

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目

**Proteins binding with a novel tumor suppressor TSLC1: Their identification and analysis of their role in tumor suppression**

新規がん抑制蛋白質 TSLC1 と結合する分子群の同定とその腫瘍抑制における役割の解明

指導教官：澁谷 正史 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名： 八下田 美佳

---

### 【序論】

新規癌抑制遺伝子 *TSLC1* は肺非小細胞癌(NSCLC)細胞株 A549 を用いたヌードマウスの腫瘍原性抑制活性を指標とした機能的相補法により同定された。*TSLC1* の片アレルの欠失変異ともう一方のアレルのプロモーター領域のメチル化による 2 ヒット不活性化が 40%の NSCLC、20-30%の肝臓癌、膵臓癌等で認められている。*TSLC1* は細胞外に 3 つの免疫グロブリン様 C2 ドメインを持つ膜貫通型糖蛋白質であり、細胞接着分子として機能することがすでに示されている。一方 47 アミノ酸から成る細胞内ドメインは、肺がんの手術材料で欠失変異が認められたことから腫瘍抑制に重要な機能を果たしていると考えられる。*TSLC1* の細胞内ドメインは、glycophorin C、ショウジョウバエの neurexin IV に高い相同性があるが、いずれの蛋白質も protein 4.1 群への結合モチーフを持つ。Protein 4.1 群は FERM ドメインとスペクトリン-アクチン結合ドメインを介して膜蛋白質とアクチン細胞骨格とを架橋する細胞の裏打ち蛋白質として機能することが知られている。膜蛋白質 glycophorin C は protein 4.1 に結合し赤血球膜の形態維持に働き、neurexin IV は protein 4.1 のショウジョウバエ相同体である Coracle に結合し、細胞接着維持に重要な機能を果たすことが示

されている。TSLC1 も Protein 4.1 群との結合が推定されるが、特に Protein 4.1 群の DAL-1/4.1B は、TSLC1 と同様に肺癌での発現低下を指標に癌抑制遺伝子の候補として単離された因子であり、肺癌以外に 60%の髄膜腫で発現の減少が報告されていることから、TSLC1, DAL-1 という 2つの癌抑制蛋白質の結合と腫瘍抑制における役割について検討した。

さらに glycophorin C は protein 4.1 の他に、PDZ 結合領域を介して膜結合型グアニル酸キナーゼ相同体 (MAGuK) ファミリーの一つである MPP / p55 とも結合し、三量体を形成する。MAGuK ファミリー分子は、Dlg-like、ZO-1-like、Lin-2-like、MPP-like MAGuK の 4 つのサブファミリーで構成されるが、いずれも PDZ, SH3, 非触媒的グアニル酸キナーゼ (GuK) の 3 ドメインを有しており、複合体形成の足場(scaffold)分子としての機能が示唆されている。神経細胞では neurexin が protein 4.1N と Lin-2-like MAGuK である CASK と、上皮細胞では Syndecan-2 が protein 4.1 と CASK と三量体を形成することがすでに報告されている。これらの膜蛋白質および TSLC1 には、Lin-2-like、MPP-like MAGuK が持つ classII PDZ ドメインに結合するモチーフ ; X- $\phi$ -X- $\phi$  (X:任意のアミノ酸,  $\phi$ :疎水性アミノ酸) が存在する。そこで次に TSLC1, DAL-1 複合体とこれらの MAGuK 蛋白質との結合について解析を行った。このような TSLC1 の細胞内領域に形成される複合体およびその機能の解析が TSLC1 を介した腫瘍抑制経路の解明につながると考えられる。

#### 【結果および考察】

##### 1) 二つの肺がん抑制因子 : TSLC1 と DAL-1 の複合体形成と腫瘍抑制における機能

TSLC1 の細胞内領域には、10 アミノ酸からなる protein 4.1 群結合モチーフが存在することから、TSLC1 と protein 4.1 群の一種である DAL-1 との結合について解析を行った。HEK293 細胞に V5 tag を付加した DAL-1 を導入し、抗 TSLC1 抗体で免疫沈降を行った。抗 V5 抗体でウエスタンブロットを行うことにより共沈した DAL-1 が検出され、*in vivo* で TSLC1 と DAL-1 が結合することが明らかになった。次に様々な欠失変異を持つ TSLC1 の細胞内領域を GST との融合蛋白質として大腸菌内で発現させ、*in vitro* で合成した DAL-1 蛋白質との結合を調べた。細胞内領域の全長および PDZ 結合領域に欠失のある GST 融合蛋白質は DAL-1 に結合するのに対して、protein 4.1 結合領域に欠失のあるそれでは DAL-1 に結合は見られず、TSLC1 は protein 4.1 結合モチーフを介して DAL-1 に結合することが示された。

また TSLC1 と DAL-1 の細胞内局在を免疫染色法により解析した。V5 tag を付加した DAL-1 を導入した HEK293 細胞を、抗 TSLC1 抗体、抗 V5 抗体およびアクチン結合性のファロイジンで

3重染色し共焦点顕微鏡による観察を行った。飽和密度状態では TSLC1, DAL-1 はアクチンと同様に細胞の接着面に共局在し、ハチの巣状の染色パターンを示した。一方、細胞密度が低い細胞接着の初期の状態では、アクチンは細胞の接着面を含む辺縁部全体に局在したが、TSLC1 と DAL-1 は接着面に強く共局在した。以上の結果と DAL-1 の機能から考えて TSLC1 は DAL-1 を介してアクチン細胞骨格に結合すると推測されるが、この仮説を証明するために、上記の細胞をアクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D で処理し同様の染色を行った。飽和密度状態にある細胞はサイトカラシン D の処理によって局所的にアクチン骨格が崩壊し細胞どうしの接着が失われたが、それらの部位では TSLC1, DAL-1 とも消失しており、未だ接着が残っている部位では TSLC1, DAL-1 とも共局在することから TSLC1 と DAL-1 の共局在はアクチン骨格依存的であることが示唆された。さらに細胞骨格との関連を調べるために DAL-1 を導入した神経膠腫細胞株 U251 を、タンパクキナーゼ C の活性化剤であるホルボールエステル(TPA)で処理し同様の染色を行った。TPA で処理しない場合には TSLC1, DAL-1 とも細胞の辺縁部に部分的に共局在し、アクチンは細胞全周囲への局在および細胞内でのストレスファイバーの形成が見られた。一方、TPA で処理した場合には、アクチンの再構成が誘導されストレスファイバーは消失し細胞膜のせり上がり(ruffling)が観察されたが、このとき TSLC1, DAL-1 は新しく形成された ruffling 部位に共局在した。このような動的な局在の変化から、TSLC1 と DAL-1 の複合体は細胞接着からの刺激を細胞骨格へと伝え、細胞の運動能へも影響している可能性が示唆された。このような細胞運動には Rho ファミリーGTPase が関与すること、TPA 処理による細胞膜のせり上がりは Rho および Rac の協調的な制御で起こることがすでに報告されていることから、TSLC1, DAL-1 の複合体の動的変化も Rho ファミリーGTPase によって制御されている可能性がある。

次にノーザンブロット法により *TSLC1* と *DAL-1* の発現を 12 の NSCLC 細胞株で比較した結果、*DAL-1* の発現は *TSLC1* の発現が抑制されている 6 つの細胞に加えて、他の 3 細胞株でも抑制が見られた。さらに *TSLC1* と *DAL-1* の発現が共に正常である 3 つの NSCLC 細胞株は、いずれも *in vivo* での転移能が低いという報告がある。ヌードマウスにおける脾臓から肝臓への腫瘍の転移能を調べた実験から、TSLC1 単独でも転移抑制効果はあるが、先の結果と合わせると、TSLC1 と DAL-1 は肺癌の形成、転移の抑制において相乗的に働く可能性ある。細胞接着因子で癌抑制蛋白質として機能する他の分子、E-カドヘリンやその結合蛋白質はいずれも癌の進行における変異の標的になっていることから考えても、TSLC1, DAL-1 の不活性化は肺癌の進行の標的となっていることが

示唆される。

## 2) 細胞膜直下での TSLC1, protein 4.1, MAGuK による三量体形成

TSLC1 はその C 末端部に glycophorin C と同様の PDZ 結合モチーフ (アミノ酸配列: EYFI) を持つことから、TSLC1 と MPP-like MAGuK 蛋白質の結合を GST pull down 法によって調べた。V5 tag を付加した DAL-1 および HA tag を付加した MPP 蛋白質を導入した cos-7 細胞抽出液を、TSLC1 の細胞内領域の GST 融合蛋白質と混合し結合を抗 V5 抗体、抗 HA 抗体によって検出した。その結果、MPP1, MPP2, MPP3 のいずれも TSLC1-DAL-1 複合体に結合することが示された。次に TSLC1 と MPP および DAL-1 と MPP の直接の結合を、GST pull down 法、免疫沈降法それぞれで調べたところ、TSLC1 は PDZ 結合モチーフ依存的に MPP 蛋白質と結合すること、DAL-1 も直接 MPP 蛋白質に結合することが示された。

次に HEK293 細胞におけるこれらの蛋白質の局在を、それぞれの特異抗体を用いた免疫染色によって調べた。飽和密度状態では内因性の MPP1, MPP2, MPP3, CASK は TSLC1, DAL-1 と同様に細胞の接着面に共局在し、ハチの巣状の染色パターンを示した。また細胞接着の初期の状態では、MPP2 のみが TSLC1 と DAL-1 と同じく接着面に強く共局在したことから、TSLC1-DAL-1-MPP2 複合体が細胞接着に関与する可能性が示唆された。さらにヒト大腸がん由来細胞 Caco-2 を極性状態で培養した場合には、TSLC1 および protein 4.1N (この細胞で DAL-1 に代わって発現する protein 4.1) はタイトジャンクションのマーカである ZO-1 より下のラテラル面に局在した。同様に 3 つの MPP 蛋白質、CASK もラテラル面に局在したが、MPP1, MPP3 は ZO-1 より上のアピカル面にもその局在が見られた。またこの細胞における TSLC1, 4.1N, MPP2 の結合を抗 TSLC1 抗体で免疫沈降することにより確認できたことから、細胞内における三量体形成が明らかにされた。

以上の結果から、glycophorin C や neurexin と同様に TSLC1, protein 4.1 と class II PDZ ドメインを持つ MAGuK 蛋白質は三量体を形成することが示された。さらに複合体中の各分子の機能から、その複合体は細胞接着と細胞骨格、細胞内シグナル伝達を共役する場となり腫瘍の形成および転移の抑制に関与することが示唆された。このような TSLC1 複合体を介した腫瘍抑制のメカニズムとしては細胞の接触阻害による増殖および運動の抑制が考えられるが、これらを実証するためにはさらなる研究が必要である。