

論文内容の要旨

博士論文題目 The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of cell-cell adhesions
(低分子量GTP結合蛋白質Rasの標的蛋白質AF-6の細胞間接着における機能解析)

氏 名 山本 隆晴

(論文内容の要旨)

(1, 200字程度)

tight junctionやadherens junctionなどの細胞間接着装置は、上皮細胞の極性形成や発生におけるパターン形成などの様々な過程に重要な役割を果たしている。tight junctionは膜貫通型蛋白質occludinとその結合蛋白質ZO-1、ZO-2から成り、adherens junctionはcadherinとその結合蛋白質catenin類から成る。低分子量GTP結合蛋白質Rasが恒常的に活性型となると、上皮細胞は大きく形態変化を引き起こし、細胞間接着が破壊されることが知られている。しかし、Rasがどのように細胞間接着を制御しているかは未だ明らかではない。Rasの標的蛋白質として、Raf、Ral GDS、PI-3 kinaseなどが同定されている。しかし、Rasによる細胞接着や細胞骨格の制御はそれら以外の標的蛋白質によるものと考えられている。私共の研究室では、Rasの新規標的蛋白質としてAF-6 (ALL-1 fusion partner from chromosome 6)を同定している。AF-6はN末端側約200アミノ酸にRas結合領域を有する分子量約18万の蛋白質である。AF-6のほぼ中央にはPDZドメインが存在する。PDZドメインを持つ蛋白質は、PDZドメインを介して細胞間接着やシナプスなどの特定の細胞膜に濃縮することが知られている。以上のような背景を踏まえ、私はRasとAF-6の細胞間接着における機能解析を行った。

本論文では、私は、AF-6がkidney由来の培養上皮細胞であるMDCKII細胞の細胞間接着部位に特異的に濃縮していることを明らかにした。AF-6はtight junctionの構成分子であるZO-1とほぼ同じ局在を示したが、adherens junctionの構成分子であるa-cateninとは違う局在を示した。免疫電顕により、AF-6はZO-1と同様にMDCKII細胞のtight junctionに濃縮していることを明らかにした。さらに、私は、ネイティブおよびリコンビナントのAF-6がin vitroでZO-1と結合することを明らかにした。ZO-1はAF-6のRas結合領域に結合した。活性型のRasはその結合を特異的に阻害した。AF-6は、tight junctionのないRat1線維芽細胞やPC12褐色細胞腫細胞においても、細胞間接着部位に濃縮していた。Rat1細胞で活性型のRasを強制発現させると、細胞間接着が破壊され、AF-6とZO-1の細胞間接着部位への濃縮が見られなくなった。

以上の結果から、AF-6はtight junctionやcadherin依存性の細胞間接着のperipheral componentとして存在し、ZO-1と結合することによりRasの下流でこれらの細胞間接着装置の機能を制御している可能性が極めて高いと考えられる。今後、Ras-AF-6 pathwayをさらに解析することにより、Rasによる細胞間接着装置の制御機構を解明することができると考えられる。

氏 名	山本 隆晴
-----	-------

(論文審査結果の要旨)

(A 4 1枚 1, 200字程度)

原癌遺伝子として同定されたrasは、人癌でその変異が高頻度に検出される。その遺伝子産物Rasは低分子量GTP結合蛋白質であり、分子スイッチとして細胞の癌化や増殖のみならず多くの生理機能を果たしている。Rasの標的蛋白質はRafキナーゼを含めて既にいくつか同定されているが、Rasの多様な生理機能はそれらのみでは説明できない。よって、Rasの新規標的蛋白質を同定しその機能を解析することは、Rasを介した未知のシグナル伝達系を解明する上で非常に重要であると考えられる。本論文は、このような背景を踏まえRasの新規標的蛋白質の探索を行い、以下に示すような成果を得ている。

(1) Rasの新規標的蛋白質としてAF-6を同定した。この際、Rasのアフィニティカラムを用いた未知結合蛋白質の同定法を確立しており、これが本論文の特徴のひとつである。

(2) AF-6の局在を光顕および電顕レベルで解析し、AF-6が細胞間接着装置の構成蛋白質のひとつであるZO-1と局在をともし、細胞間接着部位に濃縮していることを明らかにした。現在知られているRasの標的蛋白質のうち細胞間接着部位に濃縮しているのはAF-6のみであり、これが本論文の特徴のひとつである。

(3) AF-6がZO-1と結合することを*in vitro*および*in vivo*で明らかにした。また、AF-6のRas結合部位とZO-1結合部位はかなり近位で、活性型のRasはAF-6とZO-1の結合を阻害することを明らかにした。活性型Rasの標的蛋白質に対する作用機序はRafキナーゼを含めて明らかになっていないものがほとんどである。よって、活性型RasのAF-6/ZO-1コンプレックスに対する作用機序を示唆した点が、本論文の特徴のひとつである。

本論文は、以上に得られた成果から、Ras-AF-6 pathwayがZO-1を介して細胞間接着を制御する可能性を示唆している。Rasが細胞の癌化を引き起こす際に細胞間接着を破壊する現象が認められるが、その制御機構は明らかでなかった。したがって、Rasによる細胞間接着装置の制御機構の一端を明らかにした点が、本論文の特徴のひとつである。

以上のように、本論文は、Rasを介した新たなシグナル伝達系を明らかにし、細胞の高次機能の解明に貢献したという細胞生物学上の意義のみならず、Rasによる癌化のメカニズムを解明し新薬の創製にヒントを与えるという治療医学への貢献をも認められる。

したがって、本論文は博士(バイオサイエンス)の学位論文として十分に価値あるものと認める。