

# 森 剛志 論文内容の要旨

## 主 論 文

Tgat oncoprotein functions as a inhibitor of RECK by association of the unique C-terminal region

(Tgat オンコプロテインはC末端のユニーク領域を介して RECK の機能を阻害する)  
森剛志、森内良三、岡崎英子、山田兼史、片峰茂

Biochemical and Biophysical Research Communications, in press, accepted 10 February 2007

長崎大学大学院医学研究科新興感染症病態制御学系専攻  
(指導教授：片峰茂教授)

## 緒 言

近年、我々は ATL 細胞で発現しているがん遺伝子 *Tgat* (*Trio* related transforming-gene in ATL tumor cells) を分離・同定した。*Tgat* は 255 個のアミノ酸からなり、ニューロンのガイダンスに関与すると考えられている多機能タンパク質 TRIO がコードする 2 つのグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の 1 つである Rho 特異的な GEF-D2 ドメインからなる N 末側 240 アミノ酸と、選択的スプライシングにより付加された 15 個のアミノ酸からなるユニークな C 末端領域で構成されている。*Tgat* は細胞のトランスフォーメーションおよび浸潤能を有するがん遺伝子であるが、主に C 末端領域がその機能を規定している。しかしながら、C 末端領域の詳細な解析はまだ行われていない。

本研究では、酵母ツーハイブリッドスクリーニング法および免疫沈降法により *Tgat* と細胞内で結合する分子を分離同定し、さらにそれらの分子の浸潤能における役割を検討することにより *Tgat* の生体内の分子機能を明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

- 1) 酵母ツーハイブリッドスクリーニング法による *Tgat* の C 末端領域と結合する分子の同定：ツーハイブリッド用 bait として *Tgat* C 末端を用いた。prey は、*Tgat* を強制発現させた NIH3T3 のライブラリーを用いた。陽性クローンの塩基配列を決定し、BLAST にてホモロジー探索を行った。その後、哺乳動物発現プラスミドにそれらの配列を挿入し、Myc タグ付きの *Tgat* 及び HA タグ付きの prey の細胞内結合を免疫沈降法にて解析した。
- 2) 細胞浸潤能： *Tgat* 及び RECK の細胞浸潤能を検討するために、マトリックスインバージョンチャンバーを用いたマトリゲル浸潤能解析を行った。NIH3T3 に *Tgat* を強制発現させた細胞 (NIH3T3/*Tgat*) 及び *Tgat* と RECK を両方発現させた細胞 (NIH3T3/*Tgat*+hRECK) を用いてそれらの浸潤能を比較した。また、ゼラチナー

ゼ (MMPs) 活性はゼラチンザイモグラムにより確認し、数値化した。RECK を発現しないヒト繊維芽細胞 HT1080 も同様に、浸潤能及びザイモグラムによる MMPs 活性量を検討した。

## 結 果

Tgat が、腫瘍形成や細胞浸潤を負に制御すると考えられているがん抑制遺伝子産物である RECK と結合することを酵母ツーハイブリッドスクリーニング法及び哺乳細胞を用いた免疫沈降法により示した。NIH3T3 に比べ NIH3T3/Tgat では浸潤能が高く、MMPs の活性化の増強も確認された。一方、NIH3T3/Tgat+hRECK ではその浸潤能は顕著に抑えられ、MMPs 活性も抑えられた。ヒト HT1080 細胞を用いても同様の結果が得られた。RECK を発現していない HT1080 に Tgat を強発現しても、浸潤能は増強されなかった。

## 考 察

Tgat はその C 末端領域を介して、細胞浸潤を負に制御する RECK と結合することを示した。RECK は多くの組織で発現しているが、腫瘍細胞などで発現のレベルが低い。RECK は膜結合型蛋白質であり、浸潤に関与している MMP-2 及び MMP-9 の活性を阻害する分子として報告されている。本研究により、Tgat が RECK と結合してその機能を抑制することにより、NIH3T3 ならびに HT1080 細胞の浸潤能を増強させること、および MMPs の活性を高めることが示唆された。また、RECK の強制発現は Tgat による浸潤能を抑制することから、Tgat による RECK 機能の抑制効果が確認された。

Tgat は ATL 腫瘍細胞由来の cDNA ライブラリーから同定されたがん遺伝子である。一方、RECK は RAS オンコプロテインによるトランスフォーメーションを抑制するがん抑制遺伝子として同定された。すなわち、我々は“がん抑制遺伝子産物 (DNA 腫瘍ウイルス由来ではない) が、がん抑制遺伝子産物と結合することにより、その機能を抑制する”という事象を世界で初めて発見したことになる。

ATL 腫瘍細胞の最大の特徴はその多臓器浸潤性にある。また、ATL 患者血清中の MMP-9 活性が高いという報告がある。本研究では ATL 腫瘍細胞における RECK 発現解析を行っていないが、Tgat が ATL 細胞腫瘍細胞内で RECK とで結合し、その機能を抑制することで、ATL 腫瘍細胞の多臓器浸潤能に寄与することが示唆された。今後、Tgat と RECK の結合を阻害する低分子化合物や RECK 機能を亢進させる治療法の開発は ATL の治療に光明をもたらす可能性がある。