

審査の結果の要旨

氏名 石岡 利康

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、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。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、その制御因子の一つとして近年、注目を浴びている分子の一つに FLIP がある。

FLIP_L は、Caspase-8 とホモロジーを有するタンパクであるが、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。FLIP のノックアウトマウスは、Caspase-8 や 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が、実際に近年、FLIP_L の過剰発現により NF- κ B 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。

FLIP は、多くの癌細胞でも発現上昇が知られており、従来は Fas シグナルの阻害によるアポトーシス抑制機能により癌細胞の悪性化に寄与していると考えられていたが、近年の、NF- κ B をはじめとする生のシグナル伝達にも関与するという複数の報告から、アポトーシス抑制以外の FLIP の機能解明に関心が持たれてきた。

本研究では、FLIP_L のアポトーシス抑制以外の機能、特に癌細胞における機能について、検討を行った結果、以下のような成果を得た。

1. FLIP_L による β -catenin のユビキチン化阻害、およびそのシグナル活性化

FLIP_L の一過性発現により β -catenin が蓄積すること、また FLIP_L の恒常性発現細胞株において β -catenin の発現量が増すことを明らかにした。この時、FLIP_L の一過性発現、恒常性発現のどちらにおいても、TCF 結合配列を用いたレポーターアッセイで Tcf/ Lef 依存的転写活性の増強が見られ、実際に FLIP_L の発現上昇が β -catenin の蓄積を介して下流のシグナルを増強することが確認された。その機構に関しては、FLIP_L により β -catenin の分解が阻害されること、その分解阻害は GSK-3 β によるリン酸化状態によらず、FLIP_L

が β -catenin のユビキチン化を直接阻害しているということを明らかにした。また、A549 細胞で FLIP のノックダウンを行い、その際に Wnt-3a に対する応答が低下すること (TCF/ β -catenin シグナルが低下すること)を、TCF 結合配列のレポーターアッセイを行うことにより明らかにした。これらの結果から、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、そのターゲットの一つとして β -catenin シグナルを増強していることが示された。

2. FLIP_Lによる様々なタンパクのユビキチン化阻害、およびそのシグナル活性化

FLIP によるユビキチン-プロテアソーム阻害機能に関して、 β -catenin 以外のタンパク質に対しても検討を行った結果、SCF 複合体でユビキチン化される β -catenin 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 複合体でユビキチン化される HIF-1 α などでもタンパク量の蓄積が見られた。またこの時、HIF-1 結合配列を用いたレポーターアッセイで HIF-1 α 依存的転写活性の増強が見られ、実際に FLIP_L の発現上昇が β -catenin のみならず、HIF のシグナルも増強することを確認した。この時、FLIP_L によって増加したユビキチンプロテアソーム系基質も、 β -catenin と同様にユビキチン化が阻害されていることも明らかにした。これらのことから、FLIP_L は細胞内の多くのタンパク質の ubiquitin 化を阻害し、ユビキチン-プロテアソーム系の活性を制御し得ることが示された。

また、A549 細胞で FLIP のノックダウンを行い、実際に HIF のシグナルが低下することを、HIF-1 結合配列のレポーターアッセイを行うことにより明らかにした。これらの結果からは、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、そのターゲットの一つとして HIF シグナルを増強していることが示された。

3. FLIP_Lによるユビキチン化阻害機構の解明

FLIP_L の一過性発現、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あることを見出した。また、腎癌細胞株 ACHN、卵巣癌細胞株 OVCAR5、肺癌細胞株 A549 といった FLIP_L 量の多い癌細胞の中でも、A549 細胞では、一過性発現時と同様に、内在性の FLIP_L も核や細胞質以外の不溶性画分に存在することを確認した。このとき、GFP タグ ubiquitin と免疫染色を用いることで、一過性発現させた FLIP_L と ubiquitin が共局在することが観察された。また、Multi-ubiquitin 抗体を用いた免疫染色では、FLIP_L の一過性発現により細胞質での ubiquitin 化タンパクが顕著に減少し、FLIP_L と ubiquitin 化タンパクが共局在することも観察された。このことは、タグ付き ubiquitin

を発現させた細胞を分画した際にも、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が Triton X に不溶性の画分に認められるという実験結果によっても支持された。これらのことから、FLIP_L の大量発現、あるいは他の何らかの因子により(A549 細胞のように)FLIP_L が集積した場合、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、ubiquitin や他の何らかの因子が奪われることで、細胞質や核での ubiquitin 化が抑えられるという新たな機構が示唆された。

以上、本研究において石岡利康は、FLIP_L がユビキチン化を阻害し、 β -catenin や HIF-1 α などの様々なタンパクを蓄積させ、Wnt シグナル、HIF シグナルといった癌細胞の増殖・悪性化に重要なシグナル系を増強していることを明らかにした。この成果は、細胞癌化のメカニズムを理解する上で重要な知見であり、また新しい癌の治療薬開発に有用な示唆を与えるものであり、博士（薬学）の学位に値するものと判断した。