

## 審査の結果の要旨

氏名 尹 志 洙

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 $\alpha$  (topo II $\alpha$ ) 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 $\alpha$ 標的抗がん剤は、反応中間体 topo II $\alpha$ -DNA の cleavable complex を安定化し細胞死を誘導する。そのため、topo II $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。そこで本研究では、ストレスによる分解誘導に重要な topo II $\alpha$ 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ドメインの解析を行った。

### グルコース飢餓ストレスによる topo II $\alpha$ 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 $\alpha$ の発現量をウェスタンブロット法で調べた。その結果、ストレスによって topo II $\alpha$ 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 $\beta$ の発現は変化しなかった。

### topo II $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。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。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 $\alpha$ の分解に必要であると考えられた。次に、作製した topo II $\alpha$ 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 $\alpha$ 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れないことが明らかになった。以上から、ストレスによる topo II $\alpha$ の分解は核内で起こることが示唆された。

### topo II $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。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。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れ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 $\alpha$ 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。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 $\alpha$ 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。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 $\alpha$ 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 は分解誘導が起これないのに対し、topo II $\alpha$  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。以上の解析から、グルコース飢餓ストレスによる topo II $\alpha$ の分解には、topo II $\alpha$ の核局在化が必要であること、また従来 topo II $\alpha$ 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、さらに、70-170 番のアミノ酸配列が、ストレスによる topo II $\alpha$ の分解制御部位として機能することが明らかになった。

本研究により、ストレス環境下で特異的に起こる topo II $\alpha$ の分解の制御部位が明らかになった。この部位の同定によって topo II $\alpha$ のストレス誘導の分解制御機構の詳細を明らかにすることが可能になるとともに、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。この成果は生命薬学における興味ある知見を明らかにしたものであり、博士（薬学）の学位を受けるに充分値するものと判断した。