

## 論文の内容の要旨

論文題目：上皮細胞膜裏打ち蛋白質 Carom の同定と性状解析

指導教官：藤田 敏郎

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

大野 秀樹

生体において上皮細胞は腸管、腎臓などでの物質の分泌吸収作用に関与している。細胞は極性と呼ばれる方向性を有し、上皮細胞では管腔側に面した部位を頂端面、細胞同士が接着した面から頂端面の反対側までを基底側面と呼び、頂端面と基底側面という縦軸の極性が認められる。そして、頂端面と基底側面にそれぞれ異なった分子が局在するため、方向性を有する物質の分泌吸収が可能となっている。また、癌ではこの細胞極性が失われることが知られている。このように、細胞極性は生体の正常状態と病態を考える上での重要な概念といえる。

上皮細胞の基底側面には細胞間結合が発達し、この細胞極性の維持に関与している。細胞間結合部には細胞接着分子が存在し、細胞接着分子は細胞質内において細胞膜裏打ち蛋白質を介し細胞骨格と連結している。細胞膜裏打ち蛋白質の中に Membrane-associated guanylate kinases (MAGUK) 蛋白質と呼ばれる蛋白質群がある。MAGUK 蛋白質とは酵母のグアニル酸キナーゼに類似した配列を共通してもつ分子群の総称である。MAGUK 蛋白質は、グアニル酸キナーゼ領域の他に、PDZ 領域、SH3 領域または WW 領域を

もつ。これらの領域は蛋白質相互作用を介在するモジュールとして機能している。つまり、MAGUK 蛋白質は複数の分子と相互作用することにより、ある機能に関連した分子群を集積させることを可能にしている。

私は以下の研究において、タイトジャンクションに局在する MAGUK 蛋白質である membrane-associated guanylate kinase with inverted domain structure-1 (MAGI-1、または brain angiogenesis inhibitor-associated protein 1 とも呼ばれる) に結合する新規蛋白質を検索した。その結果、新規細胞膜裏打ち蛋白質 Carom を同定し、Carom がさらに MAGUK 蛋白質の一つである CASK と相互作用することを見出した。

まず、MAGI-1 と結合する新規蛋白質を同定するために、MAGI-1 をベイトとしてヒト肺 cDNA ライブラリーの酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングを行った。得られた陽性クローンの中から未知のクローンであった pPrey 10474 に関する解析を今回行った。pPrey 10474 の配列について GenBank データベースを用い検索したところ、そのアミノ酸配列は KIAA0769 と対応していた。KIAA0769 は細胞質内蛋白質と推定され、SH3 領域を 2ヶ所と、C 末端に PDZ 領域に対する結合モチーフを有していた。私はこの蛋白質を Carom と命名した。

Carom の組織分布を調べるために、ヒト組織 RNA を用いノザンブロッティングを行った。その結果心臓、脳、肝臓、膵臓、肺、腎臓などに 5.5 kb の転写産物を認めた。次に Carom の C 末端に対するポリクローナル抗体を作成し、Madine Darby canine kidney (MDCK) 細胞など各種細胞系を用いウエスタンブロッティングを行ったところ、分子量 100 kDa の蛋白質を認識した。

Carom と MAGI-1 との相互作用を検討するために、MDCK 細胞を用い免疫沈降を行ったところ、MAGI-1 は Carom により共沈された。次に Carom の MAGI-1 結合領域を決定するため、COS-7 細胞に MAGI-1 と Carom の各領域を発現させ免疫沈降を行った。その結果、Carom の PDZ 結合モチーフが MAGI-1 との相互作用に必要であることが示された。続いて MAGI-1 の Carom 結合領域を決定するために、試験管内転写翻訳により作成した <sup>35</sup>S-methionine 標識 Carom を MAGI-1 の各 PDZ 領域でプルダウンした。その結果、MAGI-1 には PDZ 領域が 6ヶ所あるが、その中の PDZ4 領域により Carom がプルダウンされた。以上より、Carom の PDZ 結合モチーフが MAGI-1 の PDZ4 に直接結合することが示された。

次に細胞間結合が成熟した状態の MDCK 細胞における Carom の局在を調べた。Carom は細胞間結合部の基底側面にみられ、E-cadherin と局在が一致し、タイトジャンクションマーカーである ZO-1 とは局在が一致しな

かった。そこで、MAGI-1 と Carom の局在を直接比較するため GFP 標識 Carom を恒常発現する MDCK 細胞を作成した。その結果 GFP-Carom は MAGI-1 と局在が一致しなかった。以上より、細胞間結合が成熟した上皮細胞では、Carom が MAGI-1 と相互作用する可能性は低いと考えた。

Carom の細胞内局在を決定する領域を同定するため、Carom の各領域を含む各種 GFP-Carom を MDCK 細胞に発現させた。C 末端領域を欠損している GFP-Carom は内在性 Carom とは異なり細胞質内に存在した。それに対し C 末端領域のみの GFP-Carom は、内在性 Carom と同様に細胞間結合部に局在した。

Carom の細胞内局在は C 末端領域によって決定されていた。そこで、成熟した細胞間結合では Carom と MAGI-1 の局在は一致しなかったことから、C 末端領域に MAGI-1 以外の蛋白質が結合し、Carom を細胞間結合部へ集積させている可能性を考えた。Carom の C 末端領域には PDZ 結合モチーフが含まれるので、細胞間結合部に存在し PDZ 領域を有する蛋白質である CASK、SAP97、Lin-7、ERBIN を Carom と結合する可能性のある分子として考えた。Carom の PDZ 領域を含む GST-Carom を用いプルダウンを行ったところ、CASK のみが結合した。同様に免疫沈降でも CASK が共沈された。

次に、CASK の Carom 結合領域について検討した。その結果は予想に反し、Carom の C 末端領域は CASK のカルモデュリンキナーゼ領域と結合し、この結合に Carom の C 末端領域の PDZ 結合モチーフは関与していなかった。以上より、CASK と MAGI-1 は Carom の C 末端の異なった領域にそれぞれ結合することが明らかとなった。

Carom における MAGI-1 と CASK の結合領域が異なることは、MAGI-1 と CASK が同時に Carom に結合し、3 者複合体を形成する可能性を示唆した。そこで、アフィニティー カラム クロマトグラフィーを行った。まず GST-Carom を吸着したビーズと GST-MAGI-1 をインキュベーションすると、GST-MAGI-1 は GST-Carom ビーズと結合した。しかし、さらに GST-CASK を加えた場合、用量依存性に GST-MAGI-1 と GST-Carom ビーズの結合が阻害され、GST-Carom ビーズには GST-CASK が結合していった。以上より、Carom に対する MAGI-1 と CASK の結合は競合的であると言えた。

成熟した細胞間結合部では Carom は MAGI-1 と局在が一致しなかった。しかし、細胞間結合が未成熟な状態では、Carom と MAGI-1 の局在が一致している可能性があった。そこでカルシウムスイッチ実験を行った。細胞間結合が成熟した状態で培地を低カルシウム状態に変えると細胞同士が離れ始めるが、この状態で GFP-Carom と MAGI-1 は局在が一致した。さらに時間が経過すると、GFP-Carom と MAGI-1 の細胞表面への集積は消失

した。続いて、細胞の培地を正常のカルシウム濃度に戻した場合、細胞同士が再び接着し始めるが、この時 GFP-Carom と MAGI-1 は再び局在が一致した。しかし、さらに時間が経過し細胞間結合が成熟した状態では、GFP-Carom と MAGI-1 の局在は一致せず、GFP-Carom と MAGI-1 が分離したことを示唆していた。

また、GFP-Carom、MAGI-1、CASK が同一部位に局在するのかという疑問があった。カルシウムスイッチ実験で内在性 CASK の局在の観察も試みたが、CASK の明瞭な像を得ることはできなかった。そこで、分裂中の細胞での GFP-Carom、MAGI-1、CASK の局在を比較した。その結果、GFP-Carom と CASK の局在が一致している状態では MAGI-1 は分離しており、この 3 者の局在が一致した像は認められなかった。

これまでの実験の際に、Carom が Triton X-100 に不溶性であることが明らかとなっていた。そこで Carom と CASK を共発現させ、可溶性の変化を検討した。CASK は単独では Triton X-100 可溶性であるが、Carom と共発現させることにより、Triton X-100 不溶性へと変化した。この結果は、Carom が CASK を Triton X-100 不溶性構造物へと結びつける作用を有することを示唆した。

本研究において、私は細胞膜裏打ち蛋白質 MAGI-1 と CASK に結合する新規蛋白質 Carom を見出した。Carom に対する MAGI-1 と CASK の結合は競合的であり、細胞間結合が未成熟な状態では Carom は MAGI-1 と局在が一致したが、Carom と CASK の局在が一致した状態では MAGI-1 が分離していることが示された。また、Carom は細胞骨格との相互作用を有することが示唆され、CASK を細胞骨格につなぐアダプター分子である可能性が考えられた。