

Title	Functional analysis of Tumor Suppressor Gene dlG
Author(s)	石田尾, 武文
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42493">https://hdl.handle.net/11094/42493</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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	石田 尾 武 文
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 15976 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Functional analysis of Tumor Suppressor Gene <i>dlg</i> (癌抑制遺伝子 <i>dlg</i> の機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 永井 克也  (副査) 教授 秋山 徹 (東大・分子研) 教授 岡田 雅人

#### 論文内容の要旨

##### 1) はじめに

*dlg* (*Drosophila discs-large*) 遺伝子はショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の癌抑制遺伝子の一種で、その産物はヒトの tight junction に相当する septate junction に局在する。*Dlg* 遺伝子に変異が起きて失活すると成虫原基の上皮細胞が極性を失うと同時に異常増殖を起こして癌化することや、神経細胞のシナプス構造に異常が生じることが知られている。ヒトには *Dlg* のヒトホモログ *hDlg* に加えて、シナプスに多量に存在する PSD-95/SAP90、PSD-93/Chapsyn110、SAP102 など、構造のよく似たタンパク質が存在する。これらのタンパク質はいずれもマルチドメインタンパク質で、PDZ ドメイン、SH3 ドメイン、GK ドメインを持っている。この GK ドメインを持っているという共通の構造から、MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) ファミリーと呼ばれている。これらのタンパク質は、細胞膜裏打ちタンパク質としてレセプターやイオンチャネルのクラスタリングを引き起こす活性を持ち、シナプスのタンパク質複合体の構築に重要な役割を果たす。また、シグナル伝達分子と結合してシグナルを伝えるための足場にもなることが明らかになってきており、これらの機能を通して、シナプス可塑性、増殖制御などに関与していると考えられ、注目を集めている。

本研究では、*Dlg* の生理的機能をさらに個体レベルで明らかにすることを目的として遺伝子欠損マウスを作製し機能解析を行った。

##### 2) 方法と結果

*Dlg* 遺伝子の N 末端側 20 アミノ酸にネオマイシン耐性遺伝子を結合させ、*Dlg* 遺伝子欠損マウスを作製した。ホモ欠損マウスはチアノーゼ症状を示し、出生直後に死亡した。出生直後のホモ欠損マウスは自発的な行動を示さず、心臓は鼓動しているものの呼吸は認められなかった。ホモ欠損マウスの肺の形態学的な観察により、肺泡が閉じたまま呼吸した形跡がないことが明らかになった。免疫組織化学的手法により *Dlg* が神経筋接合部に局在していることを見出したので、無呼吸の原因として神経筋接合部の構造、シグナル伝達に着目して解析を進めたが、構造的な異常や後シナプス側マーカーのアセチルコリン受容体や ErbB4 の局在の異常は認められなかった。更に、*Dlg* 欠損マウス由来の筋管に Heregulin を投与してもシグナル伝達に異常は見られなかった。

次に、*Dlg* の細胞周期制御における役割を明らかにするために *Dlg* 欠損マウス由来の胎児繊維芽細胞の性質を検討した。その結果、継代回数を増やしていくと、細胞の形態に異常が生じると同時にほとんどの細胞の細胞周期が

G1期で停止することが判明した。しかしながら細胞周期を停止した細胞にアデノウイルスベクターを用いてDlgを発現させたところ、細胞周期の進行が回復することが明らかになった。これらの実験結果から、Dlgは細胞周期の制御に重要な役割を担っていると考えられた。

生後直後のDlg遺伝子欠損マウスの表皮を観察すると、正常マウスに比べて毛包の数が少なかった。そこでDlg欠損マウスの皮膚をヌードマウスに移植したところ、毛が生えてくるものの、その数が非常に少ないことが明らかになった。皮膚のHE染色を行い構造を調べたが顕著な異常は認められなかった。

生後7カ月のDlgヘテロ欠損マウスにおいて肩に皮膚付属器官の腫瘍が形成された。また生後1年のDlgヘテロ欠損マウスにも同様の腫瘍が認められた。免疫組織化学的観察を行った結果、Dlgの発現は認められず、皮膚付属器官腫瘍マーカーであるcytokeratin AE1/AE3の発現が認められた。この結果からDlg遺伝子は*Drosophila* dlgと同様に癌抑制遺伝子として機能すると考えられた。

### 3) まとめ

今回、マウスにおいてDlgが神経筋接合部に局在することが明らかとなった。しかし、AChRやErbB4の局在に異常は見られずDlgはこれらの分子の局在には関与せず、HERのシグナル伝達系路にも関与していない可能性が示唆された。培養細胞ではG1期で細胞周期の停止を引き起こし、増殖制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。更に、Dlgの欠損により、皮膚において毛の形成に関与することが示唆され、またその付属器官の癌化を引き起こすことが明らかとなった。

今後、Dlgの神経組織における機能や細胞周期の停止、毛の形成、皮膚付属器官の癌化においてどのような因子が関与し、どのようなシグナル伝達系路が働いているかを明らかにする必要がある。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、癌抑制遺伝子dlgの機能を明らかにする目的でdlg遺伝子欠損マウスを作製し、神経筋接合部、細胞増殖、細胞周期、毛包の形成についてdlgの機能解析を行った結果を報告するものである。本研究では、1) Dlg遺伝子欠損マウスは肺の拡張が起こらず、出生後すぐにチアノーゼを起こし死亡すること、2) Dlgが神経筋接合部に局在し、ErbB4と結合する事によってその分解を阻害すること、3) ヘテロ欠損マウスにおいて、皮膚付属器官悪性腫瘍を生じ、そこでDlgの発現が無くなっていること、4) Dlg欠損マウス由来の胚性繊維芽細胞では継代を重ねると、G1 arrestを起こすことから、Dlgが細胞周期制御を行っていること、5) 毛包の形成にDlgが機能していること、などを明らかにした。以上の結果から、Dlgは発生や生命維持に関与し多彩な機能を有すること、マウスにおいても癌抑制遺伝子として機能していることが明らかとなった。このように、本研究はDlgの機能に関して重要な知見をもたらすものであり、博士(理学)の学位論文として十分価値があると認められる。