

論文の内容の要旨

題名 アポトーシス抑制分子 FLIP によるユビキチン-プロテアソーム系制御機能の解析

氏名 石岡 利康

【はじめに】

アポトーシスは核の凝集、断片化と、細胞の泡沫化を特徴とする細胞死の様式であり、その異常は、癌、神経変性疾患、自己免疫疾患等の原因の一つとなる重要な現象である。アポトーシスにおいては、DNA の損傷や Death Receptor へのリガンド等の刺激により、Caspase と総称されるシステインプロテアーゼの活性化を通じて、DNA の断片化や細胞の泡沫化といったアポトーシスに特徴的な変化が見られる。このアポトーシスのシグナル伝達カスケードの様々な点に制御因子が存在していることが知られているが、FLIP もそうしたアポトーシス制御因子の一つである。

FLIP_L は、Caspase-8 とホモロジーを有する分子量約 55,000 のタンパクである。しかし、FLIP_L は Caspase の活性中心に保存されているシステイン残基がチロシンに置き換わっているためにプロテアーゼ活性を持たない。このため、Fas 刺激によるアポトーシスの際に、Caspase-8 と競合して DISC (death-induced signaling complex)に取り込まれ、アポトーシスを抑制することが知られている。

しかし、FLIP のノックアウトマウスは、Caspase-8 や、同じく Death Receptor によるアポトーシスカスケードの上流分子である FADD のノックアウトマウスと同様に、心筋の発育不全のために胎生致死であり、発生には支障の無い Fas Receptor のノックアウトマウスとは表現型が異なる。これらの知見から、FLIP には Fas シグナル抑制以外の機能があると考えられてきた。実際に近年、FLIP_L の過剰発現により NF- κ B、MAPK などの、細胞の増殖・分化に関わるシグナルが増強されることが多く報告されている。

本研究では、FLIP_L の β catenin の ubiquitin 化阻害による Wnt シグナリング活性化、およびその機構の解明を目的として研究を行い、FLIP_L が β catenin のみではなく様々な分子のユビキチン-プ

ロテアソーム系による分解を抑制することを明らかにし、その分子機構の解析を行った。

【実験・結果】

FLIP_Lによるβ-catenin ユビキチン化阻害の解析

これまでに当研究室において、Yeast 内で FLIP が S100A10 と結合すること、293T 細胞において FLIP の共発現により S100A10 が蓄積することが明らかとなっていた。そこで、FLIP の高発現が同様に βcatenin の蓄積をするのではないかと予測し、解析をおこなった結果、FLIP_Lにより βcatenin が蓄積することが明らかになった (Fig.1-1)。通常、細胞質に存在する βcatenin は GSK3β によりリン酸化され、続いて ubiquitin 化を受けプロテアソームで分解される。そこで私は FLIP_L による βcatenin 蓄積の作用点について、GSK3β を共発現させて βcatenin の分解を亢進させた系で検討した。その結果、FLIP_L は βcatenin のリン酸化を阻害せず、それ以降の分解過程を阻害していることが分かった (Fig.1-2)。そこで次に、βcatenin の ubiquitin 化について検討したところ、FLIP_L との共発現により βcatenin の ubiquitin 化が顕著に阻害されていることが明らかとなった (Fig.1-3)。この時、FLIP_L の一過性発現、恒常性発現細胞 (stable clone 1 および stable clone 6) 共に、βcatenin の分解が阻害され (Fig.1-4A、1-4B)、また、FLIP_L の恒常性発現細胞では βcatenin 発現時に、親細胞に比べ、Tcf/ Lef 依存的転写活性の増強が見られた (Fig.1-5)。(論本文文中、第 1 章)

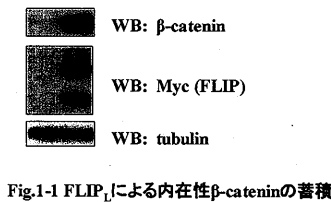


Fig.1-1 FLIP_Lによる内在性β-cateninの蓄積

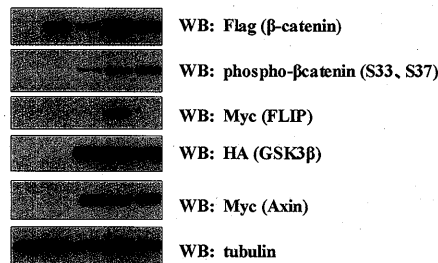


Fig.1-2 FLIP_Lによるリン酸化依存的β-catenin分解の阻害

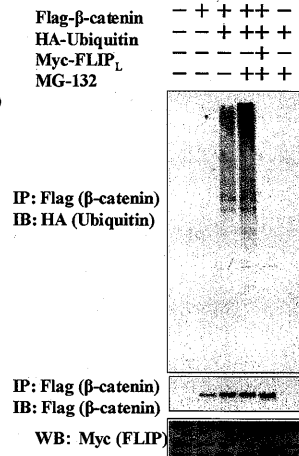


Fig.1-3 FLIP_Lによるβ-cateninのユビキチン化阻害

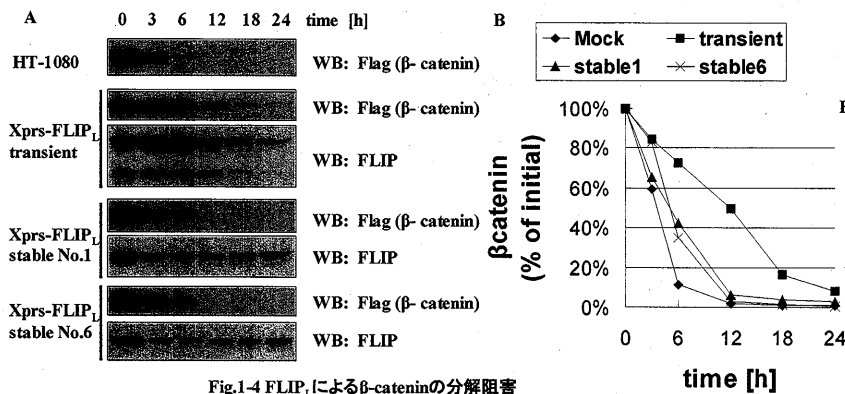


Fig.1-4 FLIP_Lによるβ-cateninの分解阻害
A. FLIP_Lとβ-catenin共発現時のβ-catenin量の経時変化
B. Aのβ-catenin量のグラフ

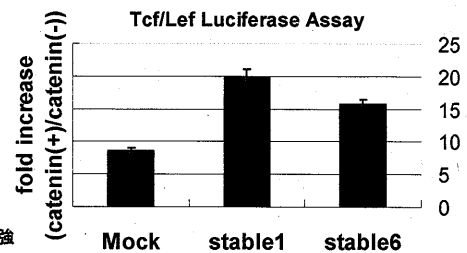


Fig.1-5 FLIP_L恒常性発現細胞でのTcf/Lef依存的転写活性の増強

FLIP_Lによる様々な分子のユビキチン化阻害

βcatenin 以外のタンパク質に対する FLIP_L の活性を調べるために、293T 細胞に様々なタンパク質と FLIP_L を共発現させ、タンパク量の蓄積を調べた。その結果、SCF 複合体 (E3ligase) でユビキチン化される βcatenin 以外にも、RING finger ドメインを持ち自己ユビキチン化活性を持つ XIAP、VBC 複合体 (E3ligase) でユビキチン化される HIF1α などでもタンパク量の蓄積が見られた (Fig.2-1)。またこの時、FLIP により HIF シグナルの活性化も観察された。

次に、これらの分子の ubiquitin 化について検討したところ、FLIP_L は、βcatenin と同様に、XIAP の自己 ubiquitin 化なども阻害することが分かった (Fig.2-2)。

これらのことなどから、FLIP_L による ubiquitin 化阻害は βcatenin に特異的なものではなく、細胞内の多くのタンパク質の ubiquitin 化を阻害することがわかった。

(論文本文中、第二章)

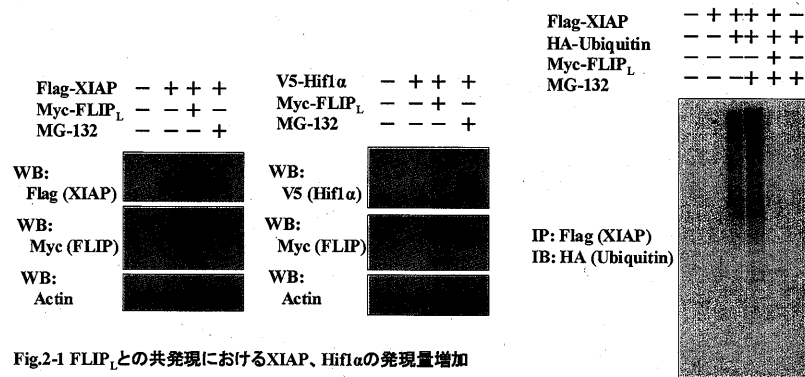


Fig.2-1 FLIP_Lとの共発現におけるXIAP、Hif1αの発現量増加

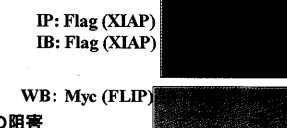


Fig.2-2 FLIP_Lとの共発現によるXIAPの自己ユビキチン化の阻害

FLIP_Lによるユビキチン化阻害の解析

FLIP_L によるユビキチン化阻害機構を明らかにするために、その局在について検討した。FLIP_L の一過性発現、GFP 標識した FLIP_L の恒常性発現細胞のどちらにおいても、FLIP_L は、細胞質の一部に集積する傾向が見られた (Fig.3-1)。

次に、ubiquitin の局在を調べるために、GFP タグ ubiquitin の恒常性発現細胞に FLIP_L を一過性発現させたところ、ubiquitin と FLIP_L の共局在が観察された (Fig.3-1)。また、FLIP_L を一過性発現させた細胞を、Multi-ubiquitin 抗体で免疫染色したところ、細胞質での ubiquitin 化タンパクが顕著に減少し、FLIP_L と多くの ubiquitin 化タンパクが共局在した (Fig.3-2)。

また、HA タグ ubiquitin を発現させた細胞を 0.1 % TritonX-100 を含むバッファーで可溶化して分画したところ、FLIP_L を共発現した細胞では、FLIP_L および ubiquitin 化タンパクの大部分は、TritonX 不溶性画分に認められた (Fig.3-3)。

これらのことから、FLIP_L の集積する場所での ubiquitin 化の亢進により、ubiquitin 化に必要な何らかの因子を奪うなどして、細胞質など他の場所での ubiquitin 化が抑えられるという機構が推測された。

(論文本文中、第三章)

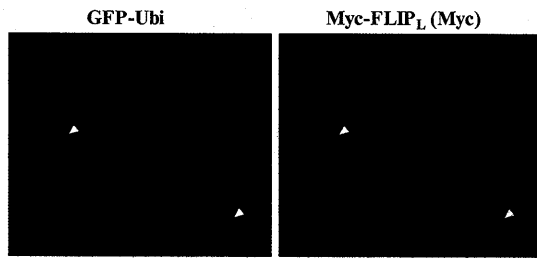


Fig.3-1 FLIP_Lとubiquitinの共局在

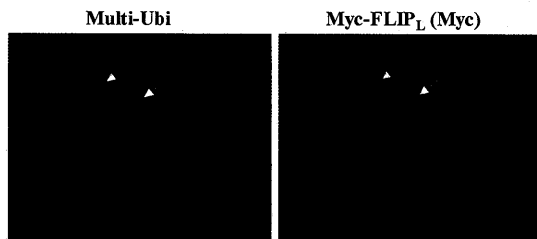


Fig.3-2 FLIP_L発現時のMulti-ubiquitin抗体による免疫染色

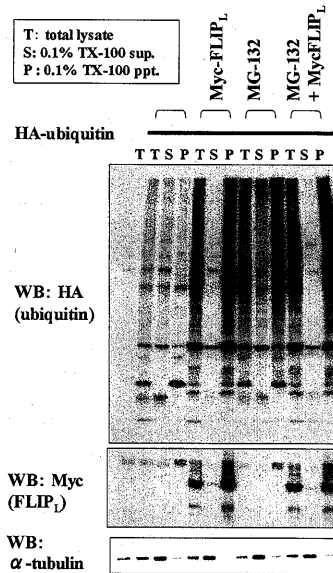


Fig.3-3 FLIP_L発現時のubiquitinの局在

内在性 FLIP_Lの機能

内在性 FLIP_Lの機能を調べるために、FLIP_Lの発現量が多い癌細胞を用いて検討した。

前述した FLIP_Lの局在について、FLIP_Lの発現量の多い卵巣癌細胞株 OVCAR5 と肺癌細胞株 A549 について検討した。細胞を、「核、細胞質、その他の不溶性画分」に分画して Western Blotting により FLIP の発現量を調べたところ、A549 細胞では FLIP_Lの大部分以上が不溶性画分に存在することが分かった (Fig.4-1)。

そこで、A549 細胞に、FLIP に対する short hairpin RNA (shRNA)を発現する pSilencer ベクターを導入して FLIP の発現量を低下させ、その際の Wnt-3a に対する応答を TCF 結合配列のレポーターアッセイで調べたところ、FLIP をノックダウンした細胞では Wnt-3a に対する応答性が低下した (Fig.4-2)。

また、FLIP により β catenin の蓄積と同様に、HIF1 α の蓄積、およびそのシグナルの活性化も観察されているため、ノックダウンを用いることで内在性 FLIP_Lの HIF シグナルに及ぼす影響を調べた。先ほどと同じ pSilencer ベクターを A549 細胞に導入して FLIP の発現量を低下させ、その際の HIF 活性を HIF 応答配列のレポーターアッセイで調べたところ、FLIP をノックダウンした細胞では HIF 活性が低下した (Fig.4-3)。

これらの結果から、FLIP_Lが不溶性画分に存在する A549 細胞では、内在性 FLIP_Lがユビキチン-プロテアソーム系を抑制することで、 β catenin および HIF のシグナルを増強していることが示唆された。

(論文本文中、第一章、第二章)

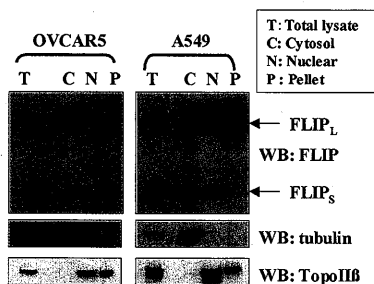


Fig.4-1 内在性FLIPの局在

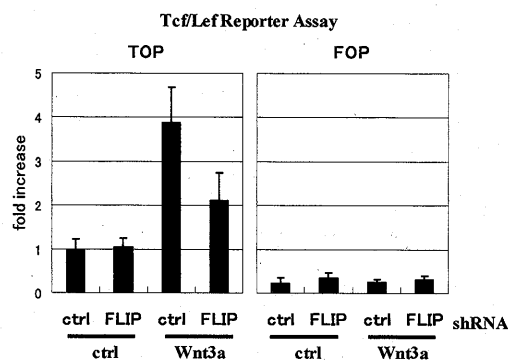


Fig.4-2 内在性FLIPをノックダウンした際のWnt応答性の減少

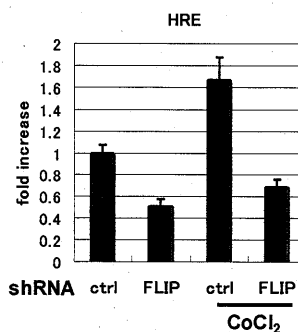


Fig.4-3 内在性FLIPをノックダウンした際のHIF活性の減少

【まとめ】

本研究では、FLIP が、従来のアポトーシス制御分子、NF-κB 活性化分子としての働き以外に、ユビキチン-プロテアソーム系の阻害活性を持つことを明らかにした。FLIP は ubiquitin 化を阻害することで、細胞質中の βcatenin や HIF1α を蓄積させ、Wnt シグナル、HIF1α シグナルの増強を引き起こす。FLIP はメラノーマ等多くの癌で過剰発現している例が報告されているが、Fas シグナリングの阻害によるアポトーシス抑制だけでなく、A549 細胞で見られたように、ユビキチン-プロテアソーム系の阻害によるタンパクの安定化を通して、βcatenin や HIF 等のシグナル系を増強することで、増殖・血管新生の促進など、癌細胞の悪性化に積極的に関与している可能性が考えられる。