

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 眞田紗代子

論 文 名 SPOP は DNA 複製ライセンス因子 CDT1 および CDC6 の  
翻訳制御を介してヒト角化細胞増殖を制御する

---

### 学位論文要旨

【目的】SPOP (speckle-type POZ protein) は、CUL3 型ユビキチン E3 リガーゼ複合体 (CRL3) を構成する基質認識受容体の一つであり、基質タンパク質をユビキチン化して分解や機能変換を誘導する。CRL3 SPOP の機能は多岐に渡り、ステロイドホルモン誘導性転写調節、免疫応答、細胞周期制御、シグナル伝達、DNA 損傷修復など、40 種以上もの標的基質タンパク質を介して様々な生理機能の維持に重要な役割を果たす。これまでに前立腺癌や子宮体癌では SPOP の遺伝子変異が報告されており、これが発癌に深く関わることが示唆されている。一方、皮膚扁平上皮癌では SPOP 遺伝子変異の報告はないものの、約 30% において SPOP のコピー数の顕著な減少が報告されている。このことは、SPOP の機能低下が皮膚角化細胞の細胞増殖制御破綻を来すことを示唆する。そこで本研究では、SPOP の発現低下がもたらす皮膚角化細胞の細胞増殖動態を解析することで、SPOP の皮膚角化細胞における生理機能の解明と、その破綻による癌化への影響を解明することを目的とした。

【方法】初代培養ヒト表皮角化細胞、ヒト不死化角化細胞 HaCaT 細胞、ヒト表皮扁平上皮癌 A431 細胞を用いた。SPOP をはじめとする各種遺伝子の発現は定量 PCR 法により、タンパク質の発現はウェスタンブロット法により解析した。各種遺伝子発現抑制は、標的とする遺伝子特異的 siRNA による RNA 干渉法を用いて行った。細胞増殖、DNA 複製、細胞分裂周期解析はそれぞれ細胞数カウント、ATP アッセイ、EdU 取り込みによる DNA 標識、FACS 解析により行った。また、タンパク質翻訳・合成はシクロヘキシミドを用いたパルスチェイス解析や L-homopropargylglycine とアルキン/アジド Click 反応解析により行った。ヒト皮膚を用いた皮膚細胞の機能に関する研究と皮膚疾患に関する因子の免疫組織学的解析は愛媛大学医学部附属病院の臨床研究倫理審査委員会によって承認されている。

【結果】ヒト初代培養ヒト表皮角化細胞、HaCaT 細胞、A431 細胞ともに SPOP タンパク質の発現を認め、以後、HaCaT 細胞を用いて解析を進めた。SPOP 遺伝子発現抑制により細胞増殖の顕著な抑制を認めた。EdU 取り込みによる DNA 標識、並びに FACS 解析から、SPOP 遺伝子発現抑制 HaCaT 細胞は、G1/S 期で細胞周期進行が停止していることが示された。そこで、まず DNA 複製開始に着目し、これを制御する DNA 複製ライセンス因子である MCM2~7、CDT1、CDC6 の遺伝子発現およびタンパク質発現を解析した。その結果、これらの全ての因子の遺伝子発現に大きな変動は認められなかったものの、CDT1 および CDC6 のタンパク質量が顕著に減少していることが明らかとなった。そこで、CDT1 および CDC6 のタンパク質の分解、合成、並びにハーフライフを解析した。その結果、CDT1 および CDC6 のタンパク質の分解速度に変化はなく、新規合成が特異的に抑制されていることが示された。さらに、細胞周期チェックポイント因子であるサイクリン依存性キナーゼ

氏名 眞田 紗代子

阻害因子群を解析した結果、p21 Waf1/Cip1 の発現が顕著に増幅していること、p21 Waf1/Cip1 の転写促進因子である p53 の活性化は認められなかったこと、p21 Waf1/Cip1 の発現増幅が CDT1 および CDC6 のタンパク質量減少に依存していることが明らかとなった。

【結論】 HaCaT 細胞での SPOP 発現抑制は、DNA 複製ライセンス化因子の CDT1 および CDC6 のタンパク質翻訳を特異的に阻害することで DNA 複製ストレスを増大させるとともに、細胞周期チェックポイント因子 p21 Waf1/Cip1 の発現を p53 非依存的に増幅することで細胞周期進行を G1/S 期で停止させる。すなわち、SPOP は複製開始前段階からライセンス化因子の CDT1 および CDC6 のタンパク質発現レベルを翻訳過程で適切に制御することで、DNA 複製ストレスを緩和させる機能を発揮している。皮膚扁平上皮癌で認められる SPOP の顕著なコピー数減少は、SPOP の機能低下をもたらし、DNA 複製ストレスを増幅することで発癌感受性の増大を来すことが本研究において示唆された。

キーワード（3～5）	SPOP DNA複製ライセンスング 翻訳 皮膚悪性腫瘍 細胞増殖制御
------------	--