

博士論文（要約）

がん抑制タンパク質 CADM1 の安定性制御機構の解析

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

メディカルゲノム専攻 人癌病因遺伝子分野

中岡 寛樹

## [要約]

Cell adhesion molecule 1 (CADM1) は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子であり、上皮細胞および神経系に強く発現する。また、様々ながんの進展に伴い発現が低下・欠如することが報告されていることから、CADM1 の発現低下・欠如はがんの浸潤・転移を促進することが示唆されている。そのため、CADM1 の発現制御機構を理解することはがんの浸潤・転移機構を理解するために極めて重要であると考えられる。CADM1 の発現制御機構として、これまでに *CADM1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化による CADM1 mRNA の発現欠如が主な原因であることが報告されている。しかし、一部の非小細胞肺癌ではプロモーター領域のメチル化非依存的に CADM1 の発現が低下すること、ならびに近年、マイクロ RNA による CADM1 mRNA の翻訳抑制機構も報告され、CADM1 の発現制御は複数の機構により制御されていることがわかり始めている。しかし、依然 CADM1 の発現制御機構の全体像は明らかとなっていないのが現状である。よって本研究では CADM1 の発現を制御する新たな機構として、CADM1 の分解制御機構に着目した。まず、CADM1 分解を制御する分子として、先行研究において同定された新規 CADM1 細胞内領域結合分子候補である Ran binding protein microtubule organizing center (RanBPM) に着目した。RanBPM は結合分子のユビキチン化を抑制し、プロテ

アソーム経路を介したタンパク質分解を抑制することが報告されている。そのため、RanBPM が CADM1 の細胞内領域と結合し CADM1 のユビキチン化を抑制することで CADM1 分解を抑制する可能性が考えられた。まず、免疫沈降法ならびにウェスタンブロット法を用いた検討により、CADM1 と RanBPM が HEK293 細胞において複合体を形成すること、また RanBPM 変異体、CADM1 変異体を用いて免疫沈降法を行った結果、両者の複合体形成は CADM1 の細胞内領域と RanBPM の SPRY ドメインを介していることを明らかとした。更に、GST プルダウン法を用いた検討により、CADM1 細胞内領域は RanBPM の SPRY ドメインと直接結合していることを明らかとした。次に、RanBPM に対する siRNA を用いて RanBPM の発現を抑制した場合における CADM1 発現量の変化を半定量的 RT-PCR 法ならびにウェスタンブロット法を用いて検討した。その結果、RanBPM siRNA による RanBPM の発現低下に伴い CADM1 の発現も低下したが、CADM1 mRNA 発現量には変化が認められなかった。更に強制発現系を用いた検討も行った。その結果、RanBPM を強制発現させた場合、CADM1 の発現量が上昇すること、ならびに CADM1 のユビキチン化が抑制されることも明らかとした。これらの結果より、RanBPM は CADM1 のユビキチン化を抑制することにより CADM1 の分解を抑制することが示唆された。次に、タンパク質分解の主要経路であるリソソーム経路、プロテアソーム経路に対す

る阻害剤を用いて、CADM1 分解における両経路の関与を検討した。その結果、リソソーム阻害剤クロロキン投与により、クロロキン濃度依存的な CADM1 の発現の上昇が認められた。一方、プロテアソーム阻害剤 MG132 投与は CADM1 の発現に影響を与えなかった。この結果より、CADM1 はリソソーム経路を介して分解されることが示唆された。また、CADM1 がユビキチン化されるか否かを免疫沈降法を用いて検討した。その結果、CADM1 がユビキチン化されることが明らかとなった。更に、ユビキチン化される可能性がある CADM1 細胞内領域の 4 つのリシン残基全てをアルギニンに置換した CADM1-4xKR 変異体を作製し、変異体におけるユビキチン化の有無を免疫沈降法を用いて検討した。その結果、CADM1 細胞内領域のリシン残基が CADM1 のユビキチン化部位であることを明らかとした。そして、タンパク質翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを用いて、CADM1 のユビキチン化は CADM1 の分解に影響を与えるか否かを検討した。その結果、CADM1-4xKR 変異体は野生型 CADM1 と比較して分解が遅延することを明らかとした。これらの結果より、CADM1 はユビキチン化を受けリソソーム経路を介した分解を受けること、ならびに RanBPM は CADM1 細胞内領域と結合し、CADM1 のユビキチン化を抑制し、リソソーム経路を介した CADM1 分解を抑制することにより CADM1 を安定化していることが示唆された。