

## [別紙 2]

### 審査の結果の要旨

氏名 西森 茂樹

本研究は細胞周期の G1 期において重要な役割を演じていると考えられている CDK 阻害因子 (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor : CKI) の 1 つである p57<sup>Kip2</sup> の細胞内分解機構を明らかにするため、マウス新生児の頭頂骨から採取した初代培養骨細胞 (osteoblastic cell) の系を用いて、p57<sup>Kip2</sup> の分解に関わる細胞内情報伝達系の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. p57<sup>Kip2</sup> は 7 種の CKI のうち、ただ一つノックアウトマウスが重篤な表現系を呈し、生後半日で死亡するが、細胞内での発現量が低いことが難点となり、他の CKI に比べ、研究が十分に進んでいない状態にあった。我々は初代培養骨細胞を血清飢餓下で培養すると、p57<sup>Kip2</sup> が著明に増加することを示した。
2. この細胞に TGF- $\beta$ 1 を添加すると、蓄積した p57<sup>Kip2</sup> が 24 時間後に消失した。この過程がプロテアソーム阻害薬によって阻害されることを示し、プロテアソームによる分解系に関わることが示された。
3. Pulse Chase Study の結果、TGF- $\beta$ 1 刺激で p57<sup>Kip2</sup> の分解が促進され、TGF- $\beta$ 1 非刺激では p57<sup>Kip2</sup> は比較的安定であった。また、Northern Blot では、TGF- $\beta$ 1 刺激後 24 時間で、p57<sup>Kip2</sup> の mRNA 量は幾分減少するものの、p57<sup>Kip2</sup> 蛋白の消失は説明出来なかった。以上の 2 点より、TGF- $\beta$ 1 による p57<sup>Kip2</sup> の消失は主に分解によることが示された。
4. TGF- $\beta$ 1 の細胞内情報伝達系として、最もよく研究されている Smad pathway の関与を、アデノウイルス発現ベクターを用いて検討した。  
(4-1) 活性型 TGF- $\beta$ 1 Type I レセプターを血清飢餓下の初代培養骨細胞に過剰発現させると、感染 72 時間後に TGF- $\beta$ 1 刺激と同様に p57<sup>Kip2</sup> が分解され、p57<sup>Kip2</sup> が TGF- $\beta$ 1 Type I レセプターの下流で確かに分解されることが示された。

(4-2) 抑制型 Smad (Smad7) の過剰発現をさせると、TGF- $\beta$ 1 刺激あるいは活性化型 TGF- $\beta$ 1 Type I レセプター過剰発現による p57<sup>Kip2</sup> の分解亢進を阻害した。Smad7 により p57<sup>Kip2</sup> の分解が阻害されたことは Smad pathway の関与が示唆された。

(4-3) TGF- $\beta$ 1 レセプター下流の Smad 以外の情報伝達因子として報告されている因子のうち、p38 MAP kinase または MAP kinase kinase (MAPKK) の阻害薬を加えても、TGF- $\beta$ 1 による p57<sup>Kip2</sup> の分解は阻害されず、この点でも主として Smad pathway が関与することが示された。

(4-4) Smad2+Smad4、あるいは Smad3+Smad4 を血清飢餓下の初代培養骨細胞で過剰発現させると、感染 96 時間後に p57<sup>Kip2</sup> の分解が見られ、さらに、Smad2+Smad4 +Smad7、あるいは Smad3+Smad4+Smad7 と抑制型 Smad も共発現させると p57<sup>Kip2</sup> の分解が抑制され、Smad pathway 関与の可能性がさらに確実となった。

(4-5) p57<sup>Kip2</sup> の分解が Smad Pathway によるならば、最下流では、転写に関わるはずであるが、TGF- $\beta$ 1 による p57<sup>Kip2</sup> の分解誘導は、転写抑制剤 Actinomycin D あるいは  $\alpha$ -Amanitin の付加によって抑制され、この過程が転写を介することが示された。

5. 以上の結果から、初代培養骨細胞における TGF- $\beta$ 1 による p57<sup>Kip2</sup> の分解には、仲介因子として Smad による細胞内情報系が関与し、その作用は遺伝子の転写を介することが明確になった。

以上、本論文はマウス新生児由来の初代培養骨細胞系の系が、p57<sup>Kip2</sup> の実験系として有用であることを示し、TGF- $\beta$ 1/Smad pathway の解析から p57<sup>Kip2</sup> の細胞内分解のメカニズムを明らかにした。本研究はノックアウトマウスが重篤な表現系を呈するにも関わらず、これまで十分に研究が進んでいなかった p57<sup>Kip2</sup> の解析に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。