

学位論文要旨

氏名 西山 加那子

論文名 CNKSR1 は RhoB-GTP との排他的な相互作用を介して
EGFR 脱リン酸化酵素を活性化する足場となる

学位論文要旨

【緒言】

上皮成長因子受容体 (EGFR) 及びヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2) のリン酸化は、HER2 陽性乳癌細胞の増殖を促進する。我々は以前、ユビキチンリガーゼ複合体である Cullin-3 (CUL3) /KCTD10 E3 複合体による small GTPase RhoB の分解が、HER2 陽性乳癌細胞株で特異的に EGF 誘導性 Rac1 活性化に機能することを報告した (Murakami et al 2019)。しかし、EGFR/HER2 シグナル伝達経路における CUL3/KCTD10 E3 複合体の役割は、まだ明らかになっていない。本研究では、HER2 陽性乳癌細胞において、CUL3/KCTD10 による RhoB の分解が EGFR/HER2 のリン酸化と細胞増殖に必須であることを明らかにした。蓄積した RhoB が EGFR/HER2 のリン酸化を負に制御していることが示唆されたため、RhoB と直接相互作用しリン酸化を制御するタンパク質を探索した。コムギ無細胞タンパク質合成系で構築されたヒト protein array を用いて、RhoB と相互作用する足場タンパク質 CNKSR1 と、EGFR を直接脱リン酸化する PTPRH を同定し、その分子間の相互作用を確認した。我々は、HER2 陽性乳癌細胞株における phosphatase 活性化の新しい分子機構を解明し、これらが HER2 陽性乳癌に対する新規標的分子機構となる可能性を見出した。

【方法】

ヒト乳癌細胞株として、MCF-7、MDA-MB-231、SKBR-3 と MDA-MB-453 を用いた。タンパク質発現抑制は siRNA によるノックダウン法を用いた。タンパク質発現と細胞内局在解析は western blotting 法及び、免疫組織染色法により行った。リコンビナントタンパク質合

氏名 西山加那子

成はコムギ無細胞タンパク質合成系を用いて行い、タンパク質分子間相互作用はアルファスクリーンにより行った。細胞増殖試験は、細胞数計測により行った。予後解析には METABRIC database と HER2 陽性乳癌組織を用いた。この実験は愛媛大学医学部の倫理審査委員会によって承認されている。

【結果】

HER2 陽性乳癌細胞株である SKBR-3 において CUL3/KCTD10 を発現抑制すると、活性型 RhoB (Rho-GTP) が蓄積し、EGFR/HER2 のリン酸化が低下した。さらに CUL3/KCTD10 と RhoB の同時発現抑制では、EGFR/HER2 のリン酸化低下が回復した。また、EGFR/HER2 のリン酸化の増減は、細胞増殖と正の相関性を示した。これらの結果から、CUL3/KCTD10 による恒常的な RhoB の分解が EGFR/HER2 のリン酸化及び SKBR-3 の増殖に必須であることが示唆された。

次に、RhoB-GTP と直接に相互作用し、かつ EGFR/HER2 のリン酸化制御に関わるタンパク質の同定を試みた。ビオチン化 RhoB-Q63L (恒常的活性型変異体) をプローブとして、ヒト 4,212 タンパク質アレイを用いてアルファスクリーンを施行し、CNKSR1 を同定した。SKBR-3 における CNKSR1 の発現抑制は、EGFR/HER2 のリン酸化を抑制し、細胞増殖も顕著に低下させた。以上から、CNKSR1 は EGFR/HER2 のリン酸化制御を介して、細胞増殖を制御することが示唆された。また、CNKSR1 は EGFR/HER2 とは直接相互作用しないことが確認できたことから、CNKSR1 が phosphatase を制御する可能性が示唆された。

そこで、CNKSR1 と直接相互作用し、EGFR/HER2 を脱リン酸化する phosphatase の同定を試みた。ビオチン化 CNKSR1 をプローブとして、ヒト 171 protein phosphatase アレイを用いてアルファスクリーンを施行し、CNKSR1 と結合する phosphatase15 分子を同定した。さらに各々の siRNA を用いた解析から、PTPRH が EGFR の特異的 phosphatase であることを明らかにした。

以上より、HER2 陽性乳癌細胞において、CUL3/KCTD10 E3 複合体による RhoB の恒常的な分解により、CNKSR1 が PTPRH と相互作用し、PTPRH の phosphatase 不活性化につながると結論付けた。

【考察】

CUL3/KCTD10 E3 複合体による RhoB の恒常的な分解により、CNKSR1 が細胞膜上で PTPRH と相互作用し、EGFR のホスファターゼ活性が不活性化される。CUL3 や KCTD10 を発現抑制すると、細胞膜に RhoB-GTP が蓄積し、それが CNKSR1 と相互作用することで、活性化した PTPRH が CNKSR1 から放出され EGFR のリン酸化が負に制御される。この PTPRH/CNKSR1 の阻害剤は、将来 HER2 陽性乳癌に対する新規薬剤となる可能性がある。

キーワード (3~5)	<ul style="list-style-type: none">• RhoB• CNKSR1• PTPRH• HER2-positive breast cancer• EGFR-positive breast cancer
-------------	---