

## 学位論文題名

発がん活性を持つpp32r1はHuRと結合しその分解を抑制する

## 学位論文内容の要旨

pp32は核に局在し、ataxin-1、Granzyme A、リン酸化Rb、HuRといった様々なタンパク質と結合することで機能を調節し、さらにpp32はアポトソームに入りアポトーシスを促進することにより、発がんを抑制することが明らかになっているがん抑制遺伝子産物である。一方、pp32r1はpp32とホモロジーの高いファミリー遺伝子だが、pp32とは異なる染色体に存在し、前立腺がんや乳がんで高い発現を示し、pp32とは対照的に細胞をがん化する能力をもつことが報告されている。しかし、pp32r1による細胞がん化機構の詳細は不明である。

HuRはRNA結合タンパクELAV(the embryonic lethal abnormal vision) ファミリーのメンバーで、AU-rich element(ARE)をもつmRNA(ARE-mRNA)の核外輸送及び細胞質での安定化に関わっている。通常、がん細胞では正常細胞に比べて細胞質にHuRが多く存在しており、細胞質におけるHuRの発現は大腸がんや口腔がんなどでその悪性形質に関わることが報告されている。

アデノウイルス初期遺伝子産物であるE4orf6が、がん細胞でpp32やHuRと結合し、本来CRM1依存的に輸送される宿主のARE-mRNAをCRM1非依存的に、強制的かつ恒常的に核外輸送・安定化することをHigashinoらは解明し、安定化されたARE-mRNAが細胞をがん化する能力を持ち、細胞がん化に寄与することも見出した。さらに、口腔がん細胞でも細胞質においてHuRやARE-mRNAが多く発現し、HuRをノックダウンすると浸潤能などのがんの悪性形質が減弱することも明らかにし、ARE-mRNAの核外輸送・安定化による細胞がん化は、新たな発がん機構として注目されている。

本研究では、がん細胞の細胞質でHuRが多く発現している意義を解明するためにpp32ファミリーによるHuRの分解について検索を行った。最近、スタウロsporin(STS)などの致死性ストレスで細胞を処理すると、HuR・pp32複合体は核外輸送され、細胞質でカスパーゼ-3もしくは7がHuRを分解し、フリーとなったpp32がアポトソームに入りアポトーシスを誘導することが報告された。しかしながら、pp32r1とHuRの分解との関連についてはまだ報告がない。

pp32r1の発現をウェスタンブロッティングで検索したところ、正常細胞と比較してがん細胞で発現の亢進が認められた。共焦点顕微鏡でpp32とpp32r1の発

現を調べたところ、pp32が核に局在していたのに対し、pp32r1は核よりも細胞質で強い発現を示した。HeLa細胞にpp32およびpp32r1を過剰発現させ軟寒天コロニー形成試験で足場非依存性増殖能を調べた。その結果、pp32発現系では軟寒天培地中のコロニー形成がコントロールと比較して大きさ、数ともに減少したのに対し、pp32r1発現系ではそれらは著しく増加した。これらの結果はpp32とpp32r1は同じファミリー遺伝子であるにも関わらず、発現、局在などが異なり、また異なる機能を有していることを示していた。

次にスタウロスポリン(STS)存在下において、pp32とpp32r1の発現とHuRの分解との関連を検討した。pp32およびpp32r1を過剰発現させたSAS細胞にSTSを作用させて免疫蛍光染色を行ったところ、pp32発現細胞では細胞質のHuRが減少したのに対し、pp32r1発現細胞では細胞質のHuR発現に変化がなかった。またウェスタンブロッティングでHuRの分解産物であるHuR-CP1の発現を調べた結果、pp32発現細胞ではコントロールと比較してHuR-CP1発現量の差はなかったが、pp32r1発現細胞ではHuR-CP1が50%程度に低下していた。以上の結果は、致死ストレス下においてpp32r1が細胞質でのHuRの分解を抑制していることを示すものであった。

pp32とHuRと同様に、pp32r1がHuRと結合するか免疫沈降法で検討した結果、両タンパクは結合することがわかった。また、pp32r1がpp32を介してHuRと結合する可能性があるため、pp32とpp32r1の結合を検討したが、両者は結合しなかった。従って、両タンパクはそれぞれ競合してHuRと結合する可能性が考えられた。次に、pp32r1、pp32とHuRの競合実験を行ったところ、pp32r1はHuRとより強く結合することが認められた。

pp32r1はがん細胞で発現が亢進し、優先的にHuRと結合していることから、致死ストレス条件下と同様にがん細胞でもpp32r1がHuRの分解を抑制する可能性がある。このことを証明するために口腔がん細胞のSASでpp32およびpp32r1を過剰発現させ、免疫蛍光染色およびウェスタンブロッティングでHuRの分解を検討した。その結果、pp32発現細胞では細胞質のHuR発現が減少したのに対し、pp32r1発現細胞では細胞質のHuR発現が増加し、がん細胞でもpp32r1によりHuRが安定化されることが解明された。

これまでpp32r1の細胞がん化機構とHuRの関連について詳細は不明であったが、本研究の結果、pp32r1がpp32と競合してRNA結合タンパクHuRと結合し、HuRのカスパーゼによる分解を抑制することが示され、その結果、HuRが結合するAREを持つmRNAが安定化され細胞がん化を導くのではないかと思われる。今後、pp32r1によるARE-mRNAの安定化など、この新たな発がんメカニズムの解析ががんの診断や治療に寄与していくものと考えている。

# 学位論文審査の要旨

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 主 査 | 教 授 | 北 川 | 善 政 |
| 副 査 | 教 授 | 進 藤 | 正 信 |
| 副 査 | 教 授 | 鄭   | 漢 忠 |

## 学位論文題名

### 発がん活性を持つpp32r1はHuRと結合しその分解を抑制する

審査は、上記担当者による申請者に対する提出論文と関連事項についての口頭試問により執り行われた。審査を行った論文の概要は以下の通りである。

アデノウイルスのがん遺伝子産物 E4orf6 は pp32 や RNA 結合タンパク HuR と結合し、AU-rich element (ARE) を持つ mRNA の核外輸送・安定化により細胞をがん化することがこれまで明らかになっている。この ARE-mRNA の核外輸送・安定化は、多くのヒトのがん細胞でも証明され、新たな細胞がん化機構として注目されている。演者は ARE-mRNA の輸送・安定化機構を解明するために、pp32 による HuR の分解に注目し、研究を行った。pp32 は HuR 結合タンパクで、tumor suppressor 活性を持ち、がん細胞ではその発現が比較的少ない。一方、pp32 ファミリーの pp32r1 は、細胞がん化活性を持ち、がん細胞でそれらの発現が高い。これまでに、pp32-HuR 複合体は細胞質に運ばれると HuR が caspase により分解され、フリーになった pp32 が apoptosis を誘発することが報告されているが、pp32r1 と HuR との関連についてはほとんど報告がない。本研究ではがん細胞を用いて pp32r1 が HuR の分解に及ぼす影響を検討した。

pp32r1 の発現をウェスタンブロッティングで検索したところ、正常細胞と比較してがん細胞で発現の亢進が認められた。免疫蛍光染色で pp32 と pp32r1 の発現を調べたところ、pp32 が核に局在していたのに対し、pp32r1 は核よりも細胞質で強い発現を示した。HeLa 細胞に pp32 および pp32r1 を過剰発現させ軟寒天コロニー形成試験で足場非依存性増殖能を調べた。その結果、pp32 発現系では軟寒天培地中のコロニー形成がコントロールと比較して大きさ、数ともに減少したのに対し、pp32r1 発現系ではそれらは著しく増加した。これらの結果は pp32 と pp32r1 は同じファミリー遺伝子であるにも関わらず、発現、局在などが異なり、また異なる機能を有していることを示していた。次にスタウロsporin (STS) 存在下において、pp32 と pp32r1 の発現と HuR の分解との関連を検討した。pp32 および pp32r1 を過剰発現させた SAS 細胞に STS を作用させて免疫蛍光染色を行ったとこ

ろ、pp32発現細胞では細胞質のHuRが減少したのに対し、pp32r1発現細胞では細胞質のHuR発現に変化がなかった。またウェスタンブロッティングでHuRの分解産物であるHuR-CP1の発現を調べた結果、pp32発現細胞ではコントロールと比較してHuR-CP1発現量の差はなかったが、pp32r1発現細胞ではHuR-CP1が50%程度に低下していた。以上の結果は、致死性ストレス下においてpp32r1が細胞質でのHuRの分解を抑制していることを示すものであった。pp32とHuRと同様に、pp32r1がHuRと結合するか免疫沈降法で検討した結果、両タンパクは結合することがわかった。また、pp32r1がpp32を介してHuRと結合する可能性があるため、pp32とpp32r1の結合を検討したが、両者は結合しなかった。従って、両タンパクはそれぞれ競合してHuRと結合する可能性が考えられた。次に、pp32r1、pp32とHuRの競合実験を行ったところ、pp32r1はHuRとより強く結合することが認められた。pp32r1はがん細胞で発現が亢進し、優先的にHuRと結合していることから、致死性ストレス条件下と同様にがん細胞でもpp32r1がHuRの分解を抑制する可能性がある。このことを証明するために口腔がん細胞のSASでpp32およびpp32r1を過剰発現させ、免疫蛍光染色およびウェスタンブロッティングでHuRの分解を検討した。その結果、pp32発現細胞では細胞質のHuR発現が減少したのに対し、pp32r1発現細胞では細胞質のHuR発現が増加し、がん細胞でもpp32r1によりHuRが安定化されることが解明された。

これまで pp32r1 の細胞がん化機構と HuR の関連について詳細は不明であったが、本研究の結果、pp32r1 が pp32 と競合して RNA 結合タンパク HuR と結合し、HuR のカスパーゼによる分解を抑制することが示され、その結果、HuR が結合する ARE を持つ mRNA が安定化され細胞がん化を導くのではないかと考えられた。今後、pp32r1 による ARE-mRNA の安定化など、この新たな発がんメカニズムの解析ががんの診断や治療に寄与していくものと考えている。

論文審査にあたっては、申請者による学位論文要旨についての説明後、担当者により研究内容および関連事項についての質問を行った。主な質問事項は、1) 癌細胞と正常細胞における HuR 発現の差について、2) HuR に対する pp32 と pp32r1 の結合力の差について、3) 癌細胞と正常細胞における pp32 と pp32r1 の発現差について、4) 本研究今後の展望についてなどであった。これらの質問に対しては申請者から適切かつ明快な回答および説明が得られ、研究の立案と遂行ならびに結果の検討について、申請者が十分な能力を有していることが確認された。本研究は、口腔癌細胞における pp32r1 を介した HuR の制御を解明したものであり、その内容が高く評価された。申請者は、優れた学識を有し発展的研究にも意欲的である。本研究業績は歯学のみならず、広く分子生物学に寄与すること大であり、博士（歯学）の学位に値するものと認められた。