

学位論文審査結果の要旨

| | |
|------|---|
| 氏名 | 眞田 紗代子 |
| 審査委員 | 主査 今井 祐記 副査 武内 章英 副査 矢野 元 副査 菊川 忠彦 副査 日野 聡史 |

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

審査結果の要旨

[研究概要]

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 の機能は多岐に渡るが、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。本研究では、SPOP の発現低下がもたらす皮膚角化細胞の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。

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。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。

siSPOP による SPOP 遺伝子発現抑制により、細胞増殖の顕著な抑制、G1/S 期で細胞周期進行の停止が示された。DNA 複製ライセンス因子である MCM2-7、CDT1、CDC6 のうち 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。また、C

DT1 および CDC6 の mRNA の発現量および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、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子群である p21 発現の顕著な増幅を認めたものの、p53 の活性化は認めず、p21 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。さらに翻訳制御に機能していることから、SPOP と RNA 結合タンパク質 hnRNP family との相互作用解析をアルファスクリーンにより網羅的に実施したところ、SPOP と結合する因子として hnRNPU を同定した。

HaCaT 細胞での SPOP 発現抑制は、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、p53 非依存的に p21 の発現を増幅し細胞周期進行を 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。

[審査結果]

公開審査会は、令和 5 年 1 月 27 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表した。審査員から本研究に対して、

1. 実験に使用した細胞株を選んだ理由や他の細胞での実験結果
2. 皮膚癌における SPOP の copy 数の低下と p53 変異との関連
3. CDT1 と CDC6 は SPOP の直接的基質でないことから、両分子を制御する分子について
4. siSPOS による CDT1 と CDC6 のタンパク質レベルの変化の原因について
5. SPOP による核内タンパク質のユビキチン化について
6. hnRNPU がユビキチン化されることによる機能制御と分解について
7. タンパク質結合のみでユビキチン化基質を同定する方法の妥当性について
8. 翻訳調節領域をどのように hnRNPU が制御するのかについて
9. ライセンシング障害のみで細胞周期停止を説明できるのか
10. 皮膚における SPOP の基質を網羅的に解析する方法について
11. CDT1 と CDC6 の mRNA 配列の特徴について
12. 本研究で見出された分子機構の細胞特異性と生体における重要性について
13. 本研究成果を将来的な治療や診断につなげるための方策について

などについて日本語で質問がなされ、申請者は自らの研究結果やこれまでの報告から得られた知見、今後の展望も踏まえて、すべての質問に日本語で適切に回答した。

以上、審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。