

氏 名	こ ばやし ゆ か 小 林 由 佳
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3202 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 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 分 子 医 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Identification of adherens junction-associated GTPase activating proteins by the fluorescence localization-based expression cloning (局在を指標とした蛍光発現クローニング法によるアドヘレンスジャンクション関連 GTP アーゼ活性促進蛋白質の同定)
論文調査委員	(主 査) 教 授 成 宮 周 教 授 宮 地 良 樹 教 授 楠 見 明 弘

論 文 内 容 の 要 旨

細胞間接着装置は、タイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション及びデスモソームと呼ばれる接着構造からなり、上皮細胞のシート構造形成のための機械的接着のみならず、生体内の異なるコンパートメント間における内部環境の恒常性維持の調節においても中心的な役割を担っている。これまでの研究より、これらの接着構造を構成する種々のタンパク質が同定されているが、細胞間接着を担う膜タンパク質に加えて、様々な細胞質タンパク質も細胞間接着装置に集積しており、細胞極性、タンパク質輸送、細胞増殖の制御など多様な細胞の機能への関与も示唆されている。従って、細胞間接着装置に局在するタンパク質を同定し、それらの機能を解析することは、細胞間接着装置の分子構築や制御機構を明らかにするとともに、上皮細胞における様々な細胞機能を解明する上でも重要であると考えられる。

これまで、接着装置関連因子を同定する方法として生化学的及び免疫学的手法が用いられてきたが、本研究は従来の手法に換わるものとして、局在を指標とした蛍光発現クローニング法 (fluorescence localization-based expression cloning <FL-REX> method) を採用し、改良及び検討を行った。本方法は、マウス cDNA の GFP との融合ライブラリを培養細胞に発現させ、融合タンパク質の細胞内局在を基にスクリーニングを行う方法である。本スクリーニングにより、複数の既知られているタイトジャンクション及びアドヘレンスジャンクション構成因子も得られており、細胞間接着装置に関連するタンパク質を探索する手法として適したものであると考えている。さらに、細胞間接着装置に局在する新規タンパク質として、2 つの GTP アーゼ活性促進タンパク質 (ARHGAP12、SPAL3) を同定した。ARHGAP12 及び SPAL3 は様々なマウス組織において mRNA レベルでの発現が認められた。また、各々に対する特異抗体を作製し、マウス組織での詳細な局在を検討した結果、ARHGAP12 及び SPAL3 はアドヘレンスジャンクションに濃縮して局在することが明らかとなった。近年、アドヘレンスジャンクションを含む接着装置の細胞質側に、グアニンヌクレオチド交換因子及び GTP アーゼ活性促進タンパク質が集積し、上皮細胞における細胞間接着構造の形成に関与するとの報告がなされており、本研究で得られた 2 つの GTP アーゼ活性促進タンパク質に関しても、細胞間接着装置を介して行われる上皮細胞の何らかの機能制御に関与する可能性が示唆される。

これらの結果より、FL-REX 法はタイトジャンクション及びアドヘレンスジャンクションに局在する新規タンパク質の同定を行う上で有効な手法であると言える。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

上皮細胞間接着装置を構成する新規分子を同定するために、申請者は、従来用いられてきた生化学的及び免疫学的手法に代わる方法として、局在を指標とした発現クローニング法である fluorescence localization-based retrovirus-mediated expression cloning method (FL-REX 法) の検討を行った。FL-REX 法は、cDNA ライブラリを GFP との融合タンパク質として培養細胞内で発現させ、その細胞内局在を指標にスクリーニングを行うものである。従来の FL-REX 法に改良を加え、

マウス培養上皮細胞から作製した cDNA ライブラリを用いてスクリーニングを行った結果、上皮細胞間接着装置に存在することが知られている多数の分子が同定された。さらに、細胞間接着部位に局在する新規分子として、small G protein の GAP ドメインを有する ARHGAP12 と SPAL3 が得られた。ARHGAP12, SPAL3 それぞれについて、特異抗体を作製し免疫蛍光染色法を行った結果、ARHGAP12, SPAL3 とともに様々なマウス組織において上皮細胞間接着装置に濃縮が認められ、さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いた詳細な形態学的解析からこれらがアドヘレンスジャンクションに局在することが明らかになった。このように、申請者は今回改良した FL-REX 法が、上皮細胞間接着装置の新規分子同定法として有用であることを実証した。

以上の研究は、上皮研究を推進するために重要な上皮細胞間接着構造の分子構築や機能制御機構の解明に貢献することが期待され、分子レベルで基礎医学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 20 年 1 月 18 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格とみとめられたものである。