

学位論文題名

毛細血管拡張性運動失調関連遺伝子 ATDC による
細胞増殖・アポトーシスの解析

学位論文内容の要旨

【背景と目的】毛細血管拡張性運動失調症(AT: Ataxia telangiectasia)は協調運動不能、毛細血管拡張、感染症などを引き起こす遺伝性の免疫不全疾患であり、ATM(AT mutated)がその原因遺伝子である。ATは常染色体劣性遺伝性疾患で臨床的には進行性の小脳運動失調を起こすのみでなく、毛細血管拡張、精神遅滞、免疫不全、早老症状、発癌率の増加など幅広い症状を呈する。実際、AT患者由来の細胞は放射線高感受性や染色体不安定性を示すことが知られている。さらに、AT患者由来の細胞を使用した細胞遺伝学的実験により、ATの異常による表現型を相補する遺伝子としてATDC遺伝子が同定されている。ATDC遺伝子は染色体11q23に存在し、588アミノ酸をコードしている。ATDCタンパク質は複数のB-ボックスドメインとコイルドコイルドメインを有し、tripartite motif (TRIM)タンパク質のひとつとしても報告されている。TRIMタンパク質群の多くは、RINGドメインを有しており、ユビキチンリガーゼE3活性を示すことが推測されるが、ATDCの構造的特徴としてはRINGドメインを欠損している。したがって、ATDCは酵素機能欠損型として生理的なドミナントネガティブ的な機能している可能性がある。今回ATDCの結合タンパク質を網羅的に同定し、ATDC分子の機能を解析した。酵母ツーハイブリット法にてATDC結合タンパク質としてヒストンアセチル化酵素であるTat-interactive protein-60 kDa (Tip60)を同定した。Tip60はhistone acetyltransferase (HAT)活性をもち、転写、細胞周期チェックポイントの制御、アポトーシス、DNA修復制御などさまざまな細胞機能に関与している。特にTip60はp53のDNA結合ドメイン内の120番目リジン(K120)をアセチル化することが分かっており、この翻訳後修飾によってp53の標的遺伝子であるBAXやPUMAが活性化されアポトーシスが誘導されることが、最近明らかにされている。今回、これらの結果を踏まえ、ATDCがTip60の機能にどのような影響を与えているかを生化学的及び細胞生物学的手法により解析した。

【材料と方法】酵母ツーハイブリット法を用いてATDCと結合するタンパク質を網羅的に検索した。同定されたタンパク質であるTip60とATDCとの哺乳類細胞内での結合、局在、安定性について検討した。ATDCによるTip60のp53-K120アセチル化の影響を検討した。さらに、アポトーシスへの影響を調べるためにFACSにてsub-G1の分布を解析した。また、レトロウイルスベクターを用いてATDC過剰発現細胞を作製し、ATDCによる細胞増殖能、フォーカス形成能及びコロニー形成能への影響を検討した。

【結果】酵母ツーハイブリット法を用いてATDCの新規結合タンパク質としてTip60を同定した。ATDCとTip60の結合はin vivoで確認できた。Tip60は通常核に発現しているが、ATDCによりTip60の局在が核から細胞質へ変化することが判明した。さらに、ATDCを過剰発現させることにより内在性Tip60の分解が促進されることが分かった。その分解はプロテアソーム阻害剤によって抑制されることから、Tip60の分解がプロテアソーム依存性に行われていることを示唆する結果であった。Tip60はp53の120番目のリジンをアセチル化することが知られており、このK120のアセチル化はp53依存性アポトーシスに重要な役割を果たし、PUMAやBAXを誘導することが報告されている。Tip60依存性p53-K120

アセチル化における ATDC の関与を調べるために FLAG-ATDC 恒常発現 HCT116 細胞を作製し、UV を照射した。すると Mock HCT116 細胞と比較して DNA ダメージ後の内在性 p53 の誘導には明らかな影響はなかったが、p53-K120 のアセチル化は明らかに減少していた。そこで Mock HCT116 細胞および FLAG-ATDC 恒常発現 HCT116 細胞に UV を照射し、FACS にて sub-G1 分画を解析した。この結果より、UV 照射 24 時間後にはそれぞれ sub-G1 は 50.8% と 25.9% となっており、ATDC はアポトーシスを抑制していることが判明した。細胞増殖能に関する検討では、ATDC は細胞増殖能に対して促進的に働いた。さらに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フォーカス形成アッセイおよびコロニー形成アッセイを行った。その結果、ATDC は活性型 c-Src の足場非依存性増殖能に対して促進的に作用した。

【考察】胃癌における ATDC の発現は、組織学的グレード、腫瘍の大きさ、腫瘍の浸潤、リンパ節転移に相関しており、高発現の症例ほど悪性度が高く、浸潤傾向が強く、リンパ節転移も多いとされている。しかし、最近まで発癌における ATDC の機能的役割は証明されていなかった。最近の報告として ATDC は膀胱癌において β -catenin 依存性シグナル伝達の重要な調節因子であることが証明された。ATDC は Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路における GSK-3 β の抑制制御分子である Dvl-2 を介して β -catenin を安定化することで発癌における機能的役割を示していることが報告されている。ATDC の新規結合タンパク質として同定した Tip60 は癌抑制遺伝子としての機能をもつことが知られており、今回の結果からは ATDC が Tip60 と結合し、共局在し、分解することで Tip60 の癌抑制的な機能を阻害していることが考えられた。ATDC は RING ドメインを欠いており、ユビキチンリガーゼとしての活性をもたない。したがって、ATDC は他の TRIM タンパク質群やユビキチンリガーゼとダイマーを形成して Tip60 の分解に関与している可能性があると思われる。Tip60 は p53 の DNA 結合ドメインの 120 番目のリジンをアセチル化する。この 120 番目のリジンのアセチル化は p53 依存性アポトーシスに重要なタンパク質修飾であることが知られている。今回の結果で、ATDC は Tip60 による p53-K120 のアセチル化を抑制しており、UV によって誘導されるアポトーシスを抑制することが判明した。さらに ATDC を過剰発現させることによって、細胞増殖能、フォーカス形成能及びコロニー形成能を有意に亢進させることが判明した。今回、ATDC 単独発現細胞においても陰性対象と比較してコロニーの形成能亢進を認めている。活性型 c-Src と共発現させることでさらに形成能が亢進していたことより、ATDC は活性型 c-Src による MAP キナーゼ経路の活性化の増強させる、もしくはヒストンのアセチル化などの別経路により腫瘍形成能を亢進させていることが示唆された。生化学的には、ATDC は Tip60 による p53-K120 のアセチル化を抑制することで癌遺伝的に機能する可能性が考えられた。

【結論】 ATDC の新規結合タンパク質として Tip60 を同定した。ATDC と Tip60 は細胞質で共局在し、ATDC の過剰発現では Tip60 のプロテアソーム依存性の分解が促進された。ATDC は Tip60 による p53 の 120 番リジンのアセチル化を抑制し、UV によって誘導される p53 依存性アポトーシスを抑制した。細胞増殖アッセイ、フォーカス形成能アッセイ及びコロニー形成能アッセイにおいても ATDC は癌遺伝的に機能することが判明した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

毛細血管拡張性運動失調関連遺伝子 ATDC による 細胞増殖・アポトーシスの解析

毛細血管拡張性運動失調症(AT: Ataxia telangiectasia)は協調運動不能、毛細血管拡張、感染症などを引き起こす遺伝性の免疫不全疾患であり、ATM(AT mutated)がその原因遺伝子である。AT 患者由来の細胞を使用した細胞遺伝学的実験により、AT の異常による表現型を相補する遺伝子として毛細血管関連運動失調関連遺伝子 ATDC が同定されている。本研究により、ATDC は Tip60 による p53 の 120 番目のリジンのアセチル化を抑制することで UV によって誘導されるアポトーシスを抑制すること、また ATDC の発現は細胞増殖能および腫瘍形成能を亢進させることにより癌遺伝子として機能することが判明した。

まず、酵母ツーハイブリット法を用いて ATDC の新規結合タンパク質として Tip60 を同定した。ATDC と Tip60 の結合は *in vivo* で確認できた。Tip60 は通常核に発現しているが、ATDC により Tip60 の局在が核から細胞質へ変化することが判明した。さらに、ATDC を過剰発現させることにより内在性 Tip60 の分解が促進されることがわかった。その分解はプロテアソーム阻害剤によって抑制されることから、Tip60 の分解がプロテアソーム依存性に行われていることを示唆する結果であった。Tip60 は p53 の 120 番目のリジンをアセチル化することが知られており、この K120 のアセチル化は p53 依存性アポトーシスに重要な役割を果たし、PUMA や BAX を誘導することが報告されている。Tip60 依存性 p53-K120 アセチル化における ATDC の関与を調べるために FLAG-ATDC 恒常発現 HCT116 細胞を作製し、UV を照射した。すると Mock HCT116 細胞と比較して DNA ダメージ後の内在性 p53 の誘導には明らかな影響はなかったが、p53-K120 のアセチル化は明らかに減少していた。そこで Mock HCT116 細胞および FLAG-ATDC 恒常発現 HCT116 細胞に UV を照射し、FACS にて sub-G1 分画を解析した。この結果より、UV 照射 24 時間後にはそれぞれ sub-G1 は 50.8% と 25.9% となっており、ATDC はアポトーシスを抑制していることが判明した。細胞増殖能に関する検討では、ATDC は細胞増殖能に対して促進的に働いた。さらに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化型 c-Src を共発現させた細胞を用いてフォーカス形成アッセイおよびコロニー形成アッセイを行った。その結果、ATDC は活性化型 c-Src の足場非依存性増殖能に対して促進的に作用した。

副査の今村雅寛教授から今回のコロニー形成アッセイで腫瘍形成能をみているが、これは癌化した細胞をみていることになっているのかとの質問があった。また、UVを照射したときに Tip60 は DNA タメージによる DNA 修復のための時間稼ぎをしているということであったが、抗癌剤においての実験は行っているのかとの質問があった。さらに、ATDC の発現は唾液腺細胞である ACC3 細胞で高発現しているとの報告であったが、その他の細胞で発現をみているのかとの質問があった。次いで副査の畠山鎮次教授から、今回は UV や抗癌剤による DNA ダメージが起きた時の Tip60 や p53 の変化をみた実験であるが、DSA が起こったときに ATDC がどのようなことに関与するかについての質問があった。また、今回はノックダウンでは形態的な変化しか得られていないが、ノックダウンすることでさらにどのような実験をして、どのような実験結果が得られることが考えられるかという質問があった。さらに、今回の実験では腫瘍細胞株でしか解析していないが、人体にできた癌での考察に関する質問があった。次いで主査の浅香正博教授からノックダウンは例えば 80% 発現を低下させても残りの 20% で機能していることもよく見うけられるが、今回のノックダウンの実験では何% 抑制されていたかという質問があった。また、ATDC のノックアウトマウスはすでに作製されているのかとの質問があった。さらに、肝癌との関連および今後の臨床応用は期待されるのかとの質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は実験で得られた結果や過去の論文等を引用し、おおむね適切に回答した。

この論文は、ATDC は p53 依存性アポトーシスを抑制するとともに、細胞増殖能および腫瘍形成能を亢進し癌遺伝子として働くことを示している。今後はこの研究をもとに臨床的な応用が期待される。

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）の学位を取得するのに十分な資格を有するものと判定した。