

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成12年度博士課程進学
氏名 金玖池
指導教官名 秋山 徹

論文題目 癌抑制遺伝子 DLG の機能解析

序論

dlg (*Drosophila discs-large*) 遺伝子はショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の癌抑制遺伝子の一種で、その産物はヒトの tight junction に相当する septate junction に局在する。*dlg* 遺伝子に変異が起きて失活すると成虫原基の上皮細胞が極性を失うと同時に異常増殖を起こして癌化することや、神経細胞のシナプス構造に異常が生じることが知られている。哺乳類には Dlg のヒトホモログ hDlg に加えて、シナプスに多量に存在する PSD-95/SAP90、PSD-93/Chapsyn110、SAP102 など、構造のよく似たタンパク質が存在する。これらのタンパク質はいずれもマルチドメインタンパク質で、PDZ ドメイン、SH3 ドメイン、GK ドメインを持っている。この GK ドメインを持っているという共通の構造から、MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) ファミリーと呼ばれている。これらのタンパク質は、細胞膜裏打ちタンパク質としてレセプターやイオンチャネルのクラスタリングを引き起こす活性を持ち、シナプスのタンパク質複合体の構築に重要な役割を果たす。また、シグナル伝達分子と結合してシグナルを伝えるための足場にもなることが明らかになってきており、特

に hDlg は家族性腺腫性ポリポーシス(familial adenomatous polyposis ; FAP)および散発性大腸癌の原因遺伝子である adenomatous polyposis coli (APC)タンパク質の C 末端 S/TXV モチーフと結合していることがわかっている。これらの働きを通して、細胞極性、増殖制御およびシナプス可塑性などに関与していると考えられ、注目を集めている。

そこで本研究では、Dlg の生理機能を明らかにすることを目的として、Dlg 欠損マウスを用いた個体レベルでの解析、および Dlg の結合タンパク質の探索を行った。

結果と考察

Dlg 欠損マウスを用いた機能解析

本研究室において、Dlg 遺伝子の N 末端側 20 アミノ酸にネオマイシン耐性遺伝子を挿入して、Dlg 遺伝子欠損マウスを作製した。ホモ欠損マウスはチアノーゼ症状を示し、出生直後に死亡した。生後 1 年以降のヘテロ欠損マウスにおいて、悪性リンパ腫の形成が確認され、免疫組織化学的観察の結果 natural-killer lymphoma であることが明らかとなった。現在ヒト同疾患検体における変異の探索を進めている。さらに、Dlg ヘテロ欠損マウスにおいて皮膚付属器官の腫瘍 (proid hydradenoma) の形成が認められた。免疫組織化学的観察を行った結果、Dlg の発現は認められず、皮膚付属器官腫瘍マーカーである cytokeratin AE1/AE3 の発現が認められた。この結果から Dlg 遺伝子は哺乳類でも *Drosophila* dlg と同様に癌抑制遺伝子として機能することが示唆された。また BrdU 染色法により皮膚において、Dlg 欠損による増殖の亢進が観察された。これは Dlg が増殖を負に制御するとの報告と一致する結果である。しかし、細胞増殖に関与している MAPK 系への影響は認められなかった。また Dlg 欠損マウス由来胎児繊維芽細胞においても細胞増殖能の差は認められなかった。

細胞接着分子の欠損は発毛をはじめとする皮膚組織での異常を示すことが知られている。そこで生後直後の Dlg 遺伝子欠損マウスの表皮を HE 染色法により解析したところ、正常マウスに比べて毛包の数が少ないことが明らかとなった。続いて Dlg 欠損マウスは出生直後に死亡するため、Dlg 欠損マウスの皮膚をヌードマウスに移植し毛の形成を観察した。その結果、発毛が見られるものの、その数が少ないことが明らかになった。しかし HE 染色で皮膚の構造を調べたところ、Dlg 欠損による他の顕著な異常は認められなかった。またβ-カテ

ニン、Shh などが毛の形成に関わっていることが知られているが、*in situ* hybridization でこれらのシグナル系で機能する分子の発現を調べた結果、これらの発現に変化がないことが明らかとなった。今後 conditional mutant mice 作製により、より詳しい解析を行う予定である。

DLG による細胞間接着の制御

細胞間接着は細胞の運動や増殖の制御に、ひいては多細胞運動の形態形成において重要な役割を果たす。ショウジョウバエの研究から DLG により細胞間接着が制御されることが予想されたので、DLG が哺乳類においても細胞間接着の制御に関与するかどうかを明らかにするために E18.5 由来の Dlg 欠損マウスの皮膚を摘出し keratinocyte 初代培養を行った。細胞極性が発達している上皮細胞の細胞間接着には形態学的に特徴的な Tight junction (TJ)、Adherens junction (AJ)が存在し、DLG は AJ に局在する。Keratinocyte を Ca^{2+} 刺激により分化を誘導し、AJ を形成させた。AJ 形成に重要な接着因子である α -カテニン、 β -カテニン、E-カドヘリン、および DLG 結合タンパク質である APC、SPAL、CASK などの局在を、免疫細胞化学法を用いて解析したところ、Dlg 欠損による変化は認められなかった。しかし Dlg 欠損 keratinocyte において微小管を形成する α -チューブリンが細胞間接着面に濃縮することを見出した。次に DLG の機能が、他の MAGUK ファミリーにより相補されている可能性が考えられるため、Dlg に加え MAGI-2 (membrane-associated guanylate kinase inverted)および DLG 結合分子である CASK の発現を、RNAi を用いて抑制し極性化された上皮系細胞における DLG の機能を解析する予定である。

DLG 結合タンパク質の同定

分子レベルで Dlg の機能を明らかにするため、DLG 結合タンパク質を検索した。ブタ肝臓ライセートより DLG-Affinity カラムを用いて結合タンパク質の精製を試みたところ、Dlg の PDZ 領域に ribosome receptor が結合していることを見出した。DLG と ribosome receptor は *in vitro*、*in vivo* で結合し、さらに免疫細胞化学の結果から両者の細胞内での局在が一致することが明らかとなった。ribosome receptor は細胞内におけるタンパク質の輸送に関与していることが示唆されていることから、DLG が分泌機構の調節分子として働く可能性が示唆された。次に Taq 付加 DLG タンパク質の強制発現系及び質量分析法を用いて DLG

結合タンパク質の同定を試みたところ、転写抑制因子である Btf が DLG と結合することが判明した。Dlg が Btf と結合して転写調節に関与している可能性もあると考えられる。

まとめ

今回、Dlg ノックアウトマウスにおいて NK lymphoma、ploid hydradenoma の形成が観察され、癌抑制遺伝子としての Dlg の機能が示唆された。癌化を引き起こすシグナル伝達系路の異常はまだ十分明らかでないが Dlg 欠損による皮膚組織における増殖能の増加が関与していることが示唆された。また毛の形成に Dlg が関わっていることが明らかとなり Dlg は癌抑制遺伝子としてだけでなく形態形成に重要なシグナル分子であることが示唆された。また DLG 結合タンパク質として同定された ribosome receptor および Btf との相互作用を明らかにすることにより Dlg を中心としたシグナル伝達系および機能が明確になることと期待される。