

氏 名	はやし けん 林 研
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2136 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 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 分 子 医 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Immunofluorescence detection of ezrin/radixin/moesin(ERM) proteins with their carboxyl-terminal threonine phosphorylated in cultured cells and tissues: application of a novel fixation protocol using trichloroacetic acid(TCA) as a fixative

(トリクロロ酢酸を用いた蛍光抗体法のための新しい固定法の検討と、その応用による C 末スレオニン・リン酸化 ERM タンパク質の細胞・組織内局在に関する研究)

(主査)

論文調査委員 教授 井出千束 教授 塩田浩平 教授 月田承一郎

論 文 内 容 の 要 旨

ERMタンパク質(エズリン・ラディキシン・モエシン)はアクチン線維と細胞膜貫通タンパク質との間のクロスリンカーとして機能し、アクチン線維を細胞膜へ結びつけるタンパク質である。そのN末端半分の細胞膜タンパク質結合能とC末端のアクチン線維結合能は細胞質中にある状態では相互にマスクされており、リン酸化などのシグナルにより抑制がはずされると活性化され、細胞膜直下に移行して機能すると考えられている。ERMタンパク質はいくつかの部位でリン酸化による制御を受けていることが知られているが、最近の生化学的研究によりC末スレオニンのリン酸化がクロスリンカー機能を反映していることが示唆された。我々はこのことをin vivoで証明するため、C末リン酸化ERMタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体297Sを用いて蛍光抗体法で観察しようとしたが、この抗体は通常のホルムアルデヒドや有機溶媒による固定では免疫組織化学に利用できなかった。そこでこの抗体での染色に有効な固定剤を検索したところ、生化学においてタンパク質の沈殿に用いられるトリクロロ酢酸(TCA)の10%水溶液を用いることで培養細胞及び組織での染色が可能になった。

この固定法の特徴を解析するため、組織化学法と同様に固定した細胞にウェスタン・ブロッティングを適用し、各種固定剤の特徴を生化学的に検討したところ、有機溶媒は脱リン酸化酵素を不活性化できないためリン酸化を維持する能力に欠け、ホルムアルデヒドはタンパク質の化学修飾によって抗原性に影響を与えていることが示唆された。TCAは脱リン酸化酵素を効果的に不活性化するとともに、抗原性を低下させるような化学修飾を与えることもなかった。また、細胞・組織の構造に大きな傷害を与えることもなく、多くの抗体で問題なく染色が可能であった。TCA固定法はホルムアルデヒドとも有機溶媒とも異なる機構の固定作用を持つため、従来の方法で染色できない場合の新しい選択肢として一般性のある有効な方法と考えられる。

TCA固定を適用し実際に蛍光抗体法を行ったところ、ERMタンパク質全体は細胞膜直下と細胞質に分布していたが、C末リン酸化ERMタンパク質は様々な培養細胞において、また様々な組織においても細胞膜直下のみに局限していた。さらに、組織においてはリン酸化レベルの非常に低い、または高い部位が見られ、ERMタンパク質のC末リン酸化のレベルは細胞や組織の種類ごとに制御されていることが明らかになった。本研究によりERMタンパク質のC末リン酸化が、in vivoにおいてもクロスリンカーとして機能している状態を反映しているという証拠が明確に示された。

論文審査の結果の要旨

ERM蛋白質はアクチン線維と細胞膜蛋白質とのクロスリンカーとして働くが、その機能に関わると考えられるC末スレオニンのリン酸化状態を特異的に認識する抗体は、新しく開発したTCA固定法によって初めて免疫組織化学での染色が可能になった。固定した細胞のイムノブロットングで各種固定剤の特徴を生化学的に検討したところ、TCA固定は有機溶媒と異なり脱リン酸化酵素を効果的に不活性化し、ホルムアルデヒドのように化学修飾で抗原性を低下させることもなかった。また多くの抗体で染色でき、TCA固定法は新しい選択肢として一般性のある方法と考えられた。

細胞・組織で蛍光抗体法を行ったところ、ERM蛋白質は細胞膜直下と細胞質を染めたがC末リン酸化状態は膜直下のみに限られ、このリン酸化がクロスリンカー機能を反映していることがin vivoで明確に示された。組織ではリン酸化レベルに違いが見られ、リン酸化が組織ごとに制御されていることがわかった。

以上の研究は一般に通用する新しい固定法の開発により免疫組織化学の応用範囲を広げるとともに、ERM蛋白質の機能制御の分子的背景を細胞・組織レベルで明らかにしたことにより、アクチンを介した細胞制御研究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3月10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。