

審査の結果の要旨

氏名 大野 秀 樹

本研究は、上皮細胞の細胞膜裏打ち蛋白質 membrane-associated guanylate kinase with inverted domain structure-1 (MAGI-1) と CASK に結合する新規細胞膜裏打ち蛋白質 Carom を同定したものであり、下記の結果を得ている。

1. タイトジャンクションに局在する細胞膜裏打ち蛋白質である MAGI-1 に結合する新規蛋白質を酵母ツーハイブリッド法により検索した。その結果、SH3 領域を 2ヶ所と、C 末端に PDZ 領域結合モチーフを有する新規蛋白質を同定し Carom と命名した。ノザンプロットティングでは心臓、脳、肝臓、膵臓、肺、腎臓などに転写産物を認めた。Carom に対するポリクローナル抗体によるウエスタンプロットティングでは、Madine Darby canine kidney (MDCK) 細胞などに分子量 100 kDa の蛋白質の発現を認めた。
2. MDCK 細胞を用いた免疫沈降では、内在性 MAGI-1 が Carom により共沈された。また、Carom と MAGI-1 のそれぞれの結合領域を免疫沈降およびプルダウンにて検討した。その結果、Carom の PDZ 結合モチーフが MAGI-1 の PDZ4 領域に結合することが示された。
3. 細胞間結合が成熟した状態の MDCK 細胞における Carom の局在を細胞染色により調べた。Carom は細胞間結合部の基底側面にみられたが、予想に反し Carom と MAGI-1 は局在が一致しなかった。また、Carom の細胞間結合部への局在には Carom の C 末端領域が必要であることが示された。
4. 細胞間結合が成熟した状態では Carom と MAGI-1 の局在は一致しなかったことから、Carom の 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

があった。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 との結合を検討した。その結果、CASK のみが Carom に結合した。次に CASK の Carom 結合領域について検討したが、予想に反し Carom の PDZ 結合モチーフを含まない C 末端領域が CASK のカルモデュリンキナーゼ領域と結合していた。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示された。

5. Carom に対する MAGI-1 と CASK の結合様式を検討した。アフィニティー カラム クロマトグラフィーを行った結果、Carom に対する MAGI-1 と CASK の結合は競合的であることが示された。

6. Carom と MAGI-1 は細胞間結合部が成熟した状態では局在が一致しなかったため、未成熟な状態での局在を検討した。カルシウムスイッチ実験を行ったところ、細胞間結合が未成熟な状態でのみ Carom と MAGI-1 は局在が一致することが示された。また細胞分裂の過程でも、Carom と MAGI-1 の局在が一致している状態が認められたが、Carom と CASK の局在が一致した状態では MAGI-1 は分離していた。以上より、細胞間結合が未成熟な状態では Carom は MAGI-1 と結合しているが、細胞間結合が成熟し Carom に CASK が結合するようになると、MAGI-1 が分離していく可能性が考えられた。

7. Carom は Triton X-100 に不溶性であった。そこで Carom と CASK を共発現させ、CASK の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。

以上、本論文は上皮細胞において新規の細胞膜裏打ち蛋白質 Carom を同定した。Carom は他の細胞膜裏打ち蛋白質と相互作用することが示され、細胞間結合部の形成、維持の解明に貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。