

氏 名	あおのしんや 青野真也
学位(専攻分野)	博士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2112 号
学位授与の日付	平成 11 年 7 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	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	p 120 カテニンによるカドヘリンの機能制御の研究

論文調査委員 (主査) 教授 竹市雅俊 教授 西田栄介 教授 平野丈夫

論 文 内 容 の 要 旨

カドヘリンはホモフィリック結合型の接着分子で、そのサブタイプに特異的な細胞外領域で規定される選択的な結合は、発生における形態形成の際、重要な役割を担うと考えられている。一方、細胞内領域でカドヘリンは、 α -カテニン、 β -カテニン、p 120 など様々な分子と相互作用していることが知られ、これらの分子は、カドヘリンの接着分子としての機能制御に関わっていると考えられている。申請者はこのカドヘリンの細胞内結合分子によるカドヘリンの機能制御について研究を行った。

まず、申請者は、上皮型カドヘリン (E-カドヘリン) の接着分子としての活性を、人為的に制御できる細胞株を発見した。Colo 205 細胞株は E-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニンを発現しているにもかかわらずお互いに接着しないが、この細胞をプロテインカイネーゼの阻害剤であるスタウロスポリンを加えて数時間培養すると、細胞間接着の誘導が認められることを示している。スタウロスポリンと同時に E-カドヘリンの機能阻害抗体を加えると、この細胞間接着が誘導されないことから、この接着は E-カドヘリン依存性の細胞接着であることを示した。また、この細胞を低濃度のトリプシン存在下で培養した際にも、E-カドヘリン依存性の細胞接着が誘導されることを明らかにした。引き続き申請者は、Colo 205 細胞が以上のような接着特性を示す原因を解明する目的で、これらの接着誘導時に、E-カドヘリン、カテニンに関して起きる変化を解析している。その結果、カドヘリンと相互作用するがその機能がわかっていない分子 p 120 に関し、その脱リン酸化が、この細胞の接着の回復と相関することを明らかにした。

p 120 の脱リン酸化とカドヘリンの活性化との因果関係をより直接的に明らかにする目的で、申請者は、p 120 及びカドヘリンの変異分子を作製し、Colo 205 細胞に導入する実験を行っている。これにより、申請者はまず、アミノ末端側 346 アミノ酸を削った変異 p 120 分子に Colo 205 細胞のカドヘリンを活性化させる働きがあることを示した。この結果から、p 120 分子にはカドヘリン機能を抑制する働きがあり、アミノ末端を削った p 120 分子はその活性を失い内在性 p 120 に対して拮抗的に働いて、カドヘリンを活性化させる可能性が示唆された。申請者は、もしこの仮説が正しいなら、p 120 と結合できないカドヘリンは Colo 205 細胞の接着性を回復させるはずであると考えた。そこで、カドヘリンの細胞内領域中で p 120 が結合することが明らかになっている領域を欠失する改変カドヘリン分子を作製し Colo 205 細胞に導入する実験を行った結果、この分子により Colo 205 細胞の細胞間接着が誘導された。

以上の結果から申請者は、p 120 はカドヘリンの活性を負に制御する分子で、アミノ末端側 346 アミノ酸領域内にその制御に関与する部位があることを、本研究によりはじめて示している。また、以上の研究により、癌細胞の接着が生理学的に抑制される機構の一端がはじめて明らかにされた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

細胞と細胞が接着するという現象は、一見静的な現象のように思われる。しかし、実際の細胞間接着は極めて動的で、複雑に制御されていると考えられており、その仕組みの解明が待たれている。申請者は細胞間接着分子カドヘリンに着目し、

この分子による細胞間接着の制御について、重要な知見を得ることに成功している。

申請者は研究の出発点として、E-カドヘリンの活性を人為的に制御できる細胞株 Colo 205 を発見し、この材料の特性を最大限、利用した研究を展開した。Colo 205 細胞は E-カドヘリンとその結合分子 α -カテニン、 β -カテニンを発現しているにもかかわらず、通常の培養条件下ではお互いに接着しない。しかし、この細胞をプロテインキナーゼの阻害剤や、低濃度のトリプシンの存在下で培養すると、カドヘリン依存性の細胞接着が誘導されることを発見した。申請者は、この現象の機構を解明すべくさまざまな実験を展開するうち、カドヘリン結合分子の一つ p 120 の電気泳動度が、上記の接着誘導に伴い、変動することに気がついた。さらに、この変動は、脱リン酸化によるものであることを示唆した。p 120 は、元来、チロシン酸化酵素の標的として注目されていたが、意外にも、この変化は、セリン・スレオニン残基が関与することも示唆された。

p 120 は、これまで、カドヘリンと相互作用すること以外、その機能が分かっていなかった。申請者は、p 120 の脱リン酸化とカドヘリンの活性化との間に、なんらかの因果関係があると考え、これを直接的に検証する実験を展開した。まず、p 120 の変異分子を作製し、Colo 205 細胞に導入する実験を行っている。驚くべきことに、アミノ末端側 346 アミノ酸を削除した p 120 の変異分子は、この細胞のカドヘリンを活性化させる働きがあった。この結果に基づき、申請者は、p 120 分子にはリン酸化によってカドヘリンの機能を阻害する作用があり、アミノ末端を削った分子は、内在性の p 120 に対してドミナントネガティブに効いて、本来の活性を除去するというモデルを提唱している。申請者は、このモデルが正しければ、すなわち、Colo 205 細胞においても p 120 がカドヘリンの負の制御因子として機能しているなら、p 120 と結合できないカドヘリンは Colo 205 細胞内でも機能できると推論した。このアイデアをテストするため、カドヘリンの p 120 結合領域を欠失する改変分子を作製し、Colo 205 細胞に導入する実験を行った。その結果、予想通り、Colo 205 細胞の細胞間接着が誘導された。この結果は、上のモデルを決定的に支持するものである。以上の研究における、p 120 及びカドヘリンの変異分子を作製し Colo 205 細胞に導入するという発想は、申請者独自のものであり、この発想がなければ p 120 の機能は解明され得なかったであろう。

p 120 に関する研究は、かつて、カドヘリンと相互作用することが報告されたのち、肝成長因子を上皮癌細胞に投与したときにチロシン残基がリン酸化されることなど、生化学的変化に関する報告はいくつもあった。しかしながら、いずれの研究も、相関現象を記載したにとどまり、p 120 の役割について、直接的に証明された例はない。そういう状況の中で申請者は、p 120 がカドヘリンの活性を負に制御する活性を持った分子であることを、初めて明らかにすることに成功した。また、複数あるカドヘリン結合分子の中で、翻訳後修飾により、カドヘリンの機能を制御する働きがあることを直接証明できたのも、これが最初であり、この分野に与える影響は計りしれない。さらに、基礎細胞生物学にとどまらず、癌細胞の転移機構の理解のためにも大きな寄与をしている。癌細胞の転移は、細胞の原発部位からの脱離によって誘発されるものであるが、本研究成果により、その仕組みの一端が明らかにされたとみなされる。

よって、申請論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められる。

なお、主論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、申請者の高い学識と研究能力を十分評価することができ、合格と認めた。