

学位論文題名

A study of alteration of gene expression in a flat revertant R1
from ras-oncogene transformed NIH/3T3 cells

(ras 癌遺伝子形質転換 NIH/3T3 細胞由来のフラット
・リバータント R1 における遺伝子発現変化に関する研究)

学位論文内容の要旨

I 目 的

癌細胞から癌としての性格を失っているフラット・リバータントを得て、解析することは、細胞癌化にとって重要な遺伝子を検索するための主要なアプローチの一つである。癌研分子遺伝部門では、活性型ヒト H-ras (EJ-ras) 癌遺伝子により形質転換した NIH/3T3 細胞 (以下、EJ-NIH/3T3 細胞) を突然変異原で処理することによりフラット・リバータント R1 を得て解析を進めてきた。R1 細胞は、EJ-ras 癌遺伝子が発現しているにも関わらず、NIH/3T3 細胞よりも平坦な形態を示し、造腫瘍性を失っており、各種の癌遺伝子による再形質転換に対して抵抗性を示す。さらに R1 細胞では、EJ-NIH/3T3 細胞や NIH/3T3 細胞ではみられない、アクチン結合蛋白質ゲルゾリンに対する抗体と反応する蛋白質 p92-5.7 が産生されている。

本研究では、p92-5.7 の機能と R1 細胞の造腫瘍性消失における関与を検討するために、この蛋白質をコードする cDNA のクローニングを行った。また、ゲルゾリンのアクチン調節蛋白質としての機能に着目し、多くの形質転換細胞で発現が減少し、しばしばゲルゾリンの発現と相関を示す α -アクチンについて検討した。さらに他の遺伝子変化を検討するために、differential hybridization 法を用いて、EJ-NIH/3T3 細胞と比較して、R1 細胞で特異的に発現が上昇している遺伝子の同定を試みた。

II 方 法

p92-5.7 の cDNA のクローニング

R 1細胞の cDNA ライブラリーを調製し、プローブにはヒト・ゲルゾリン cDNA を用いた。得られた cDNA が p 92-5.7あるいは正常ゲルゾリンをコードしていることは、in vitro transcription-translation 法にて確認した。すなわち、cDNA を pBluescript KS (-) プラスミドにサブクローニングして mRNA に転写させ、ウサギ reticulocyte lysate および L - [³⁵S] -メチオニンを用いて蛋白質に翻訳させた。合成されたポリペプチドは放射性活性のない R 1細胞の蛋白質と混合し、O' Farrell の 2 次元電気泳動法で解析した。蛋白質の検出には銀染色法を用い、³⁵S でラベルされた in vitro translation 産物は autoradiography で検出し、その位置を確認した。得られたゲルゾリンの cDNA の塩基配列は、マウス・ゲルゾリン cDNA に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ジデオキシ法により決定した。

発現の増加した遺伝子の同定

α -アクチンの mRNA の発現は α -平滑筋アクチン cDNA プロブを用い、Northern blotting 法により検討した。 α -アクチン蛋白質の産生は α -平滑筋アクチンに特異的な monoclonal 抗体を用い間接蛍光抗体法にて解析した。また、differential hybridization 法により、R 1細胞で特異的に高く発現している他の遺伝子を同定した。すなわち R 1細胞の cDNA ライブラリーより得た約 8,000 のクローンから、EJ-NIH/3 T 3細胞の cDNA プロブに比べて、R 1細胞の cDNA プロブにより強くハイブリダイズするクローンを単離し、塩基配列を決定した。さらに、それらの遺伝子の NIH/3 T 3, EJ-NIH/3 T 3, R 1各細胞における mRNA レベルでの発現を Northern blotting 法で検討した。

III 成 績

R 1細胞の cDNA ライブラリーからヒト・ゲルゾリン cDNA とハイブリダイズするほぼ完全長のクローンを 4 個得た。in vitro transcription-translation 法による解析の結果、このうち 3 つのクローンが p 92-5.7 を、1 つが正常のゲルゾリンをコードしていた。各クローンの塩基配列を解析することにより、p 92-5.7 をコードする cDNA の 321 番目のコドンに点突然変異を認めた。この点突然変異は、アミノ酸レベルで中性アミノ酸であるプロリンから塩基性アミノ酸であるヒスチジンへの変化を引き起こす。

次に、 α -アクチン mRNA の発現は、EJ-NIH/3 T 3細胞で検出されなかったが、R 1細胞では NIH/3 T 3細胞と同程度に認められた。蛍光抗体法では、EJ-NIH/3 T 3細胞で α -アクチンを含むマイクロフィラメントが検出されなかったのに対し、R 1および NIH/3 T 3細胞では規則的なフィラメントの走行を認めた。また、R 1細胞の cDNA ライブラリーか

ら differential hybridization 法によって、R 1 細胞で強く発現している 5 個のクローンを得た。これらのクローンは、塩基配列の解析から、ミトコンドリア遺伝子(cytochrome b, cytochrome c oxidase subunit II, NADH dehydrogenase subunit 1 および 4) と $\alpha 2$ (type I) コラーゲン遺伝子であることがわかった。ミトコンドリア遺伝子の発現は、いずれも R 1 細胞で最も高く、次いで NIH/3 T 3 細胞, EJ-NIH/3 T 3 細胞の順であった。 $\alpha 2$ (type I) コラーゲン遺伝子は、R 1 細胞と NIH/3 T 3 細胞では同程度の発現量を示し、EJ-NIH/3 T 3 細胞では低下していた。

IV 考 察

本研究によって、フラット・リバータント R 1 細胞とその親株である EJ-NIH/3 T 3 細胞間における、細胞骨格蛋白質ゲルゾリンおよび α -アクチン、ミトコンドリアおよびコラーゲン遺伝子の発現の相異が明らかとなった。このうちゲルゾリン変異蛋白質である p92-5.7 の変異部位は、ゲルゾリンのアクチンフィラメントおよび細胞の増殖にとって重要な因子である phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (以下、 PtdInsP_2) の結合部位である。このことは、p92-5.7 がアクチンフィラメントもしくは PtdInsP_2 に対して正常ゲルゾリンとは異なった作用を及ぼす可能性が考えられる。

α -アクチンの発現はしばしば癌細胞でも減少し、分化した細胞では増加している。このことが本研究でも確認された。また R 1 細胞におけるミトコンドリア遺伝子の発現上昇は、造腫瘍性の消失に関係のあるエネルギー代謝の変化を反映していると考えられる。さらに、R 1 細胞における細胞外マトリックス・コラーゲンの増加は、この細胞の増殖形式や接触阻止といった性質と関係があると考えられる。

V 結 語

ras 遺伝子関連腫瘍由来のフラット・リバータント R 1 細胞の造腫瘍性消失には、アクチン調節蛋白質ゲルゾリン遺伝子の点突然変異、 α -アクチン遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子および $\alpha 2$ コラーゲン遺伝子の発現上昇が関与していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 牧 田 章

副 査 教 授 西 信 三

癌細胞から癌としての性格を失っているフラット・リバータントを得て、これらを解析することは、細胞癌化およびこの抑制機構に重要な役割を持っている遺伝子を検索するための有効なアプローチの一つである。癌研究施設分子遺伝子部門で作製されたR 1細胞は、このようなフラット・リバータントの一つで、活性型ヒト H-ras (EJ-ras) 癌遺伝子により形質転換した NIH/3 T 3 細胞(以下 EJ-NIH/3 T 3 細胞)を突然変異原で処理することにより得られた。

本研究では、フラット・リバータント R 1 細胞で特異的に産生されている蛋白質 p 92-5.7 の発現と R 1 細胞の造腫瘍性消失の相関を検討するために、この蛋白質をコードする cDNA のクローニングを行った。また、ゲルゾリンのアクチン調節蛋白質としての機能に着目し、 α -アクチンの発現について検討した。さらに他の遺伝子変化を検討するために、differential hybridization 法を用い、EJ-NIH/3 T 3 細胞と比較して R 1 細胞で特異的に発現が上昇している遺伝子の同定を試みた。

R 1 細胞の cDNA ライブラリーからヒト・ゲルゾリン cDNA とハイブリダイズするほぼ完全長のクローンを四個得て、*in vitro* transcription-translation 法によって解析した結果、三つのクローンが、p 92-5.7 を、一つが正常のゲルゾリンをコードすることがわかった。各クローンの塩基配列を解析することにより、p 92-5.7 をコードする cDNA の 321 番目のコドンに点突然変異を認めた。この点突然変異は、アミノ酸レベルで中性アミノ酸であるプロリンから塩基性アミノ酸であるヒスチジンへの変化を引き起こす。

次に α -アクチン mRNA の発現は、EJ-NIH/3 T 3 癌細胞で検出できなかったが、R 1 細胞では NIH/3 T 3 細胞と同程度に認められた。同様に蛍光抗体法では、EJ-NIH/3 T 3 細胞で α -アクチンを含むマイクロフィラメントが検出されなかったのに対し、R 1 および NIH/3 T 3 細胞では規則的なフィラメントの存在を認めた。また、differential hybridization 法による検索では、R 1 細胞で強く発現している五個のクローンを得た。これらのクローンは塩基配列の解析から、ミトコンドリア遺伝子(cytochrome b, cytochrome c oxidase subunit II, NADH dehydrogenase subunit 1 および 4) と $\alpha 2$ (type I) コラーゲン遺伝子であることが

わかった。ミトコンドリア遺伝子の発現はいずれもR1細胞で最も高く、次いでNIH/3T3細胞、EJ-NIH/3T3細胞の順であった。 α -2 (type I) コラーゲン遺伝子は、R1細胞とNIH/3T3細胞では同程度の発現量を示し、EJ-NIH/3T3細胞では低下していた。

本研究によって、フラット・リバータントR1細胞とその親株である癌細胞EJ-NIH/3T3細胞間における、細胞骨格蛋白質ゲルゾリンおよび α -アクチン、ミトコンドリアおよびコラーゲン遺伝子の構造あるいは発現の相異が明らかとなった。このうちゲルゾリン変異蛋白質であるp92-5.7の変異部位は、ゲルゾリンのアクチンフィラメントおよび細胞の増殖にとって重要な因子であるホスファチジルイノシトール PIP_2 の結合部位である。このことから、p92-5.7がアクチンフィラメント又は PIP_2 に対して、正常ゲルゾリンとは異なった作用を及ぼす可能性が考えられる。また、 α -アクチンの発現はしばしば癌細胞で減少し、分化した細胞では増殖しているが、本研究でもこのことが確認された。またR1細胞におけるミトコンドリア遺伝子の発現上昇は、造腫瘍性の消失に関係のあるエネルギー代謝の変化を反映していると考えられた。さらに、R1細胞における細胞外マトリックス、コラーゲンの増加は、この細胞の増殖形式や接触阻止といった性質と関係があると考えられた。

口頭発表に際して、牧田教授、西教授、細川教授より、ゲルゾリンが持つホスファチジルイノシトール結合活性の意義とホスホリパーゼCに対する作用、アクチンとの結合性の変化、突然変異の数、二次元電気泳動上の二つのスポットの意味、ゲルゾリン変異の頻度などについて質問があり、申請者は日本語、内容ともに適切な解答をなした。また牧田教授、西教授には個別に審査を受け、合格と判定された。

以上本研究によって、ras癌遺伝子関連腫瘍由来のフラット・リバータントR1細胞の造腫瘍性消失には、アクチン調節蛋白質ゲルゾリン遺伝子の点突然変異、 α -アクチン遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子および α 2コラーゲン遺伝子の発現上昇が関与していることが示された。この研究成果は、細胞の癌化抑制機構における重要な知見であり、博士(医学)を与えるのに適格と判断した。