

氏 名	まえ だ まさ と 前 田 賢 人
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2332 号
学位授与の日付	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Expression level, subcellular distribution and Rho-GDI binding affinity of merlin in comparison with ezrin/radixin/moesin proteins に関する研究 (ezrin/radixin/moesin 蛋白質と比較した merlin の発現レベル, 細胞内局在, Rho-GDI に対する結合能に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 成 宮 周 教授 西 川 伸 一 教授 今 村 正 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

神経線維腫症Ⅱ型の癌抑制遺伝子産物である merlin は, ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) 蛋白質 (略して ERM) と高い相同性を持つ。ERM はアクチン-細胞膜間のクロスリンカーであり, Rho によって制御されると同時に, Rho-GDP dissociation inhibitor (Rho-GDI) と結合し GDI 活性を阻害し, Rho を活性化させる機能ももつとされる。merlin は ERM との相同性から細胞骨格に関連した機能が想定されているが, 詳細は不明である。merlin の生理的な機能を探る目的で, 主に ERM との対比を通して, 以下について検討した。

1. マウス上皮 MTD-1A, ヒト上皮 HeLa, マウス線維芽細胞 Swiss 3T3, 各培養細胞内の merlin と ERM の発現量を定量的 immunoblotting により測定した。
2. MTD-1A, Swiss 3T3 を可溶画分と不溶画分に遠心分離し, 各分画の immunoblotting により ERM と merlin の可溶性を検討した。
3. merlin を MTD-1A, HeLa に強制発現させ, その局在を蛍光免疫抗体法で観察した。内在性 merlin の局在の観察のためにモノクローナル抗体を作成した。
4. merlin と Rho-GDI との *in vitro* での結合実験, さらに *in vivo* での会合を確認するために, MTD-1A を用いた免疫沈降で両者が共沈するかどうかをみた。

培養細胞内の merlin/ERM のモル比は 0.05~0.14 であった。ERM は可溶画分と不溶画分にほぼ等分に分離されるが, merlin は脱リン酸化を抑制すると殆どが不溶画分に回収された。

merlin を HeLa に強制発現させると, アピカル膜の微絨毛に濃縮するなど ERM と同じ局在で, ERM の染色が減弱することから導入された merlin が ERM と置換されていると考えられた。一方, MTD-1A では merlin はラテラル膜に濃縮し, E-cadherin と類似の染色像であった。内在性の merlin の局在も同様であった。

merlin には 3' 側の alternative splicing による 2 種類の transcript isoform があるが, *in vitro* において (merlin の N 末半分 (N-merlin) および isoform II の全長が Rho-GDI と結合したが, isoform I の全長は結合しなかった。radixin と同様に merlin も N 末側を介して Rho-GDI と直接結合することが確認され, その Kd は 0.2 $\mu$ M であった。N-merlin の Rho-GDI への結合は N-radixin と競合した。

Rho-GDI の特異抗体による免疫沈降で merlin が共沈することより, 両者は *in vivo* でも会合しうると考えられた。

merlin の存在量は ERM と比べて少量で, 生理的に単に ERM と競合的に機能するとは考え難い。merlin は, 可溶性の検討からその大部分が細胞膜あるいは細胞骨格に組み込まれていることが示唆される点, 上皮細胞において細胞-細胞間のラテラル膜に局在する点などで ERM とは異なっていた。また, merlin が radixin と同様に N 末側を介して Rho-GDI と結合することが証明され, 上皮細胞で merlin が細胞間接着部位に局在することから, merlin が Rho-GDI・Rho ファミリ

一を介して細胞間接着に関与している可能性も示唆された。merlinとERMのいくつかの相違点を明らかにしたが、一層の詳細な比較検討により、merlinに対する理解がさらに深まるものと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

神経線維腫症Ⅱ型の癌抑制遺伝子産物であるmerlinは、ERM (Ezrin/Radixi/Moesin) 蛋白質 (ERM) と高い相同性を持つが、その機能の詳細は必ずしも明らかではない。申請者は、MTD-1A (マウス乳癌由来上皮細胞)、HeLa (ヒト子宮頸癌由来上皮細胞)、Swiss 3T3 (胎生期マウス由来線維芽細胞) などの培養細胞におけるmerlinの発現量および局在、さらにmerlinのRho-GDIに対する結合能について、ERMと比較検討した。

上記細胞におけるmerlinの発現量はERMの5~14%と少ないものであった。また、merlinはHeLaでは微絨毛などERMと同じ局在を示したが、MTD-1AではERMと異なり、細胞-細胞間のラテラル膜に局在し、E-cadherin類似の染色像を呈した。

また、申請者は、merlinがERMと同様にそのN末半分でRho-GDIと*in vitro*で結合することを示し、さらに、MTD-1Aを用いたRho-GDIの免疫沈降でmerlinが共沈することから、*in vivo*でも両者が会合しうることを明らかにした。このことは、merlinがRho-GDIを介して、Rhoファミリーのシグナル伝達に関与している可能性を示すものであり、上皮細胞においてmerlinが細胞間接着部位に局在する点とあわせ、merlinが細胞間接着へ関与する可能性が示唆された。

以上の研究は、merlinの機能を解明する上で示唆に富むところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成13年2月9日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。