

審査の結果の要旨

氏名 小玉 信之

細胞はゲノムDNAに損傷を受けると、細胞周期を停止させて損傷を修復したり、アポトーシスを起こして損傷を受けた細胞を排除しようとする。多くの抗がん剤は、DNAに損傷を与え、アポトーシスを誘導することがその作用メカニズムであることが明らかとなっている。DNA損傷後に活性化される細胞内シグナルとしてp53やJNK1/SAPK、Gadd45などが挙げられるが、実際の癌細胞の多くは野生型のp53を欠失しているため、p53に依存しないアポトーシスシグナル伝達経路を明らかにすることがより効果的ながん化学療法の開発に直接寄与するものと考えられる。これまでに、抗がん剤処理によって活性化するJNK1/SAPKはcaspaseの活性化を介してアポトーシスのシグナル伝達を制御していることが明らかにされている。一方、Gadd45はJNK1/SAPKの活性化因子であるという報告がなされ、抗がん剤処理により誘導されるアポトーシスシグナル伝達におけるGadd45の役割に興味をもたれた。しかしながら、Gadd45分子の抗がん剤処理による細胞内挙動についての報告はなされていない。

そこで本研究では、ともにp53が変異し、抗がん剤処理によるアポトーシス誘導に対し感受性の異なるヒト卵巣癌細胞株を用いて、抗がん剤エトポシド処理によるGadd45分子の誘導を検討し、蛋白翻訳後の制御機構に違いがあることを見出した。さらにGadd45分子が抗がん剤処理後、蛋白安定化されることを明らかにし、その分子機構について検討した。

1. 抗がん剤処理によるGadd45分子の誘導

ヒト卵巣癌細胞株であるOVCAR-3細胞は、抗がん剤処理によりアポトーシスが誘導される。一方、同じく卵巣癌細胞株であるOVCAR-8細胞はOVCAR-3細胞にアポトーシスを誘導する濃度の抗がん剤処理に対し耐性を示す。また、これら2つの細胞株はp53がともに変異していることが知られている。そこで抗がん剤処理によるp53非依存的なGadd45分子の誘導を検討するために、OVCAR-3およびOVCAR-8細胞を抗がん剤エトポシドで処理し、Gadd45分子の発現をRNAレベルおよび蛋白レベルにおいて経時的に検討した。その結果、RNAレベルでは抗がん剤の感受性の異なる両細胞においてGadd45分子の転写活性化がともに認められたが、蛋白レベルでは感受性の高いOVCAR-3細胞においてのみ、発現の誘導が認められた。これらの結果から、この抗がん剤に対して感受性の異なる両細胞においては、Gadd45分子の蛋白翻訳後の制御機構に違いがあることが示唆された。

2. 抗がん剤処理によるGadd45蛋白の安定化

次に、抗がん剤処理に対するGadd45分子の蛋白翻訳後の制御機構が存在するかを直接調べるために、外因的に導入したGadd45分子の発現を検討した。ヒト卵巣癌細胞株OVCAR-3細胞およびヒト胎性腎細胞293T細胞にFlagタグを付けたGadd45遺伝子を強制発現させ、外因性のGadd45 mRNAの発現が同程度認められる条件下で抗がん剤エトポシドを処理し、Gadd45蛋白量の経時変化を調べたところ、抗がん剤処理後12時間以降で、Gadd45蛋白の増加が認められた。このことから、抗がん剤処理によりGadd45蛋白が安定化することが明らかとなった。ここで、p53などの

DNA damageにより蛋白安定化する分子はDNA damage後にユビキチン-プロテアソーム系による蛋白分解に対して耐性を獲得することが知られている。そこで、Gadd45分子の蛋白安定化にもユビキチン-プロテアソーム系が関与しているかどうかを調べるためプロテアソーム阻害剤を用いた検討を行った。その結果、Gadd45蛋白量は抗がん剤未処理時、プロテアソーム阻害剤により増加したが、抗がん剤処理時においてはプロテアソーム阻害剤の有無に関わりなく同程度増加していた。この結果から、Gadd45蛋白は通常時においてはプロテアソームにより分解されており、抗がん剤処理時においてはプロテアソームによる分解に対し耐性を獲得することで蛋白が蓄積する可能性が示唆された。

3. 抗がん剤処理後のユビキチン-プロテアソーム蛋白分解系の変化

そこで抗がん剤処理によりGadd45蛋白がプロテアソームによる分解に対し耐性を獲得することを直接検討するため、抗がん剤処理による細胞内のユビキチン-プロテアソーム蛋白分解系への影響を検討した。この蛋白分解系において、標的蛋白はポリユビキチン化を受け、ポリユビキチン化を受けた蛋白がプロテアソームによって選択的に分解されることが知られている。そこでまず、プロテアソーム特異的蛍光基質を用いて細胞内のプロテアソーム活性を測定した。その結果、抗がん剤処理によるプロテアソーム活性の変化は認められなかった。次に細胞内におけるGadd45蛋白のユビキチン化を調べるために、タグとの融合蛋白として外因的に発現させたGadd45およびユビキチンをタグに対する抗体を用いて検討した。その結果、Gadd45とユビキチンをともに細胞内に導入したときに見られるポリユビキチン化のバンドが抗がん剤エトポシド処理時に消失した。この結果より、抗がん剤処理によるプロテアソーム蛋白分解系に対する耐性の獲得はGadd45蛋白のユビキチン化の減少に起因することが明らかとなった。

4. 抗がん剤処理によるGadd45蛋白のリン酸化

p53やATF2などDNA damageにより蛋白が安定化し蛋白量が増加、機能を発現することが知られる分子において、蛋白安定化の制御に蛋白自身のリン酸化が関与していることが報告されている。そこで、抗がん剤処理時にGadd45分子においても同様に蛋白のリン酸化が起きているかどうかを調べるために、Gadd45蛋白とGSTとの融合蛋白を作製し、これを基質としたIn vitro kinase assayを行った。その結果、GST-Gadd45融合蛋白を抗がん剤エトポシド処理した細胞のcell lysateと反応させたところ、Gadd45蛋白は用量依存的にリン酸化された。また、抗がん剤未処理のcell lysateによってはリン酸化されなかった。これらのことから抗がん剤処理により細胞内のGadd45キナーゼが活性化することが明らかとなった。また、この結果はリン酸化セリン認識抗体でも再現された。

5. 抗がん剤処理によるGadd45蛋白のリン酸化部位の同定と安定化との相関

次に、Gadd45分子のリン酸化部位について蛋白不安定化に関わるモチーフを中心に検討した。不安定な蛋白に見い出されることが知られているPEST配列は蛋白のアミノ酸シーケンスから解析することができるがGadd45分子にもこの配列が2箇所見い出された。また、DNA damage時においてSQ/TQ motifとなるセリン/スレオニン残基がリン酸化部位になりやすいことが知られているが、Gadd45蛋白においてSQとなる部位はPEST配列中に含まれる箇所を含めて3箇所見い出された。そこで、この3箇所のセリンをアラニンに各々置換したGST-Gadd45融合蛋白を作製し、抗がん剤処理したcell lysateによりリン酸化されるかどうか検討した。その結果、32番目のセリン残基

を置換したS32A変異体においてのみ、リン酸化の減少が認められた。また、細胞に外因的に発現させたGadd45蛋白に対しリン酸化セリン認識抗体を用いて検討した結果、細胞内においても抗がん剤処理時にGadd45蛋白にリン酸化されたセリンが認識され、S32A変異体におけるリン酸化の減少も再現された。これらの結果より、抗がん剤処理によりこの部位がリン酸化されることが明らかとなった。さらに、この抗がん剤処理における32番目のセリン残基のリン酸化と蛋白安定化との関係を明らかにするために、野生型および変異型Gadd45蛋白発現ベクターを作製し、細胞に導入後抗がん剤処理を行い、蛋白安定化が起こるかどうかが検討した。その結果、リン酸化を受けないS32A変異体において抗がん剤による蛋白安定化を受けないことが明らかとなった。以上の結果から、Gadd45蛋白の安定化には32番目のセリン残基のリン酸化が重要であることが明らかとなった。

以上本研究は、抗がん剤処理に対するGadd45蛋白の細胞内蛋白量制御に関し、今まで考えられていたようなRNAの転写レベルの制御だけでなく、蛋白レベルにおいてもDNA damageをリン酸化を介する細胞内シグナルとして直接受け取ることにより蛋白安定化を制御する分子機構が存在することを初めて明らかにしたものであり、Gadd45分子を標的とした新たな治療法の開発につながるものと期待される。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。