

博士審査の結果の要旨

氏名 関元昭

本研究では、肝細胞癌において発現が亢進している分子 ROBO1 の癌における役割を明らかにすることを目的とした。

肝臓癌は、日本人の癌死における部位別死亡率で第三位の疾患である。患者の 5 年生存率は 17% と予後の悪い癌の一種であり、早期診断法や治療法の開発が強く要望されている。近年、マイクロアレイを利用した網羅的な遺伝子発現解析によって、ROBO1 が肝細胞癌において発現亢進することが明らかになった。

ROBO1 は元来神経細胞で研究が進められていた分子である。神経発生において軸索が伸長する時に、反発因子である SLIT の受容体として機能し、細胞の運動を制御することが知られている。しかし、ROBO1 が肝細胞癌でどのような役割を果たしているのかについては未だ不明である。そこで、タンパク質間相互作用や細胞内の局在を解析することで、肝癌細胞内での ROBO1 の挙動を明らかにすることを試みた。

本研究では、まず第一に ROBO1 の細胞内領域に対する抗体を作製した。ROBO1 の C 末端、1455~1580 番目のアミノ酸を GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させた。この組み換えタンパク質を抗原としてウサギに免疫し、得られた抗血清に対して抗原による精製を行い、抗 ROBO1 ポリクローナル抗体 ROBO1-CpAb とした。siRNA を使って ROBO1 の発現を抑制した細胞を用いることにより、イムノブロットィングや免疫蛍光染色において ROBO1-CpAb が ROBO1 を特異的に認識することを証明した。

第二に、ROBO1 のタンパク質が切断される機構について検討した。ROBO1 が何らかの機構でタンパク質切断を受けることは予想されていたが、その機構は不明であった。ROBO1-CpAb を用いたイムノブロットィングや免疫蛍光染色によって ROBO1 の C 末端断片の存在が示唆されていたが、検出が安定していなかった。そこで ROBO1 の C 末端断片がタンパク質分解を受けていると仮定し、プロテアソームの阻害剤である MG132 を添加した培地で細胞を培養し、回収したタンパク質を解析した。その結果、ROBO1-CpAb を使用したイムノブロットィングによって約 120kDa のバンドを安定的に検出することができ、このバンドが ROBO1 の C 末端断片であると考えられた。続いて、PMA を添加した培地で細胞を培養し、同様にタンパク質を解析した。PMA は PKC の活性化を介して各種プロテアーゼを活性化することが知られている試薬である。イムノブロットィングの結果、0.1 μ g/ml の PMA を添加することで、約 120kDa のバンドがより強く検出された。つまり、ROBO1 のタンパク質切断が促進したと考えられる。さらに、同様にプロテアーゼ阻害剤を添加した細胞を用いてタンパク質の解析を行った結果、メタロプロテアーゼ阻害剤 GM6001 あるいは TAPI-1 を使用することで ROBO1 のタンパク質切断が抑制されることを示した。すなわち、PMA によって活性化した、ROBO1 の切断酵素は MMP ファミリーあるいは ADAM ファミリーのメタロプロテアーゼであることが示唆された。

第三に、ROBO1 の細胞内局在について検討した。ROBO1 が膜型タンパク質であるため、細

胞膜に存在することは知られていたが、細胞内領域の挙動については不明だった。ROBO1-CpAb を使用して肝細胞癌 PLC/PRF/5、HepG2、HuH7 細胞を免疫蛍光染色したところ、PLC/PRF/5 細胞では細胞膜、細胞核に加えて接着斑と考えられる局所的な染色が見られた。また、HepG2 および HuH7 細胞では細胞膜と細胞核に染色が見られた。ROBO1 が細胞核に存在することを証明するために、細胞核抽出法により細胞の分画を行い、それぞれの画分からタンパク質を抽出して解析した。免疫ブロットの結果、細胞の全画分、細胞質画分に加えて、細胞核画分から ROBO1 が検出された。このことは、膜タンパク質である ROBO1 は、その一部が細胞核へも移行する可能性があることを示唆している。

本研究で得られた知見は、肝細胞癌における ROBO1 の役割を明らかにする上での重要な手がかりである。

以上のように、本研究は、ROBO1 の切断機構の一端を明らかにし、細胞内局在から ROBO1 の細胞核への存在を示唆した。

この内容は 2 月 13 日の口頭発表および質疑応答を行い、審査員一同は本研究が博士論文として十分独創的であると判断した。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。