

147. オートファジーと細胞死を制御する癌抑制遺伝子の発見

難波 卓司

高知大学 教育研究部 総合科学系 複合領域科学部門

Key words : 小胞体ストレス, オートファジー, BAP31

緒言

多くの固形癌や転移した癌は低栄養環境に置かれ、増殖を行うにはその環境に適応する必要がある。そのため、癌細胞の低栄養環境への適応の阻害は新たな抗癌剤のターゲットとして有望であると考えられている。癌細胞が低栄養環境へ適応するために重要な細胞応答が、小胞体ストレス応答とオートファジーである。低栄養等のストレスにより小胞体ストレス応答が誘導され、ストレスによる小胞体の恒常性破綻を修復しようとするが、それでも細胞の恒常性を取り戻せない場合にアポトーシスが誘導される。一方、オートファジーは低栄養により誘導され、ハウスキーピング蛋白質などを分解することで、細胞の生育により重要な蛋白質を合成するためのアミノ酸を産生、供給する。これまでに癌細胞は非常に強い低栄養環境でも生育できるように小胞体ストレスによるアポトーシスに耐性化し、高いレベルでオートファジーが誘導されていることが報告されている¹⁾。最近私は小胞体膜蛋白質である B-cell receptor-associated protein 31 (BAP31) が小胞体ストレスによるアポトーシスの誘導に重要であること²⁾、及び細胞の保護に関与していることを発見した。さらに癌細胞における BAP31 の遺伝子変異についてデータベース (COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>)) で検索したところ、BAP31 のコピー数の減少 (発現抑制を示唆している) が高い頻度で確認されていた (Glioma (64.7 %)、Kidney carcinoma (67.7 %)、Lung carcinoma (62.2 %))。故に BAP31 は低栄養環境における癌細胞生育を抑制する新たな癌抑制遺伝子である可能性がある。そこで本研究では、BAP31 がオートファジーとアポトーシスを制御し、癌抑制遺伝子のような機能を有しているかを、特に BAP31 がオートファジーを制御する機構の解明を目標に研究を行った。

方法および結果

これまでの報告により小胞体ストレスによりオートファジーが誘導され、このオートファジーの誘導が小胞体ストレスによる細胞死を抑制していることが報告されている^{3,4)}。そこで、本研究で用いる実験系においてもその結果が再現されるか検討を行った。

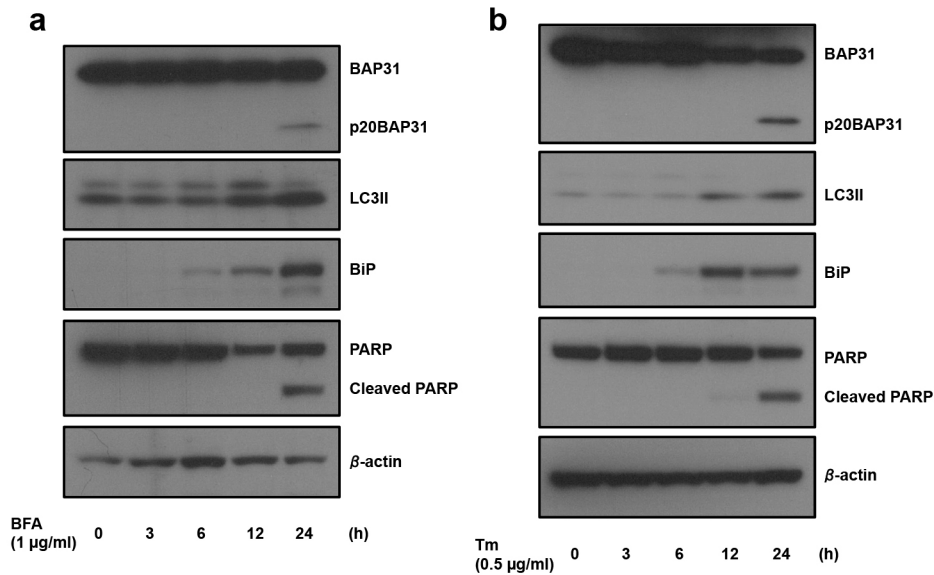


図1. 小胞体ストレスによるオートファジーの誘導

(a) BFA と (b) Tm をそれぞれ U2OS 細胞に処理し、表記のタンパク質の発現量を検討した。

まず小胞体ストレスを誘導することが知られている Brefeldine A (BFA) (図 1a) と Tunicamycine (Tm) (図 1b) を U2OS 細胞に処理し、その後ウエスタンブロット法で各種タンパク質の発現を調べた。その結果、図 1a、b で示すように、小胞体ストレス応答のマーカーである BiP の発現が誘導され、小胞体ストレス応答が誘導されていること、及び PARP が切断され (Cleaved PARP) 細胞死も誘導されていることが確認された。オートファジーの誘導についてはオートファゴソーム形成に必要な LC3II の発現を調べた。その結果、BFA、Tm とも処理後 12 時間から LC3II の発現が増加し、オートファジーが誘導されていることが示唆された。BAP31 の発現は小胞体ストレスによりほとんど変化しないが、一部は切断され p20BAP31 となり細胞死の誘導に関与している。

次に、小胞体ストレスによるオートファジーの誘導が細胞死に対して抑制的に働いているかをオートファジーの誘導阻害剤である 3-Methyladenine (3-MA) を用いて検討した。

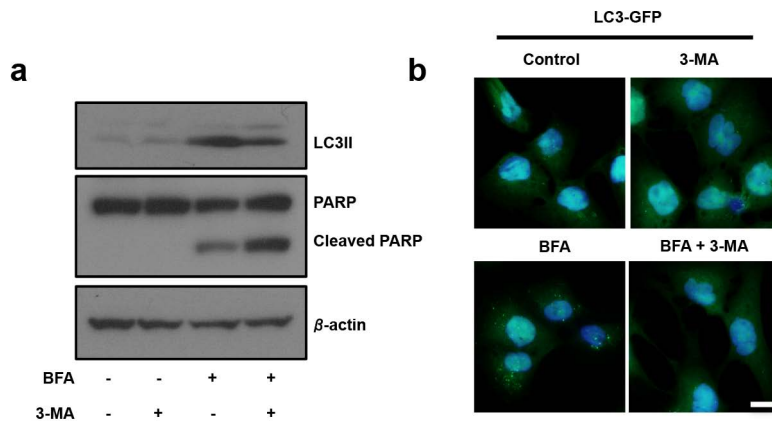


図2. オートファジーの阻害による小胞体ストレス依存の細胞死の促進

(a) オートファジーの誘導阻害剤 (3-MA) と BFA を同時、または個別に処理した時の LC3II、PARP と Cleaved PARP のタンパク質発現量。(b) a と同じ条件における LC3-GFP (緑色) の細胞内局在。凝集した緑色の光がオートファゴソーム。(DAPI (核) : 青色)。Scale bar: 20 μ m.

BFA 処理によりオートファジーが誘導されるが、その誘導は 3-MA 処理により抑制されることが、LC3II の発現増加 (図 2a) と LC3-GFP の凝集 (オートファゴソームの形成) (図 2b) により確認され、BFA による PARP の切断は 3-MA 処理により促進された。以上の結果から、小胞体ストレスによりオートファジーが誘導され小胞体ストレスによる細胞死を抑制していることが考えられる。

そこで、BAP31 がオートファジーの誘導に関与しているかの検討を行った。これまでに我々は BAP31 の発現抑制により小胞体ストレスによる細胞死が顕著に抑制されることを報告しているが、BAP31 がオートファジーの誘導に関与しているかどうかは全く分かっていない。

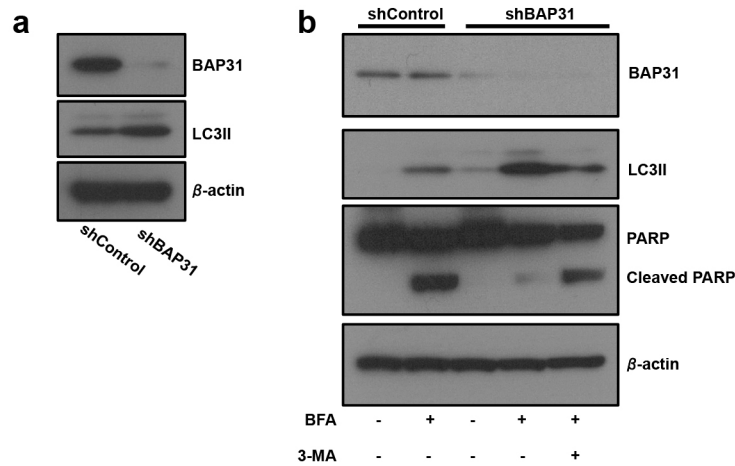


図 3. BAP31 の発現抑制によるオートファジーの誘導

(a) shBAP31 の発現を抑制した時の BAP31 と LC3II のタンパク質発現量。(b) 小胞体ストレスによるオートファジーは BAP31 の発現抑制により促進され、細胞死を抑制する。オートファジーの誘導阻害剤 (3-MA) は BFA と BAP31 によるオートファジーの誘導を抑制し、細胞死を促進する。

図 3a で示すように BAP31 の発現を shBAP31 で抑制したところ、LC3II の発現が増加し、オートファジーが誘導されていることが示唆された。そこで、BAP31 の発現抑制による小胞体ストレスによる細胞死の抑制機構に、このオートファジーの誘導に関与しているかを検討した。shBAP31 処理により BFA による細胞死 (PARP の切断) が抑制され、オートファジー (LC3II) も誘導された。BFA、shBAP31、及び 3-MA を処理したところ、BAP31 の発現が抑制され、且つオートファジーの誘導も抑制された (図 3b)。その結果、BFA による細胞死の誘導が shBAP31 と BFA を処理したものより強く誘導されていた (図 3b)。以上の結果から BAP31 は小胞体ストレスによる細胞死に関与するだけでなく、オートファジーの誘導にも関与すること、及び BAP31 の発現抑制により小胞体ストレスによる細胞死に耐性化すると同時にオートファジーの誘導も促進されることが示唆された。

ここまでの結果により BAP31 が小胞体ストレスによるアポトーシスの誘導とオートファジーの制御に関与していることが考えられる。我々はこれまでに BAP31 が小胞体ストレスによるアポトーシスの誘導に関与する機構については既に報告しているので、BAP31 によるオートファジーの制御機構について検討を行った。

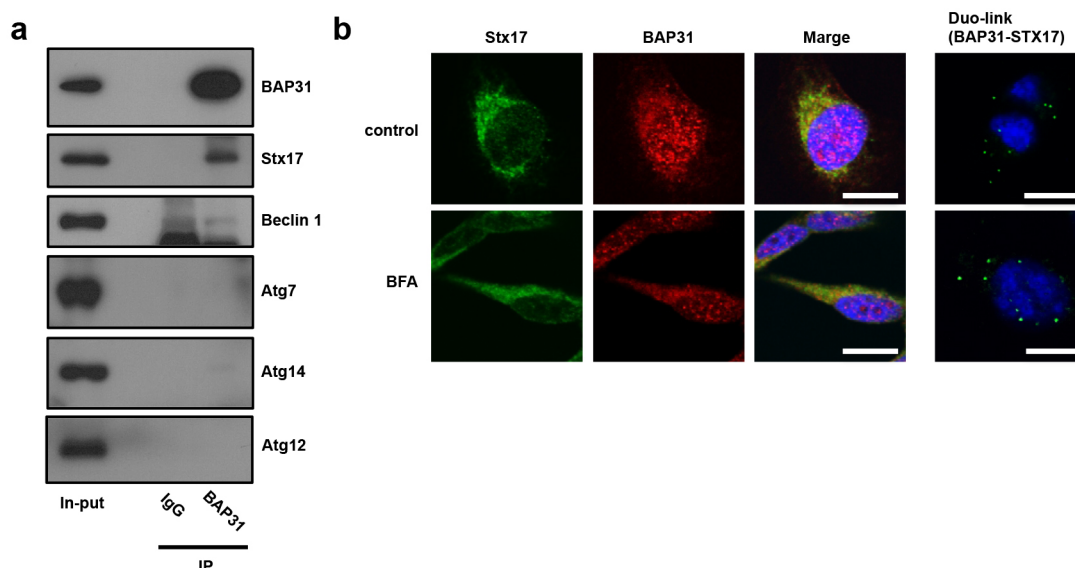


図 4. BAP31-Stx17 複合体の形成

(a) 免疫沈降法による BAP31 と相互作用するタンパク質の発見。(b) BFA 処理時と非処理時の BAP31 (赤色) と Stx17 (緑色) の細胞内局在。(DAPI (核): 青色)。Duo-link 法により BAP31-Stx17 複合体の形成を確認。緑色の点が BAP31-Stx17 複合体を示している。Scale bar: 20 μ M。

BAP31 は小胞体膜タンパク質であることから、小胞体近傍で起こるオートファジーの誘導経路に関与している可能性を考えた。これまでにオートファゴソームの形成に重要な Atg14 複合体 (Atg14、Beclin1 や Syntaxin17 (Stx17) など) の形成と活性化が小胞体膜上で起こることが報告されているので、これらのタンパク質とオートファジーの誘導に関与している Atg7 及び Atg12 と BAP31 が相互作用しているかを免疫沈降法で検討した。細胞ライセートを BAP31 の抗体で免疫沈降したところ、BAP31 と Stx17 の結合が確認された (図 4a)。また、Atg14 とも弱いながら結合していることが考えられた (図 4a)。次に BAP31 と Stx17 の結合を Duo-link 法を用いた免疫蛍光染色法で確認した。この手法により実際の細胞内で BAP31 と STX17 が結合しているかを調べることができる。Duo-link 法は目的のタンパク質の距離が近い時のみそれぞれのタンパク質の一次抗体に反応して蛍光を発生する。まず、BAP31 と Stx17 の細胞内局在を調べた。Stx17 (緑色) と BAP31 (赤色) は BFA 処理及び通常状態で共局在することが確認された (黄色)。同じ実験条件下で Duo-link 法を行ったところ緑色の蛍光が観察された (図 4b)。この結果により endogenous な条件においても BAP31 と Stx17 は結合していること、小胞体ストレスによっても BAP31 と Stx17 の結合はほとんど変化しないことが考えられる。以上のことから BAP31 は Stx17 と結合することでオートファジーの誘導を制御している可能性が示唆された。今後は、BAP31 が Stx17 と結合することで Atg14 複合体の形成にどのような影響を与えるかを検討していき、BAP31 によるオートファジーの制御機構の全容を明らかにしていく。

考 察

本研究により、BAP31 が小胞体ストレスによる細胞死と細胞の生存に寄与するオートファジーの両者を制御していることが示唆された。このように細胞の死と生存を決定する因子は癌抑制遺伝子が有名であり、BAP31 も新たな癌抑制遺伝子である可能性が考えられる。

先進諸国において癌による死亡者数は増加の一途をたどり、癌の治療は未だ大きな課題である。プロテオミクス解析や次世代シーケンスを用いた癌細胞の遺伝子情報解析から、同じ組織由来の癌であっても各個人の間で癌の性質が大きく異なること、つまりそれぞれの癌に対して有効な治療法が異なることが明らかにされた。新たなターゲットに対する抗癌剤の開発が待ち望まれている。これまでに癌細胞が低栄養等のストレスに耐性化する機構をターゲットにした抗癌剤は開発されていない。そこで本研究により明らかにされつつある BAP31 を中心にした小胞体膜上でのダイナ

ミックなシグナル伝達機構を解析し、新たなオートファジーの制御機構を解明することで、癌細胞特異的に低栄養ストレスに感受性化させ、転移を防ぐような癌の治療ターゲットの発見が期待される。

最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(12):961-7. doi: 10.1038/nrc2254. PubMed PMID: 17972889.
- 2) Namba T, Tian F, Chu K, Hwang SY, Yoon KW, Byun S, et al. CDIP1-BAP31 complex transduces apoptotic signals from endoplasmic reticulum to mitochondria under endoplasmic reticulum stress. *Cell reports*. 2013;5(2):331-9. doi: 10.1016/j.celrep.2013.09.020. PubMed PMID: 24139803.
- 3) Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*. 2006;26(24):9220-31. doi: 10.1128/MCB.01453-06. PubMed PMID: 17030611
- 4) Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem*. 2006;281(40):30299-304. doi: 10.1074/jbc.M607007200. PubMed PMID: 16901900.