

癌抑制蛋白 hScrib のアポトーシスへの関与とその機能解析

生殖・発達・加齢医学

指導教員 矢野 哲 准教授

曾根 献文

目次

要旨	4
序文	5
方法	11
1. 細胞の培養方法とアポトーシス誘導法	11
2. ウェスタンブロット法による解析	11
3. 蛍光免疫染色による解析	12
4. 遺伝子導入法による解析	12
5. <i>in vitro</i> translation 法による解析	13
6. hScrib のベクター作成と変異体作製	14
7. TUNEL 法による解析	15
結果	16
1. アポトーシス誘導時における hScrib の発現の変化	16
2. hScrib の実行カスパーゼによる分解	18
3. hScrib におけるカスパーゼ-3 の切断部位の検索	18
4. アポトーシスシグナルにおける hScrib の役割	19
5. HPV E6 によるアポトーシス誘導時の hScrib への影響	21
考察	22
1. hScrib と実行カスパーゼの関係について	22
2. hScrib におけるカスパーゼ3の切断部位について	23
3. アポトーシスにおける hScrib の役割	24
4. 本研究の臨床への発展	25

謝辭.....28

圖.....29

参考文献.....58

要旨

アポトーシスは最終的に蛋白分解酵素である実行カスパーゼが活性化し、特定の蛋白質（デスサブストレイト）を分解することにより進行する。我々は癌抑制蛋白 **hScrib** のアポトーシスへの関与とその機能を検討した。**hScrib** はアポトーシスが進行する過程で実行カスパーゼ、特にカスパーゼ 3 によって分解を受けるデスサブストレイトであることがわかった。**hScrib** におけるカスパーゼ 3 の切断部位は 504 番目のアミノ酸の C 末側である。この部位は細胞接着に関わる蛋白複合体を崩壊させるのに効果的な切断部位であることが推測される。アポトーシスが進行する過程で **hScrib** が分解されることによりアドヘレンスジャンクションを形成する蛋白質の分解が進行し、細胞接着の崩壊が促されることによって異常細胞を正常細胞から離解させるというシステムの可能性が示された。

序文

1. アポトーシス

組織のホメオスターシスは細胞の生死の均衡が保たれていることにより維持されている。

細胞は DNA ダメージ等を受けた際に内在的に自己破壊するメカニズムが備わっており、そのメカニズムは細胞のプログラム死ーアポトーシスと呼ばれる（1）。多細胞生物の中で組織のホメオスターシスを調節している多くのメカニズムはアポトーシスと深く関わっており、細胞の分化や臓器生成にも関連している（2）。アポトーシスが障害されると組織のホメオスターシスが崩れ腫瘍形成の原因となる。またアポトーシスに対して抵抗性であると腫瘍細胞は生体内の免疫機能による監視から逃れやすくなり、化学療法、放射線療法等に抵抗性となりやすくなるのが臨床上問題となっている。よってアポトーシスの機能を理解することは新しい癌治療を構築するに当たって非常に重要である。

2. カスパーゼ (caspase)

カスパーゼ (caspase) とは cysteinyl aspartic acid protease の略で、現在までにヒトでは 12 種類の遺伝子が見つかっている（3）。アポトーシスの誘導はカスパーゼカスケードの活性化が中心的なシグナルとなる。カスパーゼは N 末端側からプロドメイン・大サブユニット (p20)・小サブユニット (p10) がつながった前駆体として存在するが、アポトーシス誘導時はプロドメインが切断され、大サブユニットと小サブユニットそれぞれ 2 つずつからなる四量体の活性型プロテアーゼとなる（4）。カスパーゼカスケードと呼ばれる理由は開始

カスパーゼから実行カスパーゼへと、それぞれが活性化することによりシグナルが伝わり増幅されるからである（図1）。

またカスパーゼはアミノ酸配列のアスパラギン酸のC末側を切断する特徴があり、特にカスパーゼ3においてはアミノ酸配列D-X-X-DのC末側が典型的な切断部位であることが知られている（5）。

3. アポトーシスのシグナル伝達経路

通常、アポトーシスを引き起こすシグナルは大きく2つに分けられる。1つは細胞膜に存在するデスレセプターを介する extrinsic pathway と呼ばれる経路で、もう1つはミトコンドリアを介する intrinsic pathway と呼ばれる経路である。この2つの経路は最終的に蛋白分解酵素であるカスパーゼが活性化することによってアポトーシスに至る。

デスレセプターとは TNF（腫瘍壊死因子：tumor necrosis factor）レセプターファミリーに属するレセプターファミリーで、その中の多くは細胞内領域に DD（death domain）と呼ばれるドメインを持つⅡ型膜タンパク質であり、アポトーシス誘導シグナルを細胞内に伝達するレセプターである（6、7）。その主要な分子としては Fas、TNF レセプター I（TNFR I）、TRAIL レセプター（DR4/TRAIL-R1 と DR5/TRAIL-R2）等がある（7、8）。それらのデスレセプターにリガンドが結合すると細胞内領域に存在する DD に FADD（Fas-associated death domain）が会合する。FADD は C 末端側に DD をもち、N 末端側に DED（death effector domain）をもつアダプター分子である。DD や DED は α ヘリックス構造を繰り返して持つ分子であり、基本的にホモフィリックな相互作用で結合する。すなわち、デスレセプター

の DD と FADD の DD が会合し、FADD の DED に DED をもつ分子が会合する。その分子は、プロドメインに DED を持つ開始カスパーゼであるカスパーゼ 8 とカスパーゼ 10 である。デスレセプター・FADD・プロカスパーゼ 8 からなる DISC(death-inducing signaling complex)と呼ばれる複合体が形成され、DISC の中でプロカスパーゼ 8 が切断されることによって活性化する (9、10) (図 2)。また活性化したカスパーゼ 8 は DISC から遊離し、実行カスパーゼであるカスパーゼ 3 やカスパーゼ 7 を切断して活性化させる。カスパーゼ 8 が直接実行カスパーゼを切断してアポトーシスを誘導する細胞は Type I 細胞 (活性化した免疫の細胞が代表例である) と呼ばれる。

一方、カスパーゼ 8 が実行カスパーゼを直接切断せずにアポトーシスを誘導する系も存在する。カスパーゼ 8 は Bcl-2 ファミリーの BH3 only タンパク質の 1 つである Bid を切断する。切断された Bid はミトコンドリアに作用してシトクロム C を放出させ、カスパーゼ 9 の活性化を誘導する (9、10)。Bid を切断してアポトーシスを誘導する細胞は Type II 細胞と呼ばれる (肝臓の実質細胞が代表的な例である)。活性化したカスパーゼ 9 は実行カスパーゼであるカスパーゼ 3、カスパーゼ 6、カスパーゼ 7 を活性化させ、それらの実行カスパーゼがデスサブストレイト(death substrates)と呼ばれる特定のタンパク質を分解することにより細胞内の化学的変化、形態学的変化を引き起こしアポトーシスに至る (図 3)。

3.癌抑制遺伝子

癌細胞では、いくつかの遺伝子に発現の低下や変異がみられる。それらの遺伝子は癌の発生を抑制する機能を持つと考えられ、癌抑制遺伝子(tumor suppressor gene; TSG)と呼ばれている

(11)。 *Rb* 遺伝子が網膜芽細胞腫の発生に深く関わる遺伝子として発見されて以降、様々な遺伝子が癌抑制遺伝子の候補として同定されている。正常な状態では癌抑制遺伝子の産物は、細胞周期の制御、アポトーシスの誘導、転写の制御、DNA 損傷の修復など様々な活性を持つことが報告されている。

ショウジョウバエにおいては、癌抑制遺伝子はその遺伝子の変異体の特徴から2種類に分類される(12)。ひとつは細胞密度が単純に上昇することに伴い組織が異常に増大する過形成性癌抑制遺伝子(hyperplastic tumor suppressor gene; hTSG)である。もうひとつは細胞極性の崩壊によって、組織が異常に増大する異形成性癌抑制遺伝子(neoplastic tumor suppressor gene; nTSG)である。前者として *PTEN*, *Tsc1/2*, *salvador*, *warts*, *hippo*, *fat* などが同定されており、後者として *lethal giant larvae (lgl)*, *discs large (dlg)*, *scribble (scrib)* が同定されている(図4)。

4. 異形成性癌抑制遺伝子(neoplastic tumor suppressor gene; nTSG)

野生型のショウジョウバエの成虫原基(成虫の体幹に発生していく部分)は、3齢幼虫後期になると分化・増殖を休止する。ところが nTSG 変異型のショウジョウバエでは、3齢幼虫後期になっても成虫原基が増殖を休止せず上皮性の腫瘍を形成することがわかっている。この腫瘍を顕微鏡下に観察すると一つ一つの細胞が円形で、周囲との接着に乏しく、多層に積み重なってできていることがわかる。またこの腫瘍は周辺の組織に浸潤したり、遠隔臓器に転移したりする。このようにヒトの癌組織に類似した特徴を持っているため、nTSG は癌研究の分野で注目されている。ショウジョウバエでは現在のところ *lethal giant larvae (lgl)*, *discs large (dlg)*, *scribble (scrib)* という3つの

異形成性癌抑制遺伝子がみつがっているが、それぞれの変異体の表現型は非常に似ている。そのため 3 つの nTSG は、あるプロセスにおいて共通した経路で機能していると考えられている。3 つの nTSG が発現する異形成性癌抑制蛋白 (neoplastic tumor suppressor protein) の構造は、無脊椎動物から脊椎動物にいたるまで高度に保存されている (12)。Lgl は数個の WD40 (tryptophan-aspartic acid) ドメインと aPKC (atypical Protein Kinase C) により修飾されるリン酸化ドメインを持っている。Dlg は MAGUK (Membrane-Associated Guanylate Kinase) ファミリー蛋白のひとつで、3 個の PDZ (PSD95, Dlg, ZO-1) ドメイン、SH3 (Src Homology 3) ドメイン、GUK (Guanylate Kinase) ドメインからなっている。Scrib は LAP4 蛋白であり、16 個の LRRs (Leucine Rich Repeats) と 4 個の PDZ ドメインからなっている (図 5)。これらの 3 つの蛋白は Scrib 複合体として細胞内で協調して機能していると考えられているが、その詳細は未だ不明である。Dlg と Scrib は上皮細胞の側底部に局在しており、細胞膜に結合する足場蛋白であることがわかっている。一方、Lgl の局在は Dlg や Scrib とは異なっていると考えられている。また Dlg のヒトホモログである hDlg はアポトーシスシグナルの中で、実行カスパーゼであるカスパーゼ-3 によって分解されるデスサブストレイトであることが報告されている (13)。

5.Scrib

Scrib は前述の通り、LAP4 蛋白であり N 末側から 16 個の LRRs (Leucine Rich Repeats)、LAPSD-a、LAPSD-b、4 個の PDZ ドメインからなっている。Scrib は正常細胞においては細胞膜のアドヘレンスジャンクションに局在し、同じ異型性癌抑制蛋白 Dlg や細胞接着において中心的な役割を担う蛋白質である E-cadherin と相互作用していることが報告されている (14,15)。Scrib は細胞の極性

保持を担っており、ショウジョウバエにおいて Scrib が変異すると、細胞極性が崩壊することにより細胞が異常増殖し組織が癌化することが知られている。また我々のグループの研究で Scrib のヒトホモログである hScrib は、上皮細胞の G1 期から S 期における細胞周期を調節することにより細胞の異常増殖を抑えていることが報告されている(16)。hScrib は子宮頸癌の原因ウイルスであるハイリスク HPV(16 型、18 型)E6 癌蛋白の標的蛋白質であり、ユビキチン-プロテアソーム系を介して分解されていることが報告されている(図 6)(17、18)。また臨床検体において、正常子宮頸部上皮から前癌病変である子宮頸部異型上皮、子宮頸部浸潤癌へ進行するに従って hScrib の蛋白発現が減少することが免疫染色法、ウェスタンブロット法において確認されている。また mRNA レベルにおいても、子宮頸部浸潤癌組織における hScrib の発現の減少が認められている。一方 HPV 陰性の子宮頸癌組織においては、hScrib の発現の減少は認められなかったことから、HPV 陽性の子宮頸癌の発生には hScrib の分解が大きく関わっていると考えられる(19)。以上のことから hScrib は重要な癌抑制蛋白質であり同じ nTSG である hDlg がデスサブストレイトであることが報告されていることから、今回我々は hScrib がデスサブストレイトであるかに注目し、アポトーシスにおける役割とその機能解析について検討行った。

方法

1. 細胞の培養方法とアポトーシス誘導法

HaCaT 細胞(ヒト皮膚角化細胞株)、CaCo-2 細胞(大腸癌細胞株)、Hela 細胞(子宮頸癌細胞株) それぞれを 10%BSA (invitrogen) DMEM 溶液に密な状態(コンフルエント)になるまで培養した。アポトーシス誘導は 0.24J UV 照射、200nM エトポシド(Sigma), 500ng/ml 抗 Fas 抗体(MBL)、100 μ g/ml サイクロヘキシミド(Sigma)、2000U/ml TNF- α (Relia Tech GmbH)にて行った。追加実験として 50 μ M Z-DEVD-FMK (R&Dsystems)、Ac-VEID-CHO (Biomol)等のカスパーゼ阻害剤を培養液に添加し、上記のアポトーシス誘導を行った。

2. ウェスタンブロット法による解析

蛋白抽出液を得るために培養細胞を用いた。ディッシュ上で培養した細胞を上記方法でアポトーシス誘導したのち、時間ごとに NP-40 lysis buffer (100mM Tris-HCl at pH 8.0, 100mM NaCl, 1% NP-40)で回収した。回収した液体を -80 $^{\circ}$ Cで凍結した後に氷上で融解させ 15000rpm で 20 分間遠心し、上清をタンパク抽出液として使用した。アポトーシス誘導時における hScrib の発現の変化を調べるために、抗 Scrib 抗体(Santa Cruz Biotechnology)を用いウェスタンブロット法にて確認した。またタンパク量を合わせるためのコントロールとして抗 α -Tublin 抗体を、アポトーシス誘導時の発現の変化の比較として抗 hDlg 抗体(Santa Cruz Biotechnology)、抗 LaminB1 抗体(Santa Cruz Biotechnology)を用いた。またアポトーシス誘導時のカスパーゼ 3 の活性化の判定として抗 procaspase-3 (Santa Cruz Biotechnology)抗体を、GFP-Scrib の発現を確認のために抗 GFP 抗体

(Zymed)を用いた。

3. 蛍光免疫染色による解析

アポトーシス誘導時の hScrib の局在の変化を検討するために、蛍光免疫染色法を用いた。

HaCaT 細胞、CaCo-2 細胞を coverslip 上で密な状態(コンフルエント)になるまで培養した。上記方法にてアポトーシス誘導した培養細胞を4%のホルムアルデヒドで固定し、0.2%の Triton X-100 で浸透化した。10%BSA (Invitrogen) PBS 溶液でブロッキングをした後に、一次抗体として抗 Scrib 抗体(400 倍希釈)、抗 hDlg 抗体(100 倍希釈)を用いて培養細胞と反応させた。一次抗体を丁寧に洗浄して、蛍光標識二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat Ab (Invitrogen), Alexa Fluor 568-conjugated donkey anti-goat Ab (Invitrogen), Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse Ab, Alexa Fluor 568-conjugated rabbit anti-mouse Ab (Invitrogen) (それぞれ 200 倍希釈)を用いて培養細胞と反応させた。またアポトーシスの判定としてヘキスト染色を行った。2次抗体を丁寧に洗浄した後 Hoechst33342(Sigma)を用いて培養細胞を反応させた。Hoechst33342 を丁寧に洗浄した後 MountQuick (Daido Sangyo)を用いて固定後、共焦点顕微鏡下に観察した。

4. 遺伝子導入法による解析

さらに培養細胞内に pEGFP -WT hScrib 及び pEGFP mutant hScrib(pEGFP -504DA hScrib)を遺伝子導入し、GFP 融合 hScrib 蛋白及び 504DA hScrib 蛋白を強発現させて、アポトーシス誘導時の hScrib の変化と機能について検討を行った。MDCK 細胞(イヌ腎臓由来細胞株)を coverslip 上で培養し、Polyfect Transfection Reagent(Qiagen)、Effectene Transfection Reagent(Qiagen)を

用いて pEGFP-WT hScrib 及び pEGFP-504DA hScrib を遺伝子導入した。遺伝子導入された培養細胞に UV 照射にてアポトーシス誘導を行い、それぞれ時間ごとに 4%ホルムアルデヒドで固定し、0.2% Triton X-100 で浸透化した。10%BSA (Invitrogen) PBS 溶液でブロッキングをした後に、一次抗体として抗 E-cadherin 抗体(BD Trasnduction Laboratories)(400 倍希釈)を用いて培養細胞と反応させた。一次抗体を丁寧に洗浄して、蛍光標識二次抗体として Alexa Fluor 568-conjugated rabbit anti-mouse Ab (Invitrogen) (200 倍希釈)を用いて培養細胞と反応させた。またアポトーシスの判定としてヘキスト染色を行った。2次抗体を丁寧に洗浄した後、Hoechst33342(Sigma)を用いて培養細胞を反応させた。Hoechst33342(Sigma)を丁寧に洗浄して MountQuick (Daido Sangyo)を用いて固定後、蛍光顕微鏡下に観察した。また WT hScrib と 504DA hScrib のアポトーシス時における細胞離解への関与を比較するために、遺伝子導入された MDCK 細胞それぞれ 300 個の内、アポトーシス細胞 (ヘキスト染色により核の凝集や断片化が認められる細胞) 数、細胞接着が消失している細胞 (E-cadeherin の発現が消失している細胞) 数を測定した。また HPV-E6 によるアポトーシス誘導時における hScrib への影響を検討するために、293T 細胞株に pCMV-16E6 ベクター (HPV 16 型 E6 ベクター) を遺伝子導入し UV 照射にてアポトーシス誘導を行った。

5. *In vitro* translation 法による解析

hScrib とカスパーゼの関係を調べるために *In vitro* translation 法にて検討を行った。Promega TNT coupled transcription-translation Rabbit-Reticulocyte lysate system(Promega)にて^[35S]メチオニンでラベルした hScrib および hScrib mutants を作成した。それらを caspase-3(Chemicon), caspase-6(Alexis), caspase-7(Chemicon), caspase-8(Bio vision) 存在下に 37°C、1時間反応させ

た。それぞれの反応物を SDS-PAGE 法にて電気泳動を行い、autoradiography 法にて解析を行った。

6.hScrib のベクター作成と変異体作製

hScrib(GenBank accession number AY062238)の cDNA の全長を pcDNA3 (Invitrogen)ベクターにサブクローニングした。Scrib 内のアスパラギン酸をアラニンにアミノ酸置換した変異体を overlap polymerase chain reaction 法を基にした QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit II (Stratagene)を用いて作製した。

変異体作製のためのプライマーの配列は以下の通りである。

Asp₅₀₄Ala 5'-CCTTGCCAGCCAGCCTCTGGGTCGCCC-3'

Asp₅₂₆Ala 5'-GGCCTGAGTGAAGCCTCTCGCCCATCTGCC-3'

Asp₁₀₆₈Ala 5'-GTGAACGGGCAAGCCGTGCGGGATGCC-3'

Asp₁₀₇₁Ala 5'-CAAGACGTGCGGGCTGCCACGCACCAAG-3'

Asp₁₁₃₁Ala 5'-GGCAACCCCCGCGCCCCACAGACGAG-3'

Asp₁₁₃₄Ala 5'-CGCGACCCACAGCCGAGGGCATCTTC-3'

内部ドメインを欠損させた hScrib の変異体を作成するために、polymerase chain reaction 法(PCR 法)を用いて以下のアミノ酸配列である cDNA を作成し、pcDNA3 (Invitrogen)ベクターにサブクローニングした。

LRR+PDZ₁₋₃ (アミノ酸 1-1099)

LRR+PDZ₁₋₂ (アミノ酸 1-950)

LRR+PDZ₁ (アミノ酸 1-815)

LRR+LAPSD (アミノ酸 1-492)

LRR (アミノ酸 1-387)

また Scrib と GFP の融合タンパク質を作成するために Scrib の cDNA の全長を pEGFP-C1 ベクター(invitrogen)にサブクローニングした。

7.TUNEL 法による解析

HaCaT 細胞、CaCo-2 細胞を coverslip 上で密な状態(コンフルエント)になるまで培養した。上記方法にてアポトーシス誘導した培養細胞を4%のホルムアルデヒドで固定し、0.2%の Triton X-100 で浸透化した。10%BSA (Invitrogen) PBS 溶液でブロッキングをした後に、Promega Dead-ENDTMFluorometric TUNEL System(Promega)を用い、TUNEL 法にてアポトーシス解析を行った。

結果

1. アポトーシス誘導時における hScrib の発現の変化

Hela 細胞に対して抗 Fas 抗体、サイクロヘキシミド（デスレセプターを介するアポトーシスシグナルを増強させる試薬）、抗 Fas 抗体/サイクロヘキシミド添加群にわけて、それぞれアポトーシス誘導を行い時間ごとに蛋白抽出し、抗 hScrib 抗体及びコントロールとして抗 α -tubulin 抗体にてウェスタンブロット解析を行った。抗 Fas 抗体添加群では時間が経過するに従って hScrib の発現は低下し、170kDa 付近に新たなバンドが確認された。サイクロヘキシミド添加群でも同様の経過が認められ、抗 Fas 抗体/サイクロヘキシミド添加群ではその傾向がより顕著に認められた（図 7）。このことから hScrib はアポトーシス誘導時に分解され、発現が減少することから推測される。また C20aa にエピトープを持つ抗 hScrib 抗体、PDZ₁₋₄ ドメインにエピトープを持つ抗 hScrib 抗体とエピトープの異なる抗 hScrib 抗体を用い、ウェスタンブロット解析にて比較検討を行った。両方の抗体ともアポトーシス誘導行くと 170kDa 付近に cleavage が認められたので、p170 hScrib は PDZ ドメインを含む C 末側であることがわかる（図 8）。また TNF α 単独では hScrib の発現の変化はほとんど認められなかったが、TNF α /サイクロヘキシミド添加群にてアポトーシス誘導すると、抗 Fas 抗体と同様 hScrib の発現の減少が認められ（図 9）、デスサブステレイトとして広く知られている蛋白質 laminB 1 (20)と比較してもアポトーシス誘導時に同程度分解を受けることがわかる（図 10）。次にアポトーシス誘導時の hScrib の細胞内の発現の変化を調べるために、HaCaT

細胞に UV 照射にてアポトーシス誘導し、抗 hScrib 抗体にて蛍光免疫染色、アポトーシスの判定はヘキスト染色を行った。UV 非照射群では、hScrib は細胞膜に発現が認められるが、UV を照射するとアポトーシス細胞（ヘキスト染色にて核の凝集化、断片化が認められる細胞）においては、細胞膜での hScrib の発現が減少し細胞質に瀰漫性に認められることがわかる（図 11）。次に TUNEL 法によって解析を行った。HaCaT 細胞に UV 照射にてアポトーシス誘導を行い、時間ごとに細胞固定し抗 hScrib 抗体にて蛍光免疫染色、アポトーシスの判定として Promega Dead-ENDTM Fluometric TUNEL System(Promega)を用い TUNEL 法にてアポトーシス解析を行った。UV 照射後、時間が経過すると TUNEL 陽性細胞が増加し、TUNEL 陽性細胞においては hScrib の細胞膜における発現の減少が認められた。また図 12 矢印に示されている UV 照射後 4 時間後という比較的早期のアポトーシス細胞においても、hScrib の細胞膜における発現の減少が認められた（図 12）。このことから hScrib は、アポトーシス誘導時の比較的早期の段階で分解を受けることがわかる。

次に既にカスパーゼ 3 に分解されると報告されている、同じ異形成性癌抑制遺伝子 (neoplastic tumor suppressor gene; nTSG) である hDlg との比較を行った。HaCaT 細胞に UV 照射、エトポシドにてアポトーシス誘導を行い時間ごとに蛋白抽出し、抗 hScrib 抗体、抗 hDlg 抗体にてウェスタンブロット解析を行った。UV 照射した群でもエトポシド添加した群においても、hDlg より hScrib において早期での発現の減少が認められた（図 13）。また CaCo2-細胞に UV 照射にてアポトーシス誘導を行い時間ごとに固定し、抗 hScrib 抗体、抗 hDlg 抗体にて蛍光免疫染色を行った。蛍光免疫染色においても hDlg より hScrib において細胞膜における早期での発現の減少が認められた（図

14)。

2. hScrib の実行カスパーゼによる分解

In vitro translation 法にて [^{35}S]メチオニンでラベリングした hScrib を発現し、カスパーゼ 3、カスパーゼ 6、カスパーゼ 7、カスパーゼ 8 と反応させ、autoradiography 法により解析を行った。hScrib は実行カスパーゼであるカスパーゼ 3、カスパーゼ 6、カスパーゼ 7 によって分解を受けた (図 15)。またカスパーゼ 3 阻害剤を添加した反応物では、カスパーゼ 3 による分解を受けなかった (図 16)。これにより hScrib は実行カスパーゼによって分解されることが推測される。

次に細胞内でアポトーシス誘導時に実行カスパーゼに分解されるかを確認するために、カスパーゼ阻害剤を使った実験を行った。HaCaT 細胞に UV 照射した群、カスパーゼ 3 阻害剤 (Z-DEVD-FMK) を添加した細胞に UV 照射した群、カスパーゼ 6 阻害剤 (Ac-VEID-CHO) を添加した細胞に UV 照射した群に分け時間ごとに蛋白抽出し、抗 hScrib 抗体にてウェスタンブロット解析を行った。UV 照射した群では hScrib は時間ごとに発現の減少が認められるが、カスパーゼ阻害剤を加えた群では発現の減少が認められなかった。特にカスパーゼ 3 阻害剤を加えた群では、カスパーゼ 6 阻害剤を加えた群と比較してより hScrib の分解の阻害が認められた (図 17)。このことから hScrib はアポトーシスカスケードが進行していく過程で、実行カスパーゼ特にカスパーゼ 3 によって分解を受けるデスサブストレイトであることがわかった。

3. hScrib におけるカスパーゼ-3 の切断部位の検索

カスパーゼはアミノ酸配列の中で、アスパラギン酸の C 末側を切断する特徴がある。しかし hScrib のアミノ酸配列の中でアスパラギン酸は 100 個以上認められるので、まず hScrib の内部ドメイン欠

失変異体を作成し切断部位を推定した。PCR 法にて hScrib の内部ドメイン欠失変異体である LRR-PDZ₃、LRR-PDZ₂、LRR-PDZ₁、LRR-LAPSD、LRR を作成し、pcDNA3 にサブクローニングした。それらのサンプルを *In vitro* translation 法により [³⁵S]メチオニンにてラベリングした内部ドメイン欠失変異体を発現し、カスパーゼ 3 と反応させた。LRR-PDZ₃、LRR-PDZ₂、LRR-PDZ₁ はカスパーゼ 3 によって分解されたが LRR-LAPSD、LRR はカスパーゼ-3 によって分解されず、図 18 の三角印はカスパーゼ 3 によって分解された hScrib の N 末側、矢印は内部ドメインを欠失させた各 hScrib 変異体がカスパーゼ 3 によって分解された C 末側部分であることがわかる。このことから切断部位は LAPSD から PDZ₁の間にあると推測される(図 18)。次に LAPSD から PDZ₁の間にあるアスパラギン酸をアラニンに変える点突然変異体を N 末側にあるアスパラギン酸から最初に 2 個作成し、pcDNA3 にサブクローニングした(pcDNA3-504DA Scrib 及び pcDNA3-526DA Scrib)。上記のようなサンプルを *In vitro* translation 法により [³⁵S]メチオニンにてラベリングした点突然変異体を発現させカスパーゼ 3 と反応させたところ、504DA hScrib においてカスパーゼ 3 に分解を受けなかった(図 19)。すなわち hScrib におけるカスパーゼ 3 の切断部位は 504 番目のアミノ酸の C 末側であり、このアスパラギン酸は LAPSD から PDZ₁の間にあるアスパラギン酸の中で最も N 末側に存在する。

4. アポトーシスシグナルにおける hScrib の役割

これまでの実験から hScrib はアポトーシスが進行する過程で実行カスパーゼによって分解されるデスサブストレイトであることがわかったが、それがアポトーシスシグナルの中でどのような役割を持つか検討するために遺伝子導入法にて検討を行った。MDCK 細胞に pEGFP-WT hScrib、

pEGFP-504DA hScrib を遺伝子導入し、その 48 時間後 UV 照射にてアポトーシス誘導を行った。

時間ごとに固定し、細胞接着の判定として抗 E-cadherin 抗体(21)にて蛍光免疫染色、アポトーシスの判定としてヘキスト染色を行った。pEGFP-WT hScrib が遺伝子導入されている MDCK 細胞においては UV 照射前では GFP-WT Scrib は細胞膜に発現しているが、UV 照射後ではその細胞膜での発現の減少が認められる。それに伴い細胞膜に発現している E-cadherin も UV 照射後は発現の減少が認められ(すなわち細胞接着の消失が認められる)、ヘキスト染色により核の凝集や断片化等のアポトーシス像が認められた(図 20、21)。一方、カスパーゼ 3 によって分解されない hScrib すなわち pEGFP-504DA hScrib を遺伝子導入した MDCK 細胞においては、UV 照射前では Wild type 同様 GFP-504DA hScrib は細胞膜に発現しているが、UV 照射後もその細胞膜での発現は保たれている。それに伴い pEGFP-504DA hScrib が遺伝子導入された MDCK 細胞においては UV 照射後も E-cadherin の細胞膜での発現が保たれている(すなわち細胞接着が保たれている)が、ヘキスト染色においてはアポトーシス像が認められた。このことからカスパーゼ-3 によって hScrib が分解されないと細胞内ではアポトーシスが進行しているが、細胞接着の消失すなわち、細胞離解が起らないという現象が認められる(図 22、23)。次にウェスタンブロット法を併用し解析を行った。MDCK 細胞に pEGFP-WT hScrib、pEGFP-504DA hScrib を遺伝子導入し、その 48 時間後 UV 照射にてアポトーシス誘導した。UV 照射後、時間ごとに蛋白抽出し抗 GFP 抗体にてウェスタンブロット解析を行った。pEGFP-WT hScrib を遺伝子導入した群では GFP-WT hScrib 蛋白はアポトーシス進行過程において、カスパーゼの分解により経時的にその発現は減少した。一方、pEGFP-504DA hScrib を遺伝子導入した群では、その発現の減少は認められなかった(図 24)。次

に定量的なアプローチを行った。MDCK 細胞にて pEGFP ベクター(コントロールベクター)、pEGFP-WT hScrib、pEGFP-504DA hScribを遺伝子導入し、UVにてアポトーシス照射後8時間後に固定し、遺伝子導入されたMDCK細胞それぞれ300個について細胞接着の消失が起きている細胞の割合(E-cadherin の発現が減少している細胞の割合)、アポトーシス細胞(ヘキスト染色にて核の凝集化や断片化が認められる細胞)の割合を検討した。コントロールベクター、pEGFP-WT hScribが遺伝子導入された細胞ではUV照射するとアポトーシス細胞の割合と細胞接着の消失が起きている細胞の割合が増加するが、pEGFP-504DA hScrib を遺伝子導入した細胞では、UV照射するとアポトーシス細胞の割合は増加するが(80%強)、細胞接着の消失している細胞の割合の増加は抑えられる(10%弱)(図 25)。このことからアポトーシス進行過程の中で実行カスパーゼが活性化し hScrib を分解することによって、細胞接着の消失が進行することが推測される(図 26)。

5. HPV-E6 によるアポトーシス誘導時の hScrib への影響

HPV-E6 によるアポトーシス誘導時の hScrib への影響を検討するために、293T 細胞株に pCMV-16E6 ベクター(HPV 16 型 E6 ベクター)、及びコントロールベクターを遺伝子導入した。遺伝子導入後、抗 Fas 抗体/サイクロヘキシミド添加群にてアポトーシス誘導し時間ごとに蛋白抽出を行い、抗 Scrib 抗体を用いてウェスタンブロット法にて検討を行った。アポトーシス誘導前においては、コントロールベクターを遺伝子導入した細胞株よりも pCMV-16E6 ベクターを遺伝子導入した細胞株において hScrib の発現は低下していた。アポトーシス誘導後においては、コントロールベクターを遺伝子導入した細胞よりも pCMV-16E6 ベクターを遺伝子導入した細胞の方が p170

hScrib すなわち hScrib のカスパーゼ依存性 cleavage の生成が抑えられた。(図 27)

考察

1. hScrib と実行カスパーゼの関係について

組織のホメオスターシスは細胞のプログラム死のシステム、すなわちアポトーシスにより保たれている。また細胞間接着の崩壊は、癌細胞や炎症細胞等の異常細胞を正常細胞から切り離す意味において、アポトーシスが進行する過程の中で重要な段階の一つである。

アドヘレンスジャンクションやタイトジャンクションに存在する細胞接着を形成する蛋白質の中で E-cadherin, β -catenin, FAK, PAK2, fodrin, plakoglobin, hDlg, ZO-1, ZO-2, occludin, MAGI-1, MAGI-2 等がカスパーゼによって分解されることが報告されている(21-29)。今回我々の研究で hScrib は実行カスパーゼであるカスパーゼ 3、カスパーゼ 6、カスパーゼ 7 によって分解されるデスサブステレイトであり、主にカスパーゼ 3 によって分解されることがわかった。

またアポトーシスシグナル伝達経路の中で、TNF- α や Fas リガンド等のデスリガンドを介する経路でも UV 照射やエトポシド等のミトコンドリアを介する経路においても hScrib は分解を受けることがわかった。すなわち、どのアポトーシスシグナル伝達経路においても hScrib は分解されることが示され、その分解がアポトーシスの中で必要不可欠であることが推測される。また早期の TUNEL 陽性細胞すなわちアポトーシス細胞においても hScrib の細胞膜での発現の減少が認められたので、hScrib の分解はアポトーシスの早期の段階で起っていると推測できる。

hDlg はショウジョウバエで発見されている異形成性癌抑制遺伝子 (neoplastic tumor suppressor gene; nTSG) である dlg のヒトホモログであり、カスパーゼ 3 によって分解されるデスサブ

ストレイトであることが報告されている。今回我々はアポトーシス誘導時における hScrib と hDlg の発現の比較を行ったが、hScrib の方がより早く発現の減少が認められた。これらの結果は hScrib の発現がアドヘレンスジャンクションの形成に重要であり、その発現の減少がアドヘレンスジャンクション形成蛋白質複合体の崩壊、すなわち細胞接着の消失に必要であることが推測される。また hScrib がデスサブストレイトとして広く研究されている LaminB1 と同程度分解されることから、hScrib は数多く報告されているデスサブストレイトの中でも重要な位置を占めることが推測される。

1-2 hScrib におけるカスパーゼ3の切断部位について

カスパーゼはアミノ酸配列の中でアスパラギン酸の C 末側を切断する特徴があり、特にカスパーゼ 3 では DXXD という典型的なアミノ酸配列の切断部位が報告されている。hScrib の中にも DXXD 配列が2か所認められ(D₁₀₆₈－V－R－D₁₀₇₁、D₁₁₃₁－P－T－D₁₁₃₄)、この中のアスパラギン酸をアラニンに変える点突然変異体を作成したが、それぞれがカスパーゼ 3 によって分解されたので DXXD というカスパーゼ 3 の典型的な切断部位は、hScrib においては切断部位でなかった。(unpublished data)。

hScrib は LAP (LRRs and PDZ) 蛋白質の中の一つであり、N 末側から 16 個の LRRs と C 末側に 4 つの PDZ ドメインを有する(30)。また LRRs と PDZ ドメインの間に LRR に類似した 38 個のアミノ酸に構成されているドメインがあり、それを LAPSD-a と呼ぶ。また LAP 蛋白質に特異的に存在し LRR モチーフとも関連せず、LRRs と PDZ ドメインの間で LAPSD-a の下流にある蛋白質を LAPSD-b と呼ぶ。われわれは始めに hScrib の内部ドメイン欠失変異体を作成しカスパーゼ 3 に

おける hScrib の切断部位を検討したが、PDZ ドメインには切断部位は無く、LAPSD と PDZ₁ の間に切断部位が存在することがわかった。

さらに切断部位を特定するためにアスパラギン酸をアラニンに変えるアミノ酸置換体を作成し、カスパーゼ 3 を反応させたが 504DA-hScrib において分解が認められなかった。すなわち hScrib の切断部位が 504 番目のアミノ酸の C 末側であり、この部位は LAPSD-b と PDZ₁ の間に位置しその中のアスパラギン酸の中でも最も N 末側に存在する。hScrib の LRRs から LAPSD-b まで含む N 末側 (hScrib₁₋₇₂₄、hScrib₁₋₅₁₈) は、上皮細胞の細胞膜に局在することが報告されている(15)。また同じく LAPSD-a, LAPSD-b を含んでいても、hScrib の N 末側 (hScrib₁₋₄₉₅) は細胞膜に局在せず細胞質に局在することが報告されている(16) (図 28)。このことからカスパーゼ-3 に切断された hScrib の N 末側(hScrib₁₋₅₀₄)は細胞膜に局在しないと推測することができる。また hScrib は主に PDZ ドメインを介して ZO-2、zyxin-related proteins、Lipoma Preferred Partner(LPP)protein、TRIP6 等の蛋白質と相互作用することにより、上皮細胞間の細胞接着に関わる蛋白複合体を形成している(31)。hScrib の切断部位が 504 番目のアミノ酸の C 末側であることは、hScrib の細胞膜での発現を減少させ細胞接着に関わる蛋白複合体を崩壊させるのに効果的な切断部位であることが推測される。

1-3 アポトーシスにおける hScrib の役割

アポトーシスにおいて細胞接着の崩壊は癌細胞や炎症細胞等の異常細胞を正常細胞から切り離す意味において、重要な過程の1つである。遺伝子導入法を用いた実験によりカスパーゼ 3 によって分解されない hScrib すなわち 504DA hScrib を強発現した細胞では、細胞内においては核の

凝集や断片化などアポトーシスが進行していたが、hScrib、E-cadherin の細胞膜での発現は保たれていた。すなわちカスパーゼ-3 によって hScrib が分解されないと、細胞内ではアポトーシスは進行していくが細胞が離解しないという現象が認められる。このことからアポトーシスが進行する過程で実行カスパーゼによって hScrib が分解されることにより、E-cadherin 等アドヘレンスジャンクションを形成する蛋白質の分解が進行し細胞接着の崩壊が促されることによって、異常細胞を正常細胞から離解させるというシステムが考えられる(図 26)。

1-4. 本研究における臨床への発展

本研究によりアポトーシスが進行しても異常細胞が正常細胞から切り離されず、組織の癌化が進行するような hScrib の状態は以下の 2 つの場合が考えられる。まず一つは異常細胞にカスパーゼ 3 抵抗性である hScrib の変異がある場合である。すなわち hScrib の 504 番目のアミノ酸に変異がある場合であり、様々な婦人科癌組織の臨床検体において hScrib の 504 番目のアミノ酸の変異があるか検討する必要がある。2 つ目は hScrib がカスパーゼ 3 による分解とは異なる分解を受け発現が減少している場合である。本研究において HPV E6 ベクターを細胞に遺伝子導入後、アポトーシス誘導するとコントロール群と比較して、E6 ベクターを導入した細胞において p170 hScrib、すなわち hScrib のカスパーゼ依存性 cleavage の生成が抑えられた。HPV E6 蛋白質により hScrib がユビキチン-プロテアソーム系を介して分解されているので、アポトーシスを誘導しても hScrib のカスパーゼ依存性 cleavage の生成が抑制される(図 29)。この検討により癌蛋白である HPV E6 によって抑制される hScrib のカスパーゼ依存性 cleavage 自体が、アポトーシス進行過程にて重要な

因子である可能性が考えられる(32)。すなわちカスパーゼ 3 によって hScrib が分解されアドヘレンスジャンクションにおける hScrib の発現が減少する事だけではなく、それによって生成される hScrib のカスパーゼ 3 依存性 cleavage が細胞接着関連蛋白を崩壊し、細胞離解を進行させる必要不可欠なシグナルである仮説が考えられる(図 29)。この仮説から HPV E6 による hScrib の分解によってアポトーシス進行時におけるカスパーゼ依存性 cleavage の生成が抑制され、細胞離解が阻害されと考えられる(図 29)。以上より子宮頸癌では HPV E6 による hScrib の分解は細胞極性や細胞周期調節の崩壊だけでなく、アポトーシス時の細胞離解を阻害することにおいても癌化を引き起こしている可能性が考えられる。しかし hScrib のカスパーゼ依存性 cleavage が細胞離解させるシグナルである仮説及び HPV E6 によるアポトーシス時の細胞離解の阻害については、今後更なる詳細な in vitro による検討と臨床検体を用いた検討が必要である。

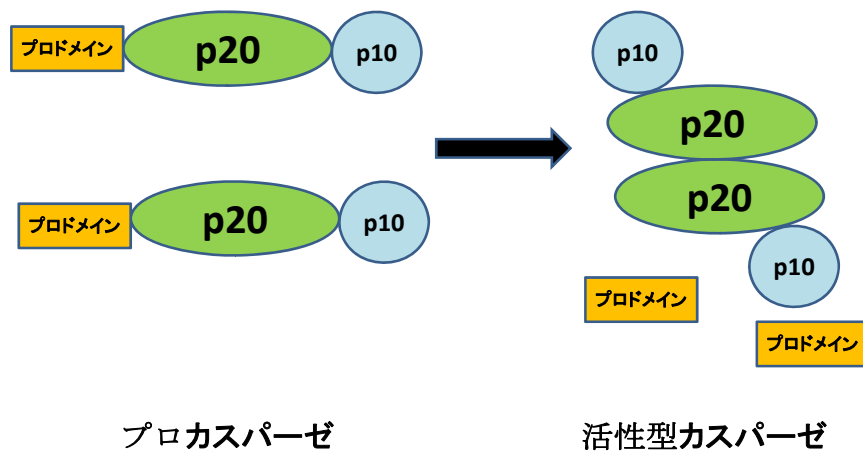
また化学療法や放射線照射抵抗性の癌のメカニズムの解明は臨床において重要である。hScrib にカスパーゼ 3 抵抗性の変異がある場合、またはカスパーゼ 3 とは異なった分解を受け発現が減少している場合において、抗癌剤等によってアポトーシスを誘導しても癌細胞が正常細胞から切り離すことができず治療抵抗性になる可能性が考えられる。すなわち hScrib の変異や発現の減少は正常組織から癌組織への進行だけでなく、既に癌化している組織における化学療法や放射線治療抵抗性に強く影響している可能性がある。例えば婦人科癌において卵巣癌は多くの組織型において化学療法が著効する一方、卵巣明細胞癌においては抗癌剤感受性が低く予後不良な組織型であることが多くの基礎的及び臨床的知見から明確になってきている。我々のグループの研究にて卵巣明細胞癌では、その臨床検体を使用し Tissue マイクロアレイ法にて切片

を作製し抗 hScrib 抗体を用いて免疫染色を行った所、化学療法が著効する他の組織型と比較して優位に hScrib の発現の低下が認められた。(unpublish deta)。すなわち hScrib の発現の低下が化学療法抵抗性につながる可能性が考えられる。以上のことより hScrib のアポトーシスへの関与を今後更に研究することにより、組織の癌化及び化学療法や放射線耐性の癌のメカニズムの解明につながる可能性が示された。

謝辞

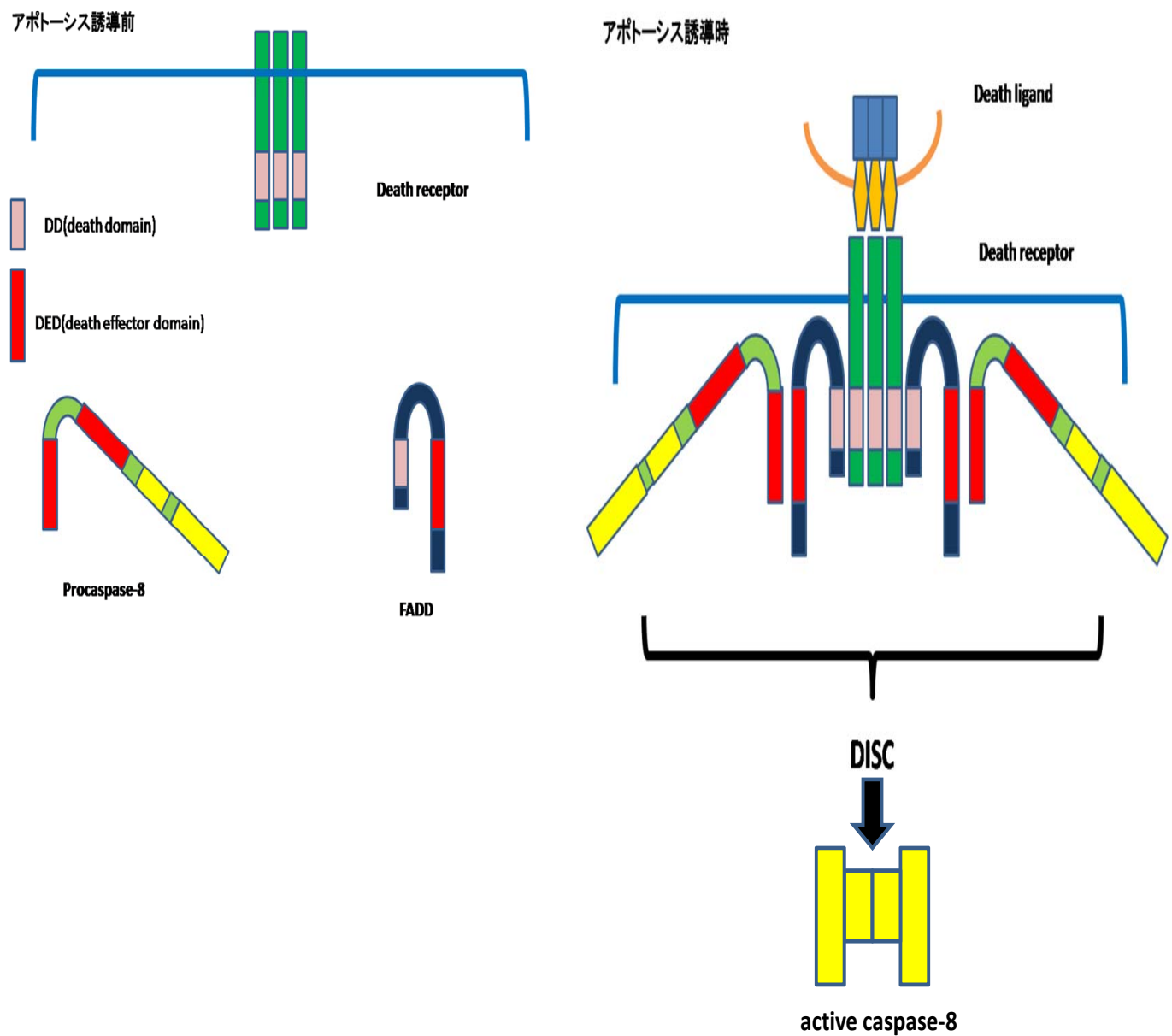
稿を終えるにあたり、御指導、御高閲いただいた、東京大学医学部産婦人科教室の武谷雄二教授、上妻志郎教授、矢野哲准教授、中川俊介講師に深く感謝いたします。また、実験計画や実験手法について御指導、御協力いただいた、東京大学医学部産婦人科教室の織田克利先生、平池修先生、松本陽子先生、長阪一憲先生、鶴賀哲史先生、平池春子先生、小山哲先生、宮本雄一郎先生、庄司恵子先生に心よりお礼申し上げます。

(図 1) カスパーゼの活性化



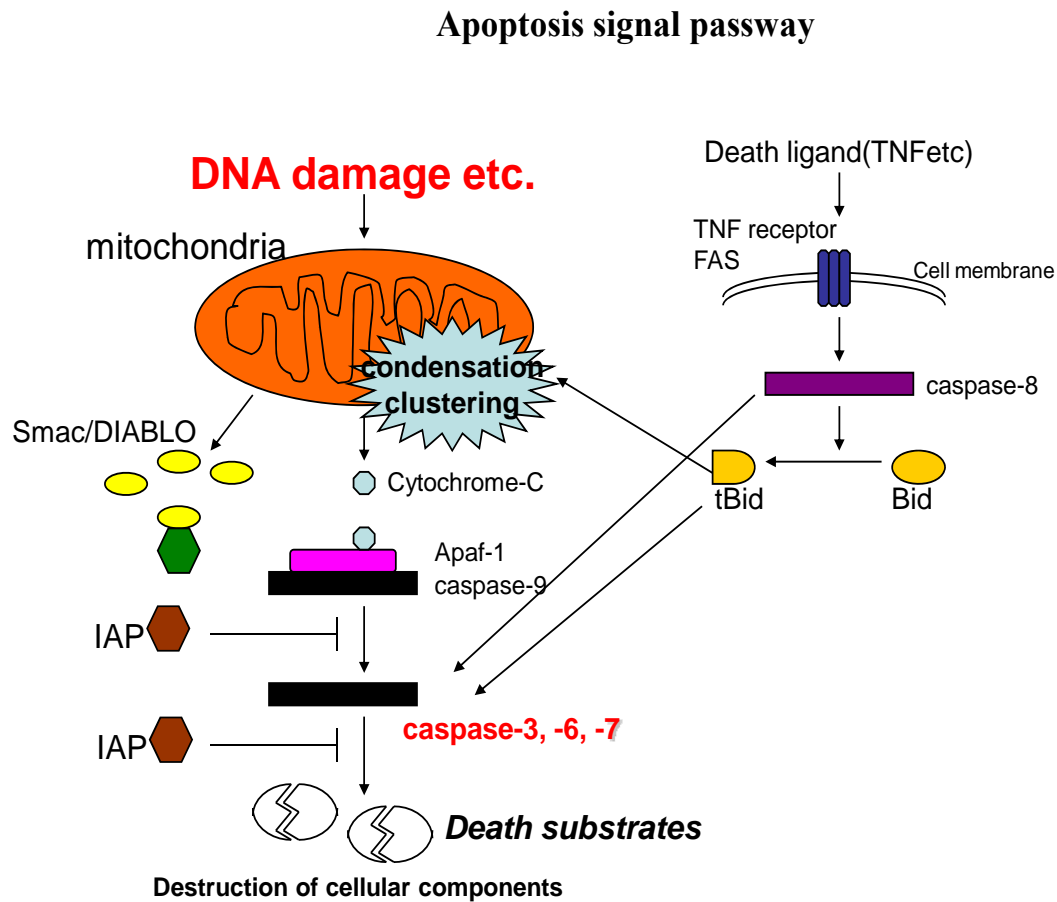
カスパーゼはN末端側からプロドメイン・大サブユニット (p20)・小サブユニット (p10) がつながった前駆体として存在する。前駆体はアポトーシスが進行する過程で切断され、大サブユニットと小サブユニット2つずつからなる四量体の活性型プロテアーゼとなる。

(図 2) デスレセプターを介するアポトーシス誘導シグナル



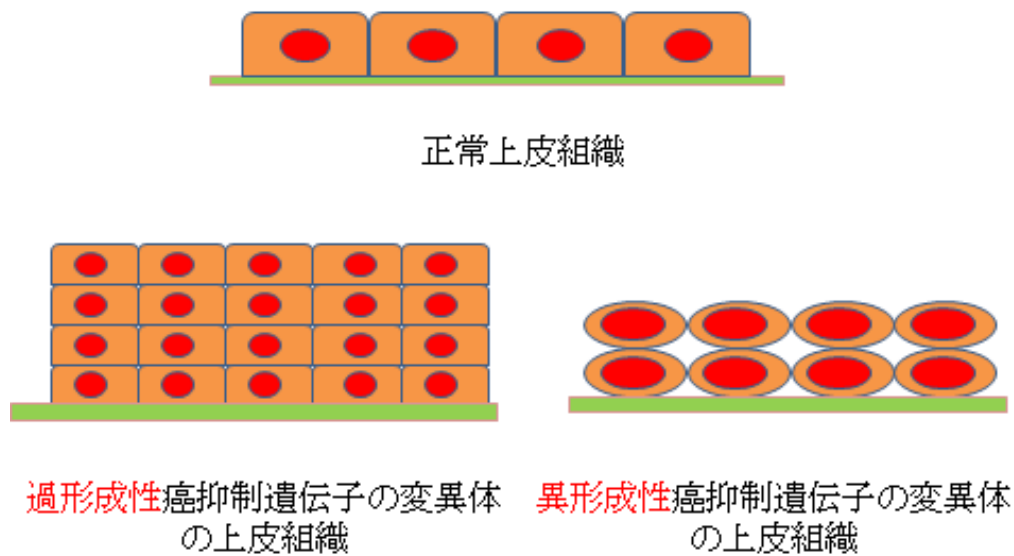
デスリガンドがデスレセプターに結合するとデスレセプターの DD と FADD の DD が会合し、FADD の DED に DED をもつ分子が会合する。その分子はプロドメインに DED を持つ開始カスパーゼであるカスパーゼ 8 である。デスレセプター・FADD・カスパーゼ 8 からなる DISC(death-inducing signaling complex)と呼ばれる複合体が形成され、DISC の中で近接したプロカスパーゼ 8 が切断されることによって活性化する。

(図 3) アポトーシスシグナル伝達経路



アポトーシスシグナル伝達経路には大きく分けてデスレセプターを介する経路とミトコンドリアを介する経路が2つある。それらの経路は最終的に実行カスパーゼを活性化させ、デスサブストレイトを分解することによりアポトーシスに至る。

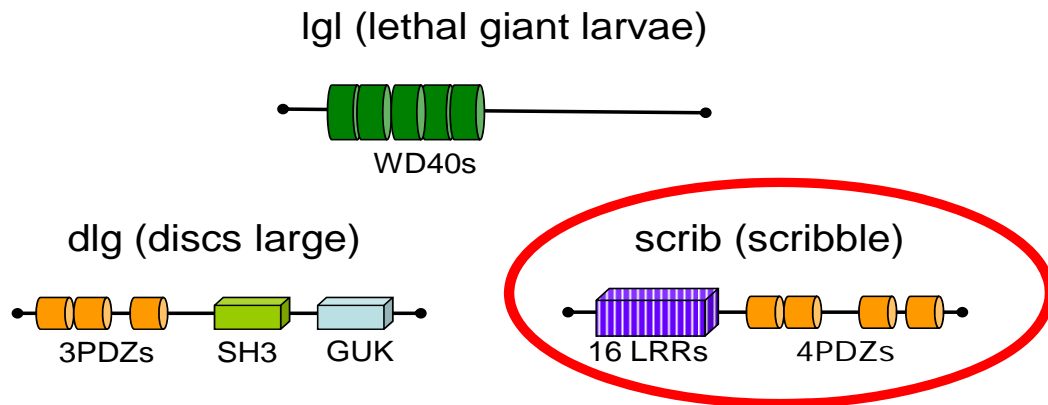
(図 4) 癌抑制遺伝子の分類



ショウジョウバエにおける研究にて癌抑制遺伝子は、その変異体の特徴から2種類に分類されている。ひとつは、細胞密度が単に上昇することに伴い組織が異常に増大する過形成性癌抑制遺伝子である。もうひとつは細胞の極性保持が崩壊した組織が異常に増大する異形成性癌抑制遺伝子である。前者として *PTEN*, *Tsc1/2*, *salvador*, *warts*, *hippo*, *fat* などが同定されており後者として *lethal giant larvae (lgl)*, *discs large (dlg)*, *scribble (scrib)* が同定されている。

(図 5) 異形成性癌抑制遺伝子 (neoplastic tumor suppressor gene; nTSG)

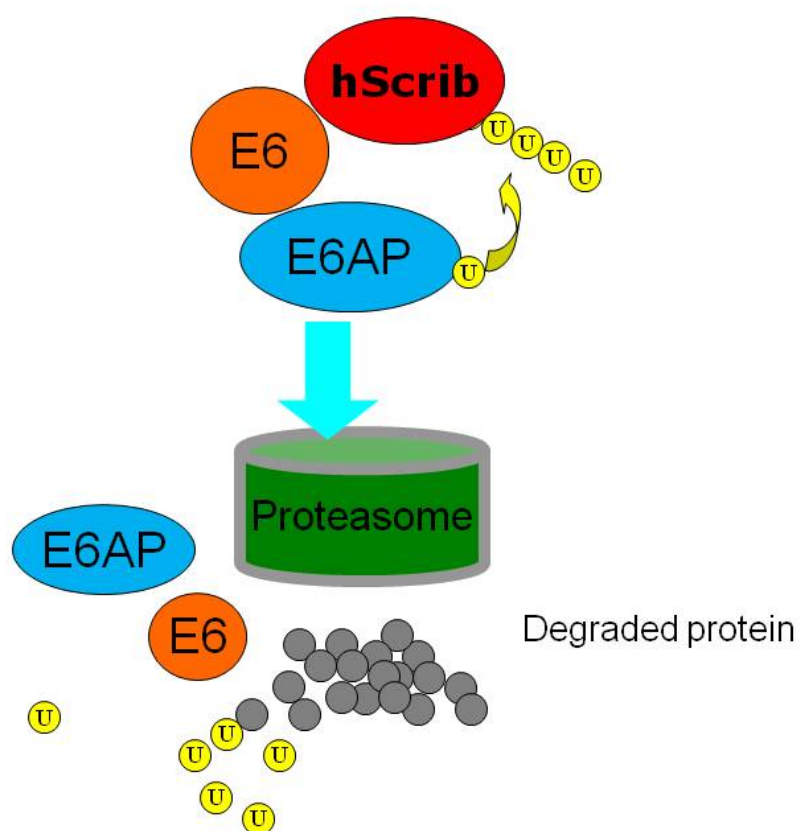
Three nTSG of *Drosophila*



Three nTSGs are found in *Drosophila melanogaster*.

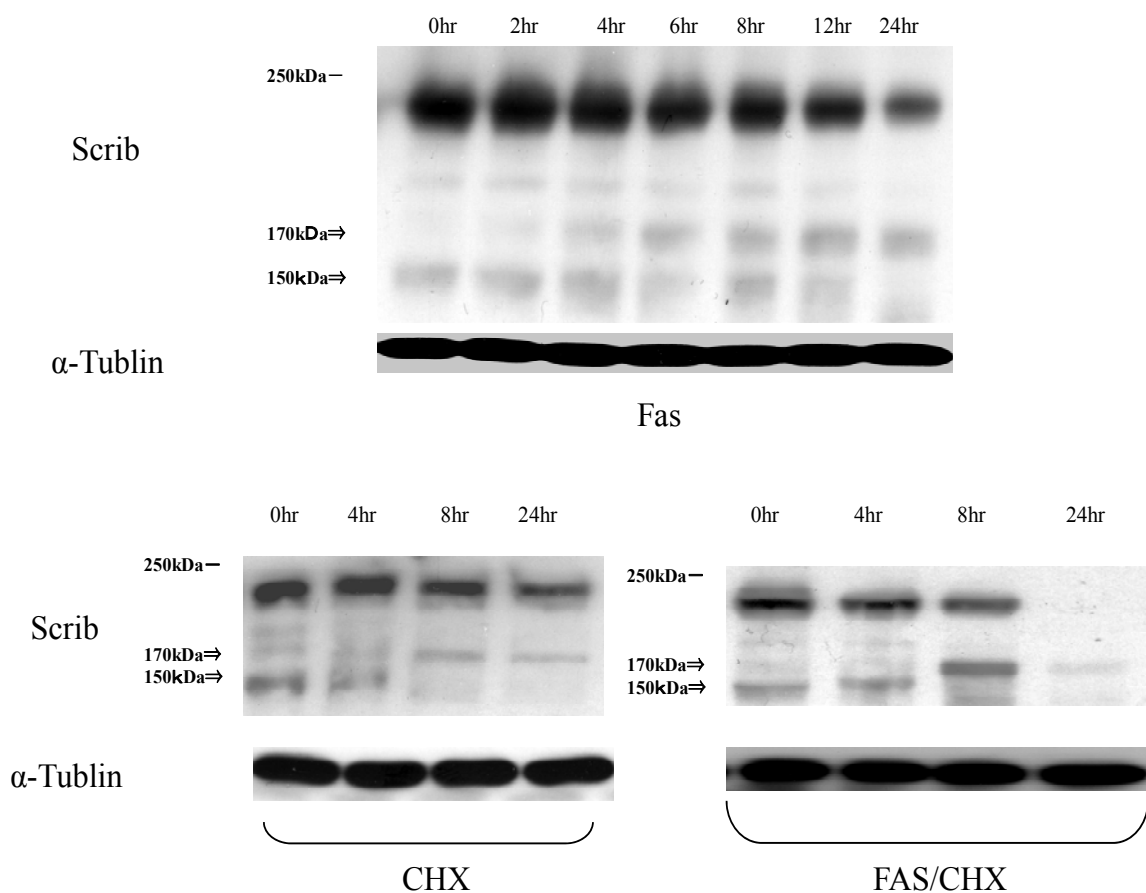
Lgl は数個の WD40 ドメインと aPKC (atypical Protein Kinase C) により修飾されるリン酸化ドメインを持っている。Dlg は MAGUK (Membrane-Associated Guanylate Kinase) ファミリー蛋白のひとつで、3 個の PDZ ドメイン、SH3 ドメイン、GUK ドメインからなっている。Scrib は LAP4 蛋白であり、16 個の LRRs と 4 個の PDZ ドメインからなっている。

(図 6) hScrib と HPV E6 の関係について



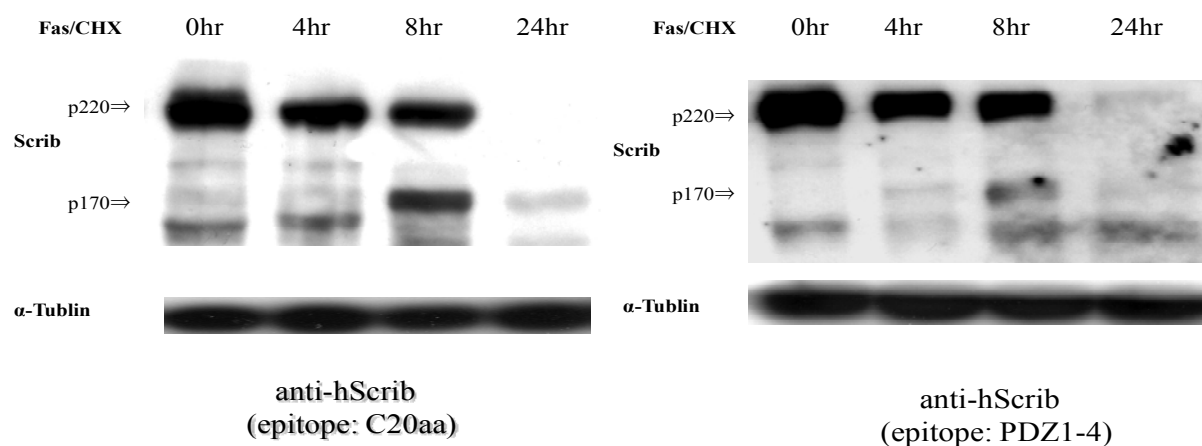
hScrib は子宮頸癌の原因ウイルスであるハイリスク HPV (16 型、18 型) E6 癌蛋白の標的蛋白質であり、ユビキチン-プロテアソーム系を介して分解されていることが報告されている

(図 7) 抗 Fas 抗体、サイクロヘキシミド刺激による hScrib の発現の変化



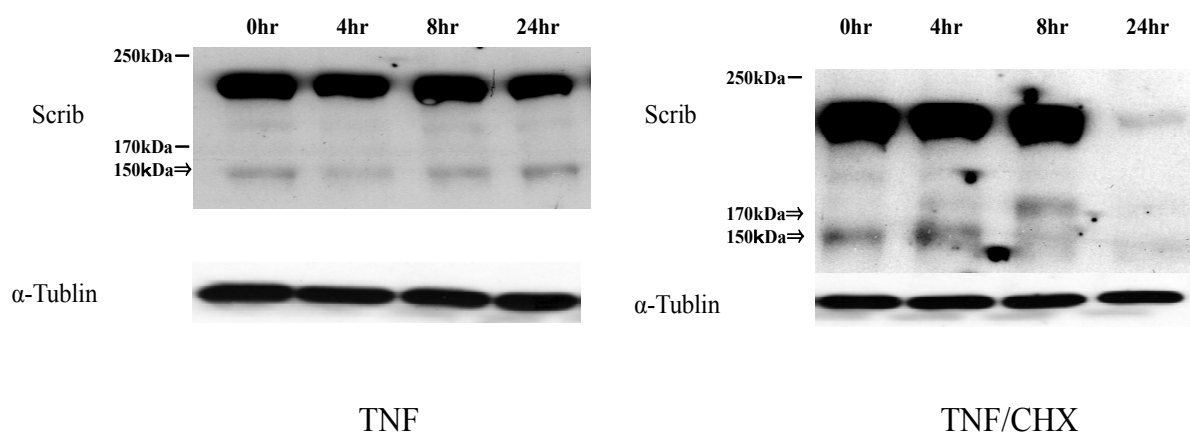
Hela 細胞に対して抗 Fas 抗体、サイクロヘキシミド（デスレセプターを介するアポトーシスシグナルを増強させる試薬）、抗 Fas 抗体/サイクロヘキシミド添加群にわけて、それぞれアポトーシス誘導を行いウェスタンブロット解析を行った。抗 Fas 抗体添加群では時間が経過するに従って hScrib の発現は低下し、170kDa 付近に新たなバンドが確認された。サイクロヘキシミド添加群でも同様の経過が認められ、抗 Fas 抗体/サイクロヘキシミド添加群では、その傾向はより顕著に認められた。

(図 8) エピトープの異なった抗 hScrib 抗体によるウェスタンブロット解析



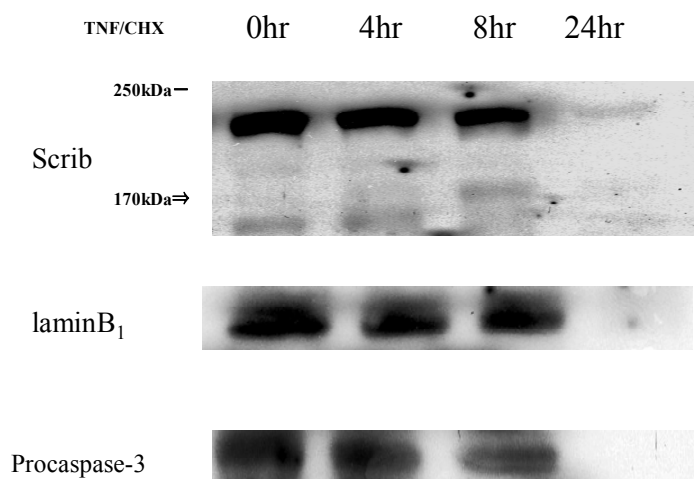
C20aa にエピトープを持つ抗 hScrib 抗体、PDZ₁₋₄ ドメインにエピトープを持つ抗 hScrib 抗体とエピトープの異なる抗 hScrib 抗体にてウェスタンブロット解析し比較検討を行った。両方の抗体ともアポトーシス誘導行くと 170kDa 付近に cleavage が認められたので、p170 hScrib は PDZ ドメインを含む C 末側であることがわかる。

(図 9) TNF α 、サイクロヘキシミド刺激による hScrib の発現の変化



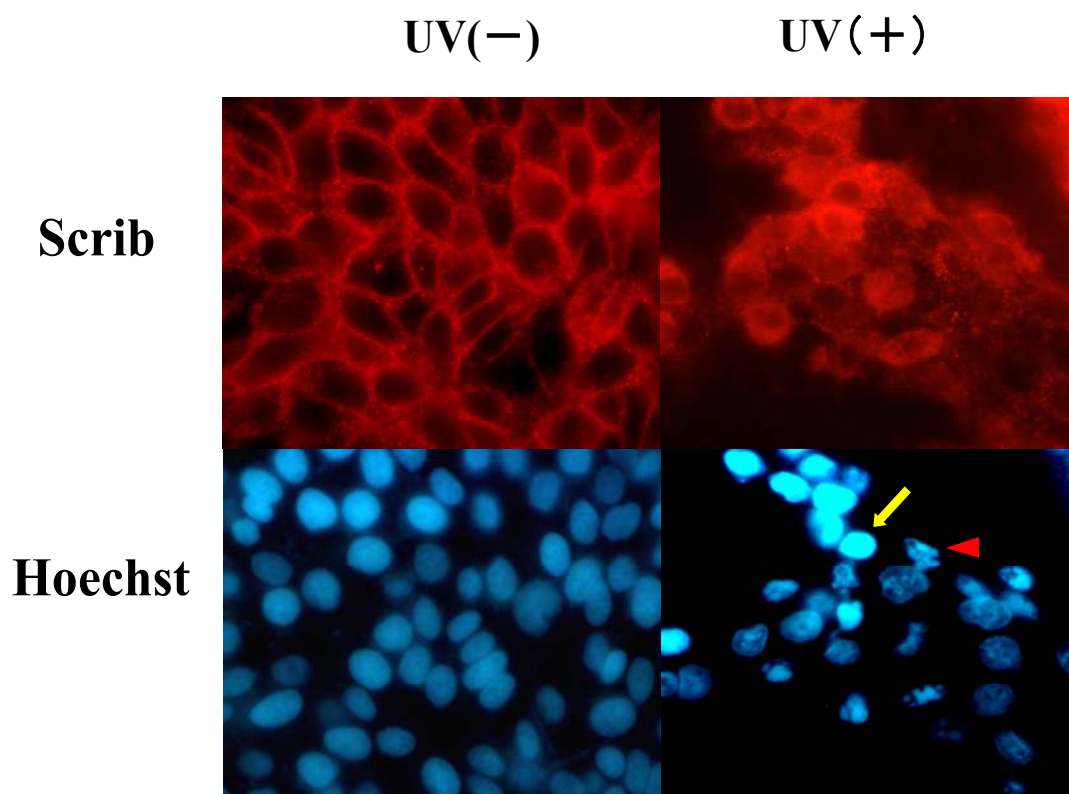
Hela 細胞に対して TNF α 、TNF α /サイクロヘキシミド添加群にわけて、それぞれアポトーシス誘導を行いウェスタンブロット解析を行った。TNF α 添加群では hScrib の発現の減少はほとんど認められなかったが、TNF α /サイクロヘキシミド添加群では時間が経過するに従って hScrib の発現は低下し、170kDa 付近に新たなバンドが確認された。

(図 10) アポトーシス時におけるデスサブストレイト laminB1 と hScrib との発現の変化の比較



デスサブストレイトとして広く報告されている laminB1 と hScrib とのアポトーシス誘導時の発現の比較を行った。hScrib と laminB1 は、同程度のアポトーシス刺激で同程度分解を受けることがわかった。

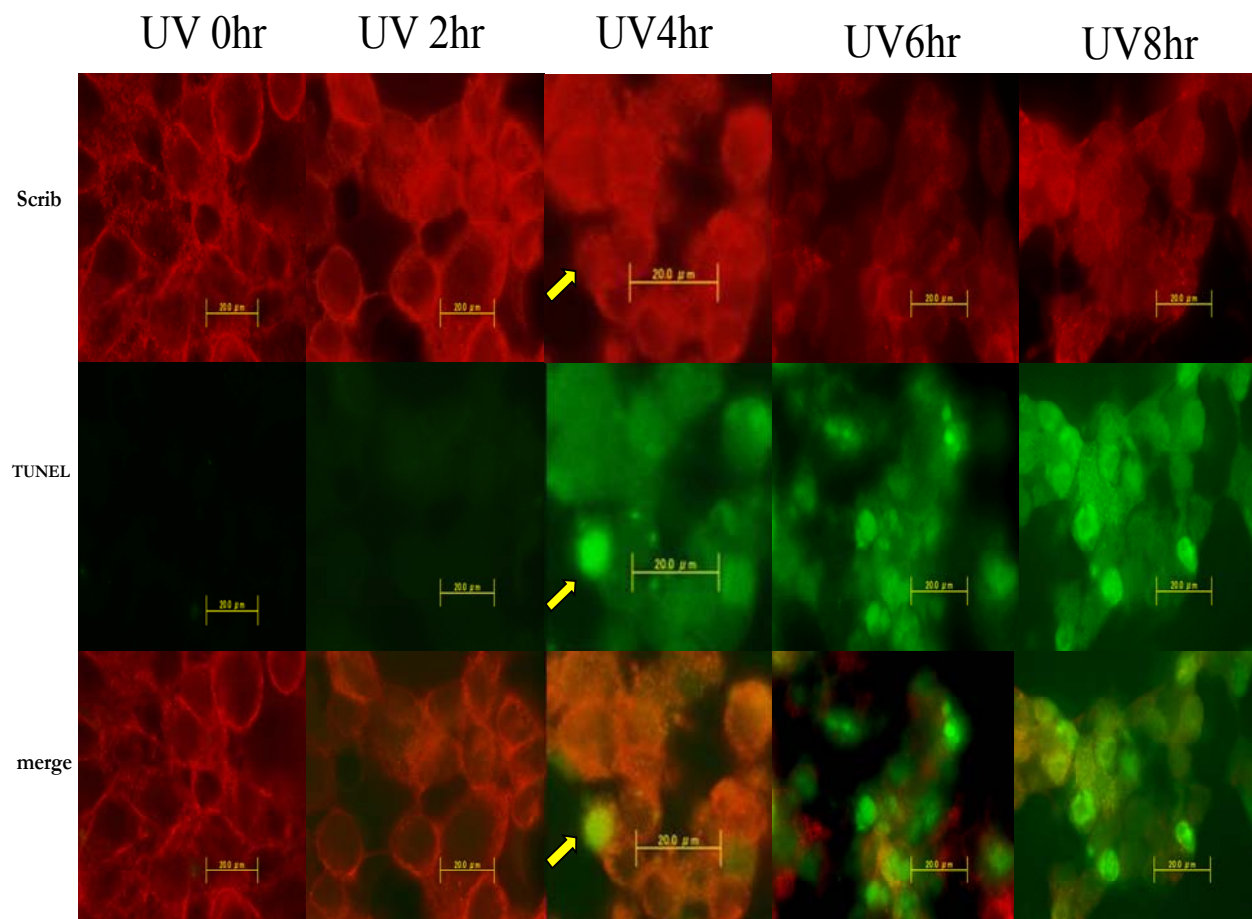
(図 11) 蛍光免疫染色法による、アポトーシス誘導時における hScrib の局在の変化の検討



アポトーシス誘導時の hScrib の細胞内における発現の変化を調べるために、HaCaT 細胞に UV 照射にてアポトーシス誘導し、抗 hScrib 抗体にて蛍光免疫染色、アポトーシスの判定はヘキスト染色を行った。UV 非照射群では hScrib は細胞膜に発現が認められるが、UV を照射するとアポトーシス細胞（ヘキスト染色にて核の凝集化、断片化が認められる細胞）では hScrib の細胞膜での発現が減少し、細胞質に瀰漫性に認められた。

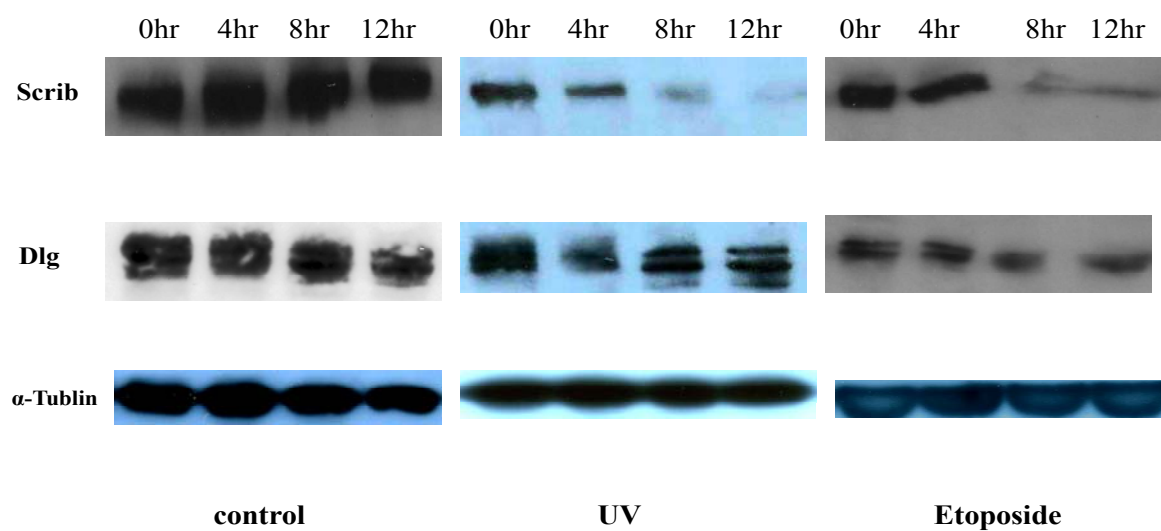
- ・ 矢印→核の凝集化
- ・ 三角印→核の断片化

(図 12) TUNEL 法によるアポトーシス誘導時における hScrib の発現の変化の検討



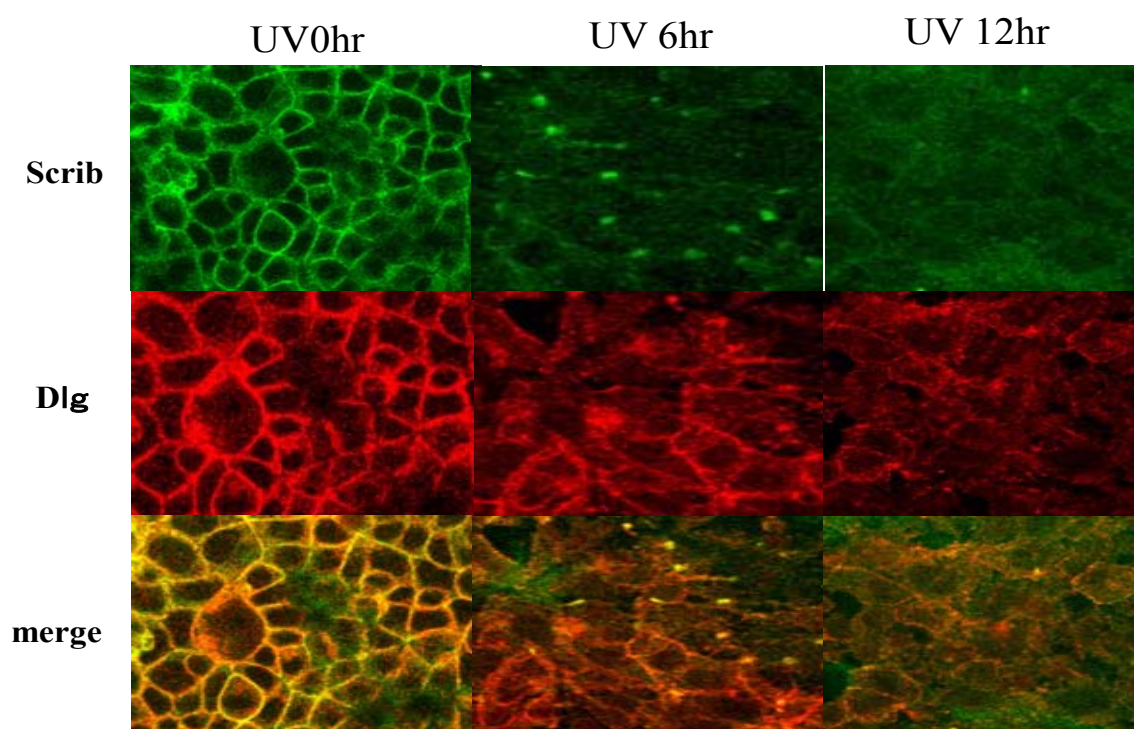
HaCaT 細胞に UV にてアポトーシス誘導を行い、時間ごとに細胞固定し抗 hScrib 抗体にて蛍光免疫染色、アポトーシスの判定として TUNEL 法にてアポトーシス解析を行った。UV 照射して時間が経過すると TUNEL 陽性細胞が増加し、TUNEL 陽性細胞では hScrib の細胞膜における発現の減少が認められた。また矢印に示されているように、UV 照射後 4 時間後という比較的早期のアポトーシス細胞においても hScrib の細胞膜における発現の減少が認められた。

(図 13)ウェスタンブロット解析によるアポトーシス時の hScrib と hDlg との発現の変化の比較



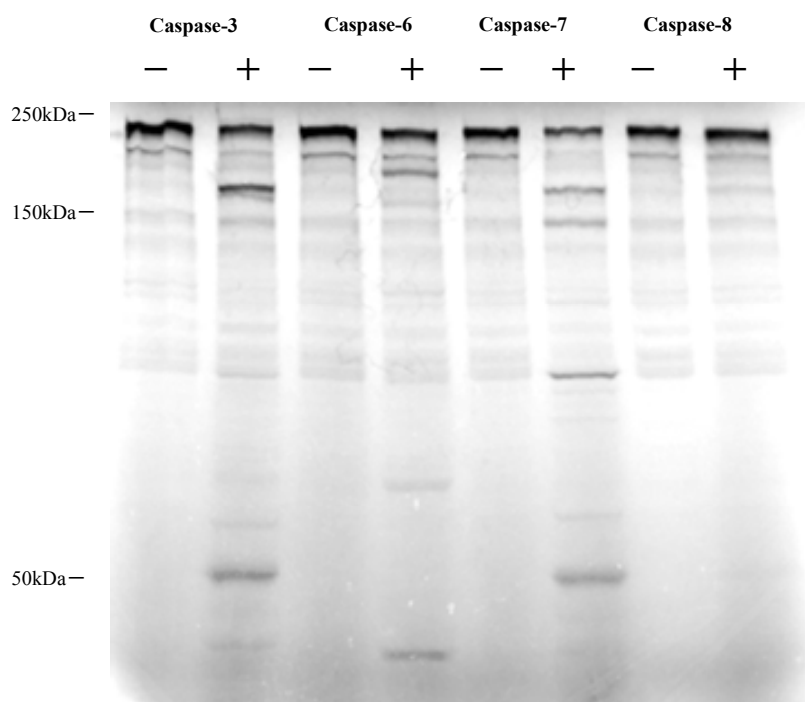
HaCaT細胞にUV照射、エトポシドにてアポトーシス誘導を行い時間ごとに蛋白抽出し、抗hScrib, 抗hDlg抗体にてウェスタンブロット解析を行った。UV照射した群においてもエトポシド添加した群でもhDlgよりhScribにおいて早期での発現の減少が認められた。

(図 14) 蛍光免疫染色法によるアポトーシス時の hDlg と hScrib の発現の変化の比較



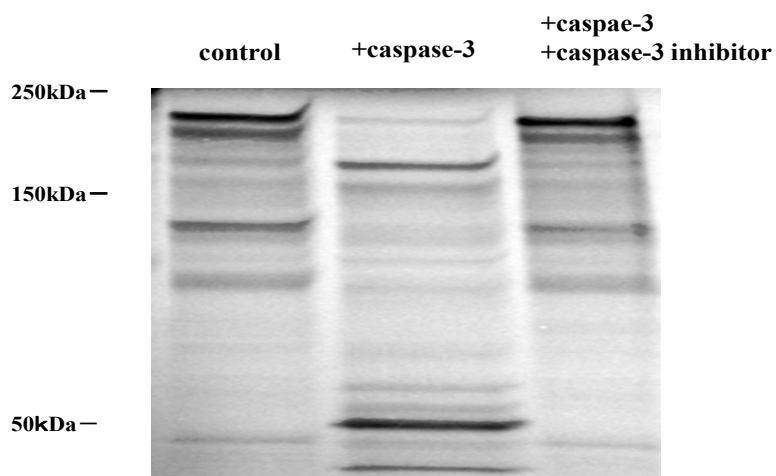
CaCo-2 細胞に UV 照射にて、アポトーシス誘導を行い時間ごとに固定し、抗 hScrib 抗体、抗 hDlg 抗体にて蛍光免疫染色を行った。蛍光免疫染色においても、hDlg より hScrib において細胞膜における早期での発現の減少が認められた。

(図 15) *in vitro* 法における hScrib とカスパーゼとの反応



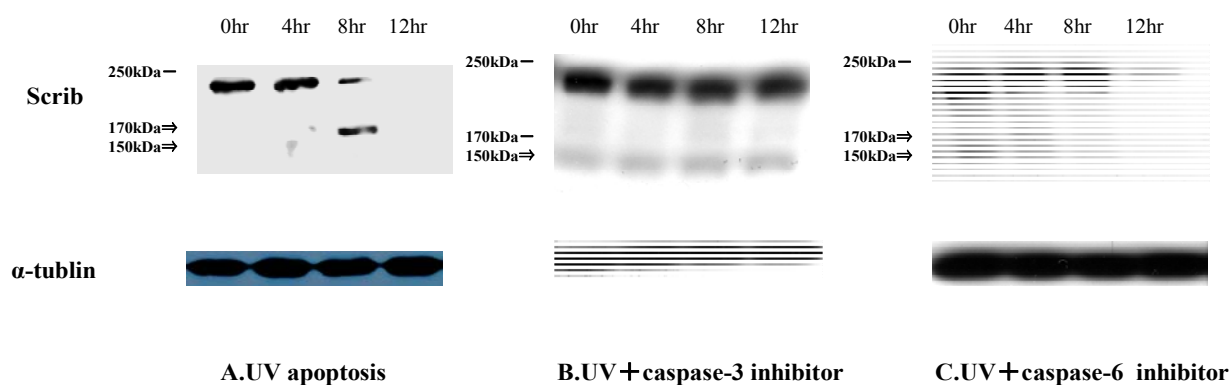
In vitro translation 法にて [^{35}S] メチオニンでラベリングした hScrib を発現し、カスパーゼ 3、カスパーゼ 6、カスパーゼ 7、カスパーゼ 8 と反応させ autoradiography 法により解析を行った。hScrib は実行カスパーゼであるカスパーゼ 3、カスパーゼ 6、カスパーゼ 7 によって分解を受けた。

(図 16) *in vitro* 法における hScrib とカスパーゼ3及びカスパーゼ 3 阻害剤との反応



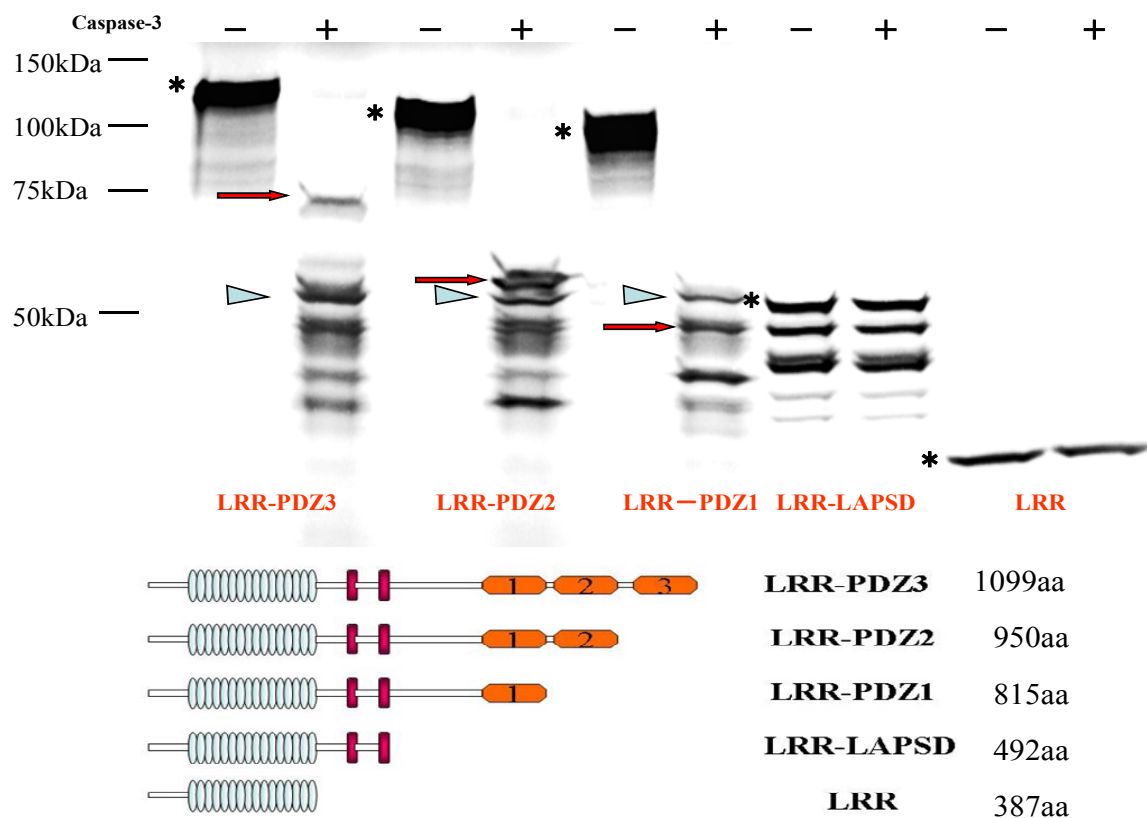
In vitro translation 法にて [^{35}S] メチオニンでラベリングした hScrib を発現し、カスパーゼ 3、カスパーゼ 3+カスパーゼ 3 阻害剤と反応させ、autoradiography 法により解析を行った。カスパーゼ 3 阻害剤を同時に添加した反応物では、カスパーゼ 3 による分解が抑えられた。

(図 17)細胞内における実行カスパーゼによる hScrib の分解



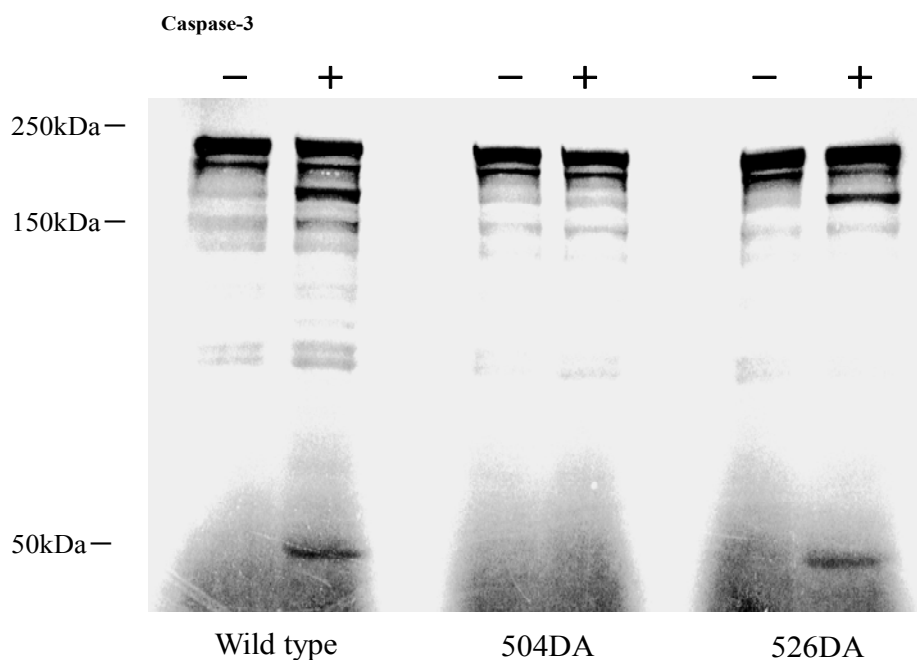
HaCaT 細胞に UV 照射した群、カスパーゼ 3 阻害剤を添加した細胞に UV 照射した群、カスパーゼ 6 阻害剤を添加した細胞に UV 照射した群に分け時間ごとに蛋白抽出し、抗 hScrib 抗体にてウェスタンブロット解析を行った。UV 照射した群では hScrib は時間ごとに発現の減少が認められるが、カスパーゼ阻害剤を加えた群では発現の減少は認められなかった。特にカスパーゼ 3 阻害剤を加えた群では、カスパーゼ 6 阻害剤を加えた群と比較してより hScrib の分解の阻害が認められた。

(図 18) 内部ドメイン欠失変異体によるカスパーゼ 3 の hScrib における切断部位の推定



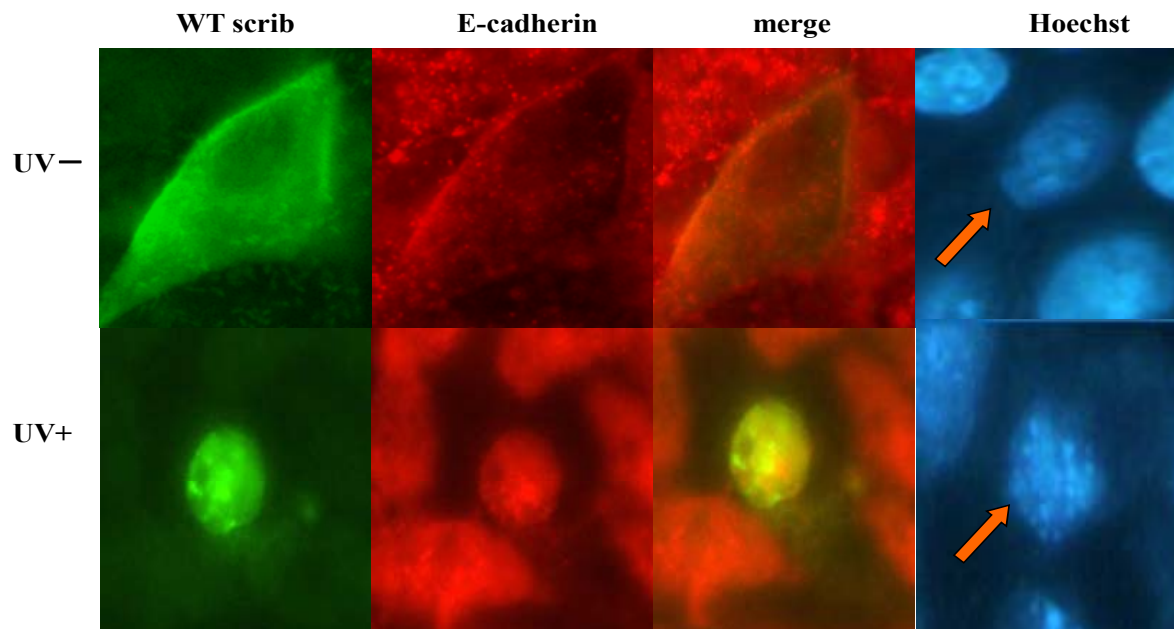
hScrib の内部ドメイン欠失変異体である LRR-PDZ₃、LRR-PDZ₂、LRR-PDZ₁、LRR-LAPSD、LRR を作成し、pcDNA3 にサブクローニングした。それらのサンプルを *In vitro* translation 法により RI でラベリングした内部ドメイン欠失変異体を発現し、カスパーゼ 3 と反応させた。LRR-PDZ₃、LRR-PDZ₂、LRR-PDZ₁ はカスパーゼ-3によって分解されたが、LRR-LAPSD、LRR はカスパーゼ 3 によって分解されなかった。

(図 19) アミノ酸置換体によるカスパーゼ 3 の hScrib における切断部位の特定

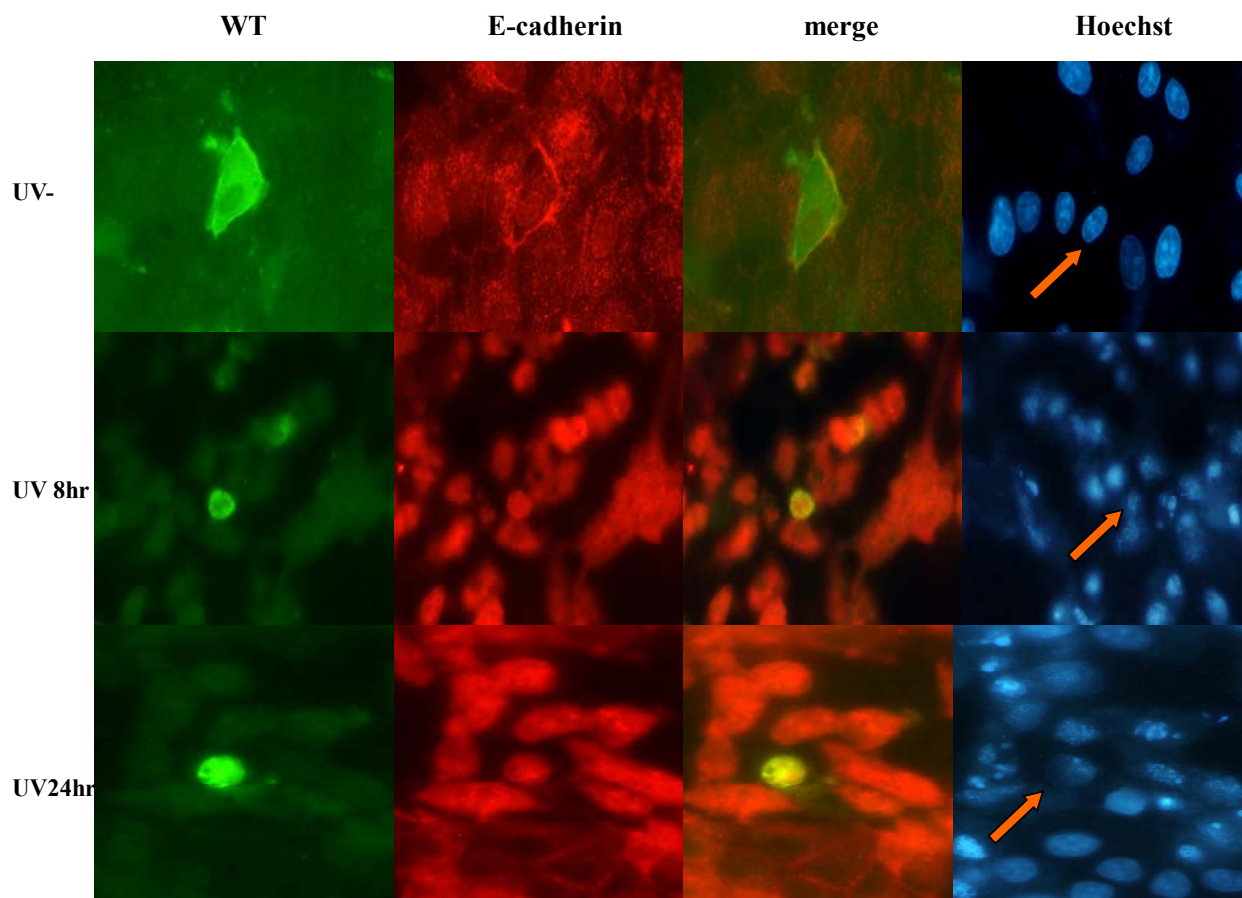


LAPSD から PDZ₁ の間にあるアスパラギン酸をアラニンに変える点突然変異体を N 末側にあるアスパラギン酸から最初に 2 個作成し、pcDNA3 にサブクローニングした (pcDNA3-504DA Scrib 及び pcDNA3-526DA Scrib)。上記のようなサンプルを *In vitro* translation 法により [³⁵S]メチオニンにてラベリングした点突然変異体を発現させカスパーゼ 3 と反応させたところ、504DA hScrib においてカスパーゼ 3 に分解を受けなかった

(図 20) 遺伝子導入法によるアポトーシス誘導時の WT Scrib の機能解析 (強拡大)

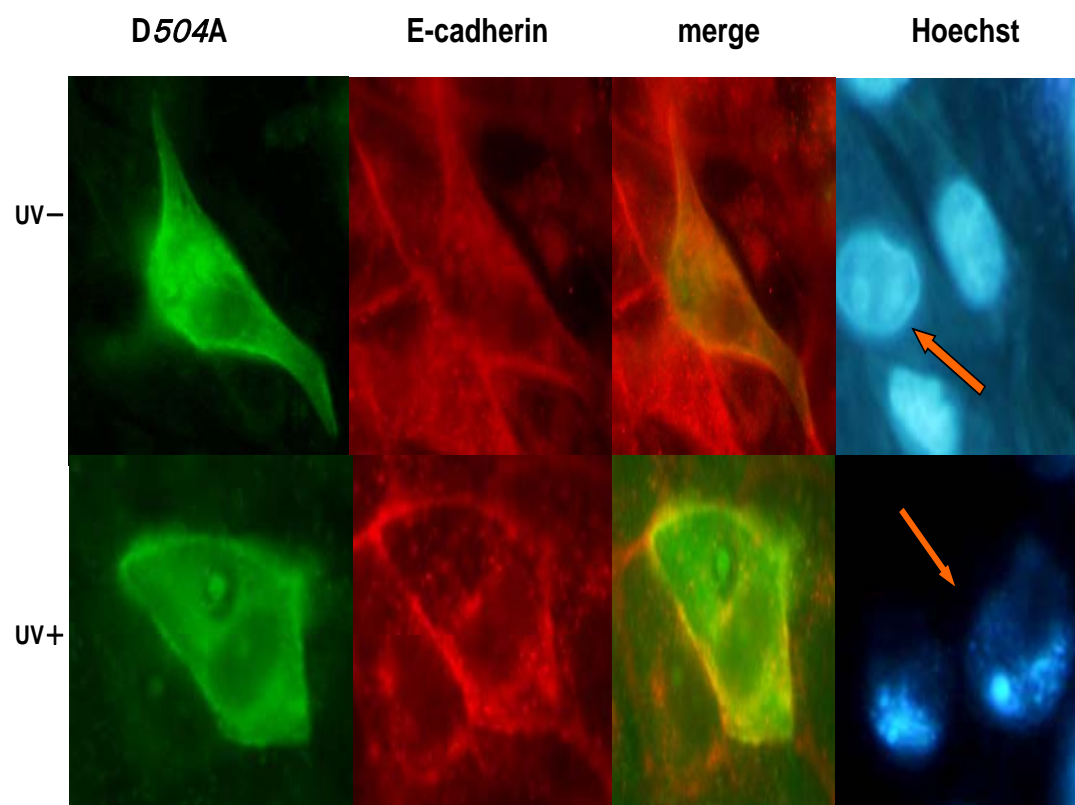


(図 21) 遺伝子導入法によるアポトーシス誘導時の WT Scrib の機能解析 (弱拡大)

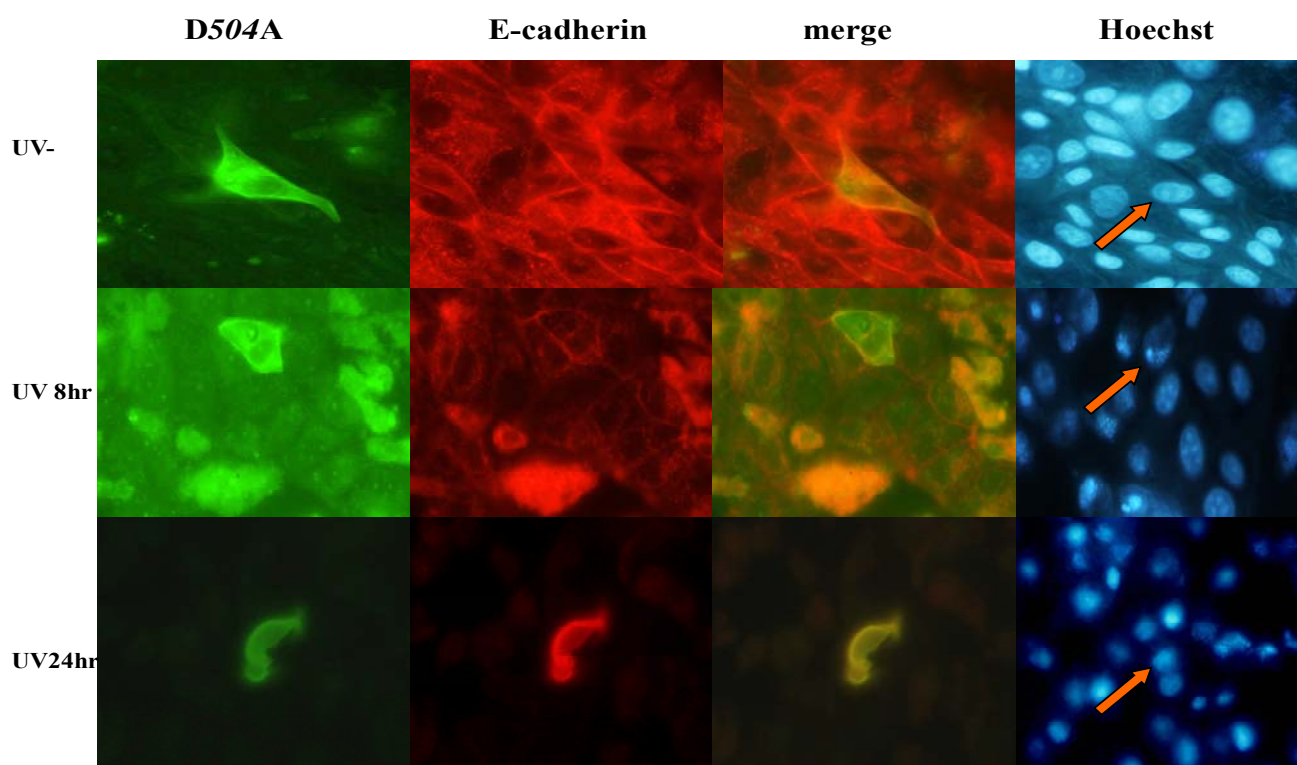


MDCK 細胞に pEGFP-WT hScrib を遺伝子導入し、その 48 時間後 UV 照射にてアポトーシス誘導した。時間ごとに固定し細胞接着の判定として抗 E-cadherin 抗体にて蛍光免疫染色、アポトーシスの判定としてヘキスト染色を行った。pEGFP-WT hScrib が遺伝子導入されている MDCK 細胞では UV 照射前は細胞膜に GFP-WT hScrib の発現が認められたが、UV 照射後は細胞膜における発現の減少が認められる。それに伴い細胞膜に発現している E-cadherin も UV 照射後は発現の減少が認められ、ヘキスト染色にて核の凝集や断片化等のアポトーシス像が認められた。

(図 22) 遺伝子導入法によるアポトーシス誘導時の 504DA Scrib の機能解析 (強拡大)



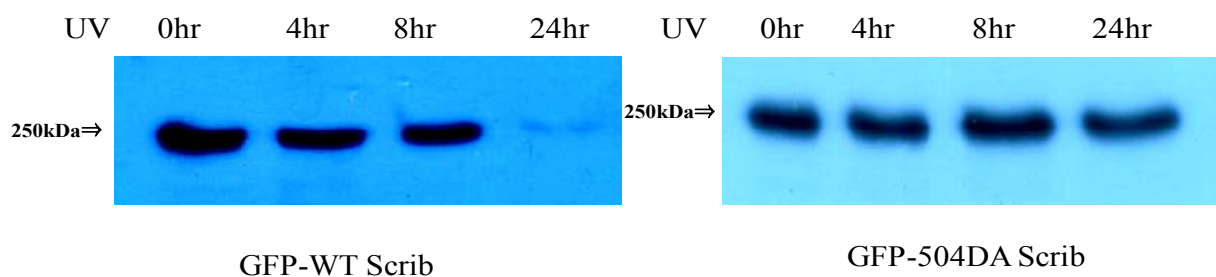
(図 23) 遺伝子導入法によるアポトーシス誘導時の 504DA Scrib の機能解析 (弱拡大)



カスパーゼ 3 によって分解されない hScrib すなわち pEGFP-504DA hScrib を遺伝子導入した MDCK 細胞では、UV 照射前は細胞膜に GFP-504DA hScrib の発現が認められるが、UV 照射後も細胞膜での発現が保たれている。それに伴い GFP-504DA hScrib が遺伝子導入された MDCK 細胞においては、UV 照射後も E-cadherin の細胞膜での発現が保たれている(すなわち細胞接着が保たれている)が、ヘキスト染色にて典型的なアポトーシス像が認められる。

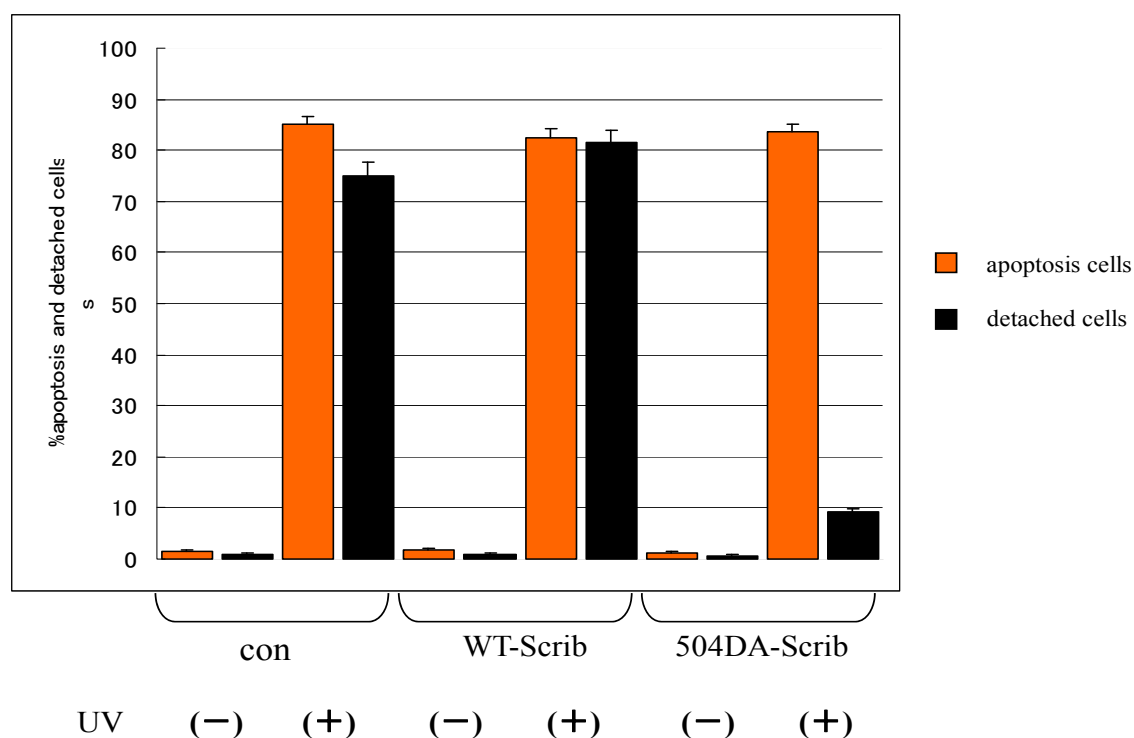
(図 24) 遺伝子導入法、ウェスタンブロット法によるアポトーシス誘導時の

WT hScrib 及び 504DA hScrib の発現の変化



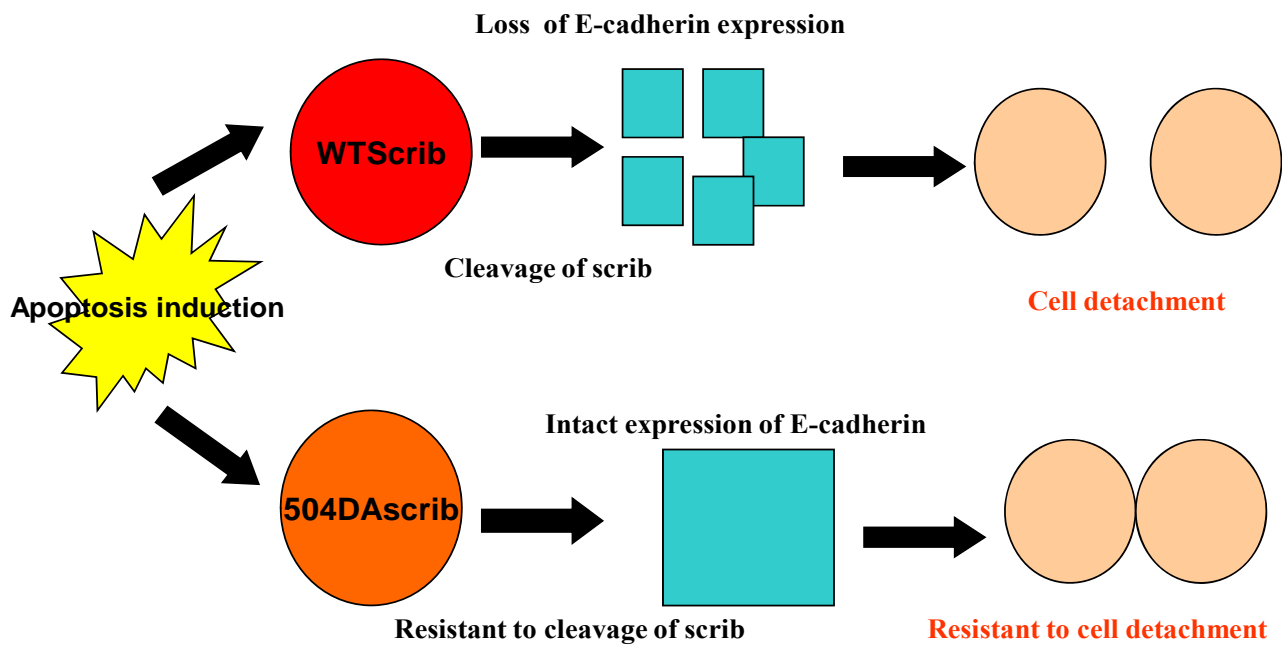
MDCK 細胞に pEGFP-WT hScrib、pEGFP-504DA hScrib を遺伝子導入し、その 48 時間後 UV 照射にてアポトーシス誘導した。時間ごとに蛋白抽出し、抗 GFP 抗体にてウェスタンブロット解析を行った。pEGFP-WT hScrib を遺伝子導入した群では GFP-WT hScrib の発現の減少が認められたが、pEGFP-504DA hScrib を遺伝子導入した群では GFP-504DA hScrib の発現は認められなかった。

(図 25) 遺伝子導入法によるアポトーシス時における hScrib の機能解析



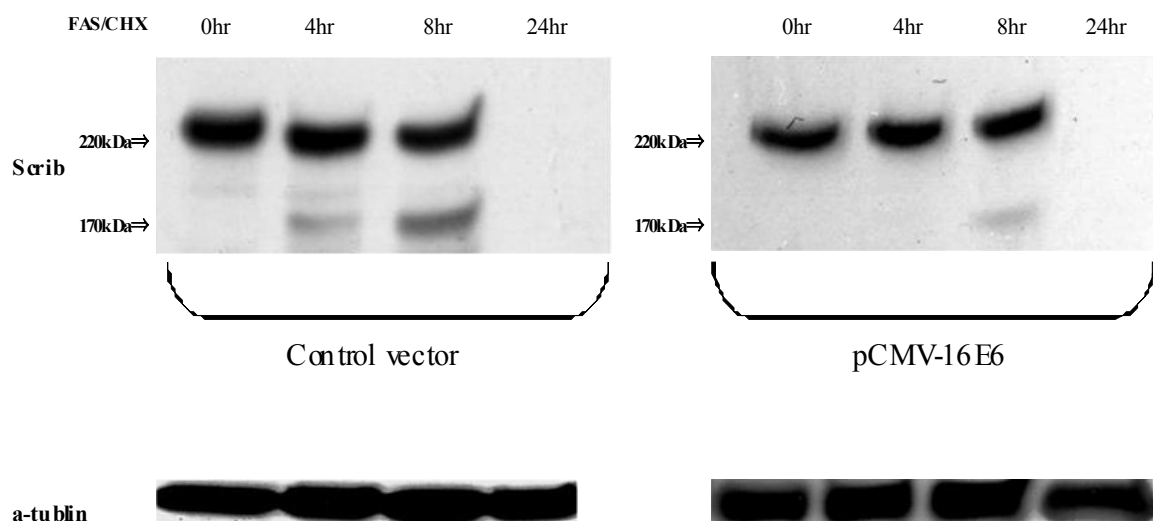
MDCK 細胞に pEGFP ベクター (コントロールベクター)、pEGFP-WT hScrib、pEGFP-504DA hScrib を遺伝子導入し UV 照射にてアポトーシス誘導後、細胞固定し遺伝子導入された MDCK 細胞それぞれ 300 個について、細胞接着の消失が起きている細胞の割合 (E-cadherin の発現が減少している細胞の割合)、アポトーシス細胞の割合を検討した。コントロールベクター、pEGFP-WT hScrib が遺伝子導入された細胞では、UV 照射するとアポトーシス細胞の割合と細胞接着の消失が起きている細胞の割合が増加するが、pEGFP-504DA hScrib が遺伝子導入された細胞では、UV 照射するとアポトーシス細胞の割合は増加するが (80% 強)、細胞接着の消失が起きている細胞の割合の増加は抑えられる (10% 弱)。

(図 26) アポトーシス時における hScrib の役割



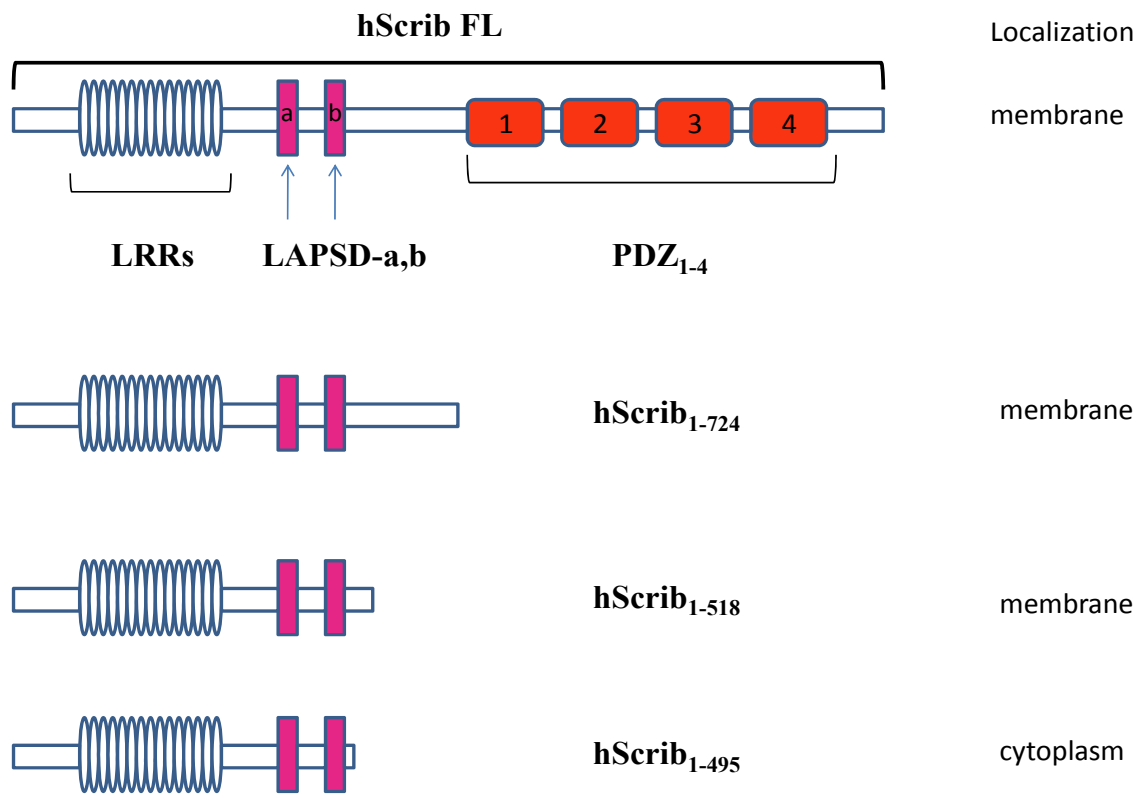
アポトーシス進行する過程において実行カスパーゼが hScrib を分解すると、アドヘレンスジャンクションの崩壊が進行し細胞が離解する。

(図 27) HPV-E6 によるアポトーシス誘導時の hScrib への影響



HPV-E6 によるアポトーシス誘導時の hScrib への影響を検討するために、293T 細胞株に pCMV-16E6 ベクター (HPV 16 型 E6 ベクター)、及びコントロールベクターを遺伝子導入した。遺伝子導入後、抗 Fas 抗体/サイクロヘキシミド添加群にてアポトーシス誘導し時間ごとに蛋白抽出を行い、抗 Scrib 抗体を用いてウェスタンブロット法にて検討を行った。アポトーシス誘導前においては、コントロールベクターを遺伝子導入した細胞株よりも pCMV-16E6 ベクターを遺伝子導入した細胞株において hScrib の発現は低下していた。アポトーシス誘導後においては、コントロールベクターを遺伝子導入した細胞よりも pCMV-16E6 ベクターを遺伝子導入した細胞の方が p170 hScrib すなわち hScrib のカスパーゼ依存性 cleavage の生成が抑えられた。

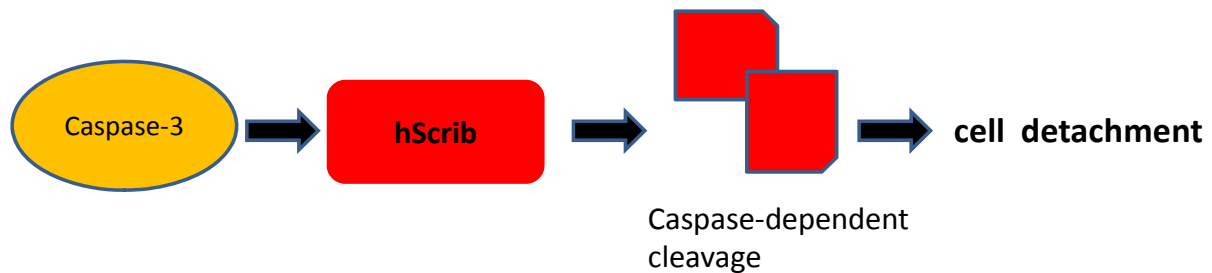
(図 28) LAPSD-a,b を含む hScrib の N 末側における局在



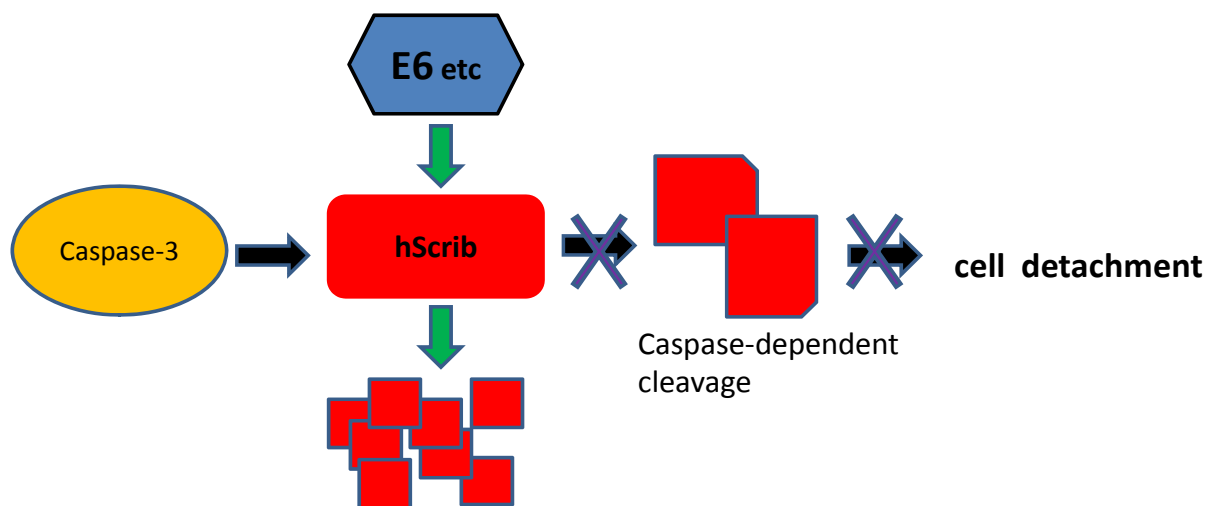
hScrib の LRRs～LAPSD-b まで含む N 末側 (hScrib₁₋₇₂₄、hScrib₁₋₅₁₈) は、上皮細胞の細胞膜に局在することが報告されている。また同じく LAPSD-a,LAPSD-b を含んでいても hScrib の N 末側 (hScrib₁₋₄₉₅) は細胞膜に局在せず、細胞質に局在することが報告されている。

(図 29) hScrib がカスパーゼ-3 による分解とは、異なる分解を既に受け発現が減少している場合

(a)正常細胞の場合



(b)hScribがHPV E6等によりカスパーゼ3とは異なる分解を既に受けている細胞の場合



アポトーシスが進行する過程において、カスパーゼ3によってhScribが分解されることにより生成されるカスパーゼ依存性 cleavage がシグナルとして働き、E-cadherin 等アドヘレンスジャンクションを形成する蛋白質の分解が進行し細胞接着の崩壊が促されることによって、異常細胞を正常細胞から離解させるという仮説が考えられる。HPV E6 蛋白質や他の原因により hScrib がカスパーゼ3とは異なる分解を受けている場合、アポトーシスを誘導しても hScrib のカスパーゼ依存性 cleavage の生成が抑制され細胞離解させるシグナルが作動しないことが推測される。

・参考文献

1. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267,1445-9. (1995).
2. Jacobson MD, Weil M, et al. Programmed cell death in animal development.
Cell 88,347-54. (1997).
3. Nicholson DW, Thornberry NA, Caspases: killer proteases.
Trends Biochem Sci 22,299-306. (1997).
4. 嘉糠洋陸ら 蛋白質核酸酵素 42 卷 2299—2310 (1997)
5. Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD, Wong WW. Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem.*272,9677-82. (1997)
6. Yonehara S. Death receptor Fas and autoimmune disease: from the original generation to therapeutic application of agonistic anti-Fas monoclonal antibody. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13,393-402.(2002)
7. Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet.*33:29-55. (1999)
8. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol.* 17:331-67.(1999)
9. Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria.
J Cell Physiol. 195,158-67.(2003)
10. Tsujimoto Y. Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria
*Biosci Rep.*22,47-58.(2002)

11. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science*. 254, 138-46. (1991)
12. Bilder D. Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev*. 18, 1909-25. (2004)
13. Gregorc U, Ivanova S, et al. hDLG/SAP97, a member of the MAGUK protein family, is a novel caspase target during cell-cell detachment in apoptosis. *Biol Chem* 386,705-10. (2005).
14. Bilder D, Li M, Perrimon N. Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science*. 289,113-6. (2000)
15. Navarro C, Nola S, Audebert S, Santoni MJ, Arsanto JP, Ginestier C, Marchetto S, Jacquemier J, Isnardon D, Le Bivic A, Birnbaum D, Borg JP. Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene* .24,4330-9.(2005)
16. Nagasaka K, Nakagawa S, Yano T, Takizawa S, Matsumoto Y, Tsuruga T, Nakagawa K, Minaguchi T, Oda K, Hiraike-Wada O, Ooishi H, Yasugi T, Taketani Y. Human homolog of *Drosophila* tumor suppressor Scribble negatively regulates cell-cycle progression from G1 to S phase by localizing at the basolateral membrane in epithelial cells. *Cancer Sci*. 97,1217-25.(2006)
17. Nakagawa S, Huibregtse JM. Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol*. 20, 8244-53. (2000)

18. Kuballa P, Matentzoglou K, Scheffner M. The role of the ubiquitin ligase E6-AP in human papillomavirus E6-mediated degradation of PDZ domain-containing proteins. *J Biol Chem.* 282, 65-71. (2007)
19. Nakagawa S, Yano T, Nakagawa K, Takizawa S, Suzuki Y, Yasugi T, Huibregtse JM, Taketani Y. Analysis of expression and localization of a LAP protein, human scribble, in the normal and neoplastic epithelium of uterine cervix. *Br J Cancer.* 90, 194-9. (2004)
20. Samejima K, Svingen PA, et al. Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J Biol Chem* 274,4335-40. (1999).
21. Herren B, Levkau B, et al. Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol Biol Cell* 9,1589-601. (1998).
22. Rudel T, Bokoch GM. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science.* 276,1571-4. (1997)
23. Wen LP, Fahrni JA, Troie S, Guan JL, Orth K, Rosen GD. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem.* 272,26056-61.(1997)
24. Jänicke RU, Ng P, Sprengart ML, Porter AG. Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem.* 273,15540-5. (1998)

25. Levkau B, Herren B, Koyama H, Ross R, Raines EW .Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis.J Exp Med. 187,579-86.(1998)
26. Steinhusen U, Badock V, Bauer A, Behrens J, Wittman-Liebold B, Dörken B, Bommert K. Apoptosis-induced cleavage of beta-catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential.J Biol Chem. 275,16345-53. (2000)
27. Bojarski C, Weiske J, Schöneberg T, Schröder W, Mankertz J, Schulzke JD, Florian P, Fromm M, Tauber R, Huber O.The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells.J Cell Sci. 117,2097-107. (2004)
28. Gregorc U, Ivanova S, Thomas M, Guccione E, Glaunsinger B, Javier R, Turk V, Banks L, Turk B. Cleavage of MAGI-1, a tight junction PDZ protein, by caspases is an important step for cell-cell detachment in apoptosis. Apoptosis. 12,343-54.(2007)
29. Ivanova S, Repnik U, Banks L, Turk V, Turk B.Cellular localization of MAGI-1 caspase cleavage products and their role in apoptosis.Biol Chem. 388,1195-8. (2007)
30. Santoni MJ, Pontarotti P, Birnbaum D, Borg JP.The LAP family: a phylogenetic point of view. Trends Genet. 18,494-7.(2002)
31. Métais JY, Navarro C, Santoni MJ, Audebert S, Borg JP. hScrib interacts with ZO-2 at the cell-cell junctions of epithelial cells. FEBS Lett. 579,3725-30.(2005)

32. Sone K, Nakagawa S, et al. hScrib, a human homologue of Drosophila neoplastic tumor suppressor, is a novel death substrate targeted by caspase during the process of apoptosis. *Genes Cells*. 13(7):771-85. 2008