

## 審査の結果の要旨

氏名 大澤 麻記

結節性硬化症は、常染色体優性遺伝形式をとる神経皮膚症候群で、多臓器にできる良性腫瘍と精神発達遅滞、てんかん、自閉症などの神経症状が特徴である。原因遺伝子である *TSC1* と *TSC2* は腫瘍抑制遺伝子で、それらは複合体を形成して **mTOR** を抑制することにより、細胞増殖、細胞成長などを制御している。

本研究では、このうち *TSC1* の機能を明らかにするため、ノックアウトマウスの腎がん細胞から樹立した *TSC1* 欠損の培養細胞株に *TSC1* を発現させた安定細胞株を作成し、これを用いて *TSC1* の機能を解析したものであり、以下のような結果を得ている。

1. 本研究で独自に樹立したマウス腎がん細胞で、*TSC1* が欠損していることにより亢進していたと思われる **mTOR** シグナル伝達系が、*TSC1* を発現させることによって抑制されていることがウェスタンブロッティングにより確認された。
2. 細胞を同数まいて経時的に細胞数をカウントし、増殖する様子を観察したところ、*TSC1* を発現させた細胞で細胞増殖は抑制されていた。**XTT** アッセイでも同様の結果が得られており、*TSC1* は細胞増殖を抑制することが示された。
3. フローサイトメトリーを用いて細胞の大きさを解析したところ、*TSC1* を発現させても細胞の大きさには変化が認められなかった。
4. 活性型の **Rho** ファミリー低分子量 **G** タンパク質の **Rac1**、**RhoA** にそれぞれ結合するビーズを用いたプルダウンアッセイでは、*TSC1* を発現させることにより **Rac1** の活性は低下し、**RhoA** の活性は変化しないことが示された。
5. *TSC1* により細胞移動が抑制されることが、スクラッチアッセイによって示された。
6. 蛍光タンパクを結合させた **phalloidin** でアクチン骨格を染色し、共焦点顕微鏡で観察したところ、細胞移動の際、先端端 (**leading edge**) でのアクチン骨格の走行方向が *TSC1* によって変化していることが示された。また *TSC1* 発現細胞では糸状仮足 (**filopodia**) や葉状仮足 (**lamellipodia**) の形成が低下していた。また、接着斑 (**focal adhesion**) の構成タンパクに対する免疫染色で、接着斑が減少していることが示された。
7. コンフルエントな単層な部分では *TSC1* を発現させた細胞において、*TSC1* 欠損細胞にはみられない、細胞の頂端側に細胞を横切るように走行する比較的整列した細いアクチン線維が出現していた。共焦点顕微鏡を用いて **Z** 方向へ連続的に解析したところ、このアクチン線維がタイトジャンクションの構成タンパクである **ZO-1** と一致する高さに存在しており、タイトジャンクションと関連したアクチン線維である可能性が示された。

8. mTOR の阻害剤である rapamycin と、RhoA のエフェクターである ROCK の阻害剤である Y27632 で細胞を処理すると、Rapamycin では細胞の頂端側のアクチン骨格に変化は認められず、Y27632 では TSC1 発現細胞でみられた細い線維は著明に減少していた。したがって、TSC1 は細胞全体の RhoA の活性には大きな変化をもたらさず、細胞の頂端側での活性を制御することにより頂端側のアクチン骨格形成に関与していると考えられた。

以上、本論文は TSC1 ノックアウトマウスの腎がん細胞に TSC1 を発現させた安定細胞株において、TSC1 は低分子量 G タンパク質の活性制御を介してアクチン骨格を制御することにより、細胞移動や細胞極性に対して機能していることを明らかにした。TSC2 に比べ TSC1 の機能はまだ不明な点が多く、特に細胞移動や細胞極性に関する機能はほとんどわかっておらず、本研究は TSC1 の機能解明に重要な貢献を成すと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。