

[ 別紙 2 ]

審査の結果の要旨

氏名 遠藤 克枝

本研究は、p53 とクラスリンを介したエンドサイトーシスの関係を解明するため、核内で p53 がクラスリン重鎖 (Clathrin heavy chain: CHC) と結合するという報告をもとに、細胞質においても p53 が CHC と結合し、クラスリンを介したエンドサイトーシスに何らかの影響を及ぼしている可能性を明らかにすることを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. p53 欠損細胞 (H1299) に p53 を遺伝子導入し、細胞質画分と核画分のそれぞれを抗 CHC 抗体で免疫沈降し、ウェスタンブロッティングにより p53 と CHC の相互作用を解析した結果、p53 は核だけでなく、細胞質においても CHC と結合することを示した。さらに、ヒト正常線維芽細胞 TIG-7 においても同様の実験を行い、内在性の p53 と CHC が細胞質でも結合することを示した。

2. p53 の細胞内局在を細胞免疫染色法により解析した結果、p53 は細胞膜近傍にも局在し、CHC と細胞膜近傍で共局在することが示された。さらに、エンドサイトーシスを誘発する上皮増殖因子 (EGF) で細胞を処理すると、p53 はエンドサイトーシス関連タンパク質と同様に、EGF 刺激によって細胞膜近傍に集積することが示された。そして、p53 は細胞膜近傍で蛍光標識した EGF と共局在することも示された。

3. p53 を RNA 干渉法でノックダウンした時に、EGF の細胞内への取り込みが減弱し、EGF 受容体 (EGFR) 下流のシグナル伝達系の異常が見出された。さらに、p53 をノックダウンした細胞で、EGF に応答した細胞増殖が亢進していた。エンドサイトーシスがシグナルの時空間的制御やシグナルの下方制御に関与してい

ること、細胞外からの秩序立ったシグナル伝達が細胞の正常な増殖には必須であることから、p53 は EGFR のエンドサイトーシスを制御することで、細胞内へ増殖シグナルを正常に伝え、細胞の異常な増殖の抑制に寄与している可能性が示唆された。

4. p53 は EGF 刺激依存的に EGFR 複合体に結合することが示された。

5. 免疫電子顕微鏡を用いた解析により、p53 は細胞膜近傍のアクチンに局在していることが明らかになった。また、CHC もクラスリン被覆小胞以外に、細胞質でアクチンに局在していることが示された。よって、p53 は CHC と細胞膜近傍でアクチンに局在していることが示唆された。さらに、免疫細胞染色法により、p53 をノックダウンした細胞でアクチンの形態異常が観察された。そして、電子顕微鏡による解析から、p53 をノックダウンした細胞で、コントロール細胞でみられた細胞膜近傍のアクチンのメッシュ構造が消失していることが示された。アクチンの再構築は細胞運動だけでなく、エンドサイトーシスにも重要なはたらきをもつことが知られているため、p53 はアクチンに局在し、アクチンの再構築系に何らかの影響を及ぼすことでエンドサイトーシスを制御している可能性が示唆された。

本論文は以上の解析から、癌抑制に重要な役割を果たしている p53 が細胞質の特に、細胞膜近傍に局在し、クラスリンを介したエンドサイトーシスの制御に関与していることを初めて示した。p53 がクラスリンを介したエンドサイトーシスのどのステップに重要であるかについてはさらなる解析が望まれるが、本研究はこれまで知られていなかったエンドサイトーシスと癌発症の関連性の解明に大きく貢献するものと考えられる。よって、本論文は学位の授与に値する。