岐阜大学機関リポジトリ
Gifu University Institutional Repository

ras細胞におけるThy-1発現抑制の分子機構の解析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-03-12 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岡野, 幸雄 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/204

緒言

マウス線維芽細胞NIH3T3に癌遺伝子rasを導入してtransformさせたDT細胞においては、ブラジキニンなどのアゴニスト刺激により細胞内Ca^{2+}濃度の周期的変動(オシレーション)が誘導されるが、親NIH3T3細胞ではこのようなオシレーションは観察されない[1]。Ca^{2+}オシレーション誘発のメカニズムは明らかにされておらず、多くの研究者らがその分子機構の解明に日夜とりくんでいる。

Sugimotoらは、リンパ球の表面抗原として知られるglycosyl phosphatidylinositol (GPI)アンカー蛋白質のThy-1が、コロニー形成能などで示される細胞の悪性度と負の相関を示すことを報告した[2]。すなわち、癌遺伝子を導入したDT細胞では細胞表面にThy-1が発現していないが、親NIH3T3細胞のほとんどにはThy-1が発現している。また、細胞の悪性度とCa^{2+}オシレーションの誘発は正の相関を示すが、Ca^{2+}オシレーションの誘発される細胞ではThy-1の発現が認められない。すなわち、Thy-1の発現は、Ca^{2+}オシレーションの誘発に抑制的に作用することを報告している[3]。さらに、DT細胞においては、Thy-1のmRNAは合成されるが、完全な蛋白質として細胞表面に出現することはない。

そこで本研究では、DT細胞におけるThy-1発現がどのように抑制されるかについての分子メカニズムの解析を目的に研究を行った。Thy-1発現抑制の分子機構として、1）Thy-1蛋白質の早期分解、2）Thy-1蛋白質の糖鎖付加の異常などが考えられ、本研究では発現クローニングの手法によってThy-1発現抑制のメカニズムを解明しようとした。というのは、細胞表面抗原の発現異常を来す場合は、夜間発作性血色素尿症（PNH）[4]に代表されるように、Thy-1蛋白質に糖鎖を付加しホスファチジルイノシトールを結合する過程での数種の酵素のうちのいずれかの欠損によることが多いからである。現在までにGPIアンカー蛋白質の合成に関与する酵素としてPIG-AからPIG-Hまで8種類の相補性群が知られているが、ヒトでその遺伝子が解明されているのはPIG-AとPIG-Fのみであり、マウスではPIG-A[5]のみが明らかにされているにすぎない。そこで本研究によって新しい遺伝子のクローニングを行おうとした。

われわれは、GPIアンカー蛋白質生合成の専門家である大阪大学医学部微生物病研究所難治疾患バイオ分析部門の竹田潤二助教授に実験方法について相談し、コメントをいただいた。その中でわれわれが学んだことは、”2倍体の哺乳動物の細胞では欠損するものが劣性である場合は、発現クローニングによっては解明できない”ということであった。欠損するものが劣性であるか否かをNIH3T3細胞とDT細胞とのfusionなどによって調べることが必要であり、優性の場合にはcomplementation assayによって欠損遺伝子を明らかにす

ることができるが、劣性の場合は発現クローニングによっては困難であることがわかった。

そこで、すでにマウスの遺伝子構造が明らかとなっているPIG-Aについてreverse transcriptase-PCR (RT-PCR)法によってメッセージの発現を解析した。

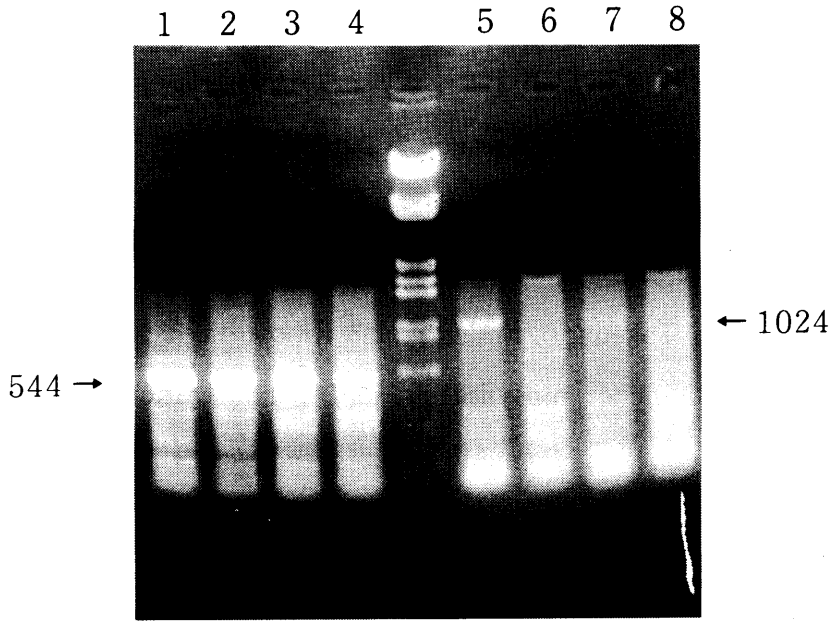
方法

NIH3T3細胞およびDT細胞からの総RNAの抽出にはisogenを用いた。得られた総RNA量を260nmの吸光度を測定し、一定量の総RNAを鋳型としてRT-PCRを行った（TAKARA社製RT-PCRキット）。すなわち、総RNA(0.72μg)、6.7mM $MgCl_2$、dNTP、RNase inhibitor、random hexamerおよびreverse transcriptase（RT）の存在下に65℃で5分、42℃で1時間処理後、95℃で5分間RTを不活性化した。続くPCR反応には、150pmoleのprimersおよびTaq polymerase存在下に94℃で2分間の前処理後、94℃,1分、55℃,2分、72℃,3分のサイクルを35回繰り返し、72℃,10分間の後処理を行った。RTおよびPCRの反応はそれぞれ30および100μlの系で行った。PCR産物10μlを1.5％アガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイドで染色して観察した。PCR primerの選択にはプライマー設定用ソフト"Oligo 4.0"を用い、マウスPIG-A cDNAの塩基配列中から、1067～1611の領域（A, 反応産物の長さ：544塩基対）および511～1534の領域（B, 反応産物の長さ：1023塩基対）を含むprimerを以下のように合成した。

A 1067：CAGGTCGTCAGCACAAAGGT、 A 1611：AAAGCCCAACACAGGAGCAA、
B 511： CTTTTCGGATTTGCTGATGT、 B 1534：GGGCTTGCTTCTACCTGCTT

結果と考察

プライマーセットAおよびBを用いて、「方法」の項で述べた条件下にRT-PCRを行った結果を右図に示す。レーン1, 2, 5, 6はDT細胞から、レーン3, 4, 7, 8はNIH 3T3細胞から抽出したRNAを用い、1と5、2と6、3と



7、4と8はそれぞれ同一の試料で行った。中央レーンにはマーカー（λ EcoR I/Hind III double digested）を示す。プライマーセットAにおいては、種々の大きさのバンドの中に目的のバンドがDTおよびNIH3T3細胞のいずれにおいても観察され、むしろDT細胞のシグナルの方がNIH3T3細胞に比べて強かった。一方、プライマーセットBにおいては、DT細胞（レーン5）においてのみ1kbのバンドを認め、NIH3T3細胞（レーン7）では弱いシグナルを認めたにすぎない。別に調製したDT細胞（レーン6）およびNIH3T3細胞（レーン8）には1kbのバンドを認めなかった。

このようにDT細胞において目的のバンドが2種類のプライマーセットを用いても検出されたことから、DT細胞においてPIG-Aが存在することが強く示唆された。すなわち、本研究の当初に考えたような、GPIアンカー蛋白質合成酵素の1つであるPIG-AがDT細胞において欠損している可能性はきわめて少ないことが考えられた。しかし、他のGPIアンカー蛋白質合成酵素の欠損の有無については明らかではない。

参考文献

1) Fu, T., Sugimoto, Y., Oki, T., Murakami, S., Okano, Y. and Nozawa, Y.: Calcium oscillation associated with reduced protein kinase C activities in ras-transformed NIH3T3 cells. *FEBS Lett.*, 281, 263-266 (1991)

2) Sugimoto, Y., Ikawa, Y. and Nakauchi, H.: Thy-1 as a negative growth regulator in ras-transformed mouse fibroblasts. *Cancer Res.*, 51, 99-104 (1991)

3) Sugimoto, Y., Fu, T., Hirochika, R., Nakauchi, H., Ikawa, Y. and Nozawa, Y.: Thy-1 inhibits mitogen-induced Ca^{2+} oscillation in ras-transformed mouse fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 203, 230-235 (1992)

4) Takeda, J., Miyata, T., Kawagoe, K., Iida, Y., Endo, Y., Fujita, T., Takahashi, M., Kitani, T. and Kinoshita, T.: Deficienct of the GPI-anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell*, 73, 703-711 (1993)

5) Kawagoe, K., Takeda, J., Endo, Y. and Kinoshita, T.: Molecular cloning of murine *Pig-a*, a gene for GPI-anchor biosynthesis, and demonstration of interspecies conservation of its structure, function, and genetic locus. *Genomics*, 23, 566-574 (1994)