

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 大澤 宜明

p21^{WAF1} 遺伝子の発現は、がん抑制遺伝子の一つである p53 により発現が制御されており、哺乳動物細胞の増殖を調節する因子として重要な役割を果たしていると考えられる。本研究は、ヒト胎児由来の線維芽細胞 WI38 を用いて、IL-1 による p21^{WAF1} 遺伝子の発現への影響、その生物活性、また p21^{WAF1} の発現機構について検討し、下記の結果を得た。

1. 世代の異なる胎児ヒト線維芽細胞株 WI38 における細胞の増殖性を比較したところ、継代早期の細胞は増殖した後、定常状態を示すのに対して、継代を重ねた細胞は増殖し続けることを示した。さらに、UV(20 J/m²)及び actinomycin D (5 µg/ml)刺激では、継代早期の細胞でのみ p53 タンパク質の発現が上昇することを Western blotting により示した。
2. IL-1(100 U/ml)の刺激により p21^{WAF1} タンパク質の発現は継代を重ねた細胞でのみ顕著に上昇するが、継代早期の細胞では上昇は認められなかった。継代を重ねた細胞での IL-1 による p21^{WAF1} の発現は刺激後 3 時間で増加し、6 時間で最大を示した。刺激後 24 時間でも p21^{WAF1} タンパク質は、無刺激状態のものと比較して高い事を示した。IL-1 の刺激に対する p53 の発現の変化は両細胞で共に認められなかった。
3. 継代を重ねた WI38 での p21^{WAF1} mRNA は恒常的に発現し、さらに、IL-1 の刺激により、濃度依存的に上昇する事を Northern blotting により示した。継代を重ねた WI38 を無血清状態で 48 時間培養して G0/G1 期に同調させた後、再び血清刺激にて細胞周期を進行させた際の各期の割合を解析した。IL-1 存在下での細胞周期の進行は非存在下と比較して、差は認められない事から IL-1 による p21^{WAF1} タンパク質の発現の上昇は細胞周期の進行に影響を

与えないことを示した。

4. 抽出したタンパク質より抗 p21^{WAF1} 抗体で p21^{WAF1} タンパク質を免疫沈降法により回収した。SDS-PAGE を行い、抗 Cdk2, 4, 6 抗体を用いて Western blotting を行った。Cdk2、Cdk4 及び Cdk6 と結合した p21^{WAF1} の量が IL-1 により増加する事を示した。さらに、Cdk-p21^{WAF1} 複合体による、標的タンパク質のリン酸化の阻害作用について検討した。ヒストン H1 を外的基質とした kinase assay では誘導された p21^{WAF1} による基質のリン酸化の阻害は認められなかった。
5. Cdk によりリン酸化調節を受ける細胞内標的タンパク質の一つである、retinoblastoma gene product (Rb) について、電気泳動の移動度の違いによるリン酸化の差を検討した。IL-1 は Rb のリン酸化に影響を与えなかった事から IL-1 により誘導された p21^{WAF1} は Cdk と複合体を形成するが、活性を阻害できない事を示した。
6. p21^{WAF1} の標的タンパク質群である Cdk2、Cdk4、および細胞周期タンパク質群である cyclin E、cyclin D1、さらに Cdk2 と結合する cyclin A, cyclin E は IL-1 の刺激による発現の変化は認められなかった。p21^{WAF1} ファミリーの Cdk inhibitor である p27^{Kip1} タンパク質の発現が IL-1 の刺激により減少する事を示した。
7. p21^{WAF1} 発現ベクターを継代を重ねた細胞に導入し、Hygromycine B 処理にて stable transfectant を得た。p21^{WAF1} を強制発現させたもの及びコントロールベクターのみを導入したものとでの増殖に顕著な差は認められなかった事から、継代を重ねた WI38 で p21^{WAF1} を強制発現させた際の増殖阻害効果は認められなかった。
8. Transcriptional run-on assay により、継代を重ねた WI38 細胞では IL-1 の刺激により p21^{WAF1} RNA の転写が増加する事を示した。p53 タンパク質の増加は認められない事から、IL-1 により誘導される p21^{WAF1} の発現は p53 に依存しない発現経路により誘導されている可能性が示唆された。さらに p53 結合部位を持った CAT reporter gene を electroporation 法により細胞内に導入した後に CAT assay を行った。wt p53 を強制発現させた細胞では CAT reporter gene の活性が増加したのに対し、IL-1 の刺激では増加は認められ

なかった。さらに、Gel-shift assay により p21^{WAF1} promoter 領域に存在する p53 結合部位との結合能を調べところ、IL-1 による p53 タンパク質の結合能は増強されないことを示した。これらのことから、IL-1 により誘導される p21^{WAF1} は p53 タンパク質の転写活性化を伴わない事を示した。

以上のように、本論文は継代を重ねた胎児ヒト線維芽細胞株 WI38 において、contact inhibition がかからない状態の解明を行い、IL-1 により誘導される p21^{WAF1} の発現機構及び作用が、従来の知見とは全て異なった状態及び動態であることを明らかにした。本研究は、継代を重ねて contact inhibition がかからない状態の細胞の増殖機構及び細胞周期調節因子の発現機構の解明に関して重要な貢献をなしたと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。