

The PDZ-LIM Protein CLP36 is required for stress fiber formation and focal adhesion assembly in BeWo cells

著者	田村 直顕
発行年	2008-03-17
URL	http://hdl.handle.net/10271/88

doi: 10.1016/j.bbrc.2007.10.064

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 513号	学位授与年月日	平成20年 3月17日
氏名	田村直顕		
論文題目	The PDZ-LIM protein CLP36 is required for stress fiber formation and focal adhesion assembly in BeWo cells (PDZ-LIM タンパクの CLP36 は BeWo 細胞におけるストレスファイバー形成と接着斑形成に必要である)		

博士(医学) 田村直顕

論文題目

The PDZ-LIM protein CLP36 is required for stress fiber formation and focal adhesion assembly in BeWo cells
(PDZ-LIMタンパクのCLP36はBeWo細胞におけるストレスファイバー形成と接着斑形成に必要なである)

論文の内容の要旨

[はじめに]

常位胎盤早期剥離は、胎児のみならず母親の生命をも脅かす可能性のある臨床上重要な疾患である。その発生機序の詳細は不明であるが、胎盤と子宮を結合している絨毛細胞の脆弱性がその一因として考えられている。一般的に細胞の構造的強度は細胞骨格によって規定されるが、特にその中で収縮性のアクチン線維束であるストレスファイバーが重要であることが知られている。ストレスファイバーはアクチンとそれに結合する α -アクチニン、ミオシンなどのアクチン結合タンパクにより構成されている。特に、 α -アクチニンとそれに対する結合タンパクであるCLP36は、ストレスファイバーの形態を調節する重要な分子であると考えられている。CLP36はPDZドメインとLIMドメインという二つのタンパク結合ドメインを有し、血管内皮細胞などの様々な細胞において細胞骨格の機能制御に関与していることが報告されているが、絨毛細胞でどのように働いているかはいまだ明らかではない。そこで本研究では、このCLP36に着目し、絨毛細胞における細胞骨格の機能制御を規定するメカニズムについて検討を加えた。

[材料ならびに方法]

妊娠中の雌SDラット(妊娠18日目)の胎盤および絨毛細胞由来のBeWo細胞におけるCLP36の発現をウェスタンブロットにて調べた。次にBeWo細胞におけるCLP36と α -アクチニンの細胞内局在を免疫組織化学にて明らかにし、免疫沈降法により両者が複合体を形成しているかについて調べた。続いて、RNA干渉によりCLP36の発現をノックダウンさせたBeWo細胞の形態変化を位相差顕微鏡にて観察し、 α -アクチニン、ビンキュリンの細胞内局在を免疫組織化学にて明らかにした。さらにCLP36ノックダウンBeWo細胞にCLP36を遺伝子導入しストレスファイバーおよび接着斑の形成の有無を評価した。

[結果]

- 1) CLP36タンパクは、胎盤および絨毛細胞由来のBeWo細胞に豊富に発現していた。
- 2) 免疫組織化学と免疫沈降法により、CLP36が α -アクチニンと結合することを明らかにし、両者が絨毛細胞においてもストレスファイバーの構成要素であることを示した。
- 3) BeWo細胞において、CLP36をノックダウンすると、著明な形態変化が観察された。さらに細胞骨格の変化を検討すると、ストレスファイバーと接着斑の消失が認められた。一方、これらの細胞にCLP36遺伝子を再導入すると、その形態が回復するとともに、ストレスファイバーと接着斑も回復した。これらの結果より、CLP36が絨毛細胞において、細胞骨格の形態を調節する分子であることが明らかとなった。

[考察]

ストレスファイバーの形成には α -アクチニンによるアクチンフィラメントの束化が必須である。本研

究により、CLP36は α -アクチニンと結合することが明らかとなった。このことから、CLP36は機能の一つとして、アクチンフィラメントの束化に関与し、ストレスファイバーの形成を誘導している可能性が考えられた。また、ストレスファイバーの形成には、small GTPaseであるRhoAを介したシグナル伝達経路が深く関わっていることが知られており、CLP36が、RhoAの下流のなんらかのキナーゼと結合してストレスファイバーの形成を制御している可能性も示唆された。

絨毛細胞は、妊娠期間を通じて子宮脱落膜と胎盤の間の強固な接着を維持するために非常に重要な細胞である。絨毛間腔に流入する母体動脈血流量は、胎児の発育に伴って著明に増加するため、絨毛細胞は常に血流による物理的ストレスを受けている。絨毛細胞におけるストレスファイバーは、これらの物理的ストレスに対して絨毛細胞の形態を維持し、子宮との接着を強固に保つために重要な細胞骨格であると考えられる。常位胎盤早期剥離は胎児娩出前に子宮と胎盤の間に出血が広がり、胎盤が子宮から剥離する病態である。したがって、この病態の発生において脱落膜から胎盤が剥離する原因として絨毛細胞のストレスファイバー形成不全が考えられ、CLP36の発現異常あるいは遺伝子異常がその一つの原因となっている可能性が示唆される。今後、常位胎盤早期剥離症例や原因不明の習慣性流産症例の絨毛細胞におけるCLP36遺伝子を解析し、特異的なアミノ酸変異の存在、さらにはそのアミノ酸の変異がストレスファイバー形成に与える影響について検討していきたい。

[結論]

絨毛細胞において、CLP36がストレスファイバー形成と接着斑形成に必要であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

常位胎盤早期剥離の原因として胎盤と子宮を結合している絨毛細胞の脆弱性が指摘されている。申請者は、細胞の構造的強度を規定する収縮性のアクチン線維束であるストレスファイバーに着目し、絨毛細胞特有の細胞骨格の機能制御機構を検討した。ストレスファイバーはアクチンとそれに結合する α -アクチニン、ミオシンなどのアクチン結合タンパクにより構成されている。 α -アクチニンとその結合タンパクであるCLP36は、血管内皮細胞などの様々な細胞においてストレスファイバーの形態を調節する重要な分子とされている。申請者は胎盤で多く発現するCLP36に着目し、絨毛細胞における細胞骨格の機能制御機構を検討した。

妊娠18日目のWistarラットの胎盤と、絨毛細胞由来のBeWo細胞を用いて実験を行った。CLP36の発現はRT-PCR法及びウェスタンブロット法で確認した。ラット胎盤組織内のCLP36の局在を*in situ hybridization*法及び免疫組織化学にて検討した結果、らせん動脈内側の絨毛細胞(Giant Trophoblast)にmRNAとタンパクの強発現が確認できた。BeWo細胞では α -アクチニンとともにストレスファイバーに一致して抗原性が確認できた。さらに免疫沈降法によりCLP36は α -アクチニンと複合体を形成している事実も確認した。続いて、RNA干渉によりCLP36の発現をノックダウンさせたBeWo細胞の形態変化を位相差顕微鏡にて観察した。CLP36をノックダウンすると、特有な紡錘形が円形となる著明な形態変化を呈するとともに、ストレスファイバーと接着斑の消失が認められた。一方、これらの細胞にCLP36遺伝子を再導入すると、その形態が回復するとともに、ストレスファイバーと接着斑も回復した。しかし α -アクチニンとの結合に関わるPDZドメインと、シグナル伝達に関わるとされるLIMドメインの、各々の欠失変異CLP36遺伝子を導入しても回復は認められなかった。

これらの結果より、CLP36が絨毛細胞において、 α -アクチニンと結合することによりアクチンフィラメントの束化に関与し、ストレスファイバーの形成を誘導して細胞骨格の形態を調節する分子であることが明らかになった。

絨毛細胞は、妊娠期間を通じて子宮脱落膜と胎盤の間の強固な接着を維持するために非常に重要な細胞である。CLP36の発現異常あるいは遺伝子異常に伴う絨毛細胞のストレスファイバーの形成不全は、常位胎盤早期剥離や原因不明の習慣流産等様々な疾患の原因となっている可能性があるとしている。

審査委員会は、申請者が今回の研究により、CLP36が絨毛細胞におけるストレスファイバー形成の鍵因子である事実を詳細な組織学的手法で初めて明らかにしたこと、更に、遺伝子操作による形態ならびに機能変化の解析から細胞骨格の形態調節における役割を解明したことを高く評価した。またその機能不全が様々な疾患に関わる可能性を示唆した点も高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) CLP36の胎盤内の局在について
- 2) CLP36の胎盤における発現の妊娠時期による変化について
- 3) 絨毛細胞に発現する特異抗原は何か
- 4) BeWo細胞と正常絨毛細胞の相違点は何か
- 5) らせん動脈内側に存在する絨毛細胞の特徴は何か
- 6) らせん動脈の血圧はどの程度か
- 7) CLP36遺伝子発現の誘導因子は何か
- 8) CLP36分子における α -アクチニンへの結合部位はどこか
- 9) GFP-CLP36分子中のGFPの位置はどこか
- 10) ストレスファイバーの構成蛋白は何か
- 11) ストレスファイバー形成に関わるシグナル伝達機構は何か
- 12) CLP36の遺伝子欠損動物の発現型の特徴は何か
- 13) CLP36の分子異常症は報告されているか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	浦野哲盟			
	副査	筒井祥博	副査	中川祐一	