

氏名・本籍	土井 捺実 (広島県)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第61号
学位授与の日付	令和4年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	ゲノムストレス応答性に細胞分裂方向を制御する RhoGDI $\beta$ の研究
学位論文審査委員	主査 教授 達家 雅明 副査 教授 菅 裕 教授 齋藤 靖和 准教授 吉野 智之

## 学位論文の要旨

本研究では、細胞分裂方向を制御するシグナルスイッチ調節分子RhoGDI $\beta$ の生理的な役割に注目した。特に、ゲノムストレス応答性に3型カスパーゼの働きによって発現するN末切断産物 $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$ の標的化を目指した創薬研究を行った。

RhoGDI $\beta$ は、アクチン細胞骨格系を中心とした様々な細胞機能発揮のための細胞内シグナル伝達経路に位置する分子スイッチ (Rhoファミリー低分子量Gタンパク質) のスイッチング機能を制御する。すなわち、その主要な役割は、細胞の状況に応じた適切な分子スイッチのオンとオフにある。また、ゲノムストレスに曝された上皮細胞において、RhoGDI $\beta$ は、活性化3型カスパーゼの働きにより、変様型であるN末を欠失したRhoGDI $\beta$  ( $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$ ) へと変化する。この変様型の $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$ は、分子スイッチのひとつRac1を制御する機能に加えて、別のスイッチであるCdc42を制御する機能を持つ。Rac1は細胞運動の活性制御に機能し、Cdc42は分裂軸を介した運動の方向性決定機能を持つ。 $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$ は、ゲノムストレス応答性に、Cdc42を制御する。

第1章では、緒言として研究背景を述べる。

第2章では、上皮組織由来細胞の紫外線誘発分裂方向異常について述べる。

ヒト子宮頸部癌由来のHeLa細胞を用いた解析を行った。基底膜は、ヒトの上皮組織において、幹細胞の生存とその分裂のニッチである。すなわち、基底膜上でのみ上皮細胞は増殖する。マトリゲル (再構成基底膜) 上で培養したHeLa細胞では、紫外線 (UVC) 照射により、分裂軸の方向性が乱れることを見つけた。非照射時における分裂軸は、培養面に対して水平であるのに対して、紫外線照射された場合、水平方向を維持した分裂軸が減少し、分裂方向異常が出現する。

第3章では、上皮組織由来細胞の紫外線誘発分裂方向異常とRhoGDI $\beta$ の関係について述べる。

マトリゲル上のHeLa細胞は、紫外線照射によって、分裂方向の異常が表れる。この時、

RhoGDI $\beta$ の発現をshRNA (Short hairpin RNA、低分子ヘアピン型RNA) によってノックダウンした場合、紫外線誘発分裂方向異常は阻止された。また、活性化3型カスパーゼ非切断型のRhoGDI $\beta$ -D19A (19番目のアスパラギン酸をアラニンに置換) を強制発現させた場合にも、紫外線誘発分裂方向異常は阻止された。更に、Cdc42ノックダウン細胞では、分裂方向異常が恒常的に出現するが、一方、恒常的活性化型のCdc42-G12V (12番目のグリシンをバリンに置換) を強制発現させた場合、紫外線誘発分裂方向異常は阻止された。すなわち、紫外線誘発分裂方向異常は、 $\Delta$ N-RhoGDI $\beta$ 発現によりCdc42が阻害されることにより生じ、RhoGDI $\beta$ 発現を抑制することによって、この異常は阻止可能であることがわかった。

第4章では、RhoGDI $\beta$ 発現を抑制するアスコルビン酸誘導体の探索について述べる。

アスコルビン酸は、皮膚組織の紫外線によるダメージを軽減し、種々の誘導体が開発されている。それゆえ、RhoGDI $\beta$ を分子標的とした創薬のための候補分子としての探索ソースとして魅力的であると考えた。アスコルビン酸と15種類の誘導体について、HeLa細胞を用いてqRT-PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction) 法によりRhoGDI $\beta$ 発現抑制効果を調べた結果、脂溶性誘導体である2-*O*-octadecylascorbic acid (2-OctadecylAA) に効果のあることがわかった。また、紫外線誘発分裂方向異常は、2-OctadecylAA処理により抑制された。2-OctadecylAAは、その開発名がCV-3611であり、齧歯類の肝癌モデルにおいて発癌抑制効果のあることが知られる。その作用機作は、抗酸化活性では説明がつかなかった。RhoGDI $\beta$ は癌転移関連分子であり、癌の進展に深く関わっていることが知られており、本研究により、ここに、RhoGDI $\beta$ 発現抑制を介した新しい2-OctadecylAAの発癌抑制機序が示唆された。

第5章では、RhoGDI $\beta$ 発現を抑制する天然物素材の探索について述べる。

化粧品素材天然物ライブラリーから105種類の素材について、HeLa細胞を用いたqRT-PCR法によりRhoGDI $\beta$ 発現抑制効果を調べた。その結果、12種類の候補素材について効果のあることが見つかった。この内、RhoGDI $\beta$ 発現抑制効果が高く、皮膚への効能が知られ、耐塩性植物としてその耐塩性獲得にRhoGDIが活発に機能しているアッケシソウに注目した。

第6章では、皮膚扁平上皮組織の細胞分裂方向に対するアッケシソウ抽出液の効果について述べる。

アッケシソウ抽出液は、マトリゲル上のHeLa細胞に対して、RhoGDI $\beta$ 発現を抑制し、紫外線誘発分裂方向異常を阻止した。そこで、皮膚扁平上皮組織の細胞分裂方向への効果を調べる目的から、試験管内皮膚扁平上皮組織分化モデルを用いて、その基底層における細胞分裂方向の紫外線照射による効果とアッケシソウ抽出液の影響を調べた。その結果、細胞分裂方向の異常が紫外線によって生じたが、アッケシソウ抽出液には、その異常を阻止する効果が認められた。また、重層扁平上皮形成における形態観察を行ったところ、紫外線による重層化の乱れは、アッケシソウ抽出液によって阻止された。

第7章では、本研究の総括を述べる。

紫外線などのゲノムストレスによって生じる上皮組織の細胞分裂方向異常と、その結果生じる組織構築や恒常性の乱れが、RhoGDI $\beta$ 発現抑制により防御可能であり、実際にスクリーニングにより幾つかの有効な創薬候補を見つけたことは、今後、化粧品や医薬品の開発分野における貢献が期待出来る。