

|           |                                                           |         |         |
|-----------|-----------------------------------------------------------|---------|---------|
| 氏 名       | ナン<br>南                                                   | ジン<br>璣 | ミン<br>旻 |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (生命科学)                                                |         |         |
| 学 位 記 番 号 | 生 博 第 114 号                                               |         |         |
| 学位授与の日付   | 平 成 19 年 3 月 23 日                                         |         |         |
| 学位授与の要件   | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                   |         |         |
| 研究科・専攻    | 生 命 科 学 研 究 科 高 次 生 命 科 学 専 攻                             |         |         |
| 学位論文題目    | AMAP1 を介した乳癌細胞の浸潤過程における Cbl 結合蛋白質 CIN85<br>の関与            |         |         |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 佐 邊 壽 孝      教 授 竹 市 雅 俊      教 授 米 原      伸 |         |         |

### 論 文 内 容 の 要 旨

腫瘍細胞の浸潤性と転移性は癌患者の予後の良し悪しを決定する重要な因子である。近年、マイクロアレイ法を用いた遺伝子発現解析により癌の悪性度進行に伴う遺伝子が同定されてきた。乳癌においても予後の良悪と関連する遺伝子発現プロファイルの存在は複数の解析から示唆されている。しかしながら、癌の浸潤・転移の分子機構は複雑であり、遺伝子発現解析のみで説明することは難しい。即ち、癌の悪性度進行においては、mRNA 発現の変化のみならず、翻訳や分解の調節による蛋白質発現量の変化や、翻訳後修飾による蛋白質の機能制御といったエピジェネティックな調節が重要である。したがって、より正確な予後の予測や癌の浸潤・転移の抑制のためには遺伝子発現解析のみならず、転写後の様々な調節機構に関しても詳細を解明する必要がある。

当研究室ではこれまでに、低分子量 G 蛋白質 Arf6 のエフェクターである AMAP1/PAG2/ASAP1 が乳癌細胞の浸潤過程において重要な機能を担うことを報告してきた。浸潤性の高い複数の乳癌細胞において、AMAP1 の蛋白質発現は亢進しており、siRNA を用いた蛋白質発現抑制により浸潤活性が抑制された。また、ヒト乳癌原発巣における免疫組織化学染色により、AMAP1 蛋白質の発現量亢進が乳癌の悪性化に相関することが強く示唆された (Onodera *et al.*, 2005)。さらに、乳癌細胞の浸潤仮足において AMAP1 は paxillin や cortactin と共局在し、複合体を形成することを見出した。本研究では、AMAP1 と相互作用する蛋白質 CIN85 および Cbl の乳癌の浸潤過程における役割について解析を行った。CIN85 と AMAP1 は乳癌細胞の浸潤仮足において共局在し、両者の結合は浸潤活性に関与することを明らかにした。また、AMAP1 は CIN85 を介して Cbl と相互作用し、AMAP1-CIN85-Cbl の複合体形成によってモノユビキチン化された。さらに、AMAP1 がポリユビキチン化ではなくモノユビキチン化されることが乳癌細胞の浸潤活性において重要であることが示唆された。

本研究により、今まで成長因子受容体の負の制御因子として知られていた CIN85 や Cbl が、AMAP1 の翻訳後修飾に関わることで乳癌の浸潤過程に寄与することが示された。これらの結果は、AMAP1 が癌浸潤過程におけるエピジェネティックな調節に関与していることを示唆する。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は乳癌の浸潤に関わる分子装置の一つである AMAP1 の作用機作に関する研究である。AMAP1 は低分子量 G 蛋白質 Arf6 のエフェクターである。論文の要旨にも述べられているように、乳癌においては公汎な解析の結果、予後の良し悪しと相関する遺伝子発現プロファイルの存在は指摘されているが、浸潤性の確たるマーカーになる発現プロファイルや遺伝子変異は見つかっておらず、従って、その浸潤転移に何か癌に特異的なものがあるのかに関しても一般に懐疑的であった。当該研究室では、AMAP1 の発現がヒト原発性乳癌の浸潤の形質や悪性度と良く相関すること、乳癌の各種培養細胞においても、その蛋白質の発現量は浸潤性と良く相関し、一方、浸潤性の弱い乳癌、非浸潤の乳癌、正常乳腺上皮細胞ではかろ

うじて検出される程度であること、さらに、浸潤性の高い乳癌細胞において、AMAP1 の発現を siRNA によって抑制するとその浸潤活性は著しく抑えられ、また、他の方法により AMAP1 の機能を阻害することによって、マウスモデルにおける乳癌の肺への転移も抑制できること等を報告してきた。従って、AMAP1 は浸潤的乳癌に特異的に高発現し、浸潤転移に特異的な分子装置を形成していると考えられる。AMAP1 の発現上昇はその mRNA 転写後制御であり、従来の遺伝子発現プロファイル法では指摘されなかった理由も明らかにした。

AMAP1 は SH3 領域に結合すると考えられるプロリンに富む配列が17回繰り返された部分を持つ。実際、この部位を介して AMAP1 は様々な蛋白質と相互作用できることも示されている。本研究はその一つである CIN85 を取り上げ、AMAP1 の乳癌浸潤におけるより詳しい作用機構を解析したものである。一連の研究成果は、1) CIN85 は AMAP1 と浸潤仮足に共局在し、浸潤に関与するコンポーネントである、2) AMAP1 は CIN85 を介して CIN85 の結合相手として知られている Cbl と相互作用する、3) Cbl は E3 ligase であるが、その AMAP1 に対する ligase 活性が AMAP1 を介する浸潤に必要である、と纏められる。AMAP1/CIN85、CIN85/Cbl それぞれの相互作用が浸潤に必要である事も示された。乳癌の浸潤はそれぞれの癌において様々である事が知られている。AMAP1/CIN85/Cbl が形成する分子装置の関与の度合いについても検討され、同じ乳癌であっても異なった細胞株間によってその寄与の度合いは大きく異なる事も示された。これらの成果は、AMAP1 機能には CIN85 と Cbl、さらには Cbl による AMAP1 は蛋白質修飾が乳癌の浸潤に関与すること、また、その関与は一意的ではなく、多様であることを明らかにし、従って、乳癌浸潤に置けるエビジェネティック過程の一端を明らかにしたものである。

本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。本学位申請は去る平成19年1月22日に学位公聴会が開かれ、発表とその後の質疑応答の結果、合格と認められた。