

遺伝性大腸疾患を例とした情報伝達機構の解析

Altered signal transduction in genetic colorectal diseases

代表研究者 東京医科歯科大学医学部衛生学教室助手 本間 美和子
Res. Assoc., Dept. of Hygiene and Oncology, Tokyo Medical and Dental Univ.
Miwako Kato HOMMA

The production of the second messenger molecules diacylglycerol and inositol 1, 4, 5-trisphosphate is mediated by activated phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PLC) enzymes. We report the enhancement of PLC activity in human colorectal carcinoma cells. PLC activity *in vitro* was increased in cell lines derived from human colorectal carcinomas, especially in KMS-4 and KMS-8 cells, both of which are derived from FAP (Familial Adenomatous polyposis) patients. In these cells, cellular contents of inositol 1, 4, 5-trisphosphate and diacylglycerol were constitutively increased. When cell lysates were phosphorylated and immunoprecipitated with anti-phosphotyrosine antibody, phosphorylated PLC- γ_1 was detected as a 145 KDa band; this phosphoprotein was not detected in lysates from normal colorectal cells. In addition, activation of membrane-bound protein kinase C was also observed in these carcinoma cells. These results suggest the involvement of phospholipase C activation induced by its tyrosine phosphorylation, followed by enhanced metabolism of inositol phospholipids and consequent activation of protein kinase C in human colorectal carcinogenesis.

研究目的

細胞の増殖制御の仕組みは、生命現象を考える上で最も本質的な課題である。多細胞生物のうち、高度に機能分化したヒトなどの高等生物では、ホルモンなどの液性因子が個体としての動きとバランスを保つために重要な意味をもっている。細胞膜上には各々の因子に対する特異的受容体が存在し、その情報が細胞内へと変換される際には、酵素類の活性化や、それにより産生されるセカンドメッセンジャーが重要な役割を果たしている。したがって、例えば受容体やそれ以後の酵素類など、情報伝達機序に何らかの異常が生じることが、種々の疾患の原因になっている場合も考えられる。本研究は、このような生体膜受容体を介する情報の変換及び情報伝達系の重要性を認識した上で、細胞増殖の異常を伴う家族性大腸腺腫症という遺伝性疾患を例として、細胞増殖に関連する情報伝達系のメカニズムを解析することを目的とする。

細胞増殖に関係した因子として、今日までに種々のペプチド性細胞増殖因子、癌関連遺伝子、癌抑制遺伝子などが見いだされ、また細胞膜中のチロシンキナーゼ活性や、イノシトールリン脂質代謝系が細胞増殖に伴い変化することが報告されている。ここで関与する酵素類として、チロシンキナーゼやプロテインキナーゼC、ホスホリパーゼCなどが知られているが、これらの活性上昇などの酵素学的変化が、量的変化、あるいは何らかの制御因子による質的变化によるものなのかは、いまだに不明な点も多い。したがって、細胞膜から核へと至る情報伝達系の大きな流れの中で、各酵素活性の変化がどのような役割を果たしているのかを明らかにすることで、細胞増殖制御機構を解明し、またその異常に伴う疾患の原因を解明しようとするものである。

研究経過

細胞をホルモンや増殖因子などで刺激した場合、受容体活性化に伴い、サイクリックAMP依

存性キナーゼ、チロシンキナーゼ、イノシトールリン脂質代謝系、などのいずれかあるいは複数が活性化され、さらに細胞内の各種酵素類の活性化が生じていわゆるカスケード反応を経て最初のシグナルが増幅される。代表者は、これまでに上皮成長因子やある種の癌遺伝子によるイノシトールリン脂質代謝の変化について研究を行い、この代謝に関与する酵素類のあるものが、刺激に反応して活性化されることを明らかにし、酵素の精製と一次構造の解析、活性化メカニズムの生化学的検討をおこなってきた。イノシトールリン脂質代謝関連酵素については、今日までの数多くの研究者達の努力により、各酵素が複数のアイソザイムを有していることが明らかにされ刺激応答に伴い活性化されるのがどのアイソザイムであるかを同定することが必須となった。

また、近年、おそらくは食事の多様化に伴い、大腸疾患が急速に増えてきている。代表者は、大腸粘膜細胞の過増殖をきたす家族性大腸腺腫症に着目し、本疾患に関与する情報伝達系について明らかにしようと考えた。特に、遺伝性の本疾患で詳細なメカニズムを検討することは、酵素類の一次構造や、生化学的な活性制御機構の研究により、より直接的に疾病の原因となる変化を明らかにする可能性がある。

研究成果

家族性大腸腺腫症に由来する細胞株及び正常細胞株を材料として、イノシトールリン脂質代謝亢進の有無を調べた。その結果大腸腺腫症に由来する細胞では、このイノシトールリン脂質代謝の著明な代謝亢進が認められ、イノシトール 1, 4, 5-トリスリン酸とジアシルグリセロールの恒常的な産生上昇がみられた。

イノシトールリン脂質代謝亢進に関与する酵素を明らかにする目的でこの代謝に関連した酵素類の活性測定を行ってみたところ、ホスファチジルイノシトールキナーゼ、ジアシルグリセロールキナーゼなどでも若干の活性の変化が認められた。しかし、最も活性変化が著明に認められたのは、イノシトールリン脂質代謝のトリガー反応を司る、イノシトールリン脂質特異的ホスホリパー

ゼC活性であった。本酵素活性は、大腸腺腫由来細胞株では、*in vitro*の活性測定により、およそ3倍の活性上昇がみられた。

先に述べたように、イノシトールリン脂質代謝関連酵素は、今日では各々、複数のアイソザイムが存在していることが明らかになった。本疾患では、どのタイプのアイソザイムが活性化されているかを同定することが重要と考えた。各細胞で発現しているホスホリパーゼCのmRNAをノーザンプロット法により調べたところ、大腸腺腫由来細胞株では γ_1 と δ_1 型の発現がみられ、正常細胞に比べて若干の発現上昇が認められたが、mRNAのサイズは各々同一であった。次に、活性上昇に関与するアイソザイムを明らかにするために、細胞可溶性画分を各々ヘパリンカラムクロマトグラフィーにアプライし、 γ_1 と δ_1 型のホスホリパーゼC両者を分離した。両アイソザイムの分離は、特異抗体により確認を行った。その結果、大腸腺腫症に由来する細胞株では、正常細胞に比べ、 γ_1 型と δ_1 型両者のホスホリパーゼC活性の上昇が認められた。

本疾患でホスホリパーゼC活性の上昇がみられたことから、次に、この酵素の活性化メカニズムを明らかにする必要がある。ホスホリパーゼCの γ 型については、リン酸化による活性化が考えられたので、標識した細胞ライゼートを、リン酸化チロシンに対する特異抗体で免疫沈降を行った。その結果、ホスホリパーゼC- γ_1 型に相当するリン酸化タンパクが同定された。

イノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼC活性化の下流には、プロテインキナーゼCが重要な役割を演じている。本疾患由来細胞株でも、プロテインキナーゼC活性の上昇が認められたことから、ホスホリパーゼCの活性化をトリガー反応とするイノシトールリン脂質代謝の亢進が、さらに下流のシグナルへと増幅された情報伝達が行われていることが、本疾患に密接に関与することが明らかになった。

今後の課題と発展

イノシトールリン脂質代謝を中心として、大腸腺腫症に関与する情報伝達系について研究を行っ

てきた。現在、ホスホリパーゼ C δ 型については、一次構造の解析を行っており、活性化のメカニズムをさらに詳細に明らかにしたいと考えている。

一昨年、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子と考えられる APC 遺伝子が単離され、その一次構造が報告された。その結果、ホスホリパーゼ C との何らかの相互作用も予想されるので、今後はイノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼ C の

側面から、大腸腺腫症発症のメカニズムについて、より直接的に、検討を行えると考えている。ひとつの遺伝性疾患について、その治療にも応用できるような研究を行いたいと切望している。

本助成による発表論文

- 1) Miwako K. Homma, Yoshimi Homma, Masayoshi Namba, Tadaomi Takenawa and Yasuhito Yuasa: Alteration of phosphatidylinositol metabolism in colorectal carcinogenesis. submitted for publication, (投稿中).