

氏 名	ひいらぎ 格 卓 志
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2175 号
学位授与の日付	平 成 12 年 1 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	Tranglutaminase Type 1 and its Cross-linking Activity Are Concentrated at Adherens Junctions in Simple Epithelial Cells (I型トランスグルタミナーゼとその架橋形成活性は、単層上皮細胞間のアドヘレンス・ジャンクションに濃縮する)

論文調査委員 (主 査) 教 授 成 宮 周 教 授 笹 井 芳 樹 教 授 月 田 承 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

細胞間接着は生物の発生、生存に必須であり、また、細胞間コミュニケーションの場と考えられている。上皮細胞間接着の中でも、アクチン繊維に裏打ちされるアドヘレンス・ジャンクション(AJ)には、チロシンリン酸化タンパク質が濃縮していることが知られており、近年解析が進んでいる細胞-細胞外基質間接着と同様に、それらが細胞間接着の調節やシグナル伝達に重要な役割を担っていると推測されてきた。しかし、その分子的基盤は乏しく、接着を介した細胞間コミュニケーションの実体は、ほとんど解明されていない。そこで、マウス肝臓より単離した、細胞間接着構造に富んだ分画(Jun分画)を用いて、AJにおける主要なチロシンキナーゼ及びその基質を同定し、それらの細胞間接着における役割を追究する目的で、以下の実験を行った。

まず、マウス肝臓よりJun分画を単離する過程で、何らかの内在性チロシンキナーゼ活性が強く濃縮することが分かった。そこで、それらにより強くリン酸化されるタンパク質を、Jun分画より抗リン酸化チロシン抗体 immunoaffinity column を用いて回収し、主要なもののアミノ酸配列を決定した。その中に、Transglutaminase type 1 (TGase 1) が同定された。TGase は二つのタンパク質の Glu と Lys の間に共有結合を形成し架橋する酵素で、type 1 は従来、皮膚における角化形成に重要な役割を果たすことが知られていたが、皮膚以外の組織での発現や細胞間接着部位への局在は、全く報告されていなかった。マウス TGase 1 cDNA をクローニングし、Northern blot によりその発現を調べたところ、主に上皮系の組織や培養細胞での広範な発現を認めた。また、種々の培養細胞に強制発現させると、細胞間接着部位に E-Cadherin と共に局在した。

そこで、TGase 1 KO マウスの組織染色をコントロールに用い、困難とされてきた TGase 1 特異的なモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体の作成に成功した。Western blot では、予測通りの 97 kD の主要なバンドだけでなく、それ自身が他のタンパク質と共有結合していると考えられる様々な大きさのバンドを認識した。また、免疫染色でも、種々の上皮系組織や培養細胞において、主として細胞間接着部位に濃縮して存在することを確認できた。さらに、免疫電顕(徳安法)を肝臓や腎臓について行い、肝実質細胞や近位尿管上皮細胞の細胞間接着部位、特に AJ に、そして血管内皮細胞にも局在することを観察できた。

さらに、TGase 反応の二つの基質のうち、基質特異性の乏しいとされる Lys 側の基質にビオチンラベルしたものをを用い、酵素反応の結果、特異性の高い Glu 側の基質をビオチンラベルさせ、酵素反応をとらえることができるシステムを利用し、生化学的にも、内在性の TGase 活性が Jun 分画に濃縮して存在することを確認できた。また、同じ基質を、細胞培養中の培養液に入れるだけで、細胞内の内在性の酵素反応を検出し、その場所を同定できることを見だし、培養上皮細胞において、確かに TGase 活性が細胞間接着部位に局在することを証明できた。

以上より、TGase 1 が広く上皮細胞の細胞間接着部位、特に AJ に存在し、また、その部位に確かに TGase 活性が存在することが証明された。細胞間接着のダイナミックな形成にタンパク質間の共有結合を介した架橋が広く使われるという新しい概念を提唱するべく、今後機能解析を進めたい。

論文審査の結果の要旨

細胞間接着におけるシグナル伝達の分子的基盤を明らかにする目的で、マウス肝臓の接着構造に富んだ分画から、主要なチロシンリン酸化タンパク質を同定した。その中に、Transglutaminase type 1 (TGase 1) が検出された。TGase はタンパク質間に共有結合を形成する酵素で、type 1 は皮膚の角化形成に重要な役割を果たすことのみ知られていた。マウス TGase 1 cDNA をクローニングし、Northern blot により主に上皮系の組織や培養細胞での広範な発現を認めた。次に、TGase 1 特異的な抗体を作成した。Western blot では、97 kD の主要なバンドと共に、様々な大きさのバンドを認識した。免疫染色では、種々の上皮系組織や培養細胞において、主として細胞間接着部位に濃縮して存在することを確認できた。また、免疫電顕を行い、肝実質細胞や腎近位尿管上皮細胞の AJ に、そして血管内皮細胞にも局在することを観察できた。さらに、生化学的にも、TGase 活性が接着構造分画に濃縮して存在し、培養上皮細胞において細胞間接着部位に局在することも確認できた。以上より、TGase 1 が広く上皮細胞の細胞間接着部位、特に AJ に存在し、またその部位に確かに TGase 活性が存在することが証明された。

以上の研究は、transglutaminase の機能の新たな可能性を提示し、細胞間接着構造の形成にタンパク質間の共有結合を介した架橋が使われるという新しい概念を提唱する点で、細胞生物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 11 年 11 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。