

大腸癌特異的ユビキチンリガーゼ RNF43の機能解析

学位論文内容の要旨

【背景と目的】欧米における悪性新生物の部位別死亡数の統計によると、大腸癌は最も多い死因のひとつである。遠隔転移があった場合、切除および化学療法等の治療法が適用される。近年、大腸癌における化学療法は著しい進歩を遂げている。しかしながら、転移性大腸癌は、いまだに根治が困難な疾患に位置している。これまでに、アポトーシスに影響を及ぼす p53, NF- κ B, Bcl-2, APC/ β -カテニン及び COX-2 などが、発癌に関与していることが報告されている。p53 遺伝子は、ヒトの癌で最も多くの変異が検出される癌抑制遺伝子のひとつである。p53 は細胞周期の停止およびアポトーシスを引き起こし、DNA 損傷応答の中心的役割を果たしている。DNA 損傷が起こった際には、p53 はリン酸化やアセチル化およびユビキチン化等の翻訳後修飾を受けることで、その安定性が変化する。ユビキチン化修飾は、細胞制御・シグナル伝達・DNA 修復等の細胞機能の制御系として機能するタンパク質の翻訳後修飾系である。遺伝子発現に関する網羅的な解析において、Ring finger protein 43 (RNF43) は大腸癌に高頻度に発現する遺伝子として同定された。これまでに、RNF43 の過剰発現により細胞増殖が促進され、siRNA によるノックダウンでは細胞の増殖が抑制されることが報告されている。また、免疫療法において RNF43 は細胞障害性 T リンパ球を誘導するエピトープペプチドを含む腫瘍抗原となる可能性があり、癌ワクチンとして臨床試験が行われている。以上のことより、大腸癌において RNF43 は癌遺伝子の特徴を有すると考えられるが、癌化に及ぼす機能は未だ解明されていない。NEDD4-like ubiquitin protein ligase-1(NEDL1) は、神経組織に高発現し、変異型 superoxide dismutase-1(SOD1) と dishevelled-1(Dvl1) に結合することが報告されている。また、NEDL1 は p53 と結合することで p53 の転写活性を制御し、アポトーシスを誘導することが知られている。これらの結果より、NEDL1 は細胞増殖およびアポトーシスなどの制御に関与していることが推測された。

今回、RNF43 の結合タンパク質を網羅的に同定し、RNF43 分子の機能を解析することを試みた。まず酵母ツーハイブリット法により、RNF43 結合タンパク質として NEDL1 を同定した。この結果を踏まえ、RNF43 が大腸癌の癌化制御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 RNF43 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 NEDL1 と RNF43 との哺乳類細胞内での結合および安定性について検討した。さらに、RNF43 と p53 との結合について検討した。ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、RNF43 による p53 の転写活性への影響を検討した。アポトーシスへの影響を調べるために、RNF43-FLAG 恒常発現 HCT116 細胞を作製し、FACS を使用した細胞周

期解析によって sub-G₁ 分画の測定, 及びカスパーゼ-3 の切断を免疫ブロット法で解析した.

【結果】 酵母ツーハイブリット法にて HeLa cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った. 陽性クローンのうちの 하나가, ヒト NEDL1 と同一の塩基配列であった. RNF43 と NEDL1 の結合は酵母細胞内でのβ-ガラクトシダーゼアッセイにて確認した. 哺乳類細胞内で RNF43 が NEDL1 と物理的に相互作用するかどうかを確かめるために *in vivo* 結合実験を行った. その結果, 哺乳類細胞内においても, RNF43 は NEDL1 と結合することが判明した. NEDL1 は p53 と結合し, p53 によるアポトーシスを増強すると報告されており, RNF43 もまた p53 と結合しうるかを検討した. その結果, RNF43 は NEDL1 と同様に p53 とも結合することが判明した. H1299 細胞に p53 のレスポンスエレメントを持つルシフェラーゼレポーター, p53 の発現プラスミド, 及び異なる量の RNF43 を同時に発現させ, ルシフェラーゼ活性を測定した. その結果, RNF43 は容量依存性に p53 の転写活性を抑制した. RNF43 過剰発現 HCT116 細胞にシスプラチンを添加し 14 時間培養した後, 免疫ブロット法で解析した. その結果, RNF43 過剰発現 HCT116 細胞においてカスパーゼ-3 の切断が抑制されていた. さらに, RNF43 過剰発現 HCT116 細胞に UV を照射し, FACS にて sub-G₁ 分画を解析したところ, 陰性対象との比較において, UV 照射 12 時間後及び 18 時間後の sub-G₁ 分画が減少していることが判明した. これらの結果より, RNF43 はアポトーシスを抑制することが判明した.

【考察】 NEDL1 が p53 の転写活性を増強し, p53 によるアポトーシスを増強させることが報告されている. 本研究により, RNF43 が NEDL1 と結合し p53 の転写活性を抑制することを示した. したがって, RNF43 は NEDL1 を負に制御することが示唆される. また, RNF43 は, 直接もしくは間接的に野生型 p53 によるアポトーシスを制御する役割を果たす可能性も考えられる. しかしながら, この点に関しての分子生物学的機序は不明であり, 今後の検討が必要と考えられる.

【結論】 RNF43 の結合タンパク質として NEDL1 を同定した. RNF43 は p53 との結合することで, p53 の転写活性を抑制して, UV および cDDP によるアポトーシスを抑制することを証明した. 大腸癌で高発現する RNF43 は, NEDL1 と協調することで, p53 によるアポトーシスを制御し, 大腸上皮細胞の癌化に関与することが示唆された.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 島 山 鎮 次
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 岩 永 敏 彦
副 査 教 授 守 内 哲 也

学位論文題名

大腸癌特異的ユビキチンリガーゼ RNF43の機能解析

欧米における悪性新生物の部位別死亡数の統計によると、大腸癌は最も多い死因のひとつである。近年、大腸癌における化学療法は著しい進歩を遂げているが、転移性大腸癌はいまだに根治が困難な疾患として位置している。p53は細胞周期の停止およびアポトーシスを引き起こし、DNA損傷応答の中心的役割を果たしている。DNA損傷が起こった際には、p53はリン酸化やアセチル化およびユビキチン化等の翻訳後修飾を受けることで制御され、その安定性が変化する。ユビキチン化修飾は、細胞制御・シグナル伝達・DNA修復等の細胞機能の制御系として機能するタンパク質の翻訳後修飾系である。ユビキチン関連酵素 Ring finger protein 43 (RNF43) は、遺伝子発現量に関する網羅的な解析において、大腸癌に高頻度に発現しているタンパク質として同定された。RNF43の過剰発現により、細胞増殖が促進され、siRNAによるノックダウンでは細胞の増殖が抑制されることが報告されている。また、RNF43は免疫療法において細胞障害性 T リンパ球を誘導するエピトープペプチドを含む腫瘍抗原となる可能性があり、癌ワクチンとして臨床試験が行われている。以上のことより、大腸癌において RNF43 は癌遺伝子的特徴を有すると考えられるが、生化学的機序はまだ解明されていない。NEDD4-like ubiquitin protein ligase-1(NEDL1)は、神経組織に高発現し、変異型 superoxide dismutase-1(SOD1)と Dishevelled-1(Dvl1)に結合することが報告されている。また、NEDL1は p53 と結合することで p53 の転写活性を制御し、アポトーシスを誘導することが知られている。これらの結果より、NEDL1 は細胞増殖およびアポトーシスなどの制御に関与していることが推測される。

今回、酵母ツーハイブリット法により RNF43 の結合タンパク質を網羅的に解析し、NEDL1 が同定された。哺乳類細胞内で RNF43 が NEDL1 と物理的に相互作用するかどうかを確かめるために in vivo 結合実験を行った結果、RNF43 と NEDL1 が結合することが判明した。NEDL1 は p53 と結合し、p53 によるアポトーシスを増強すると報告されていたため、RNF43 も p53 と結合しうるかを調べたところ、RNF43 は NEDL1 と同様に p53 にも結合することが判明した。

またルシフェラーゼレポーターアッセイにより、RNF43 は用量依存性に p53 の転写活性を抑制した。シスプラチンを添加しても RNF43 恒常発現 HCT116 細胞において、カスパーゼ-3 の切断が抑制されていた。さらに、RNF43 恒常発現 HCT116 細胞に UV 照射し、FACS にて sub-G1 分画を解析したところ、RNF43 はアポトーシス抑制活性を有することが判明した。

審査会において、副査の守内教授より論文内に使用されている科学用語に関する適切な指導を受け、最終提出論文においては訂正を加えると説明した。また、酵母ツーハイブリッド法で p53 が同定されなかった理由に関して質問を受け、使用したライブラリーにおける p53 cDNA のクローン数もしくは HeLa 細胞内の p53 mRNA の発現量がその原因の可能性として言及した。副査の岩永教授より、消化器組織を含め組織学的な発現に関しての質問を受け、現在利用できるデータベースや論文等を引用し RNF43 の発現する組織の情報を述べた。副査の上出教授より、転写や細胞死に関するデータが NEDL1 を介していることを証明するための実験に関する質問を受け、NEDL1 ノックダウン細胞を使う必要性を述べた。また、ヒト大腸癌組織を使った生化学的実験及び抗癌剤耐性細胞を使用した実験の可能性を指摘されたが、今後の研究遂行において重要であると言及した。副査の浅香教授より、今回解析した3つのタンパク質間の作用に関する分子メカニズムに関する質問を受け、研究結果等から予想されるモデルを言及した。主査の畠山教授より、RNF43 遺伝子の発現調節、膜タンパク質としての動態に関しての質問を受け、これまでの知見を踏まえ、各種転写因子による制御の可能性について説明した。

この論文は、大腸癌に特異的に発現する RNF43 が NEDL1 や p53 と相互作用することで、p53 依存性転写制御や細胞死に対する感受性を制御することを示しており、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、大学院過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。