



Title	Morphological and Biochemical Analyses of Contractile Proteins (Actin, Myosin, Caldesmon and Tropomyosin) in Normal and Transformed Cells
Author(s)	田中, 潤也
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38473">https://hdl.handle.net/11094/38473</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	田中潤也
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第10999号
学位授与年月日	平成5年12月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Morphological and Biochemical Analyses of Contractile Proteins (Actin, Myosin, Caldesmon and Tropomyosin) in Normal and Transformed Cells 正常及び形質転換細胞に存在する収縮系蛋白質の形態学的・生化学的分析 (主査) 教授 祖父江憲治
論文審査委員	(副査) 教授 志賀健 教授 米田 悅啓

### 論文内容の要旨

#### [目的]

正常の線維芽細胞をラウス肉腫ウイルス (RSV) で形質転換した悪性細胞は、培養線維芽細胞で通常見られる接着斑が消失し、より運動性が高くかつ不安定な接着性を示す動的接着部を形成する。本研究においてはアクトミオシン系蛋白質の細胞内局在を形態学的に検討し、更にこれらの蛋白質に形質転換に伴う何らかの発現変化が生じているかどうかを明らかにするために生化学的検討も行う。特に、動的接着部の運動性の細胞生物学的な解明を進めることを目的とする。

#### [方法ならびに成績]

ラット線維芽細胞の樹立細胞株 (3Y1) とこれを RSV で形質転換した細胞株 (BY1) を対象として、細胞の収縮要素を構成するミオシン、カルデスモン、トロポミオシンに対する特異抗体を用いた間接蛍光抗体法による形態学的研究、及び形質転換とともに各蛋白質の発現変化に関する生化学的研究を行った。細胞内のアクチンフィラメントの分布はローダミン標識ファロイジンを用いて検出し、これらの収縮系蛋白質が形質転換とともにどのような局在変化を示すかについて、特に細胞-基質間接着構造に着目して検討を進めた。また、各蛋白質間の相互作用を *in situ* で検討するために、背側の細胞膜を除去した細胞を作成し細胞を基質に接着したまま各蛋白質の抽出条件を比較した。さらに、形質転換とともに各蛋白質のアイソフォームの発現変化を解析するために2次元電気泳動を行った。

正常線維芽細胞では、収縮系蛋白質はおもにストレスファイバー上に分布していた。纖維芽細胞の主たる基質接着構造であり、ストレスファイバーの起始点でもある接着斑にはミオシン・カルデスモン・トロポミオシンは存在せず、接着斑は運動性に乏しい接着構造であることを示している。一方、形質転換細胞では収縮系蛋白質は運動性の高い動的接着部と呼ばれる基質接着構造に著明に集積していることが明らかになった。これは動的接着部の活発な運動性の物質的基盤がミオシン ATPase 活性にあることを示している。動的接着部における各蛋白質の局在を詳細に検討した結果、ミオシン・トロポミオシンはアクトininフィラメント束の周囲にリング状に分布しているのに対し、カルデス

モンは主にアクチンフィラメント束と一致して分布することが明らかになった。これは、正常纖維芽細胞のストレスファイバー上において各蛋白質が一致した分布を示したのとは対照的であった。また、低張な緩衝液中で背側の細胞膜を除去し、ストレスファイバーと動的接着部のアクチンフィラメント束の安定性を比較した。その結果、ストレスファイバーでは各蛋白質間の結合が強く各要素を容易には抽出できること、それに対し動的接着部ではミオシン・トロポミオシンが簡単に遊離し、カルデスモンのみがアクチンフィラメント束とともに残存しうることを見い出した。さらに、カルデスモンのアクチン結合性を弱める  $\text{Ca}^{2+}$  /カルモデュリン処理を行うとストレスファイバーでは何らの変化も見られなかったのに対し、動的接着部ではカルデスモンが遊離してきた。このような結果は動的接着部のアクチン系細胞骨格の構築がストレスファイバーに比べ明らかに不安定であることを示している。2次元電気泳動法によって各蛋白質のアイソフォームを検討したところ、 $\beta$ -、 $\gamma$ -アクチンが正常・形質転換細胞とともに観察され両者の発現量の割合の変化などは観察されなかった。カルデスモンでは正常・形質転換細胞ともに8個のアイソフォームが観察されたが、著明な発現変化は見い出せなかった。それに対し、トロポミオシンでは従来から報告されているように、形質転換細胞で発現する主な分子種が低分子型に変化していた。

#### [総括]

動的接着部の活発な運動性は癌の転移浸潤機構と関連して重要視されてきたが、今回の研究によりその運動性をもたらす物質的基盤がアクトミオシン系の蛋白質にあることが明らかになった。また、正常細胞のストレスファイバーに比べ、動的接着部のアクチンフィラメント束は構成蛋白質間の相互作用が弱く、より不安定な構造であることが示唆された。動的接着部においてはカルデスモンの分布がミオシン・トロポミオシンと解離しており、カルデスモンがアクチンファラメントの束形成などアクトミオシン系の活性調節以外にも何らかの機能を果たしている可能性がある。また、RSVによる形質転換細胞では発現するトロポミオシンの分子種がより低分子型のものに変化していたが、蛋白質発現レベルの変化が生じないホルボールエステル処理細胞においてもRSV感染細胞と同様の局在変化がみられた。これは、収縮系要素の局在変化にトロポミオシンの量的・質的变化は必ずしも必須ではないことを示している。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、正常の線維芽細胞とこれをラウス肉腫ウイルスで形質転換した細胞を対象にアクトミオシン系蛋白質(アクチン・ミオシン・カルデスモン・トロポミオシン)の細胞内局在を、特に細胞基質間接着構造に着目して詳細に検討したものである。線維芽細胞の接着構造である接着斑にはミオシン・カルデスモン・トロポミオシンは局在せず、接着斑の運動性欠如がアクトミオシン系の主要な蛋白質の欠如に対応していることを示した。形質転換細胞にはポドソームと呼ばれる活発に運動する細胞基質間接着構造が多数出現するが、この構造にはアクチンフィラメントのほかに、ミオシン・カルデスモン・トロポミオシンも集積しておりポドソームの活発な運動性の物質的基盤がアクトミオシン系の蛋白質にあることを示した。

本研究は、特に動的な細胞接着構造の運動性の物質的基盤を明らかにした点で細胞生物学の進歩に寄与したと考えられる。したがって本研究は学位に値するものと認める。