

審査の結果の要旨

氏名 村上 成文

本研究はがんの進展において重要な役割を演じていると考えられる細胞接着分子 CADM1 のシグナル伝達経路を明らかにするため、カバーガラス上に CADM1 タンパク質を固相化し、CADM1 を恒常的に発現するイヌ腎臓上皮由来細胞株 MDCK (MDCK+CADM1) を培養する系を用いて、CADM1 下流分子の働きを抑制する低分子化合物の探索を行ったものであり、以下の結果を得ている。

1. CADM1 の細胞外断片と免疫グロブリン (IgG) の Fc 領域を融合したタンパク質 (CADM1-Ecto-Fc) をカバーガラスに固相化し、そこに MDCK+CADM1 細胞を重層培養することにより、CADM1 分子のトランス・ホモ相互作用に基づく細胞形態変化を解析した。その結果、CADM1 のトランス・ホモ相互作用特異的に、アクチン骨格の再編成を伴った細胞伸長が誘導されることが示された。
2. 上記の検出系を用いて、細胞伸長を抑制する低分子阻害化合物の探索を行った結果、シグナルタンパク質である PI3K を標的とする 2 つの異なる化合物 Wortmannin および LY294002 を同定した。また、LY294002 は濃度依存かつ可逆的に細胞伸長を抑制し、CADM1 の細胞間接着能には影響しないことから、細胞伸長を誘導する CADM1 の細胞内シグナル伝達を特異的に抑制することが示された。
3. CADM1 を恒常的に発現する MDCK 細胞を用いて、伸長細胞における PI3K の活性化の検出を行った。この目的で PI3K の生成産物である PIP3 の局在を調べた結果、これらが伸長した細胞膜先端部に集積することが示された。また、PI3K の下流で働く Akt および Rac が細胞伸長に必要であることが明らかになった。
4. 細胞内領域を欠失した変異 CADM1 タンパク質は、MDCK 細胞において野生型 CADM1 と同様に細胞間接着部位に発現する一方、細胞伸長を誘導しないことが示された。
5. CADM1 の細胞内領域断片と MAGUK タンパク質群に属する MPP3 および Dlg の N 末端領域に His タグを付加した断片を用いてプルダウンアッセイを行った結果、CADM1 は MPP3 および Dlg と複合体を形成することが示された。また、これらの

タンパク質は、伸長した MDCK+CADM1 細胞において、細胞膜先端部で共局在することが示された。

6. コンフルエントに培養したヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 において、CADM1 は MPP3、Dlg に加えて PI3K の調節サブユニット p85 と細胞間接着部位で共局在することが示された。また、コンフルエント培養下の Caco-2 細胞において、抗 Dlg 抗体を用いた免疫沈降により、これらのタンパク質が複合体を形成することが示された。

以上、本論文は CADM1 を恒常的に発現するイヌ腎臓上皮由来細胞株 MDCK (MDCK+CADM1) において、CADM1 のトランス・ホモ相互作用に基づく細胞伸長を抑制する低分子化合物の探索を行い、CADM1 の下流で働くシグナルタンパク質として PI3K を同定した。本研究は、がん化において CADM1 が示す多様な役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。