論文審査の結果の要旨

氏名　　中岡　寛樹

Cell adhesion molecule 1 (CADM1) は当研究室より同定されたがん抑制遺伝子の一つである。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。これまでに、*CADM1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が CADM1 発現欠如の主な原因であることを報告している。しかし一方で、一部の非小細胞肺がんではプロモーター領域のメチル化非依存的に CADM1 発現が低下・欠如することが報告されていることから、プロモーター領域のメチル化非依存的な CADM1 発現抑制機構が存在することが示唆されている。本研究では、CADM1 の発現を抑制する新たな機構として CADM1 の分解制御機構に着目して解析を行った結果、ユビキチン化による CADM1 分解制御機構の存在を明らかとした。また CADM1 のユビキチン化を抑制する新規 CADM1 結合分子として RanBPM を同定した。

本論文では CADM1 の分解を制御する分子として、先行研究で行われた酵母ツーハイブリッド法を用いたスクリーニングにより同定された新規 CADM1 細胞内領域結合分子候補である Ran binding protein microtubule organizing center (RanBPM) に着目して研究を行っている。これまでに、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。そこでまず、CADM1 と RanBPM が複合体を形成するか否かを、GST プルダウン法、免疫沈降法ならびにウェスタンブロット法を用いて CADM1 と RanBPM の複合体形成の有無を検討した。その結果、CADM1 と RanBPM の共沈が認められた。更に、数種類の RanBPM 変異体を用いて両者の結合ドメインの同定を試みた。その結果、CADM1 は RanBPM の SPRY ドメインに結合することを明らかとした。これらの結果より、CADM1 と RanBPM は複合体を形成すること、ならびに CADM1 は RanBPM の SPRY ドメインと直接結合していることが明らかとなった。

次に、RanBPM は CADM1 の発現量に影響を与えるか否かを検討した。二種類の RanBPM 特異的 siRNA を A549 細胞にそれぞれ導入し、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 CADM1 mRNA 発現量、タンパク質発現量を比較した結果、コントロール群と比較して RanBPM siRNA 導入群では RanBPM ならびに CADM1 タンパ

ク質の発現が低下した。一方、CADM1 mRNA 発現量には変化が見られなかった。この結果より、RanBPM は CADM1 の分解を抑制することが示唆された。また、この発現の低下は mRNA 非依存的であることから、RanBPM による CADM1 の発現制御はタンパク質レベルでの現象であることが示唆された。この結果をうけ、未だ不明である CADM1 タンパク質分解経路の解析を行った。プロテアソーム阻害剤 MG132 ならびにリソソーム阻害剤クロロキンを A549 細胞の培養培地中に添加した結果、CADM1 発現量はクロロキン投与群において顕著に増加した一方、MG132 投与群では発現量に変化は認められなかった。この結果より、CADM1 はリソソーム経路により分解されることが明らかとなった。

次に、CADM1 がユビキチン化を受けるか否か、ならびに CADM1 ユビキチン化は CADM1 分解に影響を及ぼすか否かを検討した。野生型 CADM1 ならびに HA タグ付ユビキチンを共発現させた A549 細胞を用いて免疫沈降法を行った結果、CADM1 がユビキチン化を受けることが明らかとなった。また、CADM1 細胞内領域リシン残基を全てアルギニンに置換した変異型 CADM1 を用いて同様の実験を行った結果、CADM1 ユビキチン化は消失した。この結果より、CADM1 細胞内領域リシン残基がユビキチン化を受けることを明らかとした。加えて、タンパク質翻訳阻害剤シクロヘキシミドを用いて野生型 CADM1 ならびに変異型 CADM1 の分解速度を比較した結果、野生型 CADM1 と比較して変異型 CADM1 の分解速度は有意に抑制されていた。これらの結果より、CADM1 細胞内領域のリシン残基がユビキチン化を受けること、ならびに CADM1 ユビキチン化は CADM1 分解を促進することが明らかとなった。

次に、RanBPM は CADM1 のユビキチン化を抑制するか否かを検討した。内在性 CADM1 を発現しない SK-LU-1 細胞に、HA タグ付ユビキチン、野生型 CADM1 もしくは CADM1-KR 変異体、RanBPM を導入し、免疫沈降法ならびにウェスタンブロット法を用いて CADM1 のユビキチン化の有無を検出した。その結果、コントロール群と比較して RanBPM 導入群では CADM1 ユビキチン化レベルの低下が認められた。この結果より、RanBPM は CADM1 ユビキチン化を抑制すること、ならびに RanBPM は CADM1 ユビキチン化を抑制することで CADM1 タンパク質を安定化することが示唆された。

本研究成果は、従来知られていた CADM1 のプロモーター領域メチル化による発現制御機構とは異なる新たな CADM1 発現制御機構の一つを提唱するものである。

なお本研究は主に坪井裕見博士、櫻井美佳助教、村上善則教授の指導の下で行った研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。従って、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 1958 字