

学位論文題名

# Tripartite motif protein 32 facilitates cell growth and migration via degradation of Abl-interactor 2

(Tripartite motif protein 32は Abl-interactor 2の分解を介して細胞増殖および運動能を促進する)

## 学位論文内容の要旨

### 【背景と目的】

ユビキチン化はタンパク質の翻訳後修飾の一つであるが、その主な機能としてプロテアソームを介したタンパク質分解に関与している。そのユビキチン・プロテアソームシステムはユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、そしてユビキチンリガーゼ (E3) によって構成されるが、中でもユビキチンリガーゼは標的タンパク質の認識に関与する。Tripartite motif protein (TRIM protein) は RING-finger、B-Box、coiled-coil の3つのドメインを特徴としたタンパク質である。ユビキチンリガーゼの特徴とされる RING-finger ドメインを持つことからその多くはユビキチンリガーゼとして機能する。今回研究対象とした TRIM32 は Piasy や actin のユビキチン化に関与することがこれまでに報告されている。さらに、ヒト頭頸部扁平上皮癌において TRIM32 の mRNA の発現が上昇していることが報告された。しかし、発癌における TRIM32 の機能的役割はいまだ明らかにされていないため、本研究では TRIM32 の分子生化学的機能解析を行った。

### 【材料と方法】

- ① ウェスタンブロット法および免疫組織染色法を用いて、ヒト頭頸部扁平上皮癌組織における TRIM32 のタンパク質発現レベルを検討した。
- ② 酵母 2 ハイブリット法を用いて TRIM32 と結合するタンパク質を網羅的に検索した。さらに同定されたタンパク質と TRIM32 との哺乳類細胞内での結合、ユビキチン化、そして分解を検討した。
- ③ レトロウイルスベクターを用いて作製した TRIM32 の過剰発現細胞、および siRNA により TRIM32 の発現をノックダウンした細胞を作製した。これらを用いて、TRIM32 による細胞増殖能、細胞周期、細胞運動能およびシスプラチンによるアポトーシスへの影響を検討した。

### 【結果】

- ① 同一患者の頭頸部扁平上皮癌組織と正常組織での TRIM32 のタンパク質発現を比較すると、70%の症例の癌組織で発現の亢進を認めた。また、免疫組織学的にも扁平上皮癌組織における TRIM32 の高発現を認めた。
- ② 酵母 2 ハイブリッド法を用いて TRIM32 の新規結合タンパク質として Abl-interactor 2 (Abi2) を同定した。TRIM32 と Abi2 の結合は、*in vivo* および *in vitro* でも確認でき、さらに TRIM32 は NHL ドメインを介して Abi2 と結合することが明らかになった。また、*in vivo* ubiquitination assay によって TRIM32 による Abi2 のユビキチン化を認めた。さらに pulse-chase analysis によって、野生型 TRIM32 (WT) による Abi2 の分

解促進を認め、しかもその分解は RING ドメインを欠損させた TRIM32 ( $\Delta$ RING) や、プロテアソーム阻害剤によって抑制されることから、Abi2 の分解がユビキチン・プロテアソームシステム依存的に行われていることが明らかになった。

- ③ 細胞増殖能に関する検討では、TRIM32 (WT) は細胞増殖に対して促進的に働いた。一方 TRIM32 ( $\Delta$ RING) や siRNA によって TRIM32 をノックダウンさせた細胞 (siTRIM32) では逆に抑制された。また、血清飢餓状態にすることで G0/G1 期に細胞周期を同調させた細胞を用いて行った Flow cytometric analysis では、TRIM32 (WT) は S 期への移行が促進され、TRIM32 ( $\Delta$ RING) では抑制された。細胞増殖に対する影響が Abi2 の分解を介して行われたことを調べるために、Abi2 を過剰発現させた細胞で細胞増殖を検討したところ、Abi2 過剰発現細胞では増殖が抑制された。しかし、TRIM32 を共発現させた細胞では、Abi2 の発現が低下しかつその抑制能も阻害された。さらに TRIM32 による腫瘍増殖に関する影響を検討するために、癌遺伝子である活性型 c-Src を共発現させた細胞を用いて colony formation assay を行った。結果、TRIM32 は活性型 c-Src の足場非依存性増殖能に対し促進的に働いた。次に、これまでに Abi2 は細胞運動能に関与することが報告されていたため、TRIM32 の細胞運動能に対する影響を検討した。すべての実験は細胞増殖能の影響が無視できるように血清飢餓状態で行った。Wound healing assay では、TRIM32 (WT) は傷の修復を促進させ、逆に TRIM32 ( $\Delta$ RING) や siTRIM32 では抑制された。また、transwell migration assay でも同様に TRIM32 (WT) では細胞の移動が促進された。最後に、シスプラチン耐性扁平上皮癌細胞で TRIM32 の発現が亢進していたという結果から、TRIM32 のシスプラチンによるアポトーシスへの影響を検討した。まず、SRB assay でシスプラチン投与に対し生き残った細胞数を測定したところ、TRIM32 (WT) では増加し、一方、TRIM32 ( $\Delta$ RING) および siTRIM32 では減少した。さらに Flow cytometric analysis を用いて sub-G1 peak を測定すると TRIM32 (WT) では減少し、またウェスタンブロット法により cleaved caspase-3 の発現を検討したところ TRIM32 (WT) では減少していた。これらの結果から TRIM32 はシスプラチンによるアポトーシスに対し抑制的に働くことが示唆された。

#### 【考察】

これまでに、TRIM32 は Piasy の分解を介して、UVB によるケラチノサイトのアポトーシスを抑制することが報告されていた。しかし、頭頸部扁平上皮癌は口腔や咽喉頭の粘膜に発生し UVB の影響はほとんど受けないことから、別の標的タンパク質の分解を介して頭頸部扁平上皮癌の発癌に関与しているのではないかと考えられた。今回の研究で同定した Abi2 はこれまでの報告から癌抑制遺伝子として機能することが示唆されている。このため、TRIM32 が Abi2 をユビキチン化し分解を促進することで、癌遺伝子として働くことが考えられる。また、Abi2 は非受容体型チロシンキナーゼ c-Abl と複合体を形成し、c-Abl の基質が結合するのを阻害することが報告されている。このため、TRIM32 によって Abi2 の分解が促進されることでフリーな活性型 c-Abl が増加し、結果として細胞増殖を促進、また発癌に関与するのかもしれない。また、Abi2 は細胞運動能に対し抑制的に働くという報告があることから、TRIM32 が Abi2 の分解を促進することで細胞運動能を促進している可能性がある。この結果から、TRIM32 が癌細胞の浸潤や転移にも関与していることが示唆される。さらに、TRIM32 がシスプラチンによるアポトーシスを抑制することから、シスプラチンの耐性化にも関与していることが考えられた。

#### 【結論】

今回の研究結果より、ユビキチンリガーゼ TRIM32 の新規標的タンパク質として Abi2 を同定した。そして、TRIM32 は癌細胞の増殖や転移、そして抗癌剤の耐性化に関与する癌遺伝子として機能することが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 秋田 弘 俊  
副査 教授 近藤 哲  
副査 教授 畠山 鎮 次  
副査 教授 福田 諭

学位論文題名

## Tripartite motif protein 32 facilitates cell growth and migration via degradation of Abl-interactor 2

(Tripartite motif protein 32は Abl-interactor 2の分解を介して細胞増殖および運動能を促進する)

ユビキチン化はプロテアソームを介したタンパク質分解に関与しているが、その標的タンパク質の認識に関与しているのがユビキチンリガーゼである。TRIM protein は RING-finger、B-Box、coiled-coil の3つのドメインを特徴としたタンパク質であり、その多くはユビキチンリガーゼとして機能する。今回研究対象とした TRIM32 は Piasy や actin のユビキチン化に関与することがこれまでに報告されている。さらに、ヒト頭頸部扁平上皮癌において TRIM32 の mRNA の発現が上昇していることが報告された。しかし、発癌における TRIM32 の機能的役割はいまだ明らかにされていないため、本研究では TRIM32 の分子生化学的機能解析を行った。

まず、頭頸部扁平上皮癌組織と正常組織での TRIM32 のタンパク質発現を比較すると、70%の症例の癌組織での発現亢進を認めた。次に、酵母2ハイブリッド法を用いて TRIM32 の新規結合タンパク質として Abl-interactor 2 (Abi2) を同定した。両者の結合は、*in vivo* および *in vitro* でも確認でき、その結合部位は TRIM32 の NHL ドメインであった。さらに、TRIM32 による Abi2 のユビキチン化と分解の促進を認めた。その分解は RING ドメインを欠損させた変異 TRIM32 や、プロテアソーム阻害剤によって抑制されることからユビキチン・プロテアソームシステム依存的に行われていることが明らかになった。

TRIM32 による細胞増殖能に関する検討では、TRIM32 は細胞増殖に対して促進的に働いた。また、TRIM32 は G0/G1 期から S 期への移行を加速した。さらに TRIM32 と活性型 c-Src を共発現させた細胞を用いて colony formation assay を行った結果、TRIM32 は活性型 c-Src の足場非依存性増殖能を促進した。次に、TRIM32 の細胞運動能に対する影響を検討した。Wound healing assay では、TRIM32 (WT) は傷の修復を促進させ、transwell migration assay では細胞の移動が促進された。最後に、シスプラチン耐性扁平上皮癌細胞で TRIM32 が高発現していたという結果から、シスプラチンによるアポトーシスへの影響を検討した。まず、SRB assay でシスプラチン投与後に生き残った細胞数を測定したところ、TRIM32 (WT) では増加した。さらに TRIM32 による sub-G1 peak の減

少、および cleaved caspase-3 の発現低下から TRIM32 がシスプラチンによるアポトーシスに対し抑制的に働くことが示唆された。

これらの結果から、TRIM32 は、癌抑制遺伝子としての機能が報告されている Abi2 をユビキチン化し分解を促進することで、癌遺伝子として働くことが考えられた。また、Abi2 は細胞運動能に対し抑制的に働くという報告があることから、TRIM32 が Abi2 の分解を促進することで細胞運動能を促進している可能性がある。この結果から、TRIM32 が癌細胞の浸潤や転移にも関与していることが示唆される。さらに、TRIM32 がシスプラチンによるアポトーシスを抑制することから、シスプラチンの耐性化にも関与していることが考えられた。

口頭発表後、副査の近藤教授から、「TRIM32 に対する他の基質タンパク質の存在」「TRIM32 の発現量と臨床像との関連」「Abi2 による腫瘍検体の染色結果」次いで、副査の福田教授から、「過去の報告における頭頸部癌での TRIM32 発現割合とその原発部位」「正常組織で TRIM32 の発現が亢進していた理由」「今後の治療や検査への応用の可能性」次いで、副査の畠山教授から、「TRIM32 の knock-out mouse を用いた発癌に関する実験の構築」「Abi2 の分解だけでは説明できない TRIM32 の機能」さらに、主査の秋田教授から、「癌遺伝子としての TRIM32 遺伝子変化の報告の有無」「癌抑制遺伝子としての Abi2 遺伝子変化の報告の有無」「Abi2 がエピジェネティックに抑制される可能性」についての質問があった。いずれの質問に対しても申請者は自身の研究結果や文献的知識に基づき適切に回答した。

この論文は頭頸部扁平上皮癌で高発現する TRIM32 の新規標的タンパク質として Abi2 を同定し、その分解が細胞増殖や細胞運動能の促進に関与し、さらに TRIM32 によるシスプラチン抵抗性への影響を検討した点で高く評価され、今後の頭頸部癌治療への応用が期待される。

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取得単位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。