

審査の結果の要旨

氏名 片山 量平

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、自己免疫疾患等につながる重要な現象である。アポトーシスでは細胞への刺激によって生じるシグナルが、細胞内を伝達し一連の分子群を介して、Caspase と総称されるシステインプロテアーゼの活性化を伴い細胞死を引き起こす。このカスケードには様々なアポトーシス抑制分子が存在しており、細胞死の誘導にバランスをとっている。Fas や TNF による Death Receptor を介したアポトーシスにおいては FLIP がアポトーシス抑制分子として働いていることが知られている。

FLIP は約 55kDa の蛋白質であり、Caspase8 と高いホモロジーを有する。しかし、Caspase の活性中心に対応するシステイン残基がないために、Fas シグナリングにおいて、Caspase8 と競合し、Caspase 活性化を阻害することでアポトーシスを抑制する。しかし FLIP のノックアウトマウスは Caspase8 や FADD のノックアウトマウスと同様、胎生致死であり、その原因がいずれも心筋の発育不全であること、また一方、Fas のノックアウトでは発生に支障はないこと等のこれまでの報告から、FLIP には Fas シグナリング阻害以外の機能があると推測される。

また、βカテニンはあらゆる細胞に遍く発現する約 92KDa の蛋白質である。カドヘリンの裏打ち分子として細胞接着において重要な役割をしている。それと同時に Wnt シグナルのメディエーターとして発生における器官形成や細胞の癌化に重要な役割をすることが知られている。細胞質に存在する βカテニンは通常すみやかにユビキチン-プロテアソーム系で分解されているが、Wnt シグナルが入ることでその分解が抑制され、下流の転写活性化がおこる。この βカテニン分解系の異常は細胞の癌化にとって、重要なステップであると考えられている。

本研究では、FLIP の未知機能を βカテニンとの関連に着目して解析することによって以下の成果を得た。

1. FLIP による βカテニンの蓄積とそのメカニズム

293T 細胞に βカテニンのみを遺伝子導入すると、分解が早く蛋白質発現量は少ないが、全長型 FLIP (FLIP-L) と βカテニンを共発現させると、βカテニンの蓄積が非常に顕著に見られた。そこで次に、FLIP の各種欠損変異体および splicing variant である FLIP-S を用いて同様の検討をした結果、FLIP の N 末端 DED ドメインに βカテニン蛋白質蓄積の活性があることが確かめられたが、特に FLIP-L に、強い活性が見られた。さらに、内在性の βカテニンに対しても FLIP が蓄積する作用を示すかどうかを調べた結果、内在性の βカテニンに対しては FLIP-L のみが βカテニンを蓄積する活性を示し、

その他の欠損変異体では見られなかった。この結果から、FLIPはそのDEDドメインでβカテニンの蓄積をひきおこし、その活性はFLIP-Lが最も強いことが明らかになった。そこで次に、このFLIPによるβカテニンの蓄積のメカニズムを解析した結果、ユビキチン化の阻害によるものであることが明らかとなった。

2. FLIP-Lによるβカテニンの局在変化とTcf転写活性化

分解系の異常やWntシグナリングにより蓄積したβカテニンは核に移行し、Tcf転写活性化を誘導する。そこでまず、FLIP-Lにより蓄積したβカテニン核移行しているかについて、免疫染色により検討した。その結果FLIP-Lの一過性発現によってβカテニンが増加し、一部が核に移行している様子が見られた。次に、その下流のTcf転写活性化が誘導されているかどうかについてレポーターアッセイにより検討した。その結果、FLIP-Lの遺伝子導入により顕著なTcf転写活性化が観察された。が、その他のFLIP variantsでは転写活性化は観察されなかった。また、βカテニンとFLIPとを共発現した場合はβカテニンのみの発現に比べTcf転写活性が更に増強した。しかし、C末欠損変異体およびFLIP-Sにおいては、転写活性のさらなる増強は見られなかった。FLIP-Sや他の欠損変異体はβカテニンの共発現によりβカテニンの蓄積が見られるにもかかわらず、Tcf転写活性の増強がみられないことから、FLIP-LによるTcf転写活性化は、βカテニン蛋白を細胞質に蓄積するだけでなく、何らかの転写活性化を増強する機能も重要であると考えられた。

このFLIP-Lによって生じるβcatenin/Tcf転写活性化をより生理的に近い条件で見るために、FLIP-LおよびそのスプライシングバリエーションであるFLIP-Sの恒常性発現株をそれぞれ作製した。これらの細胞は一過性に過剰発現したFLIPと比べ、約1/50のFLIPを恒常的に発現した。この恒常性発現株はFLIP-L, SともにFas刺激によるアポトーシスに強い抵抗性を示し、FLIPがFasシグナルを阻害することが確認された。これらの細胞をWnt3aで刺激すると、FLIP-Lを高発現する細胞でのみ、Tcf転写活性の増強がみられた。さらに内在性のFLIPにもWntシグナルを制御する機能があるかどうかを明らかにするために、FLIPを比較的高発現しWnt3a感受性がみられた肺腺癌細胞A549を用いて、内在性FLIP蛋白をshort hairpin RNA (shRNA)によりノックダウンし、Wnt3aに対する感受性を調べた。その結果、FLIPをノックダウンした細胞ではWnt3aによるTcf転写活性が減弱した。これらの結果から、A549細胞では、内在性FLIPがWntシグナリングを増強していることが示唆された。

3. *in vivo*でのFLIP-Lの機能

Wntシグナルは発生過程において体軸の形成にも重要な機能を果たしていることが知られており、カエルの卵割期において将来腹側になる領域にWntシグナルのメディエーターを微量注入すると二次体軸が形成されることが知られている。そこで、FLIPによるWntシグナルの増強が*in vivo*の系でも見られるか検討するために、FLIPのmRNA

を *Xenopus Embryo* 4細胞期の腹側赤道面に微量注入した。その結果、頻度は低く、不完全ではあるが二次体軸の形成が見られた。さらに、FLIP の mRNA をごく少量の β カテニンとともに微量注入すると、 β カテニン単独に比べ、二次体軸の形成頻度が上昇した。また、FLIP-S やその他の欠損変異体では二次体軸の形成は全く見られなかった。

この二次体軸の形成が Wnt シグナルの増強によるものかを調べるために、*Xenopus* 胚の動物極 (animal cap) を用いて Tcf 転写活性化をルシフェラーゼアッセイで検討した。その結果、FLIP-L の用量依存的に転写活性の上昇が見られた。これらの結果から、FLIP-L による Wnt シグナリングの増強は *in vivo* の系においても確認された。

4. FLIP-L による Wnt シグナル増強の分子機構解析

FLIP が Wnt シグナリングを増強するという新しい機能について、分子メカニズムを明らかにするために、FLIP のどのドメインが Wnt シグナリング活性化に重要なのかについて検討した。C 末端側を 42 アミノ酸短くした変異 FLIP ($\Delta 438$) には Tcf 転写活性化能がなかったことから、C 末端近傍の領域が FLIP-L による Wnt シグナル増強に関与することが推測された。そこで C 末のアミノ酸配列を解析した結果、核移行シグナル (NLS) に類似した配列があることを見出した。このことから、これまで細胞質蛋白質と考えられてきた FLIP が、核にも局在する可能性を考え、FLIP を高発現する癌細胞を細胞質、核に分画した。その結果、FLIP-L は細胞質、核の両方に存在するのに対し、FLIP-S は細胞質画分に存在することを見出した。次に、FLIP-L の C 末端近傍に存在する NLS 類似配列の変異体を作製し、細胞内での局在を調べた。その結果、これらの変異型 FLIP-L はいずれも核への局在がほとんど見られなくなった。そしてこれらの変異型 FLIP-L では Tcf 転写活性化能がなくなったことから、FLIP-L の核局在が Wnt シグナルの増強に関与する可能性が示唆された。そこで、FLIP-L の N 末端側に核外排出シグナル (NES) を付加した NES-FLIP-L を作製し、まず細胞内での局在を調べた。その結果、NES-FLIP-L は主に細胞質に局在することが確認された。次に NES-FLIP-L の Tcf 転写活性化能について調べた結果、この NES-FLIP-L は、exogenous な β カテニン蛋白質を蓄積する活性は野生型の FLIP-L と全く同等に観察されたにもかかわらず、Tcf 転写活性化能は明らかに減弱していた。以上の結果から、FLIP-L の局在制御 (核局在) が FLIP-L による Tcf 転写活性化という機能にとって重要であることが強く示唆された。

以上、本研究はこれまでアポトーシスを阻害する分子として考えられてきた FLIP が β カテニンのユビキチン化を阻害し、Wnt シグナルを増強することを明らかにした。この成果は、FLIP の生理機能を解明する上で重要な知見であり、また、細胞の癌化における FLIP 分子の機能の新たな一面を見出したものであり、博士 (薬学) の学位に値するものと判断した。