

博士論文審査報告書

論文題目： ホスホリパーゼ C δ 1 の細胞増殖における機能に関する研究

申請者： 内藤陽子

1. 論文内容の要旨

イノシトールリン脂質 (PI) は、様々な細胞機能の制御において重要な役割を担っている。ホスホリパーゼ C (PLC) は、この PI 代謝においてセカンドメッセンジャー産生の引き金となる酵素である。 δ 型 PLC は粘菌・酵母・植物にもみられ、進化的に古くから保存されており、細胞増殖など生命の根幹となる現象に対して機能することが考えられている。本研究では、PLC δ 1 の細胞増殖における機能の解明を目的として解析を行った。

細胞増殖つまり細胞周期の進行に対する役割として、細胞質分裂時において PLC δ 1 が分裂溝に局在化することを見出した。GFP-PLC δ 1 PH をプローブとして用いて、細胞質分裂時におけるフォスファチジルイノシトール 4, 5 ニリン酸 (PIP2) の細胞内分布を調べたところ、PIP2 が分裂溝に局在化することを確認した。また、GFP-PLC δ 1 およびその PIP2 親和性欠損変異体について細胞内分布を比較したところ、GFP-PLC δ 1 は分裂溝に局在化するのに対して、変異体では分裂溝への集積は見られなかった。このことより、PLC δ 1 は PH ドメインを介して PIP2 と結合することにより、分裂溝へ局在化することが明らかとなった。さらに、他の PLC アイソフォームについても細胞質分裂時における細胞内分布を調べ、PLC β 1 および PLC δ 3 も分裂溝に局在化することを示した。これらのことより、細胞質分裂時において、分裂溝に局在化した PLC は、活性化されて PIP2 を代謝すると予測される。これにより産生されたイノシトール三リン酸による、カルシウムイオン濃度の上昇を介したミオシン骨格の制御や、PIP2 量の調節による PIP2 依存的アクチン調節因子を介したアクチン骨格の制御によって細胞質分裂を調節していると考えられる。

さらに、PLC δ 1 遺伝子ノックアウトマウス由来胚性線維芽細胞 (MEF) とそのコントロールの MEF を用いて、細胞増殖能を比較した。この結果、ノックアウト MEF では高密度状態においてもその増殖が促進された。また、ノックアウト MEF に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合 PLC δ 1 を発現させると、GFP のみを発現させたものと比較して、高密度時の増殖能が低下した。このことより、PLC δ 1 は細胞が高密度の時、細胞増殖に対して抑制的に働くことが示された。さらに、低密度および高密度培養した細胞を用いて、内在性 PLC δ 1 の発現量に変化があるかを調べた。この結果、低密度培養時と比較して、高密度培養時では PLC δ 1 の発現量が増加していた。これらのことより、高密度培養環境下において、栄養枯渇や細胞-基質間接着の低下、細胞接触の増加など何らかの環境変化にตอบสนองして PLC δ 1 の発現が促進されると推定される。この PLC δ 1 の増加が、細胞増殖の停止に關与する因子の制御に機能することで、細胞増殖の抑制が引き起こされると考えられる。

以上の結果より、PLC δ 1 は細胞増殖制御において多面的な役割を果たしていると考えられる。

2. 論文審査結果

本研究は、イノシトールリン脂質の代謝において重要な働きをしているホスホリパーゼC 1(PLC 1)が、細胞増殖にどのように関わっているのか機能解析を行なったものである。

まず、細胞周期において、細胞質分裂が起こる際、PLC 1 が分裂溝に局在することを見出した。この局在は、PH ドメインを介しており、フォスファチジルイノシトール 4, 5ニリン酸(PIP2)の分裂溝への分布と一致していた。PH ドメインに変異を導入すると局在化が消失した。よって、PIP2 とその代謝に関わる PLC 1 が細胞質分裂において重要な働きをしていることが示唆された。続いて、細胞増殖における PLC 1 の機能解析を行ない、細胞が増加し高密度状態になると PLC 1 のタンパク質量が増加していることを見つけた。さらに、細胞密度と細胞増殖能の関係を明らかにするため、PLC 1 ノックアウトマウス由来の胚性線維芽細胞(MEF)を用いて解析し、コントロール MEF 細胞が、細胞密度が増すと増殖がすぐに停止するのに対し、PLC 1 ノックアウト MEF 細胞は、高密度状態でも増殖を続けることを発見した。この特性は、PLC 1 を導入することにより回復した。これらの研究は、PLC 1 の細胞周期の進行および細胞増殖の制御における働きを示しており、特に、細胞密度が増加した際に細胞増殖を抑制する制御において重要な働きをすることを初めて見出したもので、がん抑制因子としての PLC 1 の機能を示唆する重要な知見である。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成21年4月28日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行なった結果、合格と判定した。

主査：西 谷 秀 男

副査：大 隅 隆

：樋 口 芳 樹

：吉 川 潮

(神戸大学

バイオシグナル研究センター、教授)

：八 木 澤 仁