

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 孫 偉勇

本論文は、申請者らが新規に単離・同定した分子である PAL31 の機能解析の結果を論じたもので、二章より構成されており、要約すれば以下ようになる。

第一章では、細胞増殖と PAL31 の発現および機能との関係が解析された。まず、ラットリンパ腫由来細胞株 (Nb2 および BAF3) を用い、これらの細胞における PAL31 mRNA の発現が、それぞれの細胞の増殖を促進する因子の濃度に依存して誘導されることを明らかにした。また、増殖刺激を与えない静止期では PAL31 発現量は低下していた。次に、フローサイトメーターを用い、Nb2 細胞では PAL31 mRNA の発現は G1/S 期に増加し、S 期にピークに達し、G2/M においてもその発現が維持されていることを明らかとした。さらに、PAL31 に対する特異的なポリクローナル抗体を作製し PAL31 タンパクの増減を調べた結果、PAL31 の発現量は S 期に最も高く、しかも核に存在していることがわかった。PAL31 の機能を、培養 Nb2 細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチド (アンチセンス) あるいはセンスオリゴヌクレオチド (センス) を添加して解析した結果、センス処理区では細胞数に影響がなかった一方で、アンチセンス処理により生存細胞数が著しく減少した。また、センス処理した Nb2 細胞の 69% が S 期に入ったのに対し、アンチセンス処理区では 34% しか S 期に入れなかった。

以上の結果より、PAL31 の発現制御機構は細胞増殖シグナルの下流に存在し、細胞周期依存的に制御されていること、および、その機能が G1/S 期への進入に必要な因子であることが示された。

第二章では、PAL31 の発現制御が可能な系を作出しさらに PAL31 の機能解析が試みられている。まず、Rat1 細胞株に PAL31 発現ベクターを導入し、PAL31 の発現をテトラサイクリン依存的に調節できる株 A34 と B27 を作製した。これらの株で PAL31 の発現を誘導すると、S 期へ進入する細胞が約 1.5 倍に増えていた。また、PAL31 の発現量依存的なアポトーシス像の減少も確認された。Nb2 細胞のアンチセンス処理においても、アポトーシスを起こした細胞が認められていることから、PAL31 はアポトーシスを抑制する機能も持つと考えられた。

PAL31 とアポトーシス誘導系との関係を解析した結果、PAL31 はカスパーゼの活性を抑制することが明らかになった。カスパーゼはアポトーシスが起こる際に細胞内で活性化されるシステインプロテアーゼであり、様々な細胞死の刺激によって活性化する。PAL31 はカスパーゼの活性を阻害し、各種の細胞死を

抑制することから、細胞死実行経路の主要な部分に PAL31 が深く関与することが示唆された。

興味深いことに、アポトーシスを誘導した Rat1 細胞では、本来の分子量よりも低分子のタンパクが抗 PAL31 抗体によって検出された。アポトーシスを引き起こす刺激によりカスパーゼのカスケードが活性化され、さまざまな細胞内タンパク質が分解される。PAL31 には、カスパーゼ 3 により切断されうるアミノ酸配列が含まれることから、カスパーゼ 3 により切断されることが考えられた。実際、GST-PAL31 融合タンパクを精製し、*in vitro* でカスパーゼ 3 と共に反応させると、Rat1 細胞で見られたものに相当する低分子量の切断片を生じた。このことから、PAL31 は、カスパーゼ 3 により切断されることが分かった。しかし、カスパーゼの阻害剤である Z-VAD は PAL31 の分解を阻害できなかった。これらを考え合わせると、PAL31 はカスパーゼ 3 により切断されるが、それ以外の未同定の PAL31 分解因子も存在することが示唆された。

以上の結果から、新規分子 PAL31 は細胞増殖とアポトーシスのバランスを保つために重要な分子であると考えられる。アポトーシスの制御不全は多くのヒト疾患の病因に関与しており、アポトーシスの実行因子カスパーゼの阻害タンパクである PAL31 は治療薬開発の標的となる可能性も考えられる。また PAL31 はリンパ腫細胞での発現が高いことから、発癌機構との関連性も考えられ、今後の細胞周期研究および癌研究の新たな標的分子になり得る。本研究による発見は、細胞周期および細胞死の執行機構を理解・解明していく上で重要な知見で、応用動物学領域に貢献しているところが少なくない。よって、審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。