

学 位 論 文 題 名

UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73
without promoting p73 ubiquitination

(UFD2a による p73分解機構についての解析)

学位論文内容の要旨

p73 はがん抑制蛋白 p53 に対する初めてのホモログとして同定され、p53 と同様に p53 標的遺伝子群の発現調節を介して、がん細胞の細胞死や細胞周期の停止を誘導するが、腫瘍組織における変異は極めて稀である。また、p53 とは異なり p73 には p73 α や p73 β など、そのカルボキシル末端の構造に違いを持つ複数のスプライス変異体が存在する。p73 β は p73 α のカルボキシル末端領域を欠いた変異体の一つである。p73 α のカルボキシル末端領域には p73 β にはない SAM(sterile α motif) ドメインが存在し、このドメインは蛋白間相互作用に関与していると考えられているが、p73 におけるその機能は未だに不明である。

抗癌剤であるシスプラチン処理などに起因する DNA 損傷に応答して、非受容体型チロシンキナーゼ c-Abl による Tyr-99 のリン酸化を介して p73 が安定化しその細胞死誘導能が促進すること、ならびに PKC による p73 の Ser-289 のリン酸化が p73 の安定化に強く関与することが既に報告されている。また、プロテアソーム阻害剤によって、細胞内の p73 蛋白量が増加することから、p73 はユビキチン・プロテアソーム系の蛋白分解システムによる制御を受けていることが示唆されている。p53 のユビキチン化を介した分解を触媒する MDM2 は、p73 のアミノ末端に結合しその転写活性化能を阻害するが、同時にその安定性を増強する。従って p73 の安定性は E3 ユビキチンリガーゼ活性を持つ別の蛋白により制御されていると考えられる。一方、p73 は cyclin G との結合を介したユビキチン化非依存性の蛋白分解を受けているという報告もあるが、その詳細な分子機構については不明である。

U-box 型のユビキチンリガーゼである UFD2a はユビキチン鎖を伸張させる活性を持つ E4 ユビキチンリガーゼとして同定された。U-box の 3 次元構造は RING フィンガーのそれと類似しており、UFD2a は E3 としての活性をも持つことが示されている。最近、我々は UFD2a 遺伝子が神経芽細胞腫に対する癌抑制遺伝子が座位すると考えられる 1p36.2-p36.3 領域にマップされていることを報告した。しかし、神経芽細胞腫においては UFD2a 遺伝子の変異は稀であることが判明した。興味深いことに、細胞死を誘導する刺激に応答して UFD2a は caspase 6 あるいは granzyme B によって分解され、その活性が失われることが明らかにされた。従って、UFD2a は細胞死の制御に関与している可能性が指摘されている。

本研究では、UFD2a が p73 α との物理的な結合を介して、その分解を促進するとともに細胞死誘導能および転写活性化能を抑制することを明らかにした。UFD2a による p73 α の分解はプロテアソーム阻害剤により抑制されるが、ユビキチン化には影響を与えなかった。

UFD2a は E3/E4 であり、そのアミノ末端に活性調節ドメイン、およびカルボキシル末端に U-Box を持つ。UFD2a 蛋白の発現量を調べる目的で UFD2a に対する特異的な抗体を作成し、各種培養細胞を用いてウェスタン解析を行ったところ、UFD2a 領域にホモ欠失のある細胞以外のすべての細胞株で UFD2a 蛋白の発現が検出され、UFD2a 抗体の特異性も同

時に確認された。また、細胞を細胞質および細胞核に分画して行ったウェスタン解析では、UFD2a は核および細胞質で検出された。次に、我々は DNA 損傷に応答した UFD2a および p73 の発現解析を行った。SH-SY5Y 細胞は 24 時間のシスプラチン処理により濃度依存的に細胞死に陥る。この実験系を用いてウェスタン解析を行うと、以前の我々の報告にもあるように p73 はシスプラチン処理に応答して安定化しその蛋白量が増加する。一方、UFD2a は p73 とは異なりシスプラチン処理によりその蛋白量が減少することが判明した。また、同時に行った RTPCR による解析では *UFD2a* mRNA の発現量にはシスプラチン処理による変化は認められなかった。以上の実験結果より、DNA 損傷に伴う UFD2a の発現量の減少が p73 の蛋白としての安定性の制御に深く関与している可能性が示唆された。

UFD2a と p73 の細胞内での物理的結合の有無を調べる目的で免疫沈降法による解析を行った。その結果、細胞内で UFD2a と p73 α は安定な複合体を形成するが、p53 とは結合しないことが判明した。次に、UFD2a との結合に必須の領域を探索する目的で p73 の様々な人為的欠失変異体およびスプライス変異体である p73 β を用いた免疫沈降法による同様の解析を行ったところ、p73 α のみに存在する SAM ドメインを含む領域が両者の結合に必要不可欠であることが明らかになった。

次に、UFD2a が p73 α の安定性の制御に関与しているか否かを調べる目的でウェスタン法による解析を行った。その結果、UFD2a の過剰発現に伴って p73 α の蛋白量は顕著に減少した。しかしながら、UFD2a との結合能を持たない p53 および p73 β の蛋白量は、UFD2a の過剰発現による影響を受けなかった。また、UFD2a の過剰発現によってシスプラチンに応答した内在性 p73 α の発現誘導が抑制された。さらに、p73 α 蛋白の半減期を調べると、UFD2a との共発現によって顕著に短縮することが判明した。興味深いことに、UFD2a による p73 α の分解はプロテアソーム阻害剤処理によって抑制されるが、UFD2a は p73 α のユビキチン化には影響を与えず、U-box を人為的に欠いた UFD2a の変異体でも p73 α の分解を促進する能力を維持していた。これらの実験結果より、UFD2a はユビキチン化非依存性の分子機構を介してプロテアソームによる p73 α の分解を促進することが示唆された。

p73 α の転写活性化能に及ぼす UFD2a の影響の有無を調べる目的でルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、アンチセンス UFD2a との共発現によって内在性の UFD2a をノックダウンしたところ、p73 α によるその標的遺伝子である p21^{WAF1}、および Bax プロモーターの誘導活性が増強された。さらに、UFD2a が p73 α の細胞死誘導活性に対する影響を調べる目的で、アンチセンス UFD2a と p73 α との共発現によるコロニーフォーメーションアッセイを行ったところ、アンチセンス UFD2a との共発現によって p73 α 依存性の細胞死誘導が亢進した。

以上の実験結果から、U-box 型 E3/E4 ユビキチンリガーゼである UFD2a は p73 α との物理的な結合を介してそのプロテアソームによる分解を促進するとともに、p73 α の転写活性化能および細胞死誘導能を阻害することが明らかになった。しかしながら、UFD2a による p73 α の分解はそのユビキチン化の程度には無関係であり、その詳細な分子機構は不明である。ヒト腫瘍の約 50% で機能喪失を伴う変異が検出される p53 とは異なり、ヒト腫瘍組織における p73 の変異は極めて稀である。従って、特に p53 の変異を持つ腫瘍組織における UFD2a の特異的な阻害は、p73 の安定化に伴う活性化による新たな抗癌治療の戦略の一つとなりうることを期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination

(UFD2a による p73分解機構についての解析)

p73 はがん抑制蛋白 p53 のホモログであり、p53 と同様に標的遺伝子群の発現調節を介して細胞死や細胞周期の停止を誘導するが、腫瘍における変異は稀である。また、p53 とは異なり p73 には複数のスプライス変異体が存在する。p73 α のカルボキシル末端領域には SAM ドメインが存在し、蛋白間相互作用に関与していると考えられているが、その機能は未だに不明である。DNA 損傷に応答して、p73 が安定化しその細胞死誘導能が促進することが既に報告されている。また、プロテアソーム阻害剤によって細胞内の p73 蛋白量が増加することから、p73 はユビキチン・プロテアソーム系の蛋白分解システムによる制御を受けていることが示唆されているが、詳細な分子機構については不明である。UFD2a は E4 ユビキチンリガーゼとして同定され、また E3 としての活性をも持つと示されている。我々は UFD2a 遺伝子が神経芽細胞腫に対する癌抑制遺伝子が座位すると考えられる領域にマップされていることを報告した。しかし神経芽細胞腫において UFD2a の変異は稀であり、細胞死誘導刺激に応答して UFD2a は活性が失われることが明らかにされた。従って、UFD2a は細胞死の制御に関与している可能性が指摘されている。SH-SY5Y 細胞は CDDP(シスプラチン)処理により細胞死に陥る。この実験系を用いて解析を行うと、p73 は CDDP 処理に応答して安定化しその蛋白量が増加する一方、UFD2a は CDDP 処理によりその蛋白量が減少した。同時に行った RT-PCR では UFD2a mRNA の発現量には変化は認められなかった。UFD2a と p73 の物理的結合の有無を調べる目的で免疫沈降法による解析を行った結果、細胞内で UFD2a と p73 α は物理的に結合するが、p53 とは結合しなかった。p73 の様々な変異体による同様の解析を行ったところ、p73 α のみに存在する SAM ドメインを含む領域が両者の結合に必要不可欠であった。UFD2a が p73 α の安定性の制御に関与しているかを調べる目的でウェスタン法による解析を行った結果、UFD2a の過剰発現に伴って p73 α の蛋白量は顕著に減少した。また、UFD2a の過剰発現によって CDDP に応答した内在性 p73 α の発現誘導が抑制された。さらに、p73 α 蛋白の半減期を調べると、UFD2a との共発現によって顕著に短縮することが判明した。UFD2a による p73 α の分解はプロテアソーム阻害剤処理によって抑制されるが、UFD2a は p73 α のユビキチン化には影響を与えず、U-box を人為的に欠いた UFD2a の変異体でも p73 α の分解を促進する能力を維持していた。これらの実験結果より、UFD2a はユビキチン化非依存性の分子機構を介してプロテアソームによる p73 α の分解を促進することが示唆された。p73 α の転写活性化能・細胞死誘導活性に

及ぼす UFD2a の影響の有無を調べる目的でルシフェラーゼレポーターアッセイ・コロニーフォーメーションアッセイを行った。アンチセンス UFD2a との共発現によって内在性の UFD2a をノックダウンしたところ、p73 α の標的遺伝子の誘導活性が増強され、また、p73 α 依存性の細胞死誘導が亢進した。以上より、UFD2a は p73 α との物理的な結合を介して、ユビキチン化非依存性にプロテアソームによる p73 α の分解を促進するとともに、p73 α の転写活性化能および細胞死誘導能を阻害することを示した。

公開発表後、副査の今村教授より 1)他抗癌剤での同結果の有無、2)p73 の生物学的機能、3)他分子での非ユビキチン分解系の有無についての質問があった。それに対して 1)同様の結果が期待されること、2)p53 との比較も含めた p73 の機能、3)文献の引用にて同系の他分子を示す等の回答があった。藤堂教授からは 1)臨床応用について、2)非ユビキチン分解系の具体的内容、3)p53 と p73 の役割の違いについての質問があった。それに対して 1)p53 変異腫瘍におけるその可能性、2)UFD2a が p73 を直接プロテアソームに結合させる可能性、3)p73 が p53 を補完しうること等の回答があった。また、主査の畠山教授より 1)p73 と p63 の関係、2)ユビキチン化アッセイの方法、3)p73 とプロテアソームの結合の有無についての質問があり、1)p63 と p73 の類似性とその違い、2)実験法と今後への応用、3)p73 とプロテアソームの結合は確認されていない等の回答がなされた。この論文は p73 と UFD2a が結合し p73 の分解を促進することを示した初めての報告であり、UFD2a 阻害による抗腫瘍効果への臨床応用が期待されることを示した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。