

論文題目 グルコース飢餓ストレスによって誘導される topoisomerase II α の分解の
制御ドメインの同定

氏 名 尹 志洙

「序」

固形がんの薬剤耐性の原因として、低酸素やグルコース飢餓などの特有の環境ストレスがある。事実がん細胞は、こうした環境下で DNA topoisomerase II α (topo II α) を標的とするエトポシドなど、種々の抗がん剤に耐性を示す。topo II α 標的抗がん剤は、反応中間体 topo II α -DNA の cleavable complex を安定化し細胞死を誘導する。そのため、topo II α の発現量が低下すると、細胞は耐性を示す。実際、低酸素やグルコース飢餓ストレス下では、topo II α の発現低下が起こる。これには、蛋白分解酵素プロテアソームが関与しており、プロテアソーム阻害剤によって、topo II α の分解が抑制され耐性誘導も抑制されること、さらには、動物レベルにおいてもプロテアソーム阻害剤が topo II α 標的抗がん剤の効果を増強することが明らかになっている。このようにストレス環境下での topo II α の分解やその制御に関する因子は、薬剤耐性克服のためのよい標的となることが期待される。しかしながら、topo II α 分解の制御機構についてはほとんど明らかにされていない。本研究において私は、ストレスによる分解誘導に重要な topo II α のドメインを明らかにすることを目的として、種々の欠失変異体を作製することによって検討し、以下の成果を得た。

「結果と考察」

1. グルコース飢餓ストレスによる topo II α の分解

ヒト線維肉腫 HT1080 細胞を用い、グルコース飢餓ストレス環境下での topo II α の発現量をウェスタンブロット法で調べた(Fig 1)。その結果、ストレスによって topo II α の発現量が減少すること、また、プロテアソーム阻害剤 PSI によってこの発現低下が抑制されることが確認された。一方、topo II β の発現は変化しなかった。

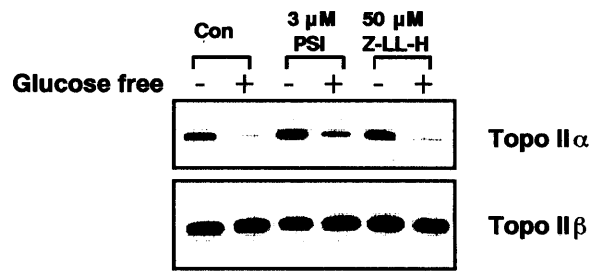


Fig. 1 Proteasome-mediated degradation of topo II α under glucose-free conditions

2. topo II α 欠失変異体の作製とストレスによる分解

グルコース飢餓ストレス下での topo II α の分解に必要なドメインを明らかにするため、種々の欠失変異体を作製した(Fig 2)。これらの欠失変異体を HT1080 細胞にトランスフェクションして発現させ、グルコース飢餓ストレス環境下での分解を検討した。その結果、C-末端側に存在する核移行シグナル(NLS2)あるいは N-末端側の ATPase ドメインを欠失させた変異体はストレスによる発現低下が起こらないことが明らかになった。一方、ATPase ドメインと NLS2 を含む変異体ではストレスによる分解が確認された(Fig 3)。従って、ATPase ドメインと NLS2 の両ドメインがストレスにより誘導される topo II α の分解に必要であると考えられた。

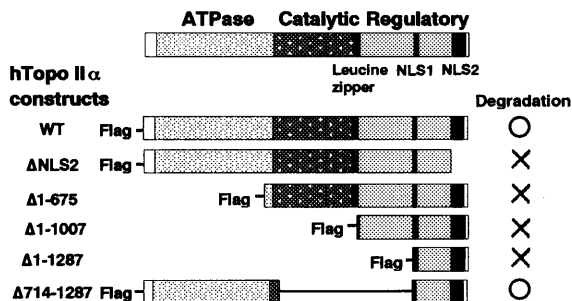


Fig.2 Schematic diagram of deletion mutants of hTopo II α

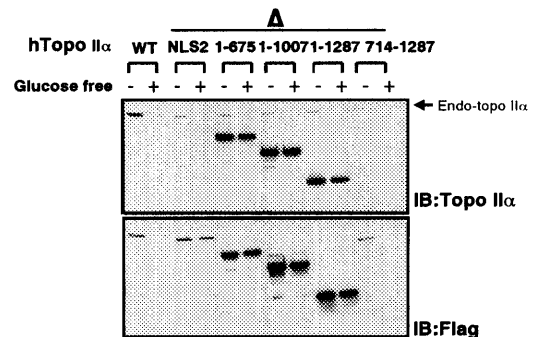


Fig.3 Degradation of hTopo II α deletion mutants under glucose-free conditions

次に、作製した topo II α の欠失変異体の細胞内における局在様式を免疫染色法で検討した。全長 topo II α 及び NLS2 を含む変異体は核に局在するが、NLS2 の欠失変異体は核への移行が起こらないことが明らかになった(Fig 4)。以上から、ストレスによる topo II α の分解は核内で起こることが示唆された。

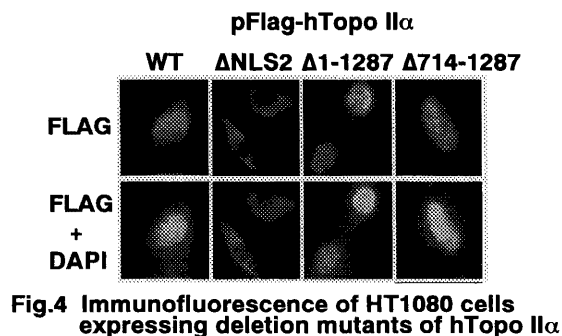


Fig.4 Immunofluorescence of HT1080 cells expressing deletion mutants of hTopo II α

3. topo II α の分解制御部位の同定

グルコース飢餓ストレスによる topo II α の分解制御に関与する部位を同定するため、ATPase ドメイン内の C-末端から欠失変異体を作製した(Fig.5)。ストレス環境下での分解誘導を検討した結果、ATPase ドメインの 1-140 アミノ酸が必要であることが明らかになった(Fig.6)。さらに、N-末端からの欠失変異体も作製して調べた結果、1-70 の欠失では分解が誘導されたが、1-125 の欠失では分解誘導が起こらないことが明らかになった。これらの欠失変異体を用いた検討の結果、ストレス環境下での topo II α の分解には ATPase ドメイン内の 70-140 のアミノ酸配列が重要な役割を担うことが明らかになった。

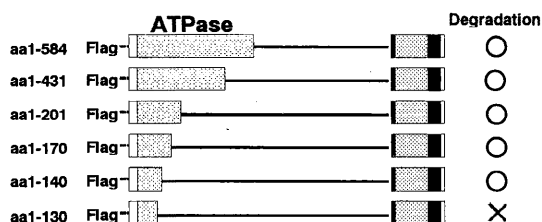


Fig.5 Constructs of C-terminal deletion mutants of hTopo II α ATPase domain

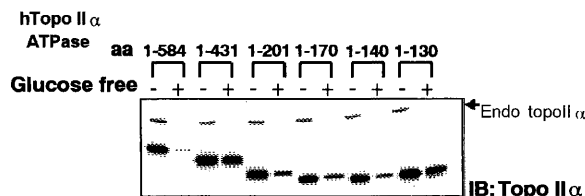


Fig. 6 Degradation of hTopo II α ATPase domain under glucose-free stress

- C-terminal deletion mutants -

さらに、同定した部位がストレスによる分解の制御ドメインとして働くことを確認するため、topo II α の 1-170 及び 70-170 アミノ酸配列と GFP との融合タンパク質を作製した(Fig.7)。なお、融合タンパク質の C-末端側には、核局在化させるために topo II α の NLS2 ドメインを付加した。これらの融合タンパク質を用いた解析の結果、コントロールの GFP は分解誘導が起こらないのに対し、topo II α 1-170 及び 70-170 を付加した GFP はストレス下で分解が誘導されることが明らかになった

(Fig,8)。

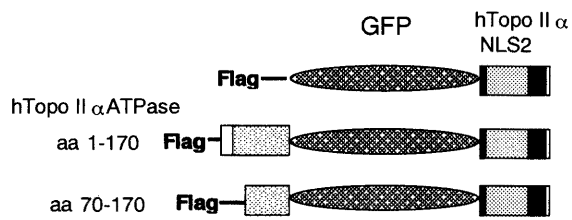


Fig.7 Schematic representation of fusion proteins containing hTopo II α ATPase and GFP

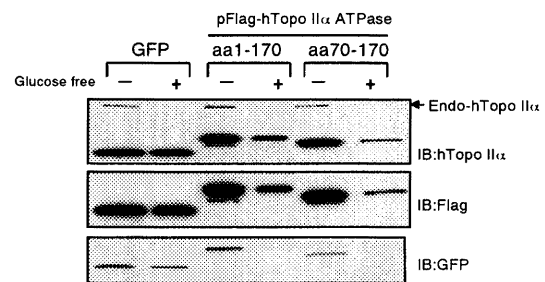


Fig.8 hTopo II α ATPase acts as a transposable degradation signal

「まとめ」

topo II α の種々の欠失変異体を用いた解析の結果、グルコース飢餓ストレスによる topo II α の分解には、topo II α の核局在化が必要であること、また従来 topo II α の制御ドメインと考えられてきた C-末端側ではなく N-末端側に存在する ATPase ドメインが重要な働きをしていることを明らかにした。さらに、70-170 番のアミノ酸配列が、ストレスによる topo II α の分解制御部位として機能することを明らかにした。この同定した部位の役割を詳細に解析していくことによって、topo II α のストレス下における分解機構が明らかになるとともに、それを制御する新たな抗がん剤耐性克服法の開発につながることを期待される。