

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 柏 木 麻 里 子

本研究は上皮細胞の終末分化に伴う細胞周期停止の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。ケラチノサイトの終末分化および細胞周期の G1 期停止を誘導するプロテインキナーゼCの η 分子種を中心に解析をおこない、下記の結果を得た。

第一章

1. ヒト正常角化細胞 (Normal Human Keratinocytes; NHK) に過剰発現させた野生型および酵素活性欠如型の η 分子種が、cyclin E/cdk2/p21 複合体と結合することが明らかとなった。BALB/MK2 マウスケラチノサイト細胞において、内在性の η 分子種が cdk2 複合体と結合することが確認された。 η 分子種と cyclin E、cdk2 は、細胞質および核膜周辺で共局在することが確認された。
2. 野生型 η 分子種の発現にともない、NHK 細胞において cdk2 活性が顕著に低下することがわかった。野生型 η 分子種による cdk2 活性の低下は、 η 分子種と cdk2 複合体を *in vitro* で混合した場合にも確認された。酵素活性欠如型の η 分子種は、cdk2 活性を低下させないことがわかった。
3. 野生型 η 分子種の発現にともない、高リン酸化型の Rb タンパクが顕著に減少し、低リン酸化型の Rb タンパクが増加することがわかった。酵素活性欠如型の η 分子種の発現によっては、高リン酸化型 Rb タンパクの減少は認められなかった。
4. 野生型 η 分子種の発現により、リン酸化 cdk2 が減少すること、酵素活性欠如型 η 分子種の発現では、リン酸化 cdk2 量は変化しないことが確認された。リン酸化 cdk2 の減少は 160 番目の Thr (T160)の脱リン酸化によるものであることが、明らかとなった。しかし、T160 をリン酸化する CAK kinase の発現、酵素活性には変化は認められなかった。

第二章

1. PKC η -cyclin E/cdk2/p21 複合体内の p21 と 20kD のタンパクが、PKC の活性化剤依存的にリン酸化されることがわかった。
2. p21 の η 分子種によるリン酸化サイトは、146番目の Ser (S146)であることがわかった。p21 は、PKC の δ 分子種によっても S146 と S153 がリン酸化されること、 α 分子種によってはリン酸化されないことがわかった

3. S146 のリン酸化によって p21 の PCNA との結合能が阻害されることがわかった。
4. S153 のリン酸化によって p21 の核移行が阻害されることがわかった。

以上、本論文は PKC の η 分子種が cyclin E/cdk2/p21 複合体に結合し、cdk2 活性を阻害、Rb 蛋白のリン酸化を抑えることでケラチノサイトの細胞周期の G1 期停止を誘導していることを見いだした。cdk2 活性の抑制には、 η 分子種の酵素活性が重要であり、PKC η -cyclin E/cdk2/p21 複合体内に基質が存在する可能性が考えられた。基質の候補として、p21 および 20kD のタンパクが確認された。

PKC が cyclin/cdk 複合体に結合し、細胞周期を直接制御しているという知見はこれまで全く発表されていない。PKC による細胞周期制御は、PKC 及び細胞周期の両研究分野において非常に価値の高い研究成果であり、学位の授与に値すると考えられる。