

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

敦賀 智子

専攻分野：遺伝子多型・機能解析学

コース：

指導教授：熊井 俊夫

主論文の題目：

UBE3B と UBE3C はユビキチン-プロテアソーム系を介して細胞増殖を機能的に制御する

共著者：熊井 俊夫、岡田 麻衣子

緒言

生体内の恒常性維持には細胞内のタンパク質量の適切な制御が必須であり、ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク分解は主要な機構の一つである。がん細胞のプロテアソーム機能は亢進しているものが多く、その機能に依存した細胞生存能の獲得が報告されている。そのためプロテアソームを分子標的としたがん治療は一定の成果を収めており、次世代のプロテアソーム阻害剤の開発や適応拡大に向けたバイオマーカー確立が期待される。一方で、プロテアソームは異なる機能を有する構成因子群が緻密に連動したタンパク分解装置であり、その制御機構や制御因子群については依然不明な点が多い。以上の観点から、本研究

ではプロテアソーム制御因子の一つである HECT 型ユビキチンリガーゼ UBE3C および UBE3C と相同性の高い機能未知因子 UBE3B に着目し、プロテアソーム制御とがんの増悪との関連性を検討した。

方法・対象

ヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞株を用いて UBE3C および UBE3B の解析を行った。UBE3B は、UBE3C の基質認識領域と相同性の高いタンパク質として注目した。両因子に対し、蛍光免疫染色法によるプロテアソーム構成因子 ADRM1 との細胞内共局在の観察を行い、siRNA を用いたノックダウン法により K48-Ub の凝集体を指標としたタンパク質分解能と細胞増殖能に与える影響を検討した。細胞増殖能の評価は、student-T 検定を用いた両側検定を行った。さらに、これらの解析について、siRNA による各因子のシングルノックダウンおよび両因子のダブルノックダウンを比較し、UBE3C と UBE3B の関連性について評価した。最後に、FACS による細胞周期解析を行い両因子の作用点を検討した。

結果

まず、UBE3C はプロテアソームと部分的な共局在が観察され、プロテアソーム制御因子としての役割が示唆された。一方で、UBE3C の発現低下は顕著な細胞増殖能の変化を示さなかった。そこで、データベース検索により、UBE3C の機能代替候補因子として UBE3B に着目し、UBE3B がプロテアソームおよび UBE3C と共局在を示すプロテアソーム制御因子である可能性を見出した。実際に、UBE3B の発現低下はタンパク質分解不全を示し、G2/M 期への細胞周期の停滞と共に顕著な細胞増殖不全が観察された。一方で、両因子の発現低下では K48-Ub の凝集体の程度が減少し、UBE3B 単独の発現低下と比較して細胞の生存が回復傾向にあった。その作用点として、UBE3C が UBE3B の発現低下に伴う G/2M 期の停滞を解除する可能性が示唆された。以上より、当初の仮説と異なり、

UBE3BはUBE3Cとは異なる機構で増殖に寄与するプロテアソーム制御因子であることが示唆された。さらに、UBE3CはUBE3Bの発現低下に伴う増殖不全を助長することが示された。

考察

本研究では、がんの増悪機構の解明にあたり、UBE3CおよびUBE3Bに着眼して解析した。UBE3Cについては、細胞内共局在からプロテアソーム制御因子としての既存の報告を支持する結果が得られた。また、UBE3Cと高い相同性を示すUBE3Bを見出し、UBE3Bがプロテアソームの正の制御因子であることが示唆された。本研究では発現低下時の解析に留まったが、UBE3Bの過剰発現細胞は、プロテアソーム機能亢進に伴いプロテアソーム阻害剤に対して高感受性を示す可能性が推測される。また、細胞増殖に関しては当初の仮説と異なり、UBE3Bは細胞増殖因子である可能性、UBE3CはUBE3Bの発現低下に伴う細胞増殖不全の助長因子である可能性が示唆された。そこで今後はUBE3Bについてはがん遺伝子である可能性を視野に入れ、染色体安定性や発現量とがん増悪との相関を明らかにする必要があると考えられる。一方で、UBE3CはUBE3Bの発現低下など、特定の細胞環境下でのみ増殖抑制能を発揮する可能性が示唆された。この仕組みは未知だが、UBE3Cはプロテアソームの正の制御因子であると共に、刺激依存的な負の制御因子として働く二面性が報告されているため、UBE3Bの発現低下時にも同様の機構が存在する可能性が推測される。あるいは、プロテアソーム機能不全の回避機構である”プロテアソームリカバリー”とUBE3Cが関連する可能性も考えられる。今後はこれらの二つの作用機序を視野にいれ、UBE3Cの発現低下はプロテアソーム不全に耐性を示す指標となる可能性について検討する予定である。以上、がん治療の観点から、UBE3Bはプロテアソーム阻害剤感受性マーカーとして、UBE3Cはプロテアソーム阻害剤耐性予測マーカーとしての可能性を秘めており、両因子の発現バランスを踏まえた治療戦略の基盤

確立は今後の課題である。