

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
辻 雄一郎	主査 教授 竹 中 洋 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 勝 健 一 副査 教授 古 谷 榮 助 副査 教授 玉 井 浩
主論文題名 Differential-expression and tyrosine-phosphorylation profiles of caveolin isoforms in human T cell leukemia cell lines (ヒト T 細胞白血病細胞株におけるカベオリンアイソフォームの同定とチロシンリン酸化について)	
学位論文内容の要旨	
<p>(研究目的)</p> <p>カベオラ(caveolae)はほとんどすべての細胞の形質膜上に認められるフラスコ状の窪みで、細胞外に存在する LDL などの巨大分子や葉酸などの小分子の取り込みに関与すると考えられてきた。しかし近年この構造内にシグナル伝達に関わる多くのタンパク質が存在していることが明らかになり、カベオラはシグナル伝達を行う細胞膜上の特殊なドメインであると提唱されるようになっていく。カベオリンはそのカベオラの主要蛋白質で、N 末端と C 末端をともに細胞質側に向け、カベオラの表面を覆っている。現在、カベオリン1(<math>\alpha</math>と<math>\beta</math>)、2(<math>\alpha</math>と<math>\beta</math>)、3のアイソフォームが存在するとされている。カベオリン1は、細胞を定常状態に保つ機能を持つ。また、多くの癌細胞において発現が減少することから、癌抑制因子として癌の診断や治療への応用が期待されている。カベオリンの検出には、免疫組織染色あるいはポリクローナル抗体(pAb)を用いた Western blotting(WB)が多く用いられているが、臨床への応用には、高感度なアイソフォーム特異的検出法の確立が必要であった。本研究ではヒトT細胞白血病細胞株を用いて、モノクローナル抗体(mAb)によるアイソフォーム検出法を検討した。この過程でヒトT細胞白血病細胞株では、カベオリン1<math>\alpha</math>がmAbと反応せず、これがチロシンリン酸化に起因することが明らかになった。</p> <p>(方法)</p> <p>ヒトT細胞白血病細胞株のカベオリン陽性株の OKM-2T とカベオリン陰性株の MT-1 を用いて実験を行った。膜タンパク質を 1% TritonX 100 を含む溶解液で可溶化し、更に沈殿物を 60 mM octylglucoside を含む溶解液で可溶化する 2 段階の可溶化を行った。得られた上清をカベオリンに対する pAb で免疫沈降した後、各カベオリンアイソフォームに対する mAb を用いて WB で検出し、比較した。他のカベオリン陽性株の MT-2、OKM-3T、Jurkat-ida とカベオリン陰性株の Jurkat-cen を用いて 2 段階の可溶化を行い、WB で検出した。またカベオリンのチロシンリン酸化は、上清を抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降後、カベオリンに対する pAb と mAb を用いて WB で検出した。</p> <p>(結果)</p> <p>OKM-2T では、カベオリン1は mAb を用いた通常の WB では検出されないが、本法では 2 段階の可溶化により明確なバンドとして検出された。カベオリン2についてもより鮮明なバンドとして検出された。今回1)カベオリン陽性株の OKM-2T、OKM-3T、MT-2、Jurkat-Ida でカベオリン1, 2は発現してい</p>	

た。2)カベオリン陰性株の Jurkat-Cen、MT-1 でカベオリン1, 2は発現していなかった。3)カベオリン3はいずれの細胞株でも発現していなかった。4)OKM-2T ではカベオリン1 $\alpha$ はpAbで検出され、mAbでは検出されなかったが、MDCK 細胞ではカベオリン1 $\alpha$ と1 $\beta$ が検出された。5)OKM-2T の上清を抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降し、カベオリンに対するpAbでWBを行うと2本のバンドが検出されたが、カベオリン1のmAbでは検出されず、カベオリン2のmAbでは1本のバンドが検出された。

#### (考察)

2段階の可溶化を行うことにより、カベオリンのアイソフォーム別の高感度の検出が可能となった。OKM-2Tでカベオリン1 $\alpha$ がmAbで検出されないのは、抗体の反応性によるものではなく、これらの細胞株でカベオリン1 $\alpha$ がなんらかの修飾を受けmAbと反応しないと考えられた。カベオリン1は正常細胞ではチロシンリン酸化されていないが、形質転換にてSrcの基質となることから、チロシンリン酸化の可能性が示唆された。抗リン酸化チロシン抗体によるカベオリンのpAbでみられた分子量の大きいバンドはカベオリン1 $\alpha$ と一致し、カベオリン1のmAbと反応しないことから、カベオリン1 $\alpha$ のバンドと判明した。またそのほとんどがチロシンリン酸化していると推測された。分子量の小さいバンドは、mAbとの反応性からカベオリン2 $\alpha$ であることが判明した。以上の結果から、OKM-2Tではカベオリン1 $\alpha$ 、2 $\alpha$ がチロシンリン酸化していること、カベオリン1 $\beta$ 、2 $\beta$ はチロシンリン酸化していないことが明らかとなった。カベオリン1は癌抑制因子として機能しており、多くの癌細胞でその発現が減少するとされている。しかし、前立腺癌ではカベオリン1の発現が増加し、転移や予後と密接に関連していることが報告されており、この分子基盤は不明である。また、血球細胞では通常カベオリンの発現が認められていないが、ヒトT細胞白血病細胞株ではCD4、IL-2レセプター、CD54を高レベルで発現し活性化状態となり、カベオリン1、2の発現を認めていることが報告されている。ヒトT細胞白血病細胞株にて、カベオリン1 $\alpha$ 、2 $\alpha$ がチロシンリン酸化されていたことから、チロシンリン酸化が細胞の活性化や癌の転移を促進する可能性が推測される。これらの結果からカベオリンを癌の診断、予後の予測、治療など臨床応用する場合、発現低下だけでなく、そのチロシンリン酸化の評価も重要であると考えられた。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	辻 雄一郎
論文審査担当者		主 査 教授 竹 中 洋 副 査 教授 林 秀 行 副 査 教授 勝 健 一 副 査 教授 古 谷 榮 助 副 査 教授 玉 井 浩	
主論文題名 Differential-expression and tyrosine-phosphorylation profiles of caveolin isoforms in human T cell leukemia cell lines (ヒト T 細胞白血病細胞株におけるカベオリンアイソフォームの同定とチロシンリン酸化について)			
論文審査結果の要旨			
<p>申請者はヒト T 細胞白血病細胞株を用い、2段階の可溶化によりカベオリン含有成分を得て、カベオリンアイソフォームに対するモノクローナル抗体(mAb)を用いて、各アイソフォームを Western blotting 法(WB)にて検出した。またカベオリンのチロシンリン酸化は、抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降後、カベオリンに対するポリクローナル抗体(pAb)とmAbを用いて WB 法で検出し、以下のような結果を得ている。</p> <p>OKM-2Tにおいて通常の可溶化ではカベオリン1は検出されないが、2段階の可溶化を行うことにより検出された。カベオリン2においてもより鮮明に検出された。OKM-2T、OKM-3T、MT-2、Jurkat-Idaでカベオリン1, 2は検出された。Jurkat-Cen、MT-1 でカベオリン1, 2は検出されなかった。カベオリン3はいずれの細胞株でも検出されなかった。また OKM-2T では、pAbで検出されるカベオリン1<math>\alpha</math>がmAbでは検出されなかった。MDCK細胞ではカベオリン1<math>\alpha</math>と<math>\beta</math>が検出された。OKM-2T を抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降し、カベオリンに対するpAbで WB を行うと2本のバンドが検出された。以上の結果から、OKM-2T ではカベオリン1<math>\alpha</math>がなんらかの修飾を受けmAbと反応しないものと考えられた。カベオリン1は正常細胞ではチロシンリン酸化されていないが、形質転換にてSrcの基質となることから、チロシンリン酸化の可能性が考えられた。分子量の大きいバンドはカベオリン1<math>\alpha</math>と一致し、カベオリン1のmAbと反応しないことから、カベオリン1<math>\alpha</math>のバンドと判明した。分子量の小さいバンドはカベオリン1<math>\beta</math>かカベオリン2<math>\alpha</math>に対応するが、mAbとの反応性からカベオリン2<math>\alpha</math>であることが判明した。そのため OKM-2T ではカベオリン1<math>\alpha</math>、2<math>\alpha</math>がチロシンリン酸化されていること、カベオリン1<math>\beta</math>、2<math>\beta</math>はチロシンリン酸化されていないことが明らかとなった。</p> <p>血球細胞では通常カベオリンの発現が認められていないが、ヒトT細胞白血病細胞株ではカベオリン1、2の発現を認めている。このことは前立腺癌にてカベオリン1の発現が増加し、転移などの悪性度を高めることと類似しており、両者が同様の分子基盤をもつ可能性が高い。ヒトT細胞白血病細胞株にて、カベオリン1<math>\alpha</math>、2<math>\alpha</math>がチロシンリン酸化されていたことから、チロシンリン酸化が細胞の活性化や癌の転移などを誘導する可能性が示唆される。</p> <p>本研究により、より鋭敏なカベオリンアイソフォームの検出法を確立した。またカベオリン1<math>\alpha</math>とカベオリン2<math>\alpha</math>がチロシンリン酸化されていることが示された。頭頸部癌においても、カベオリンの減少と増加が報告されており、本研究で得られた成果は頭頸部癌の診断、治療、予後判定にも寄与できる可能性が高いと考えられる。</p>			

以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

主論文公表誌

Internatinal Journal of Molecular Medicine 16(5): 889-893, 2005