

## 論文の内容の要旨

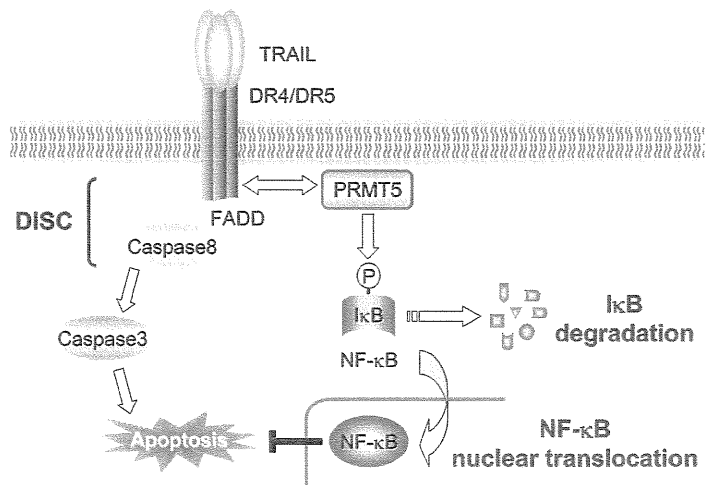
論文題目 新規 DR4 結合タンパク質 PRMT5 による TRAIL 誘導性細胞死の制御

氏名 田中 浩

### <序論>

Tumor necrosis factor (TNF) スーパーファミリーのサイトカインは、細胞増殖、アポトーシス、炎症、発生などにおいて重要な役割を果たす。中でも、TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は、TNF- $\alpha$ や Fas などと異なり、腫瘍細胞に対し選択的にアポトーシスを誘導する。さらに、TRAIL は動物モデルにおいても顕著な毒性なしに抗腫瘍効果を示し、がん治療への臨床応用が期待される。リコンビナント TRAIL や、その受容体を標的としたモノクローナル抗体は現在臨床試験第 I 相および第 II 相にある。しかし、一部のがん細胞は TRAIL に対し耐性を示すことも知られている。

TRAIL は受容体である death receptor 4 (DR4) または DR5 との結合により、細胞内において FADD や caspase-8 などからなる death-inducing signaling complex (DISC) の形成を誘導することでアポトーシスを引き起こす。一方、TRAIL はアポトーシスシグナルだけでなく、抗アポトーシス性の転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化することも知られており、NF- $\kappa$ B 経路の阻害は TRAIL による細胞死を増強する。細胞内の NF- $\kappa$ B は通常、I $\kappa$ B との結合によって細胞質にとどめられている。細胞がサイトカイン刺激を受けると、IKK 複合体により I $\kappa$ B がリン酸化される。リン酸化を受けた I $\kappa$ B はユビキチンプロテアソーム系によって分解され、遊離した NF- $\kappa$ B は核へと移行し、アポ



トーシス抑制に働く標的遺伝子群を転写誘導する (1)。TRAIL が誘導する細胞死はこれら両経路のバランスによって制御されると考えられている。私はこれまでに、PDK1 が IKK $\beta$  を介して NF- $\kappa$ B を活性化することで TRAIL 耐性に寄与することを明らかにした (2)。

タンパク質のアルギニン残基は protein arginine methyltransferase (PRMT) によってメチル化されることが知られており、このメチル化はシグナル伝達や RNA プロセッシング、転写制御などに関わっている。PRMT5 は、histone のメチル化を介してクロマチンを再構築し、転写抑制へと導くことが報告されているが、豊富に存在する細胞質での機能は未解明である。また、一部の胃がんやリンパ腫での高発現と、そのトランスフォーメーション促進能から、がんへの関与も想定される。

私は TRAIL による細胞死誘導経路の解明を目的として、TRAIL 受容体の結合タンパク質を探索した結果、PRMT5 を見出した。さらに PRMT5 は NF- $\kappa$ B の活性化に寄与することで、TRAIL 誘導性アポトーシスを負に制御することを明らかにした (3)。

## <方法・結果>

### 1. PRMT5 は DR4/DR5 と選択的に結合する。

まず、FLAG タグならびに His タグを持つ DR4 を HeLa 細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体と Ni カラムによって DR4 複合体を精製した。複合体に含まれるタンパク質を質量分析にて解析した結果、新規 DR4 結合因子として PRMT5 を同定した。過剰発現系での免疫沈降実験において、PRMT5 は DR4 だけでなく DR5 と結合したが、TNFR1 および Fas とは共沈が見られなかった (Fig. 1A)。さらに、細胞内在性の PRMT5 と DR4 との相互作用も確認された (Fig. 1B)。

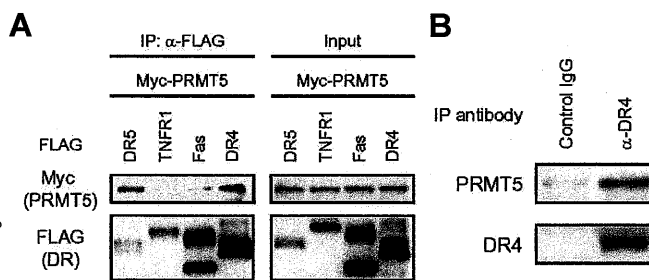


Fig. 1 (A) PRMT5 と TNFR スーパーファミリーとの結合 (B) 内在性 PRMT5 と DR4 の結合

### 2. PRMT5 による TRAIL 誘導性細胞死の抑制

次に、PRMT5 の TRAIL 感受性への関与を明らかにするために、siRNA を用いて PRMT5 をノックダウンし、TRAIL 処理時の細胞生存率を MTS 法によって測定した。Fig. 2A のように、PRMT5 を標的とする siRNA を導入した HeLa 細胞では TRAIL による細胞毒性が増加した。また、この感受性化は、caspase 阻害剤 Z-VAD の添加によって消失することと、Annexin V 染色の亢進を伴うことから、アポトーシスの促進であると考えられる。PRMT5 のノックダウンは、用いた全てのがん細胞株で同様の感受性化を引き起こしたが、正常線維芽細胞株では感受性化は認められなかった。さらに、PRMT5 を安定発現する HCT116 細胞を樹立したところ、TRAIL への耐性を示した (Fig. 2B)。以上より、がん細胞において PRMT5 は TRAIL が誘導する細胞死を抑制していることが明らかになった。

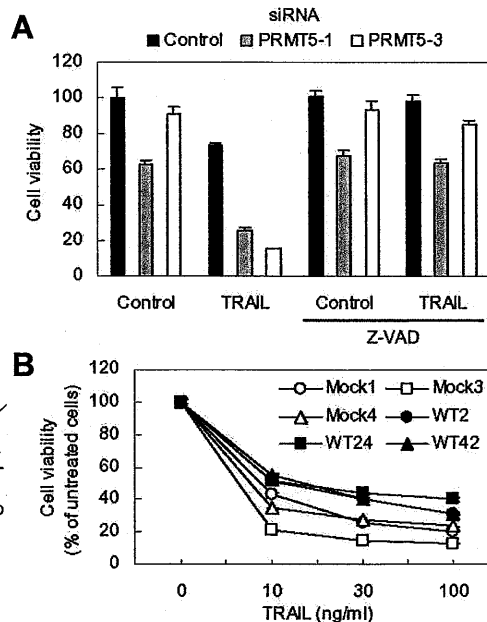


Fig. 2 (A) PRMT5 への siRNA による TRAIL 感受性化 (B) PRMT5 安定発現細胞での TRAIL 耐性化

### 3. TRAIL による NF- $\kappa$ B 活性化は PRMT5 に依存する。

2.で見られた TRAIL 感受性の変化の機構について検討した。DR4/DR5 の発現には変化がなかったため、DR4 を安定発現する HT1080 細胞を用いて TRAIL 刺激による DISC 形成を調べた。DR4 と共沈する FADD には差がなかったが、PRMT5 ノックダウン時には TRAIL が誘導する I $\kappa$ B $\alpha$  分解が阻害されることを見出した (Fig. 3A)。詳しく解析した結果、この I $\kappa$ B $\alpha$  分解阻害は、上流の IKK 複合体のキナーゼ活性抑制に起因することと、TNF- $\alpha$  処理時には見られず、TRAIL 刺激選択的であることが示唆された。次に、I $\kappa$ B $\alpha$  の下流に位置する NF- $\kappa$ B の活性化をレポーターアッセイによって定量した。I $\kappa$ B $\alpha$  の分解と一致して、TRAIL による NF- $\kappa$ B 活性化は PRMT5 ノックダウンにより顕著に減弱したが、TNF- $\alpha$  刺激では大きな変化は見られなかった (Fig.

3B)。さらに、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子として知られる IAP ファミリーに注目し、定量 RT-PCR を行った。その結果、TRAIL による cIAP1 および cIAP2 mRNA の発現誘導が、PRMT5 siRNA によって抑制されることが示された。加えて、cIAP2 はタンパク質レベルにおいても、TRAIL による発現誘導と、PRMT5 ノックダウンによるその誘導の抑制を呈した。

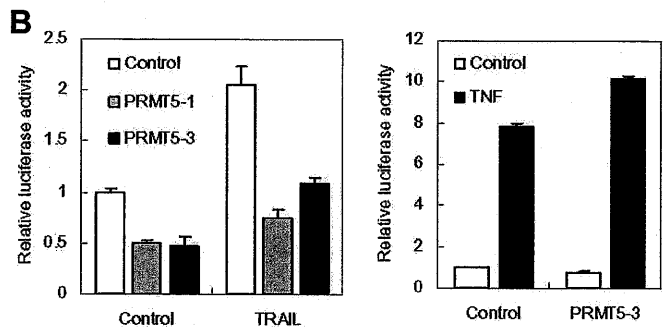
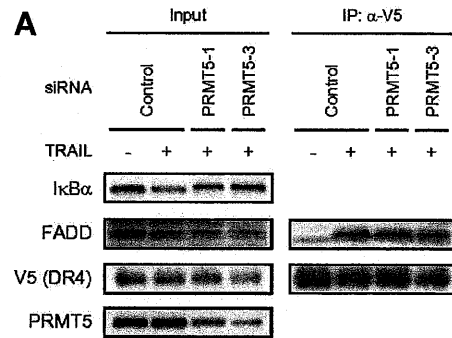


Fig. 3 (A) TRAIL 刺激時の DISC 形成と I $\kappa$ B $\alpha$  分解  
(B) TRAIL または TNF- $\alpha$  による NF- $\kappa$ B 活性化

### 4. PRMT5 は NF- $\kappa$ B を介して TRAIL 誘導性細胞死を抑制する。

3.で示したような NF- $\kappa$ B 活性の低下が TRAIL 感受性に寄与するかどうかを確認するため、IKK 阻害剤である BMS-345541 を用いた。Fig. 4A にあるように BMS-345541 存在下の HeLa 細胞では、確かに TRAIL の細胞毒性の増強が見られ、加えて、TNF- $\alpha$  処理においても生存率が低下した。これに対して、PRMT5 への siRNA は前述のように TRAIL への感受性化を引き起こすものの、TNF- $\alpha$  の毒性には大きな影響を与えなかった (Fig. 4B)。同様の結果は、HeLa 細胞以外の用いた全てのがん細胞株においても観察された。従って、I $\kappa$ B $\alpha$  の分解および NF- $\kappa$ B の活性化に対する阻害効果と同様に、PRMT5 のノックダウンは TRAIL が誘導する細胞死を選択的に増強することが示された。最後に、PRMT5 の下流における NF- $\kappa$ B 経路の重要性を解明するために、PRMT5 をノックダウンした HT1080 細胞に GFP タグを付加した活性化型の IKK $\beta$  を遺伝子導入し、TRAIL 処理を行った。核の凝縮および断片化を指標としてアポトーシスを定量したところ、PRMT5 のノックダウンにより過半数の細胞がアポトーシス様の染色像を呈したが、活性化型 IKK $\beta$  の発現はこのアポトーシスを大幅に減少させた (Fig. 4C)。これらの結果から、PRMT5 は NF- $\kappa$ B の活性化を介して TRAIL によるアポトーシスを阻害していることが考えられる。

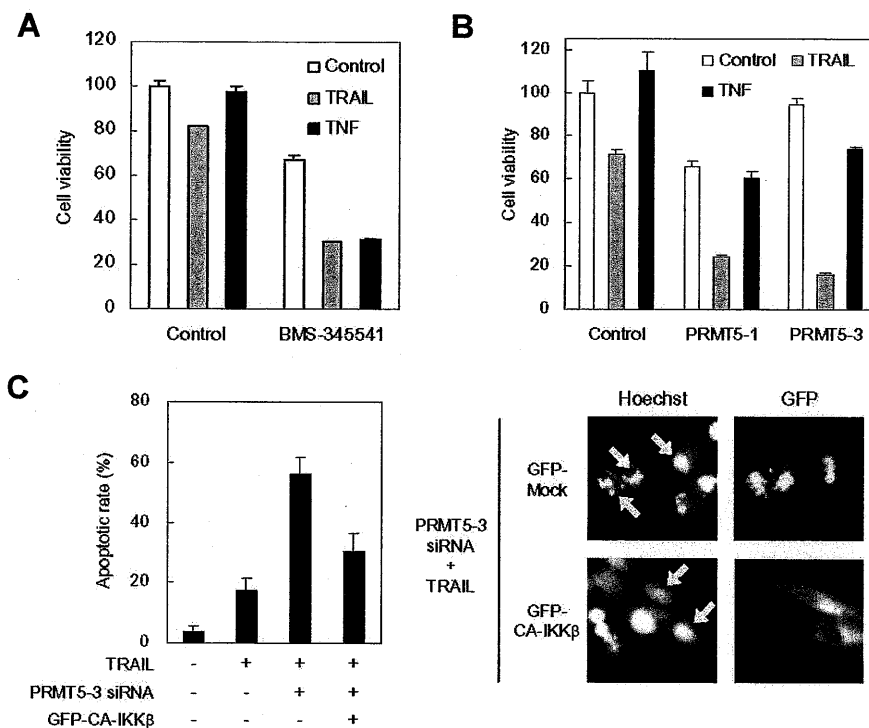


Fig. 4 (A, B) IKK 阻害剤および PRMT5 siRNA による感受性化  
(C) PRMT5 siRNA が起こす感受性化の IKKβ による克服  
(矢印は遺伝子導入された細胞)

#### <総括>

本研究において新規 DR4 結合タンパク質として同定された PRMT5 は、TNFR スーパーファミリーの中でも TRAIL 受容体である DR4/DR5 と選択的に結合した。また、PRMT5 は TRAIL による NF-κB 活性化に寄与することで、TRAIL 誘導性アポトーシスに対し抑制的に働いていることが明らかになった。さらに、これらは TRAIL 処理をしたがん細胞に限定され、TNF-α 処理時および正常細胞では見られない現象であった。TRAIL の臨床応用を進める上では、一部のがん細胞が示す耐性の克服が大きな課題となる。本研究の成果から、PRMT5 を分子標的とすることによって TRAIL の抗腫瘍効果を選択的に増強できる可能性が期待される。今後は、PRMT5 の NF-κB 経路へと関わる詳細な分子機構を解明し、また、PRMT5 の分子標的としての有用性を *in vivo* で検討していくことが必要であると考えている。

#### <参考文献>

1. Tanaka, H. and Fujita, N. (2006) *Cancer Frontier* **8**, 32-38 (Review).
2. Tanaka, H., Fujita, N. and Tsuruo, T. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 40965-40973.
3. Tanaka, H., Hoshikawa, Y., Naito, M., Noda, T., Arai, H., Tsuruo, T. and Fujita, N. *Oncogene* (In revision).