

29-II-01

SLUG遺伝子導入によるE-cadherinの発現抑制と細胞極性の喪失

前山 優子、古賀 浩徳、原田 大、久米村 寛大、
花田 慎一郎、吉田 隆文、谷口 英太郎、
川口 巧、馬場 真二、佐田 通夫
久留米大学 医学部 第2内科

29-II-02

プロテアソームの機能障害によりintermediate filamentの関与するMallory体類似の細胞内凝集体が形成される

原田 大、久米村 寛大、花田 慎一郎、
前山 優子、古賀 浩徳、上野 隆登、佐田 通夫
久留米大学 医学部 第二内科

【背景】 Cadherin分子の中で上皮細胞に多く発現する E-cadherinは、アドヘレンスジャンクションを構成する主要な膜貫通蛋白であり、細胞間の homophilicな接着を司る。最近E-cadherin発現を転写レベルで抑制するSLUG (Snail family蛋白の一種) が、 epithelial-mesenchymal transition (EMT) において重要な役割をなっていることが明らかになってきた。【目的】 SLUG発現により細胞の極性、形態、および増殖能力にどのような変化が生じるかを観察し、 SLUG発現がEMTに深く関与する遺伝子変化かどうかを検討する。【材料と方法】 細胞：MDCK。SLUG cDNA (Pearson教授より供与) をMDCKに導入。検討項目：1. E-cadherinおよびSLUGの発現 (immunoblot)、2. 間接蛍光抗体法によるE-cadherinおよびSLUGの局在と発現量の変化 (共焦点レーザー顕微鏡)、3. リン酸化ERK1/2 (p44/p42) および Cyclin B1の発現 (immunoblot)。【結果】 SLUG発現 MDCK細胞 (S-MDCK) はparental MDCK (P-MDCK) に比べ、線維芽細胞様の紡錘形に形態変化し、E-cadherinの発現はほぼ完全に失われた。強制発現されたSLUGは主として核に局在していた。S-MDCKにおけるCyclin B1の発現は増強しており、M期細胞数の増加が示唆された。【結論と考察】 SLUGは上皮細胞のE-cadherinの発現をほぼ完全に抑制し、細胞極性を喪失させ形態を紡錘形に変化させた。この所見はEMTの際にみられる現象と類似していた。またSLUGは細胞分裂も促進した。これらのことから、SLUGはEMTや腫瘍化に深く関連していることが推測された。

【背景】 真核細胞において蛋白は遺伝子の転写、翻訳によりポリペプチドとして形成された後に三次元的立体構造をとる(folding)。様々な原因により正しくfoldingされない異常蛋白が产生されるが、これらはプロテアソームにおいて分解を受ける。異常蛋白の形成が細胞の分解能を越えた場合は細胞内にaggresomeと呼ばれるintermediate filament(IF)の関連した凝集体(inclusion body=IC)が形成される。しかし、このICの形成過程や細胞生物学的な意義は明らかではない。本研究ではICの形成過程、分解機構と細胞内小器官に与える影響を検討した。【方法】 肝癌細胞株(Huh7)をプロテアソーム阻害剤存在下で培養し、経時的にIFの形態を蛍光顕微鏡で観察した。Green fluorescent protein(GFP)で標識したサイトケラチン18(GFP-CK18)を遺伝子導入した細胞へALLNを24時間作用させIFと粗面小胞体、ライソゾーム、ゴルジ装置、微小管形成中心の形態を共焦点レーザー顕微鏡で観察、さらに電子顕微鏡(TEM)を用いて超微形態を観察した。ICとユビキチン(Ub)との関係をUb遺伝子導入細胞において観察した。【結果】 Huh7へALLNを24時間作用させると約90%の細胞にICが形成され、IFのnetworkが消失した。TEMではこの構造は周囲に膜を有さず、線維成分に囲まれ、電子密度の高い沈着物を含む構造物として観察された。ICは微小管形成中心ならびにUbと関連していた。これらの細胞ではゴルジ局在蛋白が通常のゴルジリボンの形態をとらず細胞内に点在して観察された。ALLN添加後、ALLNを除去してさらに48時間培養するとICは消失し、IFのnetworkとゴルジ装置の形態が回復していた。これらの細胞のTEMによる観察では多くのautophagic vacuoleやライソゾームが観察された。【結語】 プロテアソーム機能の阻害によりMallory体類似のICが形成され、それらの細胞ではゴルジ装置の形態に変化を認め、その機能に影響が及んでいると推測された。プロテアソーム機能の回復によりICは可逆性に消失し、その除去にはautophagyを介した処理機構が関与していると考えられた。(本研究はM. B. Omari博士、菅沼龍男博士との共同研究である。)