

論文内容要旨

口腔扁平上皮癌細胞における
ユビキチン/プロテアソーム系による
インテグリン $\beta 8$ の蛋白翻訳後修飾についての解析

応用生命科学部門分子口腔医学・顎顔面外科学

(主指導教員：岡本 哲治 教授)

応用生命科学部門歯周病態学

(副指導教員：栗原 英見 教授)

基礎生命科学部門硬組織代謝生物学

(副指導教員：吉子 裕二 教授)

坂上 泰士

論 文 内 容 要 旨

論文題目 口腔扁平上皮癌細胞におけるユビキチン/プロテアソーム系による
インテグリン $\beta 8$ の蛋白翻訳後修飾についての解析

学位申請者 坂上 泰士

[目的]

インテグリンは α 鎖と β 鎖からなるヘテロ二量体の細胞膜蛋白で、細胞の増殖や運動等を制御し、がんの浸潤・転移にも密接に関与している。これまでに、ある種の扁平上皮癌細胞株においては、 $\beta 8$ は蛋白翻訳後、細胞内で分解等の修飾を受けている可能性が示されている。

本研究では、扁平上皮癌細胞における $\beta 8$ 蛋白翻訳後修飾におけるユビキチン/プロテアソーム系の関与と、カウンターパートである αv との二量体形成が $\beta 8$ 蛋白の安定性に与える影響について検討した。

[方法]

実験には舌癌由来扁平上皮癌細胞株 SCCKN と外陰部扁平上皮癌細胞株 A431 を用いた。 αv または $\beta 8$ の cDNA を哺乳動物発現ベクター pCI-neo に組み込み、それぞれ pCI-neo/ αv または pCI-neo/ $\beta 8$ を作製した。pCI-neo, pCI-neo/ αv または pCI-neo/ $\beta 8$ を A431 に導入し、それぞれ A431mock, αv 高発現細胞株 A431 αv または $\beta 8$ 高発現細胞株 A431 $\beta 8$ を分離した。

各細胞を、リソソーム阻害剤 pepstatin A, カルパイン阻害剤 ALLN またはプロテアソーム阻害剤 MG132 で処理後、 $\beta 8$ 蛋白発現を Western blot 法で解析した。さらに、ユビキチンリガーゼ human double minute 2 (Hdm2) の阻害が、各細胞の $\beta 8$ 蛋白発現に与える影響について解析した。

Hdm2 と $\beta 8$ の複合体形成を、MG132 で処理した SCCKN の cell lysate に対し、抗 $\beta 8$ 抗体または抗 Hdm2 抗体を用いた共免疫沈降法で検討した。さらに mammalian two-hybrid 法にて Hdm2 と $\beta 8$ との結合を検討した。すなわち Hdm2 と $\beta 8$ の cDNA を、それぞれ GAL4 DNA-Binding Domain Cloning Vector である pM と Activation Domain Cloning Vector である pVP16 に組み込み、Hdm2-pM と $\beta 8$ -pVP16 を作製し、Reporter Vector である pG5SEAP とともに A431 に導入し、培養上清中のアルカリフォスファターゼ活性を指標に Hdm2 と $\beta 8$ との結合を評価した。 $\beta 8$ 蛋白上における Hdm2 の結合部位を検討するため、inverse PCR 法により作製した $\beta 8$ -pVP16 の deletion mutant を

用いて mammalian two-hybrid 法を行った。

$\beta 8$ 蛋白を一過性に発現誘導させるため、テトラサイクリン (Tet) 発現誘導システムを用いた。すなわち、Tet リプレッサー発現ベクター pcDNA6/TR と Tet 誘導性発現プラスミド pcDNA4/TO に $\beta 8$ の cDNA を組み込んだ pcDNA4/TO/ $\beta 8$ を作製し、A431mock または A431 αv に導入し、それぞれ A431mock/ $\beta 8$ -On または A431 αv / $\beta 8$ -On を分離した。Tet 処理により $\beta 8$ 蛋白を発現誘導させた A431mock/ $\beta 8$ -On または A431 αv / $\beta 8$ -On を、Tet 非存在下でさらに培養し、 $\beta 8$ 蛋白発現の変化を解析することで、 $\beta 8$ 蛋白の安定性に与える αv の影響について検討した。さらに、A431 αv / $\beta 8$ -On の運動能を Boyden chamber の変法にて検討した。

[結果]

1. SCCKN 及び A431 $\beta 8$ は、 $\beta 8$ 蛋白をほとんど発現していなかったが、MG132 処理により本来 90kDa の $\beta 8$ 蛋白が約 120kDa の蛋白として発現した。Hdm2 阻害剤は 90kDa の $\beta 8$ 蛋白を発現させた。
2. 共免疫沈降法で、Hdm2 と $\beta 8$ の複合体が形成されていることが明らかとなった。
3. Hdm2-pM 及び $\beta 8$ -pVP16 を co-transfection した A431 は、コントロールに比べ、アルカリフォスファターゼ活性が約 5 倍亢進した。
4. 481 番目から 576 番目の EGF-like repeat domain を含むアミノ酸領域を欠失したミュータント $\beta 8$ では、アルカリフォスファターゼ活性が低下した。
5. Tet 処理により、A431mock/ $\beta 8$ -On 及び A431 αv / $\beta 8$ -On において $\beta 8$ 蛋白発現が誘導されたが、A431mock/ $\beta 8$ -On は Tet 非存在下では発現量が低下し、12 時間後にはほぼ消失した。これに対し、A431 αv / $\beta 8$ -On では、Tet 非存在下においても $\beta 8$ 蛋白発現は維持されていた。
6. Tet 処理により、A431 αv / $\beta 8$ -On の運動能は促進された。

[結語]

単量体のインテグリン $\beta 8$ は、脚部の EGF-like repeat domain に Hdm2 と結合することで、ポリユビキチン化されてプロテアソームで分解されていることが明らかとなった。これに対し、 αv と二量体形成した $\beta 8$ は、ユビキチン/プロテアソーム系による分解を受けず安定発現し、運動能を促進することで、がん浸潤を亢進させていることが示唆された。