

氏名	シヨ 初	トウ 冬
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)	
学位記番号	医 博 第 2391 号	
学位授与の日付	平 成 13 年 5 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 内 科 系 専 攻	
学位論文題目	Cloning and characterization of LUN, a novel RING-finger protein that is highly expressed in lung and specifically binds to a palindromic sequence (パリンδροーム様 DNA 配列と特異的に結合し、肺で高度に発現される新規 RING-finger タンパク質 (LUN) の単離同定と機能解析)	
論文調査委員	(主 査) 教 授 伊 藤 嘉 明 教 授 和 田 洋 巳 教 授 上 田 國 寛	

論 文 内 容 の 要 旨

RING フィンガーは、 Zn^{2+} 結合領域を有し、ウイルスから哺乳動物まで種を超えて広く保存されているモチーフである。このモチーフは蛋白質と核酸、および蛋白質同士の相互作用、さらに E2 依存性ユビキチン化などに深く関与することが知られている。したがって、RING フィンガーをもつ蛋白質は細胞の種々の機能において重要な役割を果たしており、特に遺伝子発現の調節、細胞の癌化、ウイルス感染、胚形成、免疫グロブリン遺伝子の組み換え、DNA 修復などへの関与で注目されている。

本研究では、新しい RING フィンガー蛋白質をコードする cDNA を単離、クローニングし、その遺伝子座、遺伝子発現パターン、発現させた蛋白質の細胞内局在、ゲノム DNA との結合性から、肺癌の発生に関係する新しい癌 (抑制) 遺伝子と推定した。

I. 新規 RING フィンガー蛋白質 LUN の cDNA クローニング

RING フィンガー蛋白質ファミリーでよく保存された配列をもつプライマーを合成し、ヒト肺 mRNA を鋳型として RT-PCR を行った結果、新しい蛋白質 (LUN と命名) をコードする cDNA を見出した。その cDNA の塩基配列から、LUN は 1045 個のアミノ酸から成り、RING フィンガーモチーフ/配列特異的 DNA 結合領域、ロイシンジッパー/コイルドコイル領域、核局在化シグナル、SUMO-1 修飾部位/p53 結合/トポイソメラーゼ I 結合領域、酸性アミノ酸領域など、多彩な機能ドメインを持つことが明らかになった。

II. LUN mRNA の発現パターンと遺伝子座の決定

Northern blot 解析により LUN の mRNA が肺で特に強く発現されることを見出し、*in situ* hybridization でその発現が肺胞上皮で強いことを確認した。また FISH 法により LUN 遺伝子がヒト染色体の 9p21 にあることを明らかにした。この領域は肺小細胞癌の 86% において LOH (ヘテロ接合性の喪失) を示すことで知られている。

III. LUN 蛋白質の細胞内局在の解析

LUN₅₁₋₁₀₄₅ と EGFP (enhanced *Aequorea victoria* green fluorescent protein) の融合蛋白質を発現するベクターを構築し、HeLa 細胞に導入した後、その細胞内での局在を観察した結果、LUN が核に局在することを確認した。

IV. LUN 蛋白質の DNA 結合性の解析

大腸菌で発現させたほぼ全長の LUN 組み換え蛋白質 (LUN₅₁₋₁₀₄₅) と C 末端欠損体 (LUN₅₁₋₃₇₄) を精製し、¹²⁵I で標識した後、その DNA との結合能を DNA cellulose binding assay を用いて解析した。その結果、LUN が Zn^{2+} 依存性に二本鎖および一本鎖 DNA に対して高い結合活性をもつことを見出した。

V. LUN 蛋白質の特異的結合配列の検索

IV で見出した Zn^{2+} 依存性 DNA 結合を指標に、ヒトゲノムライブラリーをスクリーニングした結果、LUN が特異的に

結合するパリンドローム様の DNA 配列 (5'-CCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGG-3') を発見した。この DNA 配列は細胞接着分子 E-カドヘリン遺伝子上流の転写制御領域とインテグリン結合性細胞骨格蛋白質タリン遺伝子のイントロン 2 カ所に存在することが判明した。

以上、新規 RING フィンガー蛋白質 LUN について、肺での高発現、肺小細胞癌で LOH を示す遺伝子座、核への局在と高い DNA 結合活性、さらに癌の発生と転移に深く関わる蛋白性因子 (E-カドヘリンやタリン) の転写・プロセッシング制御領域への結合性の知見から、これが他の癌関連蛋白質の発現を介して癌 (特に肺癌) 抑制因子として働く可能性を推定した。

論文審査の結果の要旨

RING フィンガーをもつ蛋白質は細胞中で種々重要な機能を果たしており、特に細胞の癌化、ウイルス感染、胚形成、免疫グロブリン遺伝子の組み換え、DNA 修復などへの関与で注目されている。

本研究では、新規 RING フィンガー蛋白質 LUN を同定し、その機能の解析を行った。LUN は 1045 個のアミノ酸から成り、RING フィンガーモチーフ/配列特異的 DNA 結合領域、ロイシンジッパー/コイルドコイル領域、核局在化シグナル、SUMO-1 修飾部位/p53 結合/トポイソメラーゼ I 結合領域、酸性アミノ酸領域など、多彩な機能ドメインをもつことが明らかになった。LUN の mRNA は肺胞上皮で強く発現しており、また LUN 遺伝子座はヒト染色体の 9p21 領域と決定された。この領域は肺小細胞癌の 86% において LOH (ヘテロ接合性の喪失) を示すことで知られている。LUN 蛋白質は細胞核に局在し、Zn²⁺ 依存性に二本鎖および一本鎖 DNA に対して高い結合活性を示した。さらにヒトゲノムライブラリーをスクリーニングした結果、LUN が特異的に結合するパリンドローム様の DNA 配列 (5'-CCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGG-3') を発見した。この配列は細胞接着分子 E-カドヘリン遺伝子上流の転写制御領域とインテグリン結合性細胞骨格蛋白質タリン遺伝子のイントロン 2 カ所に存在することが判明した。

以上の結果は、新たに見いだした RING フィンガー蛋白質 LUN が他の癌関連蛋白質の発現を介して癌抑制因子として働く可能性を強く示唆しており、癌 (特に肺癌) の分子病態を考える上で寄与するところが大きい。

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 3 月 16 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。