

Title	Increased Expression of a Nucleolar Nop5/Sik Family Member in Metastatic Melanoma Cells : Evidence for its Role in Nucleolar Sizing and Function
Author(s)	中本, 憲位
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43778
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 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	中本憲位
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16842 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Increased Expression of a Nucleolar Nop5/Sik Family Member in Metastatic Melanoma Cells; Evidence for its Role in Nucleolar Sizing and Function (転移性悪性黒色腫細胞における核小体 Nop5/Sik ファミリーの一員の発現亢進; 核小体の大きさと機能におけるその役割の証拠)
論文審査委員	(主査) 教授 野島 博 (副査) 教授 北村 幸彦 教授 松澤 佑次

論文内容の要旨

【目的】

B16マウス悪性黒色腫細胞の亜株のうち、高転移性の BL6細胞で高発現している Sik-SP と、核小体の関係についての検証

【方法ならびに成績】

B16マウス悪性黒色腫細胞について、トルイジンブルーで特異的に染めた核小体の大きさは、高転移性の BL6の方が、低転移性の F10より約1.5倍大きかった。また、cDNA ライブラリーのサブトラクションにより、Sik-SP 遺伝子が BL6で約5倍高発現していることを見いだした。

Sik-SP 遺伝子は、最近クローニングされた、Nop5/Sik ファミリーの一員であり、このファミリーの他のメンバーは、核小体に局在して rRNA のプロセッシングを制御し、リボゾーム合成、蛋白生合成に必須である。Sik-SP の機能もそれらと似ているかを調べるため、Sik-SP の全長 cDNA を BL6 cDNA ライブラリーより単離した。

Sik-SP を GFP との融合蛋白として COS7細胞に発現させ、蛍光顕微鏡で観察すると、核小体が発光し、さらに、この細胞をトルイジンブルーで染色して核小体の大きさを計測すると、コントロールの細胞より2倍大きかった。よって Sik-SP は、核小体で機能するものと考えられた。

次に、Sik-SP がリボゾーム合成に関与するかどうかを検証した。

まず、細胞内の rRNA 生合成を、*in vitro* で、他の RNA の合成を阻害するアマニチン存在下に、 $[^3\text{H}]$ UTP の取り込み率にて測定した。Sik-SP を遺伝子導入した COS7細胞は、コントロールベクターを導入した COS7細胞より rRNA 生合成量が多く、また、Sik-SP の多く発現している BL6では、F10より rRNA 生合成量が多かった。よって、Sik-SP がリボゾーム RNA の合成を促進することが示された。

続いて、Sik-SP 遺伝子の発現が亢進し rRNA の生合成が活性化された結果としてリボゾームの合成量が増加し蛋白の産生が亢進する可能性を考え、ルシフェラーゼを用いたアッセイでそれを検証した。F10と BL6において、ルシフェラーゼ遺伝子を一過性に導入し、mRNA の発現量をノザンハイブリダイゼーション法にて、蛋白合成量をルシフェラーゼ酵素活性の測定にて、それぞれ定量化すると、mRNA の転写量には差がなかった一方、蛋白合成量は BL6が有意に多かった。また、ルシフェラーゼ遺伝子発現ベクターを、Sik-SP を組み込んだ強制発現ベクターとともに

に、COS7細胞に導入して、コントロール細胞と比較すると、Sik-SPは、ルシフェラーゼの mRNA の転写には影響しない一方、ルシフェラーゼタンパクの合成量を増加させ、Sik-SP がリボゾームの量を増加させている可能性が示唆された。この傾向は、F10細胞を用いた場合にも同様に見られ F10と BL6の蛋白合成効率の差は、少なくとも部分的には、Sik-SP の発現レベルに影響されている事が示唆された。

以上2つの実験より、Sik-SP は核小体においてリボゾーム合成とタンパク産生の亢進に関与していることが示唆された。

さて、一部の癌についてはその核小体の大きい癌細胞ほど細胞増殖速度が大きいとするこれまでの報告を鑑み、F10と BL6の増殖速度を比較したが、両者の間に差はなかった。しかし、両亜株の培養細胞の血清を抜き、48時間の飢餓状態において増殖を抑制した後、血清を再添加したところ、F10より BL6の方が有意に早く対数増殖期に入り、その後も有意に多い細胞数を保った。さらに、Sik-SP を一過性に導入した F10と、ベクターコントロールを導入した F10の血清に対する反応を比較した場合、前者の反応は BL6並みに増強された。従って、細胞の血清に対する増殖応答の増強における Sik-SP の関与が示唆された。

最後に、ヒト悪性黒色腫15例（転移のなかったもの6例と転移のあったもの9例）の標本をトルイジンブルーで染めて、核小体の大きさを比較すると、転移のなかった例のものよりも、転移のあった例の原発巣の方が大きく、さらに、それらの転移巣の方が大きかった。このことは、大きい核小体を持つ悪性黒色腫患者ほど予後が悪いとする、これまでのいくつかの報告と一致するものであった。

また、ヒトにおいて Sik-SP に相当するヒト Nop58の発現を、これらの標本から抽出した RNA を使い、RT-PCR サザンハイブリダイゼーション法により検証したところ、転移のあったもののうち4例の転移巣でのみ hNop58の発現が検出された。

【総括】

以上の結果から、Sik-SP の発現が、核小体でのリボゾーム合成の亢進と、腫瘍細胞の血清に対する増殖反応の活性化の、2つの機能を持つことが分かった。このような機能が、Sik-SP の発現量の高い BL6細胞の、高転移性の一因である可能性がある。さらに、ヒトの悪性黒色腫症例においても、Nop5/Sik family の分子が、腫瘍の悪性化と関係をもつ可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、異なる転移能を持つマウス悪性黒色腫細胞株 B16-F10と B16-BL6に注目し、高転移性細胞株 BL6の方が、核小体が大きく、かつ、Sik-SP 遺伝子が高発現していることを見出した。そして Sik-SP が、核小体に局在し、核小体を増大させること、リボゾーム合成に促進的に関与すること、細胞の血清に対する増殖応答を活性化することを示し、これらの機能が、BL6細胞の高転移性の一因である可能性があることを見出した。さらに、ヒト悪性黒色腫患者についての検討を行い、転移を来さなかった病巣よりも転移巣の方が、核小体が大きく、かつ、Sik-SP と同じ Nop5/Sik ファミリーに属する hNop58遺伝子の発現率が高いことを示し、ヒトにおいても、このファミリーが、悪性黒色腫細胞の悪性化に関係を持つ可能性を示唆した。腫瘍細胞の核小体の大きさと悪性度との関連についての指摘は以前からあるが、その遺伝子レベルでの解析についての報告はまだほとんどないため、本研究は極めて意義あるものと言える。それに加え、ヒト悪性黒色腫患者の予後との関係も認められることから、臨床的にも価値のある研究である。以上より、本研究は、転移の研究における今後の発展性が期待され、学位の授与に値すると考える。