

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 八下田 美佳

本研究は、がん抑制蛋白質として同定され、細胞接着因子として機能する TSLC1 による腫瘍抑制のメカニズムを明らかにするために、その細胞内ドメインに結合する分子群の同定を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. TSLC1 の細胞内ドメインは、protein 4.1 群結合モチーフを持つが、このファミリーに属する 4 分子のうち DAL-1/4.1B は、TSLC1 と同様に肺がんの抑制遺伝子の候補として単離されたことから TSLC1 と DAL-1 の結合を免疫沈降法と GST pull-down 法により検討したところ、両者は直接結合し、細胞内で複合体を形成することが示された。

2. HEK293 細胞を用いた免疫染色法により、TSLC1, DAL-1 はアクチンと同様に細胞の接着面に共局在することが示された。また DAL-1 は膜蛋白質とアクチン細胞骨格を連結する分子であることから、細胞をアクチン重合の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ところ、アクチン骨格が崩壊し細胞どうしの接着が失われた部位では TSLC1, DAL-1 はともに消失したことから、両者の共局在はアクチン細胞骨格依存的であることが示唆された。

3. 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)で処理し免疫染色を行ったところ、処理前に見られたストレスファイバーは消失し、一方で細胞膜のせり上がり(ruffling)が観察された。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とから両者の複合体はアクチン細胞骨格の再構成を伴う細胞の運動にも関与する可能性が示唆された。

4. 多くの肺非小細胞がんで TSLC1 と DAL-1 の発現抑制が見られることから、がん化と進展の標的になることが示唆される。また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ところ TSLC1 単独でも転移の抑制効果が示された。

5. TSLC1 はその C 末端部に class II PDZ 結合モチーフを持つことから、このドメインを持つ MPP-like MAGuK 蛋白質と TSLC1-DAL1 複合体との結合を GST pull down 法によって調べた結果、MPP1, MPP2, MPP3 のいずれもこの複合体に結合することが示された。同様に TSLC1 と MPPs、DAL-1 と MPPs の直接の結合も示されたことから、TSLC1-DAL-1-MPP の三者複合体の存在が示唆された。

6. HEK293 細胞を用いてそれぞれの特異抗体により免疫染色を行ったところ、飽和密度状態では内因性の MPP1, MPP2, MPP3, CASK (Lin-2-like MAGuK)は TSLC1, DAL-1 と同様に細胞の接着面に共局在するが、一方で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、TSLC1-DAL-1-MPP2 複合体が細胞接着形成に関与する可能性が示唆された。

7. ヒト大腸がん由来細胞 Caco-2 を極性状態で培養し上と同様の免疫染色を行ったところ、TSLC1 および protein 4.1N 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、同様に MPPs, 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 抗体を用いた免疫沈降法により確認できたことから、細胞内における複合体形成が示された。

8. 上皮細胞における TSLC1-protein 4.1 (DAL-1, 4.1N)-MAGuK (MPP1-3, CASK) 複合体に相当するものとして、血球細胞では glycoprotein C-4.1R-MPP1 複合体、神経細胞では Neurexins-4.1N-CASK 複合体が同定されており、細胞膜直下に形成される三量体は進化的に保存されていることが示唆された。

以上、本論文はがん抑制蛋白質 TSLC1 の細胞内ドメインに結合する分子として protein 4.1 および MAGuK 蛋白質を同定し、これらの分子が細胞接着、細胞骨格および細胞内シグナル伝達を共役すると考えられる三者複合体を形成することを明らかにした。本研究は細胞接着分子を介した腫瘍の形成や転移の抑制のメカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。