

審査の結果の要旨

氏名 山戸 梓

本研究は、全世界のがん死の原因第一位である肺がんの原因遺伝子を明らかにするため、肺扁平上皮がん細胞株のゲノム DNA および cDNA を次世代シーケンサーで解析し、得られた変異の中で形質転換能を示したものをさらに機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 肺扁平上皮がん細胞株のゲノム DNA および cDNA を次世代シーケンサーで解析した結果 42 種類の遺伝子に 44 カ所の変異を同定した。得られた変異のうちキナーゼを含む、発がんに関係することが予想される 6 遺伝子を 3T3 focus formation assay でスクリーニングしたところ、ユビキチンリガーゼで NF- $\kappa$ B activator として知られる遺伝子（以下 NF- $\kappa$ B activator A）のナンセンス変異が変異体でのみ形質転換能を示した。
2. ナンセンス変異体はヌードマウスを用いた腫瘍形成試験でも腫瘍を形成した。また、NF- $\kappa$ B activator A のユビキチンリガーゼ活性を失活する変異体を人工的に作製した結果、同様に形質転換能を認めたことからナンセンス変異体の形質転換能はユビキチンリガーゼ活性の消失によるものであることが示唆された。ここで NF- $\kappa$ B activator A は 6 個のドメインで構成されているがそれを N 末端から①～⑥とする。失活変異体をバックボーンとし、その他のドメインを欠損させた変異での解析から失活変異体の形質転換能には①ドメインが必須であり、③ドメインも影響を及ぼすことが示された。
3. ナンセンス変異体およびドメイン欠損変異体を含む失活変異体で NF- $\kappa$ B レポータールシフェラーゼアッセイを行った結果、ユビキチンリガーゼ活性の消失が NF- $\kappa$ B を活性化することを示した。また、その活性化は①ドメインをさらに欠損させると完全に失われ、③ドメインや④ドメインの欠損で小さくなることを示した。この知見に加え NF- $\kappa$ B activator A の下流で NF- $\kappa$ B の活性化に関わる遺伝子（以下、遺伝子 X）の shRNA を恒常的に発現する NIH3T3 cell を使用した focus formation assay においてもナンセンス変異体および失活変異体がフォーカスを形成したことからナンセンス変異体の形質転換能は NF- $\kappa$ B の活性化に依存しない経路があることが示唆された。
4. 既存のデータベースにおける検索で NF- $\kappa$ B activator A の変異が多数報告されておりそれらに関しても変異を導入したプラスミドを作製し、3T3 focus formation assay および NF- $\kappa$ B レポータールシフェラーゼアッセイを行った。その中でユビキチンリガーゼを欠失する変異体群においては 3T3 focus formation assay で形質転換能を示し、さらにヌードマウスでの腫瘍形成試験で腫瘍を形成した。NF- $\kappa$ B の活性化に関してはドメイン欠失変異体の知見と矛盾しないものだった

5. NF- $\kappa$ B activator A と同じファミリーに属しユビキチンリガーゼの基質に相同性があるとされる遺伝子（以下、NF- $\kappa$ B activator B）でもユビキチンリガーゼ活性を消失させる変異を人工的に作製した。また NF- $\kappa$ B activator A と同様にデータベースで変異を検索した結果 7 種のユビキチンリガーゼ欠失変異が見つかった。これらに関しても 3T3 focus formation assay および NF- $\kappa$ B レポータールシフェラーゼアッセイを行った。その結果、①ドメインを含む全てのドメインを欠失する変異体を除いてフォーカスを形成したことから NF- $\kappa$ B activator A と NF- $\kappa$ B activator B は形質転換能に相同性があることが示唆された。一方 NF- $\kappa$ B の活性化に関しては 1 変異体を除き NF- $\kappa$ B activator A の変異と比較すると弱いものであった。NF- $\kappa$ B の活性化と独立した 3T3 focus formation での形質転換能があることは、NF- $\kappa$ B activator A と同様に遺伝子 X の shRNA を恒常的に発現する NIH3T3 cell を使用した focus formation assay においてユビキチンリガーゼ失活変異がフォーカスを形成したことからさらに裏付けられた。

以上、本論文は肺扁平上皮がん細胞株の解析から、腫瘍形成能を持つナンセンス変異体変異を同定、そのメカニズムがユビキチンリガーゼ活性の失活によると示唆されること、そして少なくとも NF- $\kappa$ B の活性化によらない経路があることを明らかにした。また、NF- $\kappa$ B activator A と NF- $\kappa$ B activator B がその形質転換能に相同性をもつことを示した。NF- $\kappa$ B activator A と NF- $\kappa$ B activator B の NF- $\kappa$ B の活性化によらない形質転換能の報告は今まで未知のものであり、悪性腫瘍の原因を解明するうえで重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。