

論文審査の結果の要旨

氏名 鈴木 亨

本論文は細胞増殖抑制因子である Tob 蛋白質が細胞周期進行において果たす役割の解明について述べられている。本論文の内容を要約すると以下のようなになる。

論文提出者はマイクロインジェクション法を用いて、Tob を細胞に過剰発現させると細胞周期の静止期から DNA 合成期への進行が抑制されることを示した。さらに静止期の細胞を血清刺激することで細胞周期を開始させ、M 期まで進行させたときの様々な経過時間における培養細胞抽出液のウエスタン解析により、Tob 蛋白質は細胞周期進行開始後すぐにリン酸化を受け、その後 G 1 中期で分解され、S 期終了時再び発現が上昇してくるという発現様式であることを示している。以降はリン酸化に注目し、Tob のリン酸化は静止期の細胞を PDGF や EGF などの増殖因子で刺激することにより誘導され、さらにシグナル伝達構成因子に対する特異的阻害剤やドミナントネガティブ体を用いた実験により Ras/MEK/MAPK の経路が Tob のリン酸化に関与していることを明らかにした。その結果をふまえた上でゲル内リン酸化反応を行い、Tob をリン酸化する酵素として MAPK ファミリーの Erk1/2 を同定し、実際に Erk1/2 は試験管内では Tob をリン酸化することを示した。リン酸化部位の決定も行っているが、その手順として様々な欠失体の作製と細胞内でリン酸化させた Tob のリン酸化ペプチドマッピングによって候補を絞り、次いで Tob のリン酸化を特異的に認識する抗体を作製することによって各部位にリン酸化が入っていることを直接確認している。

Tob のリン酸化の意義に関しては、増殖抑制因子であることからその抑制活性の制御にかかわるのではないかという仮説をたて、リン酸化型を模倣するとされる変異体を作製し、先と同様マイクロインジェクション法によりその抑制活性について検討を行った。その結果、リン酸化型を模倣する Tob は野生型およびリン酸化を受けない変異体に比べ増殖抑制活性が減少していることを示す結果を得た。また Tob の生理機能について検討するため、すでに作製されている tob 遺伝子欠損マウスから樹立した細胞を利用した実験もあわせて行った。これまでに得られた知見から、Tob の増殖抑制活性は細胞が静止期にいる際、増殖因子刺激非依存的な増殖を行わせないために発揮されるという仮説をたてた。野生型、および tob 遺伝子欠損

細胞を血清飢餓状態にすると野生型細胞は静止期に入るのに対し、*tob* 遺伝子欠損細胞では静止期に入らず DNA 合成期まで進行する割合が有意に増加しているという結果を得、その結果が支持された。すなわち *Tob* は細胞が静止期に止まっていることに必要であり、増殖因子によって活性化された MAPK が *Tob* をリン酸化するとその抑性能が解除され、細胞周期が進行するという制御機構の存在が示唆された。*Tob* は増殖因子刺激に応じた細胞周期進行の開始を厳密に行うための重要な因子である可能性が考えられる。

以上、論文提出者は増殖抑制因子 *Tob* のリン酸化による活性制御という側面から、細胞周期進行における新たな制御機構の存在を提示した。細胞周期の制御と細胞の癌化には密接な関係があると考えられていることから、本論文は細胞増殖の機構とともに癌化機構の解明にも寄与する研究であると考えられた。したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。

なお、本論文は都竹 順子氏・松田 覚氏・吉田 富氏・山本 雅氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。