

PDZ ドメイン蛋白 AIE-75 遺伝子の過剰発現における
ヒト大腸癌細胞 SW480 の G₂/M arrest に関する研究

学位論文内容の要旨

AIE-75はX染色体連鎖自己免疫性腸症 (autoimmune enteropathy ; AIE) 患者血清中の自己抗体に反応する自己抗原として同定された分子量75kDaの蛋白である。AIE-75は小腸, 大腸, 腎臓および膵臓で特異的に発現することがノーザンブロット解析で分かっている。腎臓および大腸におけるAIE-75の発現をreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) で調べ, 非癌部組織では発現が見られるが, 培養腎臓癌細胞では5株中すべての株で, 発現の著しい低下あるいは発現の消失を, 培養大腸癌細胞では5株中1株で発現の消失を認めた。この蛋白は大腸癌患者血清中の自己抗体に反応する抗原としても同定された。また, 最近AIE-75 (harmonin) 遺伝子の胚細胞系列変異が感音性難聴, 三半規管機能不全および進行性の網膜色素変性症を主症状とするUsher 症候群 type 1Cの原因になることが報告された。AIE-75の構造上の特徴は3つのPDZ (PSD-95 / Dlg / ZO-1) ドメインをもつことである。PDZドメインはタンパク質間の結合に関係するモジュールであり, C末端にX-S / T / F / Y -X-Φ (Φ: 疎水性アミノ酸) のモチーフをもつタンパク質がPDZドメインに結合しうる。PDZドメインをもつタンパクは他にも多数あり, PDZドメインが単に分子を集積するためだけの足場としてだけでなく, 分子を的確な領域に配置したりシグナル伝達を調節する上で重要な役割を果たすことが明らかになってきた。例えば, PDZドメイン蛋白の一つであるhuman homolog of the Drosophila lethal (1) discs large-1(dlg) tumor suppressor (hDLG) は, 癌抑制蛋白であるadenomatous polyposis coli (APC) と結合し, 細胞の増殖性を抑制することが知られている。また最近AIE-75に結合する新規蛋白分子として癌抑制蛋白であるmutated in colon cancer (MCC) と高い相同性をもつMCC2が同定された。

このような背景からAIE-75と癌抑制に関わる蛋白との関連が予測された。

本研究では、AIE-75の発現が非常に低いヒト大腸癌細胞株SW480にAIE-75を過剰発現させ、細胞内におこる変化を解析した。また、AIE-75に結合するタンパク質の検索を行ない、AIE-75の分子ネットワークにどのような分子が関わっているかを調べた。

【材料と方法】

ヒト大腸癌細胞株 SW480にAIE-75発現ベクターあるいはコントロールベクターを導入した後、細胞のクローニングを行った。細胞での AIE-75 の発現はRT-PCR法により調べた。各細胞クローンの細胞増殖能をin vitroおよびin vivo で比較した。細胞の観察は共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて行なった。細胞周期はフローサイトメトリーにより解析を行った。AIE-75結合のスクリーニングは酵母Two-hybrid assayを用いて行なった。

【結果と考察】

各細胞クローンの細胞増殖能をin vitroおよびin vivo で比較した結果、AIE-75過剰発現株ではコントロール株と比較して細胞増殖能の低下が認められ、AIE-75の発現と増殖抑制効果との関連が示唆された。共焦点レーザー蛍光顕微鏡による各細胞株の観察の結果、AIE-75の過剰発現と細胞核の巨核化および多核化をひき起こすことが示された。さらにフローサイトメトリーによる細胞周期の解析の結果、AIE-75過剰発現クローン株ではS期画分の減少とG₂/M期画分の著しい増加が認められ、8倍体、16倍体の細胞の存在も確認された。酵母Two-hybrid assay によって、G₂/M期チェックポイント制御因子であるプロテインフオスファターゼPP2AがAIE-75のPDZドメインと結合する蛋白として見いだされた。以上より、ヒト大腸癌細胞SW480のAIE-75過剰発現株に生じたG₂/Mブロックは、G₂/M期チェックポイント制御因子であるPP2Aの活性を促進することで生じている可能性が示唆された。

本研究の結果、ヒト大腸癌細胞株SW480にAIE-75を過剰発現させると細胞増殖抑制効果および著明な細胞の巨核化が認められた。in vitroでの細胞増殖に関する検討の結果、AIE-75発現クローン株ではコントロール株と比較して一様に細胞増殖の抑制が認められ、さらに AIE-75発現クローン株間の比較ではAIE-75の発現の高いものほど増殖抑制効果が大きくなっていることから、AIE-75の発現は細胞増殖を抑制すると考えられた。また、各細胞株のヌードマウス皮下における増殖の比較をおこなった実験の結果でも

同様にAIE-75の発現の高い細胞株では腫瘍増殖抑制効果の高いことが認められ、AIE-75の発現と腫瘍増殖抑制効果の関連性がin vitroおよびin vivoの実験によって示された。AIE-75発現株の細胞形態の変化については、今回クローニングされたすべての細胞株のうち最もAIE-75の発現が高かったクローンで特に著明であった。共焦点レーザー蛍光顕微鏡による各細胞株の観察では、コントロール株ではPIの蛍光染色像のみであったのに対して、AIE-75発現株においてはAIE-75の存在を示すAlexa 488の蛍光が観察された。すなわちAIE-75の発現のある細胞ではそうでない細胞の核と比べ、大きかった。このことはAIE-75の発現が核の巨大化に参与していることを示している。また特に緑色に強く染まる、すなわちAIE-75の発現が高い細胞においては著明な巨核細胞や、多核細胞が認められた。以上よりAIE-75の発現は細胞核の巨核化および多核化をひき起こすと考えられた。さらにフローサイトメトリーによる細胞周期の解析の結果からAIE-75発現クローン株ではS期画分の減少とG₂/M期画分の著しい増加が認められた。これはG₂/Mブロックによる細胞分裂の抑制によると考えられる。細胞分裂の抑制による核の巨大化および多核化はフローサイトメトリーによる

Hyperploid画分の存在と符合する結果である。以上よりAIE-75の発現はG₂/Mブロックおよびadaptation (mitotic slippage)によるhyperploidの核の出現をひき起こすことから、AIE-75発現株での細胞増殖抑制はG₂/Mブロックを主体とする細胞周期制御機構の変化によるものであると考えられる。

AIE-75の生物学的機能は未知であるが、酵母Two-hybrid assayによってAIE-75のPDZドメインとC末端で結合すると考えられる9つの蛋白のうち、3つがタンパク質(Ser/Thr)脱リン酸化酵素(PP)であるPP2AC- α , β およびPPP6Cであった。PPP6Cの機能はまだよく分かっていないが、PP2AC- α , β は細胞周期チェックポイント制御因子であることがわかっている。PP2AはA, B, Cの3つのサブユニットからなり、今回AIE-75と結合することが判明したのはCのcatalytic subunitで、PP2Aの酵素活性作用にとって重要な蛋白である。本研究ではAIE-75過剰発現によってヒト大腸癌細胞のG₂/Mブロックが認められた。これはG₂/M期チェックポイント制御因子としてのPP2Aの作用をAIE-75蛋白が促進することで生じることが可能性の1つとして考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 博
副 査 教 授 向 後 隆 男
副 査 教 授 戸 塚 靖 則
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

PDZ ドメイン蛋白 AIE-75 遺伝子の過剰発現における ヒト大腸癌細胞 SW480 の G₂/M arrest に関する研究

審査担当者全員が一堂に会して、口頭にて審査した。はじめに、論文提出者から論文内容の説明を受けた。説明の要旨は以下の通りであった。

【目的】AIE-75はX染色体連鎖自己免疫性腸症 (auto immune enteropathy ; AIE) 患者および大腸癌患者血清中の自己抗体に反応する自己抗原として同定された分子量75kDaの蛋白である。ヒト正常組織では小腸、大腸、腎臓および膵臓で特異的に発現することが知られている。AIE-75は蛋白質間の結合に関わるPDZドメインをもつ。PDZドメインをもつ蛋白の一つであるhDLGは、癌抑制蛋白であるAPCと結合し、細胞の増殖性を抑制することが報告されている。またAIE-75に結合する新規蛋白として同定されたMCC2は癌抑制蛋白であるMCCと高い相同性をもつことが報告された。このような背景から、AIE-75が癌抑制に関わる可能性が予測された。そこでAIE-75を過剰発現させることにより細胞内におこる変化を解析すること、さらにAIE-75に結合するタンパク質の検索を行ない、AIE-75の分子ネットワークにどのような分子があるかを調べることを目的に研究を行った。

【材料と方法】AIE-75の発現の非常に低いヒト大腸癌細胞株 SW480 にAIE-75発現ベクターあるいはコントロールベクターを導入し、細胞のクローニングを行った。細胞でのAIE-75の発現はRT-PCR法により調べた。各細胞クローンの細胞増殖能をin vitroおよびin vivoで比較した。細胞の観察は共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて行った。細胞周期はフローサイトメトリーにより解析した。AIE-75結合蛋白の検索は酵母Two-hybrid assayを用いて行った。

【結果と考察】各細胞クローンの細胞増殖能をin vitroおよびin vivoで比較した結果、AIE-75過剰発現株ではコントロール株と比較して細胞増殖能の低下が認められ、AIE-75の過剰発現と増殖抑制効果との関連が示唆された。共焦点レーザー蛍光顕微鏡による各細胞株の観察の結果、AIE-75の過剰発現と細胞核の巨核化および多核化との関連が示された。さらにフローサイトメトリーによる細胞周期の解析の結果、AIE-75過剰発現クローン株ではS期画分の減少とG₂/M期画分の著しい増加

が認められ、細胞周期のG2/Mブロックが生じていた。また、8倍体、16倍体の細胞の存在も確認された。酵母Two-hybrid assay によってG2/M期チェックポイント制御因子であるプロテインフォスファターゼPP2AがAIE-75のPDZドメインと結合する蛋白として見いだされた。以上より、ヒト大腸癌細胞SW480のAIE-75過剰発現株に生じたG2/Mブロックは、G2/M期チェックポイント制御因子であるPP2Aの活性を促進することで生じている可能性が考えられた。

続いて、各審査担当者から本研究ならびに関連論文に関して、一般的事項について以下のような種々の質問があった。

1. AIE-75は小腸、大腸、腎臓、脾臓で特異的に発現するということであるが、他にどのような組織での発現が調べられているか？口腔や食道での発現は調べられているか？
2. AIE-75の変異は、いつごろ起こるのか？
3. AIE患者で実際AIE-75の異常などが報告されているか？
4. AIE-75遺伝子導入を2回おこなっている理由は？
5. 酵母Two-hybrid法によって同定されたPP2AがAIE-75遺伝子過剰発現によるG2/M arrestに関与する直接的な根拠があるのか？
6. G2/M期における制御機構、とくにMPFの機能について
7. G2/Mブロックを乗り越えてDNA相対量が8N、16Nのものが出てくるのは何故か？
8. 巨核細胞、多核細胞に関して、その意義。さらに、核分裂および細胞分裂の過程と制御について、例えば破骨細胞のように核の大きい細胞などではAIE-75の発現はどうなっているのでしょうか？
9. 本研究の現時点での問題点と今後の研究課題について

論文提出者はこれらの質問に対して明快に回答した。

本論文内容の斬新さ、ならびに今後の発展性を高く評価されるとともに、論文提出者が本研究を中心に広い学識を有していることが認められ、博士（歯学）を授与するに値するものと判断された。