The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	MCC, a Cytoplasmic Protein That Blocks Cell Cycle Progression from the G0/G1 to S Phase
Author(s)	松峯, 昭彦
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/39898
rights	© the American Society for Biochemistry and Molecular Biology
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【19】

氏　　名	松　峯　昭　彦（まつ みね あき ひこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　12368　号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学　位　論　文　名	MCC, a Cytoplasmic Protein That Blocks Cell Cycle Progression from the G 0／G 1 to S Phase （MCC遺伝子産物は細胞質に局在し，G 0／G 1期からS期に至る細胞周期の進行を抑制している）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　秋山　徹 （副査） 教　授　越智　隆弘　　教　授　羽倉　明

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

MCC遺伝子（mutated in colorectal cancer）はヒトの染色体5q21よりポジショナルクローニングの手法で癌抑制遺伝子として単離され，現在まで大腸癌でその遺伝子変異が見つかっている。MCC遺伝子は829アミノ酸をコードし，その遺伝子産物はcoiled－coil構造をとると考えられているユニークなタンパクであるが，細胞内での生理機能は解明されていない。本研究は，MCC遺伝子産物を同定し，その局在を知り，細胞内での生理機能を解析することを目的としている。

【方法ならびに結果】

1）MCCタンパクの同定

MCC遺伝子産物を同定するためにMCCタンパクのC末端14アミノ酸に対するラビットポリクローナル抗体を作成し，[^{35}S] メチオニンラベルしたマウスNIH3T3細胞を用いて免疫沈降実験を行うと，分子量100kDのタンパクが沈降することが認められた。このタンパクをV8プロテアーゼマッピングし，in vitro translationで作成したMCCタンパクと比較すると同様のパターンを示した。したがって，この抗体はMCCタンパクを特異的に認識していると考えた。また，[^{32}P] ラベルしたNIH3T3細胞を用いて免疫沈降実験すると100kDのバンドを認めたことからMCCタンパクはリン酸化タンパクであることが明らかとなった。

2）MCCタンパクの細胞内局在

MCCタンパクの細胞内局在を知るためにマウスNIH3T3細胞をホモジナイザーで破砕後細胞分画すると，MCCタンパクは主に細胞質および細胞膜画分に存在することが明らかとなった。しかもそれらは0.5MNaCl，1％NP40でも完全に可溶化しなかったことから，MCCタンパクは膜タンパクではなく，何らかの細胞内タンパクと不溶塊を形成していると考えられた。

次に，MCCタンパクの細胞内局在をより詳しく調べるために，免疫組織化学的手法を用いて正常マウスにおける小腸および小脳での発現を検討した。小腸においては，光学顕微鏡レベルで上皮細胞外側の細胞境界領域にMCCタンパクのシグナルを認め，金コロイド法を用いた免疫電顕では細胞境界領域の細胞膜近傍の細胞質にシグナルを認めた。小脳においては，MCCタンパクは光学顕微鏡レベルで分子層，プルキンエ細胞，顆粒層に発現を認め，免疫電顕では神経細胞の細胞膜あるいは細胞内小器官の膜構造物近傍に存在することがわかった。

3）細胞周期の進行に伴うＭＣＣタンパクの発現量およびリン酸化状態の変化

つぎに細胞周期の進行に伴うＭＣＣタンパクの発現量およびリン酸化状態の変化を調べた。マウスＮＩＨ３Ｔ３細胞を0.5％牛血清添加ＤＭＥＭ培地で48時間培養し細胞周期をＧ０期に同調した後，10％血清を添加し細胞増殖を誘導し一定時間ごとに細胞を回収した。ＭＣＣタンパクの発現量はウエスタンブロットで，リン酸化状態は，［^{32}P］ラベルしたのち回収した細胞を抗ＭＣＣ抗体で免疫沈降することによって検討した。ＭＣＣタンパクの発現量は細胞周期にかかわらず一定であったが，そのリン酸化状態は，Ｇ０期には非リン酸化型であったが，血清刺激後６－８時間にはリン酸化型へと変化することがわかった。

4）細胞周期の進行に対するＭＣＣタンパクの効果

ＭＣＣタンパクが細胞周期の進行を制御するのではないかと考えマイクロインジェクションの手法を用いて検討した。0.5％牛血清添加ＤＭＥＭ培地でＧ０期に同調したマウスＮＩＨ３Ｔ３細胞に，発現ベクター pME18S にサブクローニングしたＭＣＣ遺伝子をマイクロインジェクションし，血清添加に伴う細胞周期のＳ期への移行を調べた。Ｓ期へ移行した細胞はブロモデオキシウリジン（BrdU）の取り込みにより検出した。その結果ＭＣＣ遺伝子をインジェクションした細胞は BrdU の取り込みが抑制されることが明らかとなった。大腸癌で見つかる変異ＭＣＣ遺伝子（コドン506アルギニンをグルタミンに置換）やｂ－galactosidase 遺伝子をインジェクションした時にはこのようなＳ期進行の抑制は認めなかった。また，アフィディコリンでＧ１／Ｓに細胞周期を同調した細胞にＭＣＣ遺伝子をインジェクションしてもＳ期進行の抑制は認めなかった。

【総括】

大腸癌の癌抑制遺伝子として単離されたＭＣＣ遺伝子の産物は，分子量100kD のリン酸化タンパクであり，小腸上皮細胞，神経細胞で細胞の膜構造物近傍に局在し，細胞周期の進行にともなってそのリン酸化状態が変動することが明らかとなった。また，ＭＣＣタンパクの過剰発現により，Ｇ１期からＳ期への細胞周期の進行が抑制されることから，ＭＣＣタンパクは細胞周期の進行を負に制御するシグナル伝達に関与していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

ＭＣＣ（Mutated in Colorectal Cancer）遺伝子は大腸癌で突然変異の見いだされる遺伝子としてヒト染色体５q21から単離された。本研究は，ＭＣＣ遺伝子産物を同定すると同時に細胞内での局在，組織での発現などを明らかにし，さらに細胞増殖制御における役割を解明するための手がかりを得ることを目的としている。研究の結果，１）ＭＣＣ蛋白質は，分子量100kDa のリン酸化蛋白質であること，２）細胞の膜構造近傍に存在しおそらく細胞骨格と複合体を形成していること，３）腸管上皮，神経細胞，平滑筋など種々の組織で広く発現し増殖，分化に関わっている可能性があること，４）細胞周期の進行にともなってリン酸化の状態が変動すること，５）過剰発現すると細胞周期のＧ１期からＳ期への進行を阻害すること，６）大腸癌で見いだされた変異を持つＭＣＣは細胞周期制御活性が消失していることなどが明らかになった。特にＭＣＣ蛋白質が細胞周期を負に制御する活性をもつことを見いだしたことは，ＭＣＣの異常による細胞癌化の機構を理解する上で重要な知見であると考えられる。よって本研究は学位に値するものと考えられる。