

学位論文題名

PDZ ドメイン蛋白 AIE-75 に結合する
MCC ホモログ新規蛋白 MCC2 の同定

学位論文内容の要旨

(背景・目的)

AIE-75は自己免疫性腸症(AIE)患者血清中の自己抗体に反応する自己抗原として最近発見された75 kDaの蛋白である。この蛋白はまた大腸癌患者血清中の自己抗体に反応する抗原としても同定されている。AIE-75の詳細な機能は未だ不明であるが、3つのPDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1)ドメインを持っている。PDZドメインを持つ蛋白は受容体やイオンチャンネルといった膜蛋白と結合し、これらを頂端側の適切な表面に集積させてこれらの蛋白の機能を制御したりnNOSや κ B α といった細胞質蛋白と結合してこれらの輸送・選別の役割を果たしている。PDZドメイン蛋白の一つであるhDLGは、癌抑制蛋白であるAPCと結合し、Wnt/winglessシグナル伝達系の調節により細胞の増殖を制御することが知られている。PDZドメインに結合する蛋白はそのカルボキシル末端部にX-S/T/Y-X- Φ (Φ =疎水性アミノ酸)という共通配列を有する。また別に、ある蛋白では β -ヘアピンフィンガーを形成し、そのヘアピンの先端にこの共通配列を有している場合もある。PDZドメイン蛋白の機能の解明にはこれに結合する蛋白の同定が必須であることから、著者らはPDZドメイン蛋白AIE-75に対する結合蛋白の検索を行なった。

(方法・結果)

- 1) AIE-75に対する結合蛋白の検索を酵母two-hybrid法によるcDNAライブラリーのスクリーニングにより行なった。結合蛋白の一つは癌抑制蛋白であるMCC(以降MCC1)と高い相同性を示す703アミノ酸より成る新規蛋白であった。予測されるアミノ酸配列のカルボキシル末端部の配列はDTFLとなり、PDZドメインと結合する共通アミノ酸モチーフX-S/T-X- Φ (Φ : 疎水性アミノ酸残基)に合致した。この新規蛋白MCC2は二次構造予測の結果、この蛋白のホモログMCC1と同様にcoiled-coil構造をとると考えられた。
- 2) MCC2遺伝子の染色体上での位置をStanford G3 Radiation Hybrid Panelを用いて決定した結果、MCC2遺伝子は第19染色体p13.1に存在する染色体マーカーD19S899の近傍に存在するマーカーであるSHGC-69238より6 cRの間隔をおいて存在していた。
- 3) ノーザンプロット法の結果よりMCC2には約2.4 kbと3.5 kbの2種類のサイズの転写産物が存在することが明らかになった。3.5 kbの転写産物についてはその全長配列を決定した結果、この転写産物より翻訳されるペプチドはアミノ酸が68個しかなく、機能を持たないと考えられた。

4) MCC2の臓器別の発現を見ると心臓で最も強く、骨格筋、肺、肝臓、腎臓、小腸及び胎盤で中程度見られた。MCC2とAIE-75との結合様式を詳細に検討した結果、MCC2のカルボキシル末端がAIE-75のPDZ第1ドメインと結合することが判明した。MCC1もそのカルボキシル末端にPDZドメインに結合し得るアミノ酸配列 (ETSL) を有しているため、MCC1についてもAIE-75との結合の有無を検索したが、MCC1は全長配列及びカルボキシル末端部を含む断片の何れにもAIE-75とは結合しなかった。

5) 32系の癌細胞株についてMCC2遺伝子の発現を解析した (肺癌7系、腎癌5系、脳腫瘍6系、大腸癌5系、卵巣癌5系、前立腺癌4系) 結果ほぼすべての細胞株について、MCC2遺伝子の発現は各臓器とも正常組織における発現より低下しているか消失していた。

(考察)

AIE-75結合蛋白として同定された蛋白はMCCの新規ホモログであった。MCC1遺伝子とAPC遺伝子が共に第5染色体q21の位置に存在しているのと同様、第19染色体p13に存在するAPCL遺伝子とMCC2遺伝子の位置が非常に近接していることは非常に興味深い。

MCC1はAIE-75とは結合せず、MCC1遺伝子の発現は大腸、脳、胃、肺、肝臓、腎臓、膀胱及び心臓といった主要臓器に一様に見られている。発現臓器およびAIE-75との結合の有無よりMCC1はMCC2のそれとは各々の発現臓器において異なった機能を持つと考えられる。

MCC2に相当する第5染色体q21上のMCC1については癌抑制蛋白であるといういくつかの知見が知られている。1)一例の大腸癌において再構成された第5染色体q21断片が見い出されていること、2)大腸癌過剰発現させると細胞周期がG0/G1期からS期に移行する段階で停止したこと。これらよりMCC1と相同性を有するMCC2も腫瘍抑制因子としての機能を持つかということが問題となる。これについての直接の証明は得られていないが、前立腺癌細胞において第19染色体p13.1-13.2の領域の正常断片を導入することにより前立腺癌細胞の腫瘍原性を抑制することが示されている。第17染色体と第19染色体との間での染色体転座t(17;19)(p13;p13)は急性骨髄単球性白血病において見い出されている。また家族性甲状腺腫瘍の素因となる遺伝子が第19染色体p13.2に存在することが知られている。MCC2遺伝子の存在する第19染色体p13.1にはMCC2以外には癌抑制遺伝子候補が存在しない (癌抑制遺伝子であるAPCL及びSTK11遺伝子は第19染色体p13.3に存在する) ことから、これらの知見はMCC2が癌抑制遺伝子である可能性を示唆している。

最近VerpyらのグループはAIE-75遺伝子が、先天的な感音性難聴及び網膜色素変性症を呈する常染色体劣性遺伝疾患であるUsher症候群type 1Cの原因遺伝子であることをつきとめた。彼等はUsher症候群type 1Cの患者においてAIE-75遺伝子に変異を見い出した。さらにAIE-75の発現は内耳感覚有毛細胞の細胞質及び不動毛束で見い出されることを示した。我々は内耳細胞でのMCC1及びMCC2の発現は確認していない。しかし、coiled-coil構造をとる蛋白は細胞骨格、分子柄、分子レバー、スペーサーといった様々な機能を果たしていることが知られており、MCC1ないしはMCC2がmechano-receptorを介したシグナル伝達に関連する多分子複合体の構成分子であることも考えられる。

本研究では、これまでホモログの存在の知られていなかったMCCの新規ホモログMCC2のクローニングに成功し、その予測される二次構造、染色体上での位置、発現臓器におけるMCC1との類似点及び相違点を明らかにした。今後はMCC2による腫瘍抑制効果の直接的な証明がMCC2を発現する臓器での腫瘍形成の機

序の解明につながると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 田 中 一 馬

学 位 論 文 題 名

PDZ ドメイン蛋白 AIE-75 に結合する MCC ホモログ新規蛋白 MCC2 の同定

AIE-75は自己免疫性腸症(AIE)患者血清中の自己抗体に反応する自己抗原として発見された75 kDaの蛋白で3個のPDZドメインを有している。この蛋白は大腸癌患者血清中の自己抗体に反応する抗原としても報告されている。PDZドメインを持つ蛋白は受容体やイオンチャンネルといった膜蛋白と結合し、これらを頂端側の適切な表面に集積させてこれらの蛋白の機能を制御したりnNOSやIkBaといった細胞質蛋白と結合してこれらの輸送・選別の役割を果たしている。AIE-75蛋白の機能の解明にはこの蛋白のPDZドメインに結合する蛋白の同定が必須であることから、著者はAIE-75結合蛋白の検索を行なった。

AIE-75に対する結合蛋白の検索は、酵母内でAIE-75と未知の蛋白を結合させる酵母 two-hybrid法により行った。未知蛋白を発現させる酵母発現 cDNA ライブラリーとしてはヒト胎盤 cDNAライブラリーを用いた。単離された cDNAクローンの一つは癌抑制蛋白であるMCC (以降MCC1と表記) と高い相同性を示す703アミノ酸より成る新規蛋白をコードしていた。MCC1との高い相同性から、この遺伝子はMCC2と名付けられた。PDZドメインに結合する蛋白はそのカルボキシル末端部にX-S/T-X-Φ (Φ=疎水性アミノ酸) というコンセンサス配列を有する。MCC2もそのカルボキシル末端部にTFLという配列を持っておりコンセンサス配列と一致した。MCC2のアミノ酸配列から二次構造を予測した結果、MCC1と同様にcoiled-coil 構造をとると考えられた。

MCC2遺伝子の染色体座位をStanford G3 Radiation Hybrid Panelを用いて調べた結果、MCC2は第19染色体短腕13.1にマップされた。ノーザンブロット解析では、MCC2には約2.4 kbの転写産物の他に3.5 kbの転写産物が存在することが示された。そこで3.5

kbの転写産物の塩基配列を決定した結果、この転写産物より翻訳されるペプチドはアミノ酸が68個しかなく、機能を持たないと考えられた。MCC2の発現は心臓で最も強く、骨格筋、肺、肝臓、腎臓、小腸及び胎盤で中程度見られた。

MCC2とAIE-75との結合様式を詳細に検討した結果、MCC2のカルボキシル末端がAIE-75のPDZ第1ドメインと結合することが判明した。MCC1についてもAIE-75との結合の有無を検索したが、MCC1は全長配列及びカルボキシル末端部を含む断片の何れもAIE-75とは結合しなかった。

32系の癌細胞株（肺癌7系、腎癌5系、脳腫瘍6系、大腸癌5系、卵巣癌5系、前立腺癌4系）についてMCC2遺伝子の発現を解析した結果、ほぼすべての細胞株でMCC2遺伝子の発現は各臓器とも正常組織における発現より低下しているか消失していた。MCC1が癌抑制蛋白であるという知見、および前立腺癌・白血病・甲状腺腫瘍といった様々な腫瘍において第19染色体p13領域の欠失・転座が報告されていること等からMCC2が癌抑制遺伝子である可能性がある。

一方、AIE-75 遺伝子が先天的な感音性難聴及び網膜色素変性症を呈する常染色体劣性遺伝疾患であるUsher症候群type 1Cの原因遺伝子であり、その発現は内耳感覚有毛細胞の細胞質及び不動毛束で見い出されることが最近報告された。筆者は内耳細胞でのMCC2の発現は確認していないが、coiled-coil構造をとる蛋白は細胞骨格、分子柄、分子レバー、スペーサーといった様々な機能を果たしていることから、MCC2が音のシグナル伝達に関与している可能性もある。

公開発表では小林邦彦教授よりMCC2とAIE-75との発現臓器の相違点、MCC2とAIE-75との結合の強度、MCC2以外のAIE-75結合分子に関して質問があった。次いで田中一馬教授よりMCC2とMCC1との相違点について質問があった。また守内哲也教授よりMCC2遺伝子の発現が癌細胞株で低下する機序、*in vivo*でのMCC2 遺伝子の機能の解析に関する質問があったが、申請者はいずれも妥当な回答をした。

本研究は、癌抑制遺伝子MCCのホモログをクローニングしただけでなくこの蛋白がUsher 症候群 type 1C の原因蛋白と結合することを初めて証明した論文として高く評価され、今後の研究の発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。