

## Formin-binding Protein17 の機能と局在

### 学位論文内容の要旨

#### 緒言

Formin-binding protein 17 (FBP17)は多機能を持つ formin の proline-rich 領域に結合する分子として注目されているが、その機能は未だ不明な点が多く、現在までに acute myelogenous leukemia のキメラ遺伝子 MLL の fusion partner であるという報告があるのみである。FBP17 は C 末に Src homology 3 (SH3) domain を持っており、これを介して結合する他の poly proline を有する分子の検索が機能解明に新たな道を開くものと予想される。

最近、成長因子の受容体のシグナル分子 CIN85 の poly proline と endophilin の SH3 が結合し receptor tyrosine kinases による増幅シグナルを減少させる negative receptor signaling の系が注目を集めている。FBP17 の SH3 が endophilin の SH3 と同様に dynamin1 に結合するという事実に基づき、本研究では最初に FBP17 が CIN85 に結合し、受容体からのシグナル系に関与しているかを検討した。次いで FBP17 の特異的抗体を用いてヒト臓器とその主な疾患での FBP17 の発現様式を網羅的に解析し、FBP17 の局在からみた機能の予測を行った。

#### 対象と方法

1) FBP17 と CIN85 の局在に関する実験。FBP17 の SH3 領域(FBP17-SH3)は FBP17 cDNA を鋳型にして PCR でその部分を増幅し GST を tag として有する pGEX ベクターに挿入し作成した。Dynamin1 cDNA は human heart library を鋳型にして PCR で増幅し FLAG tag 付きベクター-pCXN2-FLAG に挿入した。FLAG-tag 付き CIN85 発現ベクター(FLAG-CIN85)および GFP tag 付き FBP17 発現ベクター(EGFP-FBP17)も用意した。HEK293T 細胞に dynamin1 もしくは CIN85 を強制発現して、cell lysate を調整し、GST 融合 CIN85-SH3 蛋白質と混合し GST pulldown assay を行った後に、抗 FLAG 抗体を用いて結合蛋白質を検出した。

ヒト血管内皮細胞に FLAG-CIN85 と EGFP-FBP17 を共発現させて、CIN85 は蛍光抗体で標識し、両者の蛍光を共焦点顕微鏡にて観察した。

2) FBP17 のヒト組織での分布。ヒト組織は手術材料および病理解剖例を使用した。Northern blotting には解剖症例から得た種々の組織から RNA を抽出し、mRNA の発現をオートラジオグラフィーで確認した。mRNA の発現が高かった小脳を digoxigenin 標識法を用いた *in situ* hybridization にて検討した。蛋白の発現は N 末の合成ペプチドを抗原として作成した抗体を用いて免疫染色により検索した。

#### 結果

- 1) GST pulldown assay の結果 FBP17 の SH3 領域は dynamin1 および CIN85 と結合することを確認した。
- 2) CIN85 を細胞に発現させると核を除いて細胞質内に一様に発現していた。また

- FBP17 単独では細胞質内に多数の細線維状構造を形成していた。FBP17 と CIN85 を共発現させると、FBP17 の局在に一致して CIN85 も細線維状に局在し、共焦点顕微鏡で両者は merge しており、CIN85 と FBP17 は細胞内でも結合していると予想された。
- 3) Northern blotting では FBP17 の mRNA は約 6 kb の位置に testis, spleen, skeletal muscle, cerebellum で強く、lung, kidney, heart, spinal cord, cerebrum に弱く検出された。
  - 4) ヒト cerebellum を対象とした *in situ* hybridization にて Purkinje cell と granule cell に FBP17 mRNA の発現を認めた。
  - 5) FBP17 のペプチド抗体は Western blotting にて 1000 倍希釈でも抗原を認識していた。
  - 6) 抗 FBP17 抗体を用いた免疫染色では、ヒト組織や細胞により各々異なる染色性が見られた。神経内分泌系細胞、リンパ球骨髄系細胞、精粗細胞、脱落膜細胞は常に強陽性を示したが、扁平上皮や繊毛上皮、横紋筋、骨軟骨細胞では陰性であった。
  - 7) 免疫染色の結果、多くの組織では腫瘍化すると FBP17 蛋白の発現の程度が亢進していた。

#### 考 察

FBP17 の構造と局在からその機能を推測することを目的として検討を行った。培養細胞では FBP17 を導入すると dynamin1 依存性の endocytosis を抑制し、tubule 構造をとることが報告されている。今回の検索で FBP17 は CIN85 に結合することが判明した。CIN85 は Cbl と結合し受容体 tyrosine kinase からの signal を抑制していることが推測されるので、FBP17 は受容体からのシグナル伝達を抑制的に調節していることが予想された。

免疫染色による蛋白の発現と局在を見ると、特殊な細胞に限局して発現していることが判明した。総括的に見ると FBP17 は neuron や neuroendocrine cell に発現しており、これらの細胞の機能発現に関与しているものと思われる。また、lymphatic tissue では常に強い発現が見られ、種々の cytokine の分泌、あるいはそれらの合成に FBP17 が何らかの役割を演じているものと考えられた。今後、FBP17 の promoter 領域に cytokine responsive element などが存在し、cytokine により発現誘導が制御されていることも調べていく必要があると思われる。

腫瘍細胞での FBP17 の発現を検討した報告は無いが、今回の検索の結果多くの腫瘍で高い発現が観察された。

#### 結 語

FBP17 は、細胞に強制発現させると SH3 を介して CIN85 に結合し、受容体からのシグナル伝達の制御に関与していることが示唆された。FBP17 はヒト組織で特異的に発現する細胞が存在し、個々の細胞で独自の機能発現に関連している蛋白と思われる。多くのヒト腫瘍では FBP17 の発現亢進が見られ、FBP17 が腫瘍化とその維持にも働いていることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎  
副 査 教 授 吉 木 敬  
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

## Formin-binding Protein17 の機能と局在

Formin-binding protein 17 (FBP17)は多機能を持つ formin の proline-rich 領域に結合する分子として注目されているが、その機能は未だ不明な点が多い。FBP17は C 末に Src homology 3 (SH3) domain を持っており、これを介して結合する他の poly proline を有する分子の検索が機能解明に新たな道を開くものと予想される。

FBP17の SH3が endophilin の SH3と同様に dynamin1に結合するという報告に基づき、本研究では最初に FBP17が CIN85に結合し、受容体からのシグナル系に参与しているかを検討した。次いで FBP17の特異的抗体を用いてヒト臓器とその主な疾患での FBP17の発現様式を網羅的に解析し、FBP17の局在からみた機能の予測を行った。

GST pulldown assay の結果 FBP17の SH3領域は dynamin1および CIN85と結合することを確認した。CIN85を細胞に発現させると核を除いて細胞質内に一様に発現していた。また FBP17単独では細胞質内に多数の細線維状構造を形成していた。FBP17と CIN85を共発現させると、FBP17の局在に一致して CIN85も細線維状に局在し、共焦点顕微鏡で両者は merge しており、CIN85と FBP17は細胞内でも結合していると予想された。Northern blotting では FBP17の mRNAは約 6 kb の位置に testis, spleen, skeletal muscle, cerebellum で強く、lung, kidney, heart, spinal cord, cerebrum に弱く検出された。ヒト cerebellum を対象とした *in situ* hybridization にて Purkinje cell と granule cell に FBP17 mRNA の発現を認めた。FBP17 のペプチド抗体は Western blotting にて 1000 倍希釈でも抗原を認識していた。抗 FBP17 抗体を用いた免疫染色では、ヒト組織や細胞により各々異なる染色性が見られた。神経内分泌系細胞、リンパ球骨髄系細胞、精粗細胞、脱落膜細胞は常に強陽性を示したが、扁平上皮や繊毛上皮、横紋筋、骨軟骨細胞では陰性であった。免疫染色の結果、多くの組織では腫瘍化すると FBP17 蛋白の発現の程度が亢進していた。

口頭発表に当たり、副査の石橋教授より、細胞による FBP17 発現の差が生ずる分子機構、強発現させた CIN85 の局在変化、CIN85 の正常細胞や組織での発現に関して、続いて副査の吉木教授より、FBP17 強発現での細胞形態や動きに関する所見、管状構造形成に関わる他の分子との関連、腫瘍発現での一貫性に関する質問があり、最後に主査の長嶋より *in vitro*

に於る所見とヒト腫瘍との相関に関する質問があった。発表者はこれらの質問に関して概ね妥当な解答を行った。

この論文は個々の組織における腫瘍化におけるシグナル伝達の解釈に貴重な示唆を与えたものと考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。