

論文の内容の要旨

Analysis of the degradation of tumor suppressor proteins through ubiquitin proteasome system by HPV E6 oncoprotein

ヒトパピローマウイルスの E6 癌蛋白によるユビキチンプロテアソームシステムを介する癌抑制蛋白分解のメカニズムについての解析

指導教員 武谷 雄二 教授

東京大学大学院医学系研究科
平成 15 年 4 月入学

医学博士課程
生殖発達加齢医学専攻

松本 陽子

【背景】 子宮頸癌は世界的に見て女性が罹患する癌の中では 2 番目に発生率の高い癌であり、多くの疫学的、基礎的研究をもとに、子宮頸癌発生の原因は **high-risk** 型のヒトパピローマウイルス (HPV) であることが知られている。HPV は 100 種類ほど存在し、子宮頸癌の原因となる 16 型や 18 型をはじめとする **high-risk** 型、良性の腫瘍であるコンジローマ発生の原因となる 6 型や 11 型などの **low-risk** 型などがある。HPV は約 8000bp の 2 本鎖 DNA ウイルスで、genome 内には E6、E7 癌遺伝子が含まれており、この癌遺伝子が子宮頸部上皮に感染すると細胞の DNA と組み換えを起こし、発癌すると考えられている。E7 癌蛋白質は Rb(retinoblastoma susceptibility) 癌抑制蛋白質と結合し、その働きを阻害するこ

とで癌化を促進する。Rb は核内蛋白で S 期の DNA 合成を促進する E2F の働きを止めることで、cell cycle を調節している。E6 癌蛋白質はユビキチンプロテアソームシステム (ubiquitin proteasome system) を介した細胞内の蛋白分解システムを利用し、細胞のアポトーシス誘導や cell cycle に関わる p53 などの癌抑制蛋白を分解する。ユビキチンはユビキチン活性酵素からユビキチン結合酵素に運搬され ubiquitin protein ligase である E6AP へと運ばれる。E6 は E6AP と標的癌抑制蛋白と 3 量体を形成し、ユビキチンが E6AP から、E6 と結合した p53 などに付加される。複数個のユビキチン分子が結合した p53 は、プロテアソームと結合しその内部に搬入し分解されると考えられている。

p53 以外に E6 による分解のターゲットとなるものとしては、hDlg や human Scribble (hScrib) などがある。hDlg や hScrib はショウジョウバエの癌抑制蛋白質である Discs large (Dlg) および Scribble のヒトホモログである。hScrib と hDlg は E6 蛋白が C 末端で特異的に結合する PDZ domain を持つという構造上の共通点がある。また hDlg、hScrib 共に細胞の極性の決定に関わるとされている癌抑制蛋白で、細胞内では両者は細胞膜に colocalization する。

E6 蛋白には Cys-X-X-Cys モチーフが 4 箇所あり、それらが金属結合を形成している。結合部分の間には 29 のアミノ酸があり二つのループ状になっている。また、E6 蛋白の C 末端のスレオニン、グルタミン、ロイシンの 3 塩基の配列は非常に特徴的で、16 型や 18 型など high-risk の HPV ではすべて C 末端が T/S-X-L/V (スレオニンもしくはセリンとアミノ酸 X、ロイシンもしくはバリン) という配列になっている。癌抑制蛋白である hDlg や hScribble が持っている PDZ domain と E6 の末端 3 塩基が結合することにより、high-risk の E6 蛋白は hDlg や hScrib などの癌抑制蛋白を分解する。

【目的】 E6による p53 および hScrb の分解には E6AP が ubiquitin protein ligase として関与していることが示されているが、hDlg の分解に関与する ubiquitin protein ligase は明らかにされていない。本研究ではまず hDlg の分解への E6AP の関与について検討した。また、HPV E6 による細胞の癌化には p53 をはじめ複数の重要な癌抑制蛋白が関与しており、他にもユビキチンプロテアソームシステムを介した分解の標的蛋白が存在し、発癌に関与していることが考えられた。そこで新規の分解標的癌抑制蛋白を同定し、子宮頸癌発生のメカニズムのさらなる解明を進めた。

【方法】 hDlg の分解への E6AP の関与を検討するため、E6 と E6AP との結合に関与していると考えられる E6 のループ部分のアミノ酸 18 箇所を一つ一つ違うアミノ酸に変異させた 18 種類の変異導入 E6 蛋白を作った。18 種類の E6 ミュータントを *in vitro* で RI ラベルして発現させ、E6AP との結合の有無および hDlg の分解の有無を調べた。また、*in vitro* での hDlg 分解能が *in vivo* でも一致するかを調べるため、HPV negative で hDlg の発現量が非常に少ない子宮頸癌細胞株である C33a に hDlg と代表的ないくつかの mutant E6 を導入し、Westernblotting にて hDlg の発現量を比較した。さらに E6 陽性の子宮頸癌細胞株である、CaSKi, SiHa, Hela で E6 もしくは E6AP の発現を SiRNA により抑制し、hDlg の発現量を検討した。

次に新規の分解標的癌抑制蛋白を細胞の抽出液から GST fusion E6 を用いて pull down 法にて E6 の結合蛋白を単離した。ゲルから目的の蛋白のバンド部分を切り出し、PMF analysis により、新規標的蛋白である DBC-1 (deleted in breast cancer-1)を同定した。また、DBC-1 の分解が p53 などと同様に ubiquitin proteasome system を介した E6-E6AP complex の分解標的蛋白であるかを検討するため。E6 による DBC-1 の分解を *in vitro*, *in*

vivo で調べた。また、16 型や 18 型などの high-risk 型および low-risk の 6 型 E6 蛋白と DBC-1 との結合を pull down 法にて解析した。E6AP が存在するウサギ網状赤血球上清もしくは E6AP が存在しない小麦胚芽をもちいて発現させた E6 蛋白と DBC-1 を反応させ、DBC-1 の分解能を in vitro で解析し、E6AP の関与を検討した。また in vitro ubiquitination や HPV positive の CaSki 細胞に proteasome inhibitor を作用させて DBC-1 の回復を確認し、ubiquitin proteasome system の関与を検討した。

【結果と考察】 E6 のミュータントを E6AP で pull down すると、ミュータントは E6AP に結合するもの、弱い結合を示すもの、結合しないものに分けられた。さらに RI でラベリングした p53 や hDlg、hScrib と各々の E6 ミュータント、E6AP を混ぜて反応させ、時間の経過とともに p53 などが分解され少なくなっていくかどうかを調べた。ミュータントは 3 種類の癌抑制蛋白を分解するもの、3 種類とも分解能が減弱しているもの、または 3 種類とも分解しないものに別れ、このグループ分けは E6AP との結合の強弱と一致した。また、in vivo でも、hDlg の分解能は in vitro の結果と一致した。さらに E6 陽性の子宮頸癌細胞株で E6 もしくは E6AP の発現を SiRNA により抑制すると、ともに hDlg の発現が増加した。この研究により、既存の p53 や hScrib に加え、hDlg の分解においても E6AP が ubiquitin protein ligase として関与している可能性が示された。

E6 による新規の分解標的癌抑制蛋白として乳癌細胞で高頻度に欠失が認められる 8 番染色体短腕 21 に存在する *dbc-1*(deleted in breast cancer 1)遺伝子産物である DBC-1 を同定した。

E6 による DBC-1 の分解は in vitro, in vivo 共に認められた。また、16 型や 18 型などの high-risk 型および low-risk の 6 型 E6 蛋白と DBC-1 との結合を pull down 法にて解析し

たところ、high-risk 型 E6 とのみ結合する p53 や hDlg, hScrib などとは異なり、DBC-1 は low-risk 型とも弱い結合を示した。また DBC-1 は E6AP が存在するウサギ網状赤血球上清で発現させた場合のみ E6 蛋白により分解を受けた。また DBC-1 が in vitro でユビキチン化を受けることも示された。さらに HPV 陽性の CaSki 細胞に proteasome inhibitor を作用させると DBC-1 の回復が確認された。これらの結果から DBC-1 の分解に ubiquitin proteasome system の関与が示された。

この研究から、DBC-1 は low-risk の E6 と弱く、high-risk の E6 と強い結合能をもち、E6AP を ubiquitin protein ligase とする ubiquitin proteasome system を介した HPV E6 の新規分解ターゲット蛋白であることが示された。

現在 DBC-1 の機能についてはほとんど説明がなされていないが、DBC-1 と同じ領域に存在し、高率に乳癌細胞で欠失が認められる DBC-2 は癌抑制蛋白として細胞周期やアポトーシスなどに関与しているという報告がある。また、TNF などの caspase 依存型のアポトーシスを細胞に誘導した際に、DBC-1 の N 末端部の核移行シグナルを含む部分が切断され、DBC-1 は核から細胞質に移動しミトコンドリアに集積するという報告がある。

HPV E6 による DBC-1 の分解と、子宮頸部発癌メカニズムとの関連を検討するために C33a 細胞の培養液に caspase-9 や caspase-3 依存型のアポトーシスを起こすエトポシドを添加してアポトーシス誘導型の細胞傷害を起こし、DBC-1 の局在の変化を蛍光抗体染色法で解析した。エトポシドの添加によっても DBC-1 は核内からミトコンドリアに集積することが明らかになった。Caspase によるアポトーシスのシグナル伝達は多くの場合ミトコンドリアを介することなどから、DBC-1 は caspase による修飾でアポトーシス関連癌抑制蛋白としての機能が活性化されると考えられている。HPV E6 癌蛋白および E6AP に

よる DBC-1 の分解は、ミトコンドリアで起こるアポトーシス経路を阻害することで子宮頸癌の発生に関与している可能性が示された。

以上の研究から、子宮頸癌の原因である HPV の発癌のプロセスには E6 癌蛋白による複数の癌抑制蛋白分解が重要な役割を担っており、E6 は細胞内の蛋白分解システムである ubiquitin proteasome system を利用して ubiquitin protein ligase である E6AP と標的蛋白と結合し、ターゲットを分解する。細胞周期やアポトーシス誘導に関与する p53、細胞の極性や構造維持に関わる hDlg や hScrib、アポトーシス実行のプロセスに関与する DBC-1 など細胞、組織の恒常性を維持している様々な種類の重要蛋白を標的としていることが明らかとなった。