京都大学	博士（医学）	氏　名	吉原　賢
論文題目	Phosphorylation state regulates the localization of Scribble at adherens junctions and its association with E-cadherin-catenin complexes （リン酸化状態が Scribble のアドヘレンスジャンクションへの局在と E-カドヘリン-カテニン複合体との相互作用を制御する）		

（論文内容の要旨）

カドヘリンを接着分子とする細胞間接着装置アドヘレンスジャンクション(AJ)は上皮構造の形成と維持に必須である。カドヘリンはその細胞質領域でカテニンと複合体を形成しており、この複合体が更にアクチン細胞骨格と相互作用することにより AJ は強い細胞接着能を発揮している。これまでに、ショウジョウバエのがん抑制遺伝子 Scribble の哺乳動物相同分子が E-カドヘリンーカテニン複合体の安定化を介して細胞間接着の制御に関わっていると報告されているが、その詳細な機構は明らかでない。そこで本研究では、Scribble がカドヘリンによる細胞間接着を制御する分子機構を理解することを目的として、Scribble の翻訳後修飾と AJ への局在化の関係を検討した。

免疫染色の結果、マウス小腸上皮細胞において Scribble は細胞側底膜に局在すると共に AJ にも濃縮することが観察された。一方、マウス上皮細胞株 MTD-1A 細胞と EpH4 細胞のウエスタンブロットにおいて Scribble は二本のバンドとして検出された。抗 Scribble 抗体による免疫沈降物をアルカリフォスファターゼ処理すると、低分子量型のバンドのみが検出されたことから、Scribble の二本のバンドはリン酸化状態の違いを反映していることが示唆された。そこで、その原因となるリン酸化部位の同定を試みた。38 のエキソンから成るマウス Scribble 遺伝子にはエキソン 16、29、36 においてスプライシングバリアントが存在し、網羅的リン酸化部位同定解析によりエキソン 36 を欠損したスプライシングバリアント(－e36)において 1601 番目のセリンがリン酸化を受けることが報告されている。このセリンのリン酸化に注目し、－e36 およびその 1601 番目のセリンを非リン酸化型およびリン酸化型に模倣した SA 変異型および SD 変異型の発現ベクターを動物培養細胞に導入し、発現した Scribble タンパク質をウエスタンブロットによって解析した。その結果、－e36 では二本のバンドが検出されたのに対し SA 変異型、SD 変異型はそれぞれ低分子量型、高分子量型のバンドのみが検出された。従って、ウェスタンブロットにおいて検出される Scribble の高分子量型、低分子量型の二本のバンドは 1601 番目のセリンのリン酸化の有無を反映することが強く示唆された。

次に AJ と細胞側底膜に局在する Scribble のリン酸化状態の相違を検討した。MTD-1A 細胞を非イオン性界面活性剤である 1%Triton X-100 で可溶画分と不溶画分に分画してウエスタンブロットを行うと、不溶画分では低分子量型のみが検出された。MTD-1A 細胞を 1%Triton X-100 で処理して免疫染色した結果、側底膜から Scribble は抽出され AJ のみが残った。これらの結果から、AJ に存在する Scribble は 1601 番目セリンの非リン酸化型であることが示唆された。更に自作の抗 Scribble ポリクローナル抗体の一つである R3 抗体がウェスタンブロットにおいて高分子量型 Scribble を選択的に認識することが明らかになった。R3 抗体により免疫沈降された Scribble の大部分は高分子量型であったが、これをアルカリフォスファターゼ処理すると低分子量型に変わった。R3 抗体を用いて小腸組織の免疫染色を行うと、細胞側底膜のみが染色された。これらの結果から、Scribble は 1601 番目セリンのリン酸化状態により AJ と細胞側底膜への局在が制御されていることが示された。

次に、Scribble と E-カドヘリンーカテニン複合体との相互作用について、マウス L 線維芽細胞に E-カドヘリンを発現させた EL 細胞を用いて検証した。免疫染色の結果、Scribble は EL 細胞において E-カドヘリンが集積するスポット状 AJ に濃縮した。更に培地中のカルシウムイオン濃度を操作することにより AJ 形成を人為的に制御した EL 細胞では、AJ 形成時にのみ低分子量型 Scribble の結合が認められた。

以上から、Scribble は 1601 番目セリンのリン酸化により上皮細胞における細胞内局在が制御され、非リン酸化型が AJ へ局在すると共に E カドヘリンーカテニン複合体と相互作用していることが明らかになった。従って、Scribble のこのリン酸化状態がカドヘリンによる細胞間接着を制御している可能性がある。

（論文審査の結果の要旨）

ショウジョウバエの上皮細胞の極性形成に関わるタンパク質 Scribble の哺乳類ホモログは、E-カドヘリンを接着分子とする細胞間接着装置アドヘレンスジャンクション(AJ)の形成を制御することが近年報告されている。しかしその分子機構については不明な点が多い。本研究では、Scribble のリン酸化状態がマウス Scribble の AJ への局在化、および E-カドヘリン-カテニン複合体との相互作用に与える影響を解析した。その結果、マウスの多くの器官で優位に発現する Scribble のスプライシングバリアントでは 1601 番目のセリンがリン酸化されること、この部位がリン酸化されていない Scribble は上皮細胞において AJ へ局在し、リン酸化されているものは細胞側底膜に局在することが明らかとなった。さらに、このセリンが非リン酸化型の Scribble が E-カドヘリン-カテニン複合体と共沈することが明らかとなった。すなわち、特定のアミノ酸のリン酸化状態の違いによって Scribble の局在と E-カドヘリン複合体との相互作用が制御されていることが示唆された。

以上の研究は、Scribble のカドヘリンによる細胞間接着への関与において Scribble 分子内のリン酸化修飾の重要性を示したものであり、細胞生物学（細胞間接着の制御機構の解明）に寄与するところが多い。

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 23 年 5 月 30 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。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降