

Localization of Ezrin in Cultured MDCK Cells

| | |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 呉, 一心 メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/10271/1034 |

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 181号 | 学位授与年月日 | 平成 7年 3月27日 |
| 氏名 | 呉 一 心 | | |
| 論文題目 | Localization of Ezrin in Cultured MDCK Cells (培養 MDCK 細胞におけるエズリンの局在) | | |

博士(医学) 吳 一心

論文題目

Localization of Ezrin in Cultured MDCK Cells

(培養 MDCK 細胞におけるエズリンの局在)

論文の内容の要旨

目的

エズリンはニワトリの小腸上皮微絨毛から初めて精製された分子量81kの蛋白質で、細胞骨格系蛋白質の一つと考えられている。その分子構造からエズリンはアクチン結合蛋白質の一つであることが理解されている。エズリンは広くいろいろな細胞に存在しているとされているが、この蛋白質の本来の機能についてはまだ不明である。本研究の目的は腎臓由来の細胞である MDCK 細胞を用いて、エズリン蛋白質の局在と分布をモノクローナル抗体で調べ、またアクチンとの関係を組織化学的に明らかにし、両者の関連性からエズリン蛋白質の機能を解明することである。

方法

抗エズリンモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的染色法を行った。細胞は MDCK 培養細胞を用い、直接スライドグラスに培養し、そのまま固定を行い蛍光抗体法を実施した。さらに、TRITCでラベルしたファロイジンと細胞との反応を調べ、アクチンフィラメントとの共存を二重染色法で調べた。細胞分画は MDCK 細胞のホモジネートをソルビトール密度勾配法により行った。各分画についてマーカー酵素の活性を調べ、蛋白質の SDS-電気泳動を行い、ウエスタンブロットによりエズリンの存在の確認を行った。さらに LR-ホワイト樹脂を用いた金コロイド免疫透過電顕法で MDCK 細胞におけるエズリン蛋白質の局在を観察した。

結果

抗エズリンモノクローナル抗体に対して MDCK 細胞が特異的に反応することがわかった。細胞ホモジネートを SDS-電気泳動後、ウエスタンブロットで調べると81Kの蛋白質のみが反応した。蛍光抗体法による免疫光顕はエズリン蛋白質が MDCK 細胞の微絨毛膜と細胞側底膜(その細胞接着部位)に局在することを示した。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察や蛍光による二重染色法から、エズリン蛋白質がアクチンフィラメントと同様な分布パターンを示すことがわかった。細胞膜分画法で得られた膜画分でもとくに側底膜に富むフラクションにエズリンの存在密度が高いことがウエスタンブロット法により確認された。

考察

これまでの報告ではエズリンの細胞における発現は主に細胞頂部の微絨毛に見られると思われてきた。今回の実験結果から、エズリンは MDCK 培養細胞の微絨毛膜だけでなく細胞の側底膜にも近接して存在することがわかった。実験に用いたモノクローナル抗体は MDCK 細胞の81K蛋白質と特異的に反応し、これがエズリンであることを他の抗体を用いて確認した。エズリン蛋白質は ERM ファミリー(Ezrin, Radixin, Moesin)に属する細胞膜裏打ち構造を構成している細胞骨格系蛋白質と考えられる。蛍光による二重染色法からエズリンの分布はアクチンフィラメントと同様に分布していることがわかった。MDCK 細胞は上皮系細胞株で、細胞極性維持のための骨格系蛋白質として機能していると思われる。従ってエズリンが MDCK 細胞の側部膜に接して局在していることは、細胞と細胞の接着に何らかの関与を示唆するものと考えられる。このアクチンフィラメントとの共存は上皮系細胞の頂

部の微絨毛のみでなく、極性の維持や細胞間の接着にエズリンのアクチン結合能が重要な意味を持つことを示唆していると思われる。

論文審査の結果の要旨

エズリン ezrin は ERM (ezrin, radixin, moesin) ファミリータンパク質の一員である。最近ではこれにさらに merlin (NF2 発現産物) が加わり、MERM ファミリーとも称される。これらは細胞膜タンパク質と細胞骨格を結びつけるタンパク質群であるとされている。ERM は N 末端側のアミノ酸配列で約 85%、C 末端側の配列で約 60% のホモロジーを示す。

ERM の生理機能に関する研究はまだ始まったばかりであり、研究者間で一致しない知見も多い。エズリンやモエシンは focal contact や adherens junction (AJ) には見出しえないという報告 (Franck, z.ら、1993) がある一方で、ERM は AJ にも微絨毛にもあるという報告 (Sato, N.ら、1992) がある。

申請者らは、イヌ尿細管細胞に由来する Madin-Darby canine kidney cell (以下 MDCK 細胞) を用いてエズリンの細胞内局在を再検討した。エズリンに対するモノクローン抗体は Chemical International Inc., USA よりえたものである (catalog#, MAB3056)。本抗体についてはすでに他の研究者らによる実績があるが、本研究でもウエスタンブロットで MDCK 細胞ホモジェネートタンパク質のうちエズリン (分子量 81K) に相当する単一のバンドと反応することを確認した。また、月田らの供与による抗体でも一致するバンドを検出した。本抗体はエズリンの C 末端のペプチド部分を抗原として作製されたものである。

培養後、固定し、Triton X-100 で透過化 (permeabilize) した MDCK 細胞を抗マウス IgG ヤギ抗体に FITC を共役させたもので処理している。共焦点レーザー顕微鏡で単層のコンフルエントな細胞を、頂部、中部、底部の 3 焦点面で観察することにより、蛍光が頂部 (微絨毛とタイト結合を含むと思われる)、中部 (側膜形質膜と AJ を含む) に著明で、底部には微弱であることが見出された。

細胞分画によってえられた側膜画分にも抗原が濃縮されていることがウエスタンブロットによって示された。また、アクチンと結合することの知られたファロイジンを TRITC で蛍光標識したものをを用い、エズリン抗原とアクチンが同じ分布パターンを示すことを確認した。

これらの結果はエズリンが側膜 (AJ を含む) にも存在していることを示唆しており、Franck らの知見より Sato らのそれを支持するものである。

以上の発表に対して次のような質疑ないし討論がなされた。

- 1) MDCK 細胞はどのような細胞であり、どのような培養形態を示すか
- 2) この研究に用いたエズリン抗体について
- 3) パラフィン包埋した試料は使えるか
- 4) 細胞底部にヘミデスモソームはみえないか
- 5) アクチンフィラメント像について
- 6) 細胞質にみえるエズリン抗原は可溶性のものなのかアクチン結合なのか
- 7) 金コロイド組織化学のバックグラウンドはどのようなものであるか
- 8) 単層を形成するまえの MDCK 細胞におけるエズリン分布はどうか
- 9) 微絨毛内でのエズリン局在はどのようにになっているか
- 10) 膜の分画で膜結合でないもの (エズリン) はどこに回収されるか

11) 正常の腎組織についてエズリン分布を調べたか

12) ノードマウスに MDCK 細胞を移植して生じるダクト(管)についてエズリン分布を調べてみたか

以上の質問に対する申請者の解答はおおむね適切であり、研究内容も博士(医学)の学位論文としての水準に達しているものと全員が判定した。

論文審査担当者 主査 教授 藤 田 道 也

副査 教授 喜 納 勇 副査 教授 馬 場 正 三

副査 助教授 右 藤 文 彦 副査 助教授 宮 本 愛