

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 品田 恵佐

### 学位論文題名

大腸癌特異的ユビキチンリガーゼ RNF43 の機能解析

【背景と目的】欧米における悪性新生物の部位別死亡数の統計によると、大腸癌は最も多い死因のひとつである。遠隔転移があった場合、切除および化学療法等の治療法が適用される。近年、大腸癌における化学療法は著しい進歩を遂げている。しかしながら、転移性大腸癌は、いまだに根治が困難な疾患に位置している。これまでに、アポトーシスに影響を及ぼす p53, NF- $\kappa$ B, Bcl-2, APC/ $\beta$ -カテニン及び COX-2 などが、発癌に関与していることが報告されている。p53 遺伝子は、ヒトの癌で最も多くの変異が検出される癌抑制遺伝子のひとつである。p53 は細胞周期の停止およびアポトーシスを引き起こし、DNA 損傷応答の中心的役割を果たしている。DNA 損傷が起こった際には、p53 はリン酸化やアセチル化およびユビキチン化等の翻訳語修飾を受けることで、その安定性が変化する。ユビキチン化修飾は、細胞制御・シグナル伝達・DNA 修復等の細胞機能の制御系として機能するタンパク質の翻訳後修飾系である。遺伝子発現に関する網羅的な解析において、Ring finger protein 43 (RNF43) は大腸癌に高頻度に発現する遺伝子として同定された。これまでに、RNF43 の過剰発現により細胞増殖が促進され、siRNA によるノックダウンでは細胞の増殖が抑制されることが報告されている。また、免疫療法において RNF43 は細胞障害性 T リンパ球を誘導するエピトープペプチドを含む腫瘍抗原となる可能性があり、癌ワクチンとして臨床試験が行われている。以上のことより、大腸癌において RNF43 は癌遺伝子の特徴を有すると考えられるが、癌化に及ぼす機能は未だ解明されていない。NEDD4-like ubiquitin protein ligase-1(NEDL1)は、神経組織に高発現し、変異型 superoxide dismutase-1(SOD1)と dishevelled-1(Dvl1)に結合することが報告されている。また、NEDL1 は p53 と結合することで p53 の転写活性を制御し、アポトーシスを誘導することが知られている。これらの結果より、NEDL1 は細胞増殖およびアポトーシスなどの制御に関与していることが推測された。

今回、RNF43 の結合タンパク質を網羅的に同定し、RNF43 分子の機能を解析することを試みた。まず酵母ツーハイブリット法により、RNF43 結合タンパク質として NEDL1 を同定した。この結果を踏まえ、RNF43 が大腸癌の癌化制御にどのような影響を与えているかを生化学的及び細胞生物学的手法により解析した。

【材料と方法】酵母ツーハイブリット法を用いて RNF43 と結合するタンパク質を網羅的に検索した。同定されたタンパク質である NEDL1 と RNF43 との哺乳類細胞内での結合および安定性について検討した。さらに、RNF43 と p53 との結合について検討した。ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、RNF43 による p53 の転写活性への影響を検討した。アポトーシスへの影響を調べるために、RNF43-FLAG 恒常発現 HCT116 細胞を作製し、FACS を使用した細胞周期解析によって sub-G<sub>1</sub> 分画の測定、及びカスパーゼ-3 の切断を免疫プロット法で解析した。

【結果】酵母ツーハイブリット法にて HeLa cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。陽

性クローンのうちの 하나가, ヒト NEDL1 と同一の塩基配列であった. RNF43 と NEDL1 の結合は酵母細胞内での $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイにて確認した. 哺乳類細胞内で RNF43 が NEDL1 と物理的に相互作用するかどうかを確かめるために *in vivo* 結合実験を行った. その結果, 哺乳類細胞内においても, RNF43 は NEDL1 と結合することが判明した. NEDL1 は p53 と結合し, p53 によるアポトーシスを増強すると報告されており, RNF43 もまた p53 と結合しうるかを検討した. その結果, RNF43 は NEDL1 と同様に p53 とも結合することが判明した. H1299 細胞に p53 のレスポンスエレメントを持つルシフェラーゼレポーター, p53 の発現プラスミド, 及び異なる量の RNF43 を同時に発現させ, ルシフェラーゼ活性を測定した. その結果, RNF43 は容量依存性に p53 の転写活性を抑制した. RNF43 過剰発現 HCT116 細胞にシスプラチンを添加し 14 時間培養した後, 免疫ブロット法で解析した. その結果, RNF43 過剰発現 HCT116 細胞においてカスパーゼ-3 の切断が抑制されていた. さらに, RNF43 過剰発現 HCT116 細胞に UV を照射し, FACS にて sub-G<sub>1</sub> 分画を解析したところ, 陰性対象との比較において, UV 照射 12 時間後及び 18 時間後の sub-G<sub>1</sub> 分画が減少していることが判明した. これらの結果より, RNF43 はアポトーシスを抑制することが判明した.

【考察】 NEDL1 が p53 の転写活性を増強し, p53 によるアポトーシスを増強させることが報告されている. 本研究により, RNF43 が NEDL1 と結合し p53 の転写活性を抑制することを示した. したがって, RNF43 は NEDL1 を負に制御することが示唆される. また, RNF43 は, 直接もしくは間接的に野生型 p53 によるアポトーシスを制御する役割を果たす可能性も考えられる. しかしながら, この点に関しての分子生物学的機序は不明であり, 今後の検討が必要と考えられる.

【結論】 RNF43 の結合タンパク質として NEDL1 を同定した. RNF43 は p53 との結合することで, p53 の転写活性を抑制して, UV および cDDP によるアポトーシスを抑制することを証明した. 大腸癌で高発現する RNF43 は, NEDL1 と協調することで, p53 によるアポトーシスを制御し, 大腸上皮細胞の癌化に関与することが示唆された.