロファージへの感染に重要であると考えられる。しかしこれらの機能の中で、感染時のエイズ発症に重要なものがどれであるのかは分かっていない。今回 hAXIN と Vpr の相互作用が、Vpr による細胞周期制御やアポトーシス誘導に一部寄与していることが分かった。この相互作用を阻害するペプチドを発現させることで Vpr の機能が抑制されることから、HIV-1 感染系にこのペプチド発現系を導入して、その効果を見ることに興味を持たれる。hAXIN とその下流の Wnt/ β カテニン経路がどのように Vpr 機能に関与しているかは今後の研究課題である。

NPM は多くのウイルス性核タンパク質と相互作用することが知られている。またリボソームの代謝に関与しており、それを介して細胞の活動に機能していることが報告されている。細胞内局在の解析

から、Vpr は NPM と相互作用してその核内への移行を阻害し、核膜周辺に蓄積させることが分かった。これにより核内でのリボソーム代謝に異常を来し、細胞周期停止が誘導される可能性が考えられた。また NPM は centrosome の複製にも関与しており、Vpr との相互作用によってその本来の機能が阻害されることで、染色体の不安定性が更新し、それにより G2/M 期細胞周期停止、あるいはアポトーシスの誘導が引き起こされることも考えられる。実際に CV1 細胞で Vpr による染色体異常の亢進を確認しており、その分子機構の詳細を明らかにしたい。

Nef による CD4 発現抑制と、それによるウイルス重感染阻止機能がウイルスの複製に有利に働くことが示された。Nef による CD4 発現抑制がウイルス増殖に正の方向で寄与していることは、初代培養 T 細胞での感染実験からも示されている。このことは Nef が感染個体内で HIV-1 の複製効率、あるいはウイルス粒子あたりの感染性を高めることで、HIV-1 の感染持続に貢献している可能性を示している。Nef には CD4 の制御とは独立にウイルスの感染性を規定する機能があることが報告されている。今後はさらに Nef の機能の詳細を明らかにして、Nef の機能を阻害する分子の検索を行いたい。

E. 健康危険情報

当研究課題の遂行において、主任研究者・分担研究者から健康危険情報は得られていない。

F. 研究発表

1. 論文発表

Iwai, A., Marusawa, H., Matsuzawa, S., Fukushima, T., Hijikata, M., Reed, J.C., Shimotohno, K., and Chiba, T.: Siah-1L, a novel transcript variant belonging to the human Siah family of proteins, regulates β -catenin activity in a p53-dependent manner.

- Oncogene 23: 7593-7600 (2004)
- Koyanagi, M., Hijikata, M., Watashi, K., Masui, O., and Shimotohno, K.: Centrosomal P4.1-associated protein is a new member of transcriptional coactivators for nuclear factor- κ B. J. Biol. Chem. 280: 12430-12437 (2005)
- Murata, T., Ohshima, T., Yamaji, M., Hosaka, M., Miyanari, Y., Hijikata, M., and Shimotohno, K.: Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF- β . Virology 331: 407-417 (2005)
- Kodama, Y., Hijikata, M., Kageyama, R., Shimotohno, K., and Chiba, T.: The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. Gastroenterology 127: 1775-1786 (2004)
- Shimakami, T., Hijikata, M., Luo, H., Ma, Y.Y., Kaneko, S., Shimotohno, K., and Murakami, S.: Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. J. Virol. 78: 2738-2748 (2004)

2. 学会発表

- 上野孝治、佐々木健太、吉田智志、酒井博幸：HPV 制御遺伝子による上皮過形成誘導機構の解析。第 52 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2004。
- 佐々木健太、上野孝治、吉田智志、酒井博幸：ヒトパピローマウイルス制御遺伝子の TNF α シグナル経路への影響に関する解析。第 63 回日本癌学会総会、福岡、2004。
- 佐々木健太、吉田智志、上野孝治、酒井博幸：HPV 複製解析系の構築とその応用。第 52 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2004。
- 吉田智志、佐々木健太、上野孝治、酒井博幸：HPV 感染による多段階発が

んモデルの検証. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

HIV-1 制御遺伝子による Wnt/ β カテニン経路制御の機能解析

分担研究者 土方 誠 京都大学ウイルス研究所・助教授

研究要旨

Vpr は hAXIN と相互作用することが分かっており、その詳細な結合部位に関しても解析が進んでいる。この研究では Vpr-hAXIN の相互作用の生物学的な意義を検討した。hAXIN は Wnt シグナルの下流に存在し、 β カテニンのリン酸化過程に関わる足場タンパクである。本年度の研究では、 β カテニンリポーター解析を進め、Vpr 発現が hAXIN の足場機能を阻害し、 β カテニン経路の活性化に関与することが分かった。 β カテニンは細胞増殖や活性化、あるいは細胞のがん化に関与することがよく知られている。Vpr 発現によって感染 T 細胞やマクロファージの増殖性や分化機構を改変することで、HIV-1 複製に有利な細胞環境が形成される可能性が考えられた。さらに Vpr 発現による細胞内での hAXIN 局在も確認し、hAXIN が Vpr とともに特異的部位に移行して存在することが確認できた。

A. 研究目的

我が国において HIV-1 感染者数の増加は大きな社会的問題であり、啓蒙活動などによる感染拡散の防止とともに、エイズ発症を抑える治療法の開発が急務となっている。HIV-1 に感染した場合の治療法としては現在のところ HAART 法が主流であるが、それでもなお薬剤耐性変異ウイルスの出現が確認されており、より効果的な治療法を考案する必要がある。そのためには新規の作用標的を持った薬剤を開発し、多面的にウイルスの複製を抑制することが重要である。

この研究課題では新規抗ウイルス剤の標的として、ウイルス固有の遺伝子でありエイズ発症に重要であることが多く報告されている Vpr に着目している。HIV-1 の制御遺伝子産物の中で、Vpr は【ウイルス DNA の核移行】【細胞周期制御】【アポトーシス制御】など多彩な生物活性を持つことが知られている。これらの機能は感染個体内でのエイズ発症に重要な機能を果たしている。

Vpr の機能発現には細胞性タンパクとの相互作用が必須であると考えられるが、【ウイルス DNA の核移行】以外は関与す

る因子は明らかではない。我々のグループでは Vpr と相互作用するものとして hAXIN を同定している。hAXIN は Wnt/ β カテニン経路に関わる因子であることから、Vpr 発現がこの Wnt/ β カテニン経路を修飾することで、その生物機能を発現している可能性が考えられた。そこで Vpr による Wnt/ β カテニン経路の修飾・改変を生化学的に明らかにし、そのモデルに基づいて抗 HIV 剤の標的となりうる分子標的を探ることがこの研究の目的である。生化学的な情報にもとづいてプロドラッグをデザインする手法は、今後現れると考えられる新興感染症への対応においても重要であると考えられる。

B. 研究方法

この研究課題においては、HIV-1 の制御遺伝子である Vpr と hAXIN の相互作用を介した Wnt/ β -catenine 経路の制御機構について分子生物学的検討を行った。

(1) Vpr 発現による Wnt/ β カテニン経路への影響を解析した。用いた細胞は HeLa 細胞、CV1 細胞、HEK293 細胞、SW480 細胞、そして T 細胞株として Jurkat 細胞を利用した。遺伝子導入には

- transcriptional coactivators for nuclear factor- κ B. *J. Biol. Chem.* 280: 12430-12437 (2005)
- Murata, T., Ohshima, T., Yamaji, M., Hosaka, M., Miyanari, Y., Hijikata, M., and Shimotohno, K.: Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta. *Virology* 331: 407-417 (2005)
- Kodama, Y., Hijikata, M., Kageyama, R., Shimotohno, K., and Chiba, T.: The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology* 127: 1775-1786 (2004)
- Shimakami, T., Hijikata, M., Luo, H., Ma, Y.Y., Kaneko, S., Shimotohno, K., and Murakami, S.: Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J. Virol.* 78: 2738-2748 (2004)

なし
 2. 実用新案登録
 なし
 3. その他
 なし

2. 学会発表

- 渡士幸一、土方誠、下遠野邦忠：シクロスポリンによる HCV ゲノム複製抑制のしくみ。第 63 回日本癌学会総会，福岡，2004.
- 土方誠、高橋仁、下遠野邦忠：C 型肝炎ウイルスとインターフェロニンシグナル。第 63 回日本癌学会総会，福岡，2004.
- 土方誠、宮成悠介、下遠野邦忠：C 型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム複製単位 (レプリコン) を用いた HCV RNA 複製機構の解析。第 27 回日本分子生物学会年会，神戸，2004.
- 小柳三千代、土方誠、渡士幸一、増井修、下遠野邦忠：CPAP は NF- κ B の新規転写コアクチベーターである。第 27 回日本分子生物学会年会，神戸，2004.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

HIV-1 制御遺伝子による Wnt/ β カテニン経路制御の機能解析

分担研究者 土方 誠 京都大学ウイルス研究所・助教授

研究要旨

Vpr は hAXIN と相互作用することが分かっており、その詳細な結合部位に関しても解析が進んでいる。この研究では Vpr-hAXIN の相互作用の生物学的な意義を検討した。hAXIN は Wnt シグナルの下流に存在し、 β カテニンのリン酸化過程に関わる足場タンパクである。本年度の研究では、 β カテニンリポーター解析を進め、Vpr 発現が hAXIN の足場機能を阻害し、 β カテニン経路の活性化に関与することが分かった。 β カテニンは細胞増殖や活性化、あるいは細胞のがん化に関与することがよく知られている。Vpr 発現によって感染 T 細胞やマクロファージの増殖性や分化機構を改変することで、HIV-1 複製に有利な細胞環境が形成される可能性が考えられた。さらに Vpr 発現による細胞内での hAXIN 局在も確認し、hAXIN が Vpr とともに特異的部位に移行して存在することが確認できた。

A. 研究目的

我が国において HIV-1 感染者数の増加は大きな社会的問題であり、啓蒙活動などによる感染拡散の防止とともに、エイズ発症を抑える治療法の開発が急務となっている。HIV-1 に感染した場合の治療法としては現在のところ HAART 法が主流であるが、それでもなお薬剤耐性変異ウイルスの出現が確認されており、より効果的な治療法を考案する必要がある。そのためには新規の作用標的を持った薬剤を開発し、多面的にウイルスの複製を抑制することが重要である。

この研究課題では新規抗ウイルス剤の標的として、ウイルス固有の遺伝子でありエイズ発症に重要であることが多く報告されている Vpr に着目している。HIV-1 の制御遺伝子産物の中で、Vpr は【ウイルス DNA の核移行】【細胞周期制御】【アポトーシス制御】など多彩な生物活性を持つことが知られている。これらの機能は感染個体内でのエイズ発症に重要な機能を果たしている。

Vpr の機能発現には細胞性タンパクとの相互作用が必須であると考えられるが、【ウイルス DNA の核移行】以外は関与す

る因子は明らかではない。我々のグループでは Vpr と相互作用するものとして hAXIN を同定している。hAXIN は Wnt/ β カテニン経路に関わる因子であることから、Vpr 発現がこの Wnt/ β カテニン経路を修飾することで、その生物機能を発現している可能性が考えられた。そこで Vpr による Wnt/ β カテニン経路の修飾・改変を生化学的に明らかにし、そのモデルに基づいて抗 HIV 剤の標的となりうる分子標的を探ることがこの研究の目的である。生化学的な情報にもとづいてプロドラッグをデザインする手法は、今後現れると考えられる新興感染症への対応においても重要であると考えられる。

B. 研究方法

この研究課題においては、HIV-1 の制御遺伝子である Vpr と hAXIN の相互作用を介した Wnt/ β -catenine 経路の制御機構について分子生物学的検討を行った。

(1) Vpr 発現による Wnt/ β カテニン経路への影響を解析した。用いた細胞は HeLa 細胞、CV1 細胞、HEK293 細胞、SW480 細胞、そして T 細胞株として Jurkat 細胞を利用した。遺伝子導入には

常法のリン酸カルシウム法、リポフェクション法、またエレクトロポレーション法を改変した AMAXA 社の遺伝子導入装置を利用した。hAXIN1 発現プラスミドは東大の秋山徹博士から分与されたものを利用した。リポーターアッセイには Tcf/Lef1 の結合部位を持つルシフェラーゼリポータープラスミドを用いた。これにより、 β カテニンの活性化（核内への蓄積）が確認できる。 β カテニンの発現量変化は抗 β カテニン抗体を利用したウェスタンブロット法においても検討した。

(2) 細胞内での局在性の評価を行う。Vpr はその N 末部分に FLAG エピトープタグを付加した。このタグ付加が Vpr の局在性や機能の生物機能に影響しないことは予め確認した。hAXIN に関しては市販の抗 AXIN 抗体を利用した。この抗体に関してはバックグラウンドのシグナルが高いので、高発現した場合でないと hAXIN のシグナルの検出が困難であった。S/N 比をあげる目的で hAXIN の N 末端に DsRed 標識を付加したのも併用した。局在性に関してはこの標識が影響しないことは確認した。

(倫理面への配慮)

この研究課題では個体間の遺伝情報や資質の差などを対象としておらず、人権擁護上の問題となる状況は生じない。また動物実験や感染者を対象とした解析も行わないために、倫理面においても研究遂行上問題はない。ウイルスの感染標的として、プライマリーの T 細胞やマクロファージを用いることもあるが、これらは京都府赤十字血液センターにおける献血のバフィーコートから回収する。この材料に関しては適切な契約に基づき採取し、個人情報などの機密は確保されている。なお今年度の研究ではヒト由来のプライマリー細胞は利用せず、既に樹立され世界的に研究に利用されている細胞株を用いた。

C. 研究成果

[1] Vpr による Wnt/ β カテニン経路への影響

結腸がん由来の SW480 細胞では APC の変異によって細胞内の β カテニンが蓄積し、Wnt/ β カテニン経路が恒常的に活性化した状態にある。この細胞に Vpr を発現させた場合、レポーターアッセイではほとんど変化がなかった。hAXIN を導入するとレポーター遺伝子の発現が抑制され、hAXIN を介した β カテニンのリン酸化が促進され、 β カテニンが分解誘導されたと考えられた。hAXIN と Vpr を同時に発現させると、hAXIN による抑制効果が解除された。これは Vpr が hAXIN による Wnt/ β カテニン経路抑制機能を阻害した可能性を示している。

同様の実験を HeLa や HEK293 細胞で行ったところ、SW480 細胞ほど明確なレポーター遺伝子発現が認められなかった。これは結腸ガン細胞とは異なり、これらの細胞では Wnt/ β カテニン経路の活性化が引き起こされていないからと考えられた。hAXIN の過剰発現は弱いながらレポーター活性を低下させる。Vpr の単独発現はこの場合ほとんど影響しなかった。しかし hAXIN と Vpr を同時に発現させるとコントロールに比べ数倍高いレポーター遺伝子の発現が観察された。これは Wnt/ β カテニン経路に関わる因子の相対的な分子数比が適切な β カテニン制御に関与している可能性を示唆している。これらの細胞に対し、Wnt3a を含む培養液を添加するとレポーター活性が亢進する。この状態で hAXIN や Vpr を発現させると SW480 で観察されたのと同様の変化が認められた。

Jurkat 細胞でも同様の解析を行った。この場合は遺伝子導入効率が低く、Vpr や hAXIN の効果を定量的に評価することは困難であった。しかし、Jurkat を Wnt3a 処理した場合には、Vpr と hAXIN の発現は HeLa や HEK293 細胞と同様の効果を示した。このことから HIV-1 の標的である T 細胞においても Vpr は Wnt/ β カテニン経路を活性化する機能を持つ

と考えられた。

以上の効果を β カテニンのタンパク量を検討することで確認した。この評価は遺伝子導入効率が高いHeLaとCV1細胞においてのみ行った。しかしこの系ではレポーターアッセイの結果と核内 β カテニン量の間には明確な相関は認められなかった。Wnt3a処理では核内 β カテニン量は有意に増加することから、核内タンパクの分画法などには問題はないと考えられた。

[2] Vpr 発現による hAXIN の細胞内局在性の変化

Vpr は細胞核、特に核膜周辺に局在することが知られている。この局在性は細胞周期制御やアポトーシス誘導の機能とは相関しないことが報告されている。それに対して hAXIN は細胞質にスポット状に散在することが知られており、今回の解析でも同様の局在性が確認できた。HeLa 細胞で hAXIN と Vpr を同時に発現させると、hAXIN が核膜周辺に凝集塊として存在することが確認できた。Vpr は核膜部分にもあるが、やはり hAXIN と共局在することが観察された。このとき hAXIN による β カテニン制御は異常となっていることから、Vpr による hAXIN 局在性の改変は hAXIN 機能に影響を及ぼしていると考えられる。

タンパク量を調べると、Vpr の発現によって hAXIN は安定化することが認められた。また、Vpr に関しても核分画に存在する量が若干減る一方で、細胞質分画の Vpr 量は数倍程度増加することが認められた。Vpr と hAXIN が共局在している核膜周辺の凝集塊は、細胞内のタンパク分解系から逃れ、それぞれのタンパクが安定化している可能性が考えられた。

D. 考察

Vpr の機能に関しては、細胞周期の停止機能、およびアポトーシスの誘導の他に、プレインテグレーション複合体を細胞質から核内へ移行させる際にも機能することが知られている。細胞周期の停止

に関しては、ウイルス遺伝子の発現が G2 期に活性化されるという報告や、細胞寿命の延長によるウイルス産生の持続、また最近ではウイルス初期感染性が高くなるという意義が報告されている。アポトーシスに関しては、感染細胞が死滅することはウイルス複製には有利ではないが、周辺の細胞に対して傷害を与え、エイズ発症に寄与している可能性がある。プレインテグレーション複合体の核内以降に関しては、特に静止期の T 細胞や単球細胞、分化したマクロファージへの感染に重要であると考えられる。しかしこれらの機能の中で、感染時のエイズ発症に重要なものがどれであるのかは分かっていない。

今回の解析から、Vpr が hAXIN との相互作用を介して Wnt/ β カテニン経路を活性化する可能性が強く示唆された。Wnt/ β カテニン経路は T 細胞やマクロファージの分化状態や活性化に影響することから、この Vpr の機能は HIV-1 の遺伝子発現や複製を有利に行うための環境調整として機能している可能性がある。また一方で、Wnt 経路を介して細胞側が Vpr の機能、たとえばアポトーシス誘導などを抑制している可能性もある。これらの点に関しては、HIV-1 感染実験を通して検討するべき課題であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

Iwai, A., Marusawa, H., Matsuzawa, S., Fukushima, T., Hijikata, M., Reed, J.C., Shimotohno, K., and Chiba, T.: Siah-1L, a novel transcript variant belonging to the human Siah family of proteins, regulates β -catenin activity in a p53-dependent manner.

Oncogene 23: 7593-7600 (2004)

Koyanagi, M., Hijikata, M., Watashi, K., Masui, O., and Shimotohno, K.: Centrosomal P4.1-associated protein is a new member of

- | | |
|--|-----------------|
| transcriptional coactivators for nuclear factor- κ B. J. Biol. Chem. 280: 12430-12437 (2005) | なし |
| Murata, T., Ohshima, T., Yamaji, M., Hosaka, M., Miyanari, Y., Hijikata, M., and Shimotohno, K.: Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta. Virology 331: 407-417 (2005) | 2. 実用新案登録 なし |
| Kodama, Y., Hijikata, M., Kageyama, R., Shimotohno, K., and Chiba, T.: The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. Gastroenterology 127: 1775-1786 (2004) | 3. その他 なし |
| Shimakami, T., Hijikata, M., Luo, H., Ma, Y.Y., Kaneko, S., Shimotohno, K., and Murakami, S.: Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. J. Virol. 78: 2738-2748 (2004) | |

2. 学会発表

- 渡士幸一、土方誠、下遠野邦忠：シクロスポリンによる HCV ゲノム複製抑制のしくみ。第 63 回日本癌学会総会，福岡，2004.
- 土方誠、高橋仁、下遠野邦忠：C 型肝炎ウイルスとインターフェロンシグナル。第 63 回日本癌学会総会，福岡，2004.
- 土方誠、宮成悠介、下遠野邦忠：C 型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム複製単位 (レプリコン) を用いた HCV RNA 複製機構の解析。第 27 回日本分子生物学会年会，神戸，2004.
- 小柳三千代、土方誠、渡士幸一、増井修、下遠野邦忠：CPAP は NF- κ B の新規転写コアクチベーターである。第 27 回日本分子生物学会年会，神戸，2004.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--------|--|----------------|-----|-------------|------|
| 岩井明夫他 | Siah-1L, a novel transcript variant belonging to the human Siah family of proteins, regulates beta-catenin activity in a p53-dependent manner. | Oncogene | 23 | 7593-7600 | 2004 |
| 小柳三千代他 | Centrosomal P4.I-associated Protein Is a New Member of Transcriptional Coactivators for Nuclear Factor- κ B. | J. Biol. Chem. | 280 | 12430-12437 | 2005 |
| 村田貴之他 | Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF- β . | Virology | 331 | 407-417 | 2005 |
| 嶋上哲朗他 | Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. | J. Virol. | 78 | 2738-2748 | 2004 |

Siah-1L, a novel transcript variant belonging to the human Siah family of proteins, regulates β -catenin activity in a p53-dependent manner

Akio Iwai^{1,2}, Hiroyuki Marusawa¹, Shu-ichi Matsuzawa³, Toru Fukushima^{1,3}, Makoto Hijikata², John C Reed³, Kunitada Shimotohno^{*2} and Tsutomu Chiba¹

¹Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan; ²Laboratory of Human Tumor Viruses, Department of Viral Oncology, Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto, Japan; ³The Burnham Institute, La Jolla, CA 92037, USA

β -Catenin is a potent oncogenic protein whose cytoplasmic accumulation is a frequent event in cancer cells. The level of β -catenin is regulated by two mechanisms: the adenomatous polyposis coli/Axin/glycogen synthase kinase 3 β -dependent degradation pathway and the Siah-1/Siah interacting protein/Ebi-mediated degradation pathway. In this study, we have investigated the functional significance of p53-inducible human Siah-family protein expression in the regulation of β -catenin activity. We show here by reverse-transcriptase polymerase chain reaction that two mRNA transcripts, designated human Siah-1 and Siah-1L, are generated from the human Siah-1 locus. Interestingly, the expression of Siah-1L was upregulated by p53, whereas human Siah-1 expression was constant. Furthermore, introduction of exogenous Siah-1L protein downregulated β -catenin protein and promoted apoptosis induced by anticancer drugs in cancer cells that lack endogenous p53. Thus, Siah-1L represents a new member of the human Siah family that is induced in response to p53 and plays an important role in the regulation of β -catenin activity in tumor cells. These findings also suggest new strategies for restoring tumor suppressive pathways lost in cancer cells that have suffered p53 inactivation.

Oncogene (2004) 23, 7593–7600. doi:10.1038/sj.onc.1208016
Published online 23 August 2004

Keywords: β -catenin; Siah-1; Siah-1L; p53; hepatocellular carcinoma

Introduction

β -Catenin is a multifunctional cytoplasmic protein, which plays an important role in Wnt signalling pathway and in the maintenance of cell–cell adhesion (Provost and Rimm, 1999; Peifer and Polakis, 2000). It has been demonstrated that cellular β -catenin levels are

regulated by two different mechanisms. The first mechanism involves a phosphorylation-dependent pathway. The current model suggests that the Axin and adenomatous polyposis coli (APC) gene products serve as scaffolds to facilitate the phosphorylation of β -catenin by glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) (Yost *et al.*, 1996; Hart *et al.*, 1998). Phosphorylated β -catenin is targeted for ubiquitin-mediated degradation. The second mechanism is a phosphorylation-independent pathway, which is initiated by an increase in Siah-family protein expression. Siah-family proteins interact sequentially with Siah interacting protein (SIP), Skp1, and Ebi (Matsuzawa and Reed, 2001). Ebi binds directly to β -catenin and initiates a subsequent proteasome-mediated degradation (Matsuzawa and Reed, 2001).

The Siah-family proteins are the mammalian homologues of the *Drosophila* Sina protein. The Siah-family proteins bind ubiquitin-conjugating enzymes via an N-terminal RING domain and target other proteins for degradation (Hu *et al.*, 1997b). The human Siah-1 and Siah-2 genes encode Sina-like proteins (Hu *et al.*, 1997a). The human Siah-1 gene has two murine homologues, Siah-1a and Siah-1b (Della *et al.*, 1993). The murine Siah-1b was reported to be a direct transcriptional target of p53 (Fiucci *et al.*, 2004). Some studies have also suggested that human Siah-1 may act as a downstream effector of p53 (Hu *et al.*, 1997a; Matsuzawa *et al.*, 1998; Roperch *et al.*, 1999; Relaix *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2002). However, the mechanism by which p53 induces human Siah-1 gene is still unclear. Moreover, it is possible to hypothesize that findings in murine may be also found in human Siah-1 gene.

Although aberrant accumulation of β -catenin is a frequent event observed in various human cancers including colorectal, lung, and breast cancers, hepatocellular carcinoma (HCC), and hepatoblastoma (Chung, 2000; Lin *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001; Ueda M *et al.*, 2001; Inagawa *et al.*, 2002), mutation of APC, Axin, or β -catenin is not commonly found in several human cancers including HCC (de La Coste *et al.*, 1998). In fact, it has been reported that the β -catenin and Axin are mutated in only about 10 and 7% of HCC, respectively (Satoh *et al.*, 2000; Devereux *et al.*, 2001; Wong *et al.*,

*Correspondence: K Shimotohno, Department of Viral Oncology, Institute for Virus Research, Kyoto University, 53 Kawara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan;
E-mail: kshimoto@virus.kyoto-u.ac.jp
Received 8 April 2004; revised 24 June 2004; accepted 7 July 2004; published online 23 August 2004

2001). These results indicate that the cytoplasmic accumulation of β -catenin is not associated with mutations in β -catenin, Axin, or APC in 35–80% of HCCs. Moreover, aberrant accumulation of β -catenin protein without any evidence of dysfunction in the GSK3 β -mediated degradation pathway is not limited to HCCs (Chung, 2000; Lin *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001; Ueda M *et al.*, 2001; Inagawa *et al.*, 2002). Therefore, it is possible to hypothesize that dysfunction in the Siah-1-mediated degradation pathway may contribute to the accumulation of β -catenin in human cancers.

In this study, we have addressed the mechanism of β -catenin protein regulation in tumor cells by investigating the functional significance of p53-inducible Siah-family protein expression. We demonstrated here a novel Siah-1 variant that is involved in the regulation of β -catenin protein degradation in a p53-dependent manner. Our findings thus provide novel insights into the mechanism of β -catenin accumulation in cancers lacking functional p53.

Results

Siah-1L is upregulated in response to p53 and plays an important role in p53-mediated downregulation of β -catenin

The human Siah-1 gene maps to chromosome 16q12–13 (GeneBank accession number NP_010505.11) and consists of two exons and one long intron (~24 kb) (Figure 1a). Using an RNase protection assay, we have previously identified an alternative human Siah-1 mRNA variant that was induced by p53 (Matsuzawa *et al.*, 1998). This mRNA variant contains an additional in-frame ATG start codon (first ATG) upstream of the original ATG (second ATG) (Figure 1a). Indeed, reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using primers specific for human Siah-1 revealed two different transcripts in MCF7 cells, which have wild-type p53 gene (data not shown). The shorter transcript encoded the human Siah-1 mRNA, while

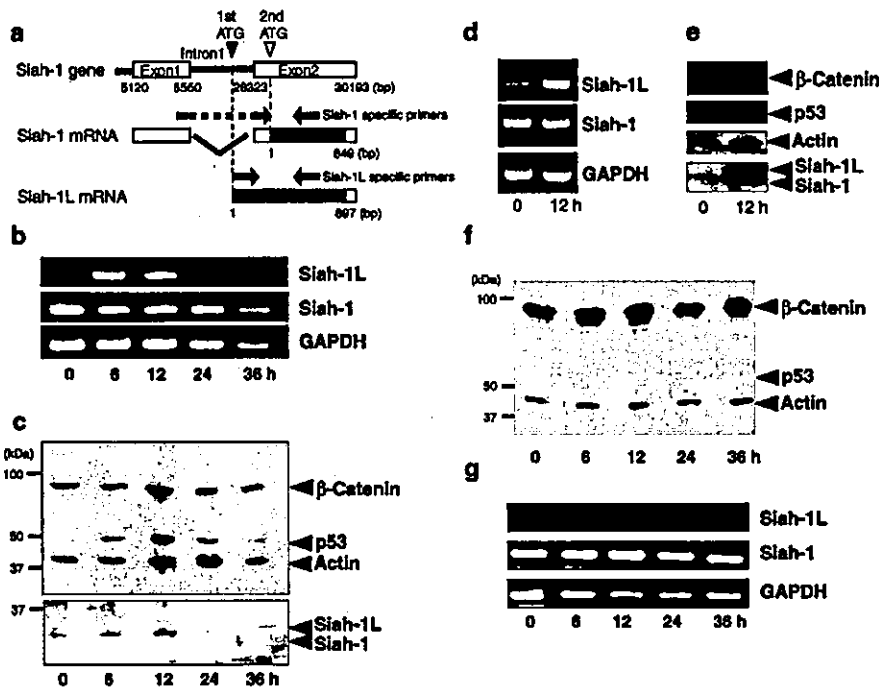


Figure 1 The expression of Siah-1L is induced by p53-mediated signalling. (a) Schematic presentation of the Siah-1L and Siah-1 genes. The Siah-1 gene is shown along with the mRNAs encoding Siah-1L and Siah-1. Splice sites and start and stop positions are shown as lower numbers at their respective genomic nucleotide positions. Ligation of exons 1 and 2 produces the Siah-1 mRNA, whereas inclusion of an extra 48 bp due to an early translation initiation from an ATG codon in the intron produces the Siah-1L mRNA, which encodes a 298-amino-acid protein. The binding sites of the primers used for RT-PCR are outlined. (b) MCF7 cells (p53 wild type) were treated with DOX (1.5 μ g/ml). Total RNA was isolated before (0 h) and 6, 12, 24, and 36 h after DOX treatment. RT-PCR was performed using 0.5 μ g of each RNA sample as a template and oligonucleotide primer sets specific for Siah-1L (upper panel), Siah-1 (middle panel), and GAPDH (lower panel). (c) Total protein was immediately isolated from MCF7 cells before (0 h) and 6, 12, 24, and 36 h after treatment with DOX (1.5 μ g/ml). A 5 μ g portion of each protein sample was electrophoresed, blotted, and reacted with antibodies to β -catenin, p53, Siah-1, or α -actin. (d) MCF7 cells were treated with UV irradiation (10 J/m²), and total RNA was isolated immediately before (0 h) and 12 h after UV treatment. RT-PCR was performed using specific primers for Siah-1L (upper panel), Siah-1 (middle panel), and GAPDH (lower panel). (e) MCF7 cells were irradiated at 10 J/m², and total protein was isolated before (0 h) and 12 h after irradiation. A 5 μ g portion of each protein sample was analysed by Western blots using anti- β -catenin, anti-p53, anti-Siah-1, or anti- α -actin antibodies. (f) Hep3B (p53-null) cells were harvested before (0 h) and 6, 12, 24, and 36 h after treatment with DOX (1.0 μ g/ml). Total protein was isolated and Western blot analyses were carried out using anti- β -catenin, anti-p53, or anti- α -actin. (g) Total RNA was sequentially isolated from Hep3B cells before (0 h) and after DOX treatment (6, 12, 24, and 36 h). RT-PCR was performed using 0.5 μ g of each RNA sample and specific primers for Siah-1L, Siah-1, and GAPDH

the longer transcript encoded a new variant containing 48 extra nucleotides at the 5' end (Figure 1a). We named the novel longer transcript Siah-1L. To clarify which Siah-1 transcript was actually induced by p53, we further investigated the expression of human Siah-1 transcripts in MCF7 cells after treatment with doxorubicin (DOX; Calbiochem, San Diego, CA, USA), which is known to induce p53 activation. As shown in Figure 1b, an endogenous 897-bp Siah-1L transcript was barely detectable in control cells; however, the expression of Siah-1L mRNA was strongly induced 6–12 h after DOX treatment (Figure 1b, upper panel). In contrast, the 849-bp Siah-1 mRNA remained unchanged (Figure 1b, middle panel). The increase in Siah-1L mRNA levels prompted us to examine whether the protein levels changed in response to DOX treatment. Next, we analysed the expression levels of p53, β -catenin, and Siah-1-family proteins. As shown in Figure 1c, p53 protein expression was strongly induced 6 h after treatment with DOX and the expression peaked at 12 h. The level of endogenous β -catenin protein started to decrease 24 h and showed a marked reduction 36 h after treatment. The expression of endogenous Siah-1-family proteins was low in control cells; however, Siah-1L but not Siah-1 was upregulated 12 h after DOX treatment (Figure 1c, lower panel).

To further investigate whether Siah-1L was induced in a p53-dependent manner, we examined the expression levels of Siah-family proteins and β -catenin in cells after UV irradiation. As shown in Figure 1d, the Siah-1L transcript increased 12 h after UV irradiation in MCF7 cells; in contrast, UV treatment did not trigger any changes in the level of Siah-1 transcript. Furthermore, Siah-1L protein expression was markedly increased in response to UV treatment, and the elevation of p53 protein and the degradation of β -catenin were also observed at the same time (Figure 1e).

Next, we investigated the expression levels of Siah-1L transcript in Hep3B cells, which have been reported to lack both copies of the p53 gene (Lee *et al.*, 2002). Expression of the p53 and β -catenin proteins was analysed by Western blots after DOX treatment. As expected, the p53 protein was undetectable in lysates derived from control cells and DOX-treated cells (Figure 1f). The expression of endogenous β -catenin protein did not change in the presence of DOX (Figure 1f). The Siah-1 transcript was detectable in control cells and was not changed when the cells were treated with DOX (Figure 1g, middle panel). In contrast, the Siah-1L mRNA was undetectable in the presence and absence of DOX (Figure 1g, upper panel). These findings further suggest that Siah-1L is upregulated in response to p53 activity.

To determine whether the induction of Siah-1L expression is specifically dependent on p53, MCF7 and Hep3B cells were transiently transfected with expression plasmids encoding wild-type or mutant p53, and Siah-1-family transcripts were analysed by RT-PCR. As shown in Figure 2a, increased amounts of Siah-1L mRNA were found in p53-expressing MCF7 cells, but not in control cells. Siah-1 mRNA remained unchanged in cells after

the overexpression of p53 protein. Mutant p53 did not upregulate the Siah-1L mRNA, and instead decreased its expression (Figure 2a). To explore the role of Siah-1L in the regulation of β -catenin activity, we analysed the expression of β -catenin protein in cells transfected with wild-type or mutant p53. Levels of β -catenin protein were significantly lower in p53-overexpressing cells compared with both control and p53-mutant-expressing cells (Figure 2b). Since loss of p53 function is a frequent event in various human cancer cells, we then tested whether Siah-1L could be induced by exogenous p53 in cells that lack functional p53. As shown in Figure 2c, Siah-1L mRNA was significantly upregulated in p53-expressing Hep3B cells, while Siah-1L transcript was undetectable in control and mutant p53-expressing cells. The expression levels of Siah-1 were unchanged in p53-expressing cells compared to control cells (Figure 2c). Notably, levels of β -catenin protein were markedly decreased in endogenous p53-deficient cells after transfection with the p53 expression plasmid (Figure 2d). Next, to clarify whether Siah-1L is responsible for the p53-mediated degradation of β -catenin, we employed the short interfering RNA (siRNA) approach and used an expression plasmid encoding Siah-1 lacking the RING finger domain (pcDNA3-FLAG-Siah-1 Δ RING), which is a dominant-negative form of Siah-1L. We showed the siRNA specific for Siah-1L (siSiah-1L) induced the reduction of the transfected Siah-1L, not Siah-1, in HEK293T cells (Figure 2e). In contrast, control siRNA (siCTR) did not show any effect of the protein levels of Siah-1L and Siah-1. Moreover, in the p53-transfected cells, siSiah-1L markedly reduced the expression level of endogenous Siah-1L, but not Siah-1 transcript (Figure 2f). To examine the protein levels of β -catenin in the Siah-1L knockdown cells, we performed Western blots. Transfection of siSiah-1L had almost rescued the p53-induced degradation of β -catenin (Figure 2g). However, this recovery of the β -catenin protein levels was not observed in siCTR-transfected cells. We also demonstrated that the protein levels of β -catenin were recovered in the cells cotransfected with expression plasmids encoding FLAG-Siah-1 Δ RING and p53 from the p53-dependent degradation (Figure 2h). Taken together, these findings suggest that p53 specifically enhances the expression of Siah-1L and is involved in the regulation of β -catenin protein degradation via the expression of Siah-1L.

Siah-1L suppresses Tcf/LEF transcriptional activity and enhances the degradation of β -catenin

To explore the functional significance of p53-inducible Siah-1L expression, we asked whether Siah-1L production affects β -catenin activity in cells. Since β -catenin forms a complex with a member of the T-cell factor (Tcf)/lymphocyte enhancer-binding factor (LEF) family and activated the target genes (Omer *et al.*, 1999), reporter assays were performed to monitor Tcf/LEF-dependent gene expression in the presence or absence of Siah-1L or Siah-1. We used pcDNA3-FLAG-Siah-1 Δ RING, which is a dominant-negative form of

Siah-1L, as a negative control. In addition, a reporter plasmid with a mutated Tcf-binding site was also used as a negative control for the reporter assay. As shown in Figure 3a, about a 40-fold augmentation of relative luciferase activity was found in cells transfected with an expression plasmid encoding β -catenin. When Siah-1L was produced in cells, the level of Tcf/LEF transcriptional activity induced by overexpression of β -catenin was markedly decreased compared with that in control cells (Figure 3a). In contrast, a plasmid encoding Siah-1 Δ RING did not decrease reporter activity, instead slightly upregulated the β -catenin activity. Transcription from the reporter plasmid containing the mutated Tcf/LEF-binding site was not affected by overexpression of β -catenin or Siah-1L protein. We also found that expressing Siah-1L in cells resulted in a dose-dependent reduction in the relative Tcf/LEF transcriptional activity induced by β -catenin (Figure 3b). In addition, a marked reduction in the levels of endogenous β -catenin protein was detectable in cells expressing Siah-1L compared to control or Siah-1 Δ RING-expressing cells (Figure 3c). These findings indicate that Siah-1L regulates Tcf/LEF activity and β -catenin protein levels in cells.

Figure 2 p53 specifically enhances the expression of Siah-1L and is involved in the regulation of β -catenin protein degradation via Siah-1L. MCF7 and Hep3B cells were transfected with pRC-CMV-p53 (wild type) (p53), pRC-CMV-p53 (Mut178) (Mut-p53), or empty vector (CTR). (a) Total RNA was prepared from MCF7 cells 24 h after transfection, and RT-PCR was performed using specific primers for Siah-1L (upper panel), Siah-1 (middle panel), and GAPDH (lower panel). (b) MCF7 cells were cotransfected with pPUR and expression plasmids encoding wild-type p53 (p53), p53 mutant (Mut-p53), or empty vector (CTR). After 24 h, puromycin (2.0 μ g/ml) was added to the medium and the cells were cultured continuously for 72 h. Cell lysates (5 μ g) were analysed by Western blots using anti- β -catenin (upper panel), anti-p53 (middle panel), or anti- α -actin (lower panel) antibodies. (c) The levels of Siah-1L (upper panel) and Siah-1 (middle panel) mRNAs in total RNA isolated from Hep3B cells transfected with plasmids encoding wild-type p53 or mutant p53 were determined by RT-PCR. (d) Expression plasmids encoding wild-type or mutant p53 and pPUR were cotransfected into Hep3B cells, and puromycin (2.0 μ g/ml) was added to the medium 24 h after transfection. After 72 h, total protein was isolated and analysed by Western blots using anti- β -catenin (upper panel) or anti-p53 (middle panel) antibodies. (e) HEK293T cells were transfected with the expression plasmids of FLAG-Siah-1L or -Siah-1 with or without siRNA for Siah-1L (siSiah-1L). Cells were cultured for 36 h in the presence of MG 132. Cell lysates were analysed by Western blots using anti-FLAG and anti- α -actin antibodies. siCTR represents a control siRNA. (f) Total RNA was isolated from HEK293T cells transfected with p53 expression plasmids with or without siRNA for Siah-1L (siSiah-1L). Control siRNA-transfected cells (siCTR) were used as a negative control. RT-PCR was performed using specific primers for Siah-1L (upper panel), Siah-1 (middle panel), or GAPDH (lower panel). (g) The siRNA for Siah-1L (siSiah-1L) or control siRNA (siCTR) was transfected in HEK293T cells. After 24 h, cells were transfected with the expression plasmids of Myc-tagged β -catenin (AAAA) with or without p53 expression plasmid and cultured for 36 h. Total protein was isolated from these cells and Western blots were performed using anti-Myc, anti-p53, and anti- α -actin. (h) Total protein was isolated from HEK293T cells transfected with Myc-tagged β -catenin (AAAA) and p53 expression plasmids with or without FLAG-tagged Siah-1 Δ RING expression plasmid. Cell lysates were analysed by Western blots with antibodies against Myc, p53, FLAG, and α -actin

Since a p53-activating stimulus was required for Siah-1L expression, we asked whether Siah-1L could reduce β -catenin activity in Hep3B cells that lack endogenous p53. As shown in Figure 3d, expression of β -catenin protein induced about a 20-fold in Tcf/LEF transcriptional activity. When an expression plasmid encoding Siah-1L was cotransfected, Tcf/LEF activity was reduced almost by half. Moreover, analysis of endogenous β -catenin levels demonstrated that exogenously expressed Siah-1L protein significantly reduced the amount of β -catenin (Figure 3e). Similar results were observed in H1299 cells, which lack p53 genes (data not shown). Thus, despite the deletion of the endogenous p53 genes, exogenous expression of Siah-1L resulted in the degradation of endogenous β -catenin protein, suggesting a role for Siah-1L as a negative regulator of β -catenin activity.

Mutant β -catenin found in some cancer cells is resistant to Siah-1L-induced protein degradation

Mutated β -catenin found in HepG2 cells is known to carry an activating mutation caused by the deletion of amino acids 25–140 (de La Coste *et al.*, 1998). This mutant β -catenin is known to be resistant to GSK3 β -mediated degradation, resulting in an aberrant accumulation of β -catenin (de La Coste *et al.*, 1998). To determine whether Siah-1-family proteins can regulate the activity of mutated β -catenin, we examined the effects of Siah-1L expression on mutant β -catenin protein in HepG2 cells, which have wild-type p53 gene.

