

論文の内容の要旨

論文題目 MELK, maternal embryonic leucine zipper kinase, involved in mammary carcinogenesis through interaction with Bcl-G, a pro-apoptotic member of Bcl-2 family (MELK (maternal embryonic leucine zipper kinase) タンパク質のアポトーシス促進因子 Bcl-G との結合を通じた乳癌の発癌への関与)

指導教員 中村 祐輔 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成15年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 林 孟磊

本研究は、近年本邦においても増加傾向にある乳癌の新規治療薬の開発およびその発症・進展のメカニズムを分子レベルで解明するために、当研究室で構築している cDNA マイクロアレイを用いた乳癌の遺伝子発現情報解析を通じて、乳癌の発生母地である正常乳管細胞に比して乳癌細胞において高頻度に発現亢進を認めるキナーゼタンパク質をコードする MELK(maternal embryonic leucine zipper kinase) 遺伝子に着目し、その機能解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. 乳癌臨床検体より抽出した mRNA を用いた半定量的 RT-PCR 法および乳癌細胞株とヒト正常臓器由来 mRNA を用いたノザン解析の結果、MELK 遺伝子はほとんどの乳癌細胞において高発現を示す一方、治療薬開発のために重要な観点で

ある正常臓器での発現は、精巣、小腸および胸腺にて若干認めるもののほとんどの臓器において認めなかった。

2. MELK 遺伝子の乳癌の細胞増殖への関与を調べるために、MELK の高発現を認める 2 種類の乳癌細胞株 (T47D および MCF7) に MELK 遺伝子特異的 small-interfering RNA (siRNA) 発現ベクターを導入し、この遺伝子の発現を特異的に抑制した結果、その発現が転写およびタンパク質レベルともに効果的に抑制され、顕著な細胞増殖抑制効果が認められた。このことより、MELK は乳癌細胞の増殖に重要な役割を果たすことが示めされた。
3. 乳癌細胞における MELK タンパク質の機能を調べるために、野生型 MELK とキナーゼ不活性型変異 MELK の組み換えタンパク質をそれぞれ乳癌細胞の細胞可溶化液とインキュベーション後、*in vitro* pull-down アッセイ法および質量分析法を行った。その結果、野生型 MELK 特異的に結合するタンパク質として、Bcl-2 ファミリーメンバーでアポトーシス促進性因子である Bcl-G_L を同定した。MELK および Bcl-G_L の発現ベクターを用いた免疫沈降法および *in vitro* 結合法により、両タンパク質の相互作用を確認し、その結合は MELK のアミノ末端 12-71 アミノ残基の領域を介することも明らかにした。さらに、免疫複合体キナーゼアッセイ法および組み換えタンパク質を用いた *in vitro* キナーゼアッセイ法により、野生型 MELK が *in vitro* において Bcl-G_L を直接リン酸化することを明らかにし、Bcl-G_L が MELK の基質である可能性を示した。
4. アポトーシス促進性因子 Bcl-G_L は、ほ乳類細胞に過剰発現することによってアポトーシス作用を促進することが知られていることから、MELK による Bcl-G_L のリン酸化がアポトーシスに与える影響を TUNEL アッセイによって調べた。野生型 MELK および Bcl-G_L を共発現した細胞では、Bcl-G_L 単独に比して TUNEL 陽性細胞の明らかな減少を示したのに対して、キナーゼ不活性型変異 MELK を導入した細胞では、陽性細胞の変化はほとんど認められなかった。以上の結果は、sub-G₁ 細胞の測定による FACS 解析においても同様の結果が認められた。これらのことより、MELK による Bcl-G_L のリン酸化が、そのアポトーシス作用を制御している

可能性が示された。

以上、本論文は、ゲノムワイドな遺伝子発現情報解析を通じて同定した乳癌特異的遺伝子 MELK がそれ自身のキナーゼ活性によるアポトーシス促進性因子 Bcl-2 のリン酸化を介して、そのアポトーシス作用を阻害することで乳癌の発症進展に重要な役割を担っていることをはじめて明らかにした。また治療を考える上で、MELK は、正常臓器での発現が極めて低いことから、MELK を標的とした抗がん剤の開発は重篤な副作用が起こる恐れが少ないことが期待される。以上より、本研究は、乳癌新規分子標的治療薬の開発および乳癌発症機構の解明に重要な貢献をなすと考えられる。