

## 審査の結果の要旨

氏名 大河内謙太郎

本研究は受容体型チロシンキナーゼ ErbB-2 の下流のシグナル伝達を解明するため、ErbB-2 受容体の細胞内膜近傍領域での会合分子としてクローニングされた増殖抑制性タンパク質 Tob の生理機能の解析を試みたものである。コンセンサス配列をもたず、過剰発現によってのみ増殖抑制能を呈するものの、内在性の蛋白質の検出が困難な Tob の分子機能の解明は極めて難航していたが、新規 Tob 結合蛋白質の同定を手がかりとして下記の結果を得ている。

1. Tob に会合する分子として、far-western screening 法による Jurkat leukemia cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、Tob homology domain への会合分子の候補として、poly(A)-binding protein (PABP) 及び T 細胞活性化刺激で発現が誘導される PABP のホモログである inducible poly(A)-binding protein (iPABP) の二種類の蛋白質を同定した。これら PABP 及び iPABP との相互作用を *in vitro* 及び *in vivo* で確認した結果、Tob はこの両者と結合するが、特に iPABP とより強く結合する事を示した。さらに iPABP の C 端側の様々な deletion mutant を用いて免疫共沈した結果、iPABP の 580-605 番目のアミノ酸が Tob との結合に必要である事を明らかにした。
2. 次に iPABP の C 端側と Tob との会合の生理的意義を解析する手がかりとして、まず poly(A) tail をもつ細胞質の IL-2 mRNA への iPABP タンパク質の影響を *in vitro* translation 系を用いて調べた結果、iPABP が ヒト IL-2 mRNA の翻訳効率を上昇させ、Tob がこの効果を抑制する事、またこの Tob による IL-2 mRNA の翻訳調節には、iPABP の C 末端の Tob 結合配列及び IL-2 mRNA の 3'UTR より下流の配列が必要である事を示した。またコントロールの luciferase mRNA ではこれらの翻訳制御は観察されなかった。iPABP の代わりに PABP を用いて行った同様の実験では IL-2 の翻訳への影響はやや iPABP よりも弱いものの同様な結果が得られた。

3. さらに、内在性の IL-2 mRNA の影響を受けない動物細胞での *in vivo* 実験系で Tob による IL-2 mRNA の翻訳制御機構を解析する為に、iPABP を恒常的に発現する NIH3T3 細胞株を樹立し、これに Tob を過剰発現させて IL-2 及びコントロールの GST の発現への影響を調べた。この結果 Tob の過剰発現により IL-2 mRNA の生成は減少しなかったが、IL-2 タンパク質の生成は抑制する事を確認した。つまり、過剰発現された Tob は IL-2 の産生を転写後調節により抑制すると考えられた。内在性に多く存在する PABP の影響について iPABP との比較をするとより厳密な議論が可能であったがより優れた実験系の構築は *in vivo* では困難であった。
4. この Tob による IL-2 発現の転写後調節の分子メカニズムをさらに詳しく調べる為に、ショ糖密度勾配を用いたポリソーム分画を解析した。過剰発現させた Tob は IL-2 mRNA への 60S ribosome のエントリー障害をおこし、40S ribosome の集積が認められた。つまり Tob による IL-2 mRNA へのリボソームのエントリー抑制でのタンパク合成阻害が転写後調節による蛋白の発現抑制の原因の一つである事を示唆する結果を得た。
5. 最後に、新鮮なヒト末梢血から T 細胞を採取して内在性の Tob 及び iPABP について調べた。ヒト末梢血 T 細胞への抗 CD3 単独のアナジー誘導性刺激では、Tob の発現が約 6 時間をピークに誘導され iPABP とも会合するが、抗 CD3 及び抗 CD28 による活性化刺激では、Tob の発現誘導も iPABP との会合も確認されなかった。Tob はユビキタスであるが不安定であり内在性の蛋白質の検出が困難であったが、アナジー誘導性刺激では強く発現誘導されることが確認された。また一連の解析により、Tob がヒト T 細胞アナジーの成立過程初期において早期に発現誘導され、転写後調節レベルでの抑制因子として働くとする作業仮説を呈示するに至った。

以上、本論文は機能未知の Tob に結合する分子の新規同定及びその相互作用がもたらす生理的意義に関する解析を行った点で他の Tob の研究に類を見ない新しい進展といえる。IL-2 以外の増殖因子や他の Tob ファミリー間でのターゲット特異性に関してのより広範な解析が将来的な課題ではあるが、Tob の細胞増殖抑制の分子機能の解明への糸口を見出した点で、今後の Tob ファミリーの研究に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。