



| | |
|--------------|--|
| Title | Srcチロシンキナーゼの活性型を特異的に認識するモノクローナル抗体の開発と応用 |
| Author(s) | 川勝, 一左哲 |
| Citation | 大阪大学, 1999, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/42914 |
| 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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|---------------|---|
| 氏 名 | 川 勝 一 左 哲 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (薬 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 4 8 8 6 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 11 年 6 月 30 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 | Src チロシンキナーゼの活性型を特異的に認識するモノクローナル抗体の開発と応用 |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 那須 正夫 (副査) 教 授 前田 正和 教 授 山元 弘 教 授 田中 慶一 |

論 文 内 容 の 要 旨

Src ファミリーは現在までに 9 個のメンバーが同定されている膜結合型、非レセプタータイプのチロシンキナーゼで、細胞の増殖、分化、接着、運動、ストレスに対する応答等において細胞膜に存在する蛋白質からのシグナルを細胞内で伝達する役割を担っている。そのシグナル伝達のメカニズムとしては、標的蛋白質のチロシンリン酸化に加え、リン酸化チロシンを含む配列を認識する SH (Src homology) 2 ドメインやプロリンリッチな配列を認識する SH3 ドメインを介しての物理的相互作用が重要と考えられている。Src の酵素活性の修飾や細胞内局在の変化はこれらの相互作用によって複雑に制御されているが、不活性型と活性型の変換は、C 末端の Tyr530 のリン酸化と脱リン酸化によることが、点変異や欠失変異を用いた実験によって明らかにされている。脱リン酸化型が活性型であり、リン酸化型が不活性型である。しかしながら、実際の細胞のシグナル伝達やガン化のプロセスにおいて Src の活性化がいつ、どこでおこるかを検出することは不可能だった。

このような状況化で、我々は活性化を制御している c-Src の C 末の Tyr530 を含む領域に着目し、合成ペプチドを抗原としてモノクローナル抗体の作製を試みた。従来より細胞や組織染色に使用可能な c-Src に対する抗体は作製が困難である事が知られていたため、最初に抗原の作製方法についての検討を行った。特異的で高感度に c-Src の活性型を識別するモノクローナル抗体は、従来より長いスペーサーを持つ架橋剤を使用して、温和な条件下でペプチドをキャリアー蛋白質に結合させることにより、作製に成功した。得られた Clone28 は、生化学的な方法でも細胞組織染色でも使用可能であった。正常纖維芽細胞では活性型は細胞骨格微小管に局在した。また正常組織における活性型 Src の同定にはマウス胎児、新生児の組織切片を用いて行ったところ、中枢、末梢神経系並びに巨核芽球 (megakaryocyte、血小板の前駆細胞) のみに強い染色が認められた。Src がほとんどすべての細胞に発現していることから、この事実は Src の制御とその生理機能を考える上で非常に興味深い。

次に、我々は Clone28 を用いてガン組織標本において Src の活性化を検討した。正常細胞がガン細胞に至るには、多段階の遺伝子変化が必要と考えられている。ガン化のプロセスでいつ Src の活性化が起こっているかを検討するため、前ガン状態からガンへと連続的に変化がおこるとされるヒト大腸病理組織標本を用いた。ヒト大腸組織標本にお

いても、正常組織で染色されるのは Auerbach 神経叢のみで、マウスの結果と一致した。病理標本においては、前ガン状態と考えられるアデノーマにおいて66例中61例(92%)が陽性を示したのに対し、大腸ガンにおいては16例中4例(25%)が陽性となったのみであった。また、陽性と判定された大腸ガンはすべて初期のステージに属するのに対し、進行ガンにおいては活性型 Src は検出されなかった。これらの結果は Src の活性化が、ガン他の初期のプロセスに関与することを示唆する。今後の大腸ガンの早期診断を行う上で、他の遺伝子変化と併せて Src の活性化をも考慮することにより、より的確な診断と治療方法の開発に役立つものと思われる。

さらに、分子レベルで Src の活性化によって伝達されるシグナルを解析する為のモデル系として、estrogen 依存性を保持している乳ガン細胞株 MCF7 を用いた。生化学的実験によって、活性型 Src が C キナーゼの一つである PKC-delta と PKC 活性化に依存的に結合し、PKC-delta をチロシンリン酸化することが分かった。しかしこのリン酸化は PKC-delta のキナーゼ活性には影響を与えるなかった。PKC-delta のチロシンリン酸化の生理的な意義については今後の検討課題である。

以上の結果から、我々の開発した Clone28 により活性型 Src の新たな生理機能が明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本論文は、① Src チロシンキナーゼの活性型を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製、②大腸ガンの発生過程における Src の活性化の検討、③ Estrogen 依存性乳ガン細胞株 MCF7 における活性型 Src と PKC-delta の相互作用より構成されている。

モノクローナル抗体の作製にあたっては、活性化を制御している c-Src の C 末の Tyr530 を含む領域に着目し、合成ペプチドを抗原とした。そしてペプチドの架橋法を改良することにより、細胞組織染色に使用可能な Clone28 を開発した。次に本抗体を用いて大腸ガンの組織染色を行い、前ガン状態と考えられるアデノーマにおいて陽性率が92%であることを明らかとし、Src の活性化がガン化の初期のプロセスに関与することを示唆した。この結果は、他の遺伝子変化と併せて Src の活性化をも考慮することにより、大腸ガンの早期診断、さらには治療方法の開発に役立つものと考えられる。またさらに乳ガン細胞株を用いて、活性型 Src が C キナーゼの一つである PKC-delta と PKC 活性化に依存的に結合することを証明し、Clone28 の幅広い有用性を実証した。

以上、申請者は活性型 Src を特異的に検出する系を作成し、細胞のシグナル伝達やガン化のプロセスにおいて Src の活性化がいつ、どこでおこるかを示したことは、活性型 Src の生理機能の詳細を明らかにするものであり、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいと考える。