

論文の内容の要旨

論文題目 癌抑制蛋白 hScrib のアポトーシスへの関与
とその機能解析

指導教員 矢野 哲准教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 18 年 4 月入(進)学
医学博士課程
生殖・発達・加齢医学専攻
氏名 曾根 献文

細胞は DNA ダメージ等を受けた際に内在的に自己破壊するメカニズムが備わっており、それは細胞のプログラム死—アポトーシスと呼ばれる。アポトーシスを引き起こすシグナルは大きく 2 つに分けられる。1 つは細胞膜に存在するデスレセプターを介する *extrinsic pathway* と呼ばれる経路で、もう 1 つはミトコンドリアを介する *intrinsic pathway* と呼ばれる経路である。この 2 つの経路は蛋白質分解酵素である実行カスパーゼ（カスパーゼ 3、6、7）を活性化させ、特定の蛋白質（デスサブストレイト）を分解することによってアポトーシスに至る。今回我々は癌抑制蛋白 hScrib のアポトーシスへの関与とその機能解析を行った。

ショウジョウバエにおいては細胞極性の崩壊によって組織が異常に増大する遺伝子が広く研究されており、異形成性癌抑制遺伝子と呼ばれる。現在報告されている遺伝子は *lethal giant larvae (lgl)*, *discs large (dlg)*, *scribble (scrib)* が同定されている。Scrib のヒトホモログである hScrib は細胞膜のアドヘレンスジャンクションに局在し、細胞の極性保持に関わっていることがわかっている。本研究にて hScrib が、カスパーゼ

によって分解されるデスサブストレイトであるかを検討した。

Hela 細胞等の細胞株に抗 Fas 抗体や UV 照射等にてアポトーシス誘導し、hScrib の発現の変化をウェスタンブロット法で解析した。アポトーシス誘導時の hScrib の細胞膜における局在の変化については蛍光免疫染色、アポトーシスの判定は Hoechst 染色、TUNEL 法を用いて検討した。また *In vitro* translation 法により発現させた hScrib を実行カスパーゼと反応させ、その切断の有無を検討した。また細胞内においても hScrib がカスパーゼ依存性に分解されるかを検討するために、細胞内にカスパーゼ阻害剤を添加した状態にて UV 照射しウェスタンブロット法で解析した。カスパーゼはアミノ酸配列の中でアスパラギン酸の C 末側を切断する特徴がある。次に hScrib のカスパーゼ 3 における切断部位を検討するために内部ドメイン欠失変異体、アミノ酸置換体（アスパラギン酸をアラニンに置換）をそれぞれ作成し検討した。また hScrib のアポトーシスへの関与を検討するために遺伝子導入法にて検討を行った。pEGFP-Wild type hScrib 及び、カスパーゼにより切断を受けない pEGFP-mutant hScrib (pEGFP-504DA hScrib) を MDCK 細胞に遺伝子導入し細胞内に発現させ、アポトーシスの判定として Hoechst 染色を用い、細胞離解の判定として E-cadherin の発現の変化を蛍光抗体法により解析した。また HPV-E6 によるアポトーシス誘導時の hScrib への影響を検討するために、293T 細胞株に pCMV-16E6 ベクター (HPV 16 型 E6 ベクター)、及びコントロールベクターを遺伝子導入した。遺伝子導入後、抗 Fas 抗体/サイクロヘキシミドにてアポトーシス誘導し、抗 Scrib 抗体を用いてウェスタンブロット法にて検討を行った。

アポトーシス誘導するとウェスタンブロット解析にて、hScrib は発現の減少が認められた。*In vitro* translation 法により発現させた hScrib は実行カスパーゼにおける分解が認められた。またカスパーゼ阻害剤を用いたウェスタンブロット解析においては、アポトーシス誘導時における hScrib の分解の阻害が認めら

れた。特にカスパーゼ 3 阻害剤によって分解の阻害が認められた事から、hScrib は主にカスパーゼ 3 により分解を受けていることが考えられる。蛍光免疫染色においてアポトーシス細胞では、hScrib の細胞膜における発現は消失もしくは減弱していた。これにより hScrib はアポトーシス誘導時に実行カスパーゼにより分解され、細胞膜での発現が減少することが推測される。また hScrib のアミノ酸置換体を用いた実験において、hScrib は 504 番目のアミノ酸の C 末側でカスパーゼ 3 により切断を受けることがわかった。504DA hScrib (カスパーゼ 3 により分解されない hScrib) を発現させた細胞では、wild-type hScrib を発現させた細胞と比べアポトーシス誘導による E-cadherin の発現の消失、すなわち細胞接着の消失が抑えられた。pCMV-16E6 ベクターを遺伝子導入した検討においてはアポトーシス誘導後では、コントロールベクターを遺伝子導入した細胞よりも pCMV-16E6 ベクターを遺伝子導入した細胞の方が p170 hScrib すなわち、hScrib のカスパーゼ依存性 cleavage の生成が抑えられた。

アポトーシスにおいて、カスパーゼによる細胞接着因子の分解が重要な役割をもつ。hScrib はアポトーシスが進行する過程で実行カスパーゼ、特にカスパーゼ 3 によって分解され、その発現が消失するとアドヘレンスジャンクションの崩壊が進行し細胞接着の消失に大きく関わることを示された。また HPV E6 ベクターを用いた検討により癌蛋白である HPV E6 によって抑制される hScrib のカスパーゼ依存性 cleavage 自体がアポトーシス進行過程にて重要な因子である可能性が考えられる。すなわちカスパーゼ 3 によって hScrib が分解され、アドヘレンスジャンクションにおける hScrib の発現が減少する事だけではなく、それによって生成される hScrib のカスパーゼ 3 依存性 cleavage が、細胞接着関連蛋白を崩壊させ細胞離解を進行させる必要不可欠なシグナルである仮説が考えられる。今後この仮説について更なる検討を進めることは、組織の癌化及び化学療法や放射線耐性の癌のメカニズムの解明につながる可能性が示された。