

| | |
|----------|---|
| 氏名 | ひらつか まさはる 平塚 正治 |
| 学位の種類 | 博士（生命科学） |
| 学位記番号 | 乙第10号 |
| 学位授与年月日 | 平成16年 8月 3日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 学位論文題目 | Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene (グリオーマ発生に関与する蛋白群のプロテオーム解析: SIRT2 の発現低下とその意義) |
| 学位論文審査委員 | (主査) 佐藤 建三 (副査) 箸本 英吉 押村 光雄 |

学位論文の内容の要旨

グリオーマの発生と進展に関わる遺伝子異常として、これまで EGF-R、CDK4、MDM2 の遺伝子増幅や p53、Rb、p16、PTEN、DMBT1 の欠失、不活性化に繋がる変異などが明らかにされている。しかし、これら以外にも染色体 1p、11p、19q、22q の領域で高頻度に染色体欠失が認められているが、遺伝子は同定されておらず、グリオーマの発生・進展機構には未だ不明な点が残されている。近年の遺伝子解析技術の進歩により、SAGE 解析や cDNA マイクロアレイ解析など大規模な発現遺伝子解析が可能になり、グリオーマにおいても GOA (ring-finger B-box protein) や ZIC1、OTX2 が発現上昇する遺伝子として同定されているが、グリオーマ形質との関係は必ずしも明確ではない。一方で、最終的に細胞の形質を決定している分子は蛋白質であることから、直接蛋白質の発現量や翻訳後修飾の変化を網羅的に検索できるプロテオーム解析の手法が、新たな病態解析の手法として注目されている。我々はプロテオーム解析手法を用いてグリオーマの発生・進展に関わる新たな分子の同定を試みた。

方法

グリオーマ組織 5 例、および正常脳組織 6 例からタンパク質を抽出し、2次元電気泳動を行い、それぞれの発現蛋白プロフィールを作成した。内部標準スポットを定め、ゲル間の染色性の違いを補正したのち、それぞれのスポットについて正常症例とグリオーマ症例の発現量を比較した。正常症例の全平均値に対して 2 倍以上の変動を示すグリオーマ症例が過半数を超えたスポットを、グリオーマで有意に変動しているスポットと定義した。これらのスポットをゲルから切り出し、

in gel トリプシン消化後、生じたペプチド断片長を MALDI-TOF-MS で質量分析し、得られたペプチドフィンガープリントをデータベース検索することにより、スポットに含まれる蛋白質を同定した。

SIRT2 の発現レベル解析については、グリオーマ組織 17 例、正常脳組織 3 例、培養グリオーマ細胞株 8 株から mRNA を抽出し、ノーザンブロットを行った。また、GFP との融合蛋白質として強制発現させ、グリオーマ細胞の表現型の変化を観察した。

結果と考察

2次元電気泳動によるプロテオーム解析により、グリオーマで有意に発現が上昇しているスポットとして 11 スポット、減少しているものとして 4 スポットを見出し、全てペプチドフィンガープリント法により同定出来た。15 個の蛋白質は 5 つの機能グループに分類でき、それぞれ、細胞骨格調節に関わるもの、神経前駆細胞の分化に関わるもの、神経変性に関わるもの、細胞老化に関わるもの、血中蛋白質と考えられるものであった。これらの蛋白質の発現プロフィール変化がグリオーマの発生・進展に重要な役割を果たしていることが示唆され、グリオーマの新たな分子マーカーとなることが期待される。

特に、細胞骨格調節に関わる SIRT2 はグリオーマで高頻度に欠失している染色体 19q13.2 に位置し、グリオーマの癌抑制遺伝子である可能性も考えられることから、さらに詳細に解析した。グリオーマ組織 17 例、正常組織 3 例についてノーザン解析したところ、17 例中 12 例で SIRT2 mRNA 発現の減少が観察された。ヒトグリオーマ細胞株 8 株についても、全ての細胞株で発現レベルは極めて低かった。このグリオーマ細胞株に、GFP との融合蛋白質として SIRT2 を強制発現させたところ、SIRT2 は細胞質に分布した。SIRT2 発現細胞では微小管ネットワーク構築の乱れが観察された。最近、SIRT2 が α -tubulin を脱アセチル化するという報告がなされ、今回の結果はこれを支持するものと考えられる。SIRT2 強制発現細胞はコロニー形成率がコントロールに比べて著しく低下していたことから、SIRT2 は細胞増殖、コロニー形成など癌細胞の重要な形質の発現制御に関与していることが示唆された。

結 論

グリオーマのプロテオーム解析により、15 種類の蛋白質の発現が癌化に伴い変化することが明らかとなり、グリオーマの新たな分子マーカーの候補を見出せた。このうち特に SIRT2 は mRNA レベルでの発現低下、グリオーマ細胞のコロニー形成能抑制作用を示し、癌抑制遺伝子である可能性も示唆された。今回同定された蛋白質により、グリオーマの特徴が更に明らかになり、今後の医療に貢献するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究はグリオーマの発生・進展に関与する新しい分子マーカーの同定を目的とし、正常脳組織およびグリオーマ組織を用い、プロテオーム解析を行うことにより、15種類のタンパク質の発現がグリオーマで有意に変化していることを明らかにした。さらに、このうち SIRT2 がグリオーマ 17 症例中 12 例で mRNA 発現レベルが減少していること、培養グリオーマ細胞株のコロニー形成能を抑制することを明らかにし、グリオーマの発生・進展に関与すると考えられる有力なタンパク質の同定に成功した。本論文の内容は、癌の発生・進展に関与する蛋白質の同定にプロテオーム解析が有用であることを示したばかりでなく、グリオーマの進展機構を解明する上でも極めて重要な知見であり、癌研究の分野において明らかに学術水準を高めたものと認める。