

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 上 田 章 子

本研究ではポリアミン生成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の阻害剤である α -difluoromethylornithine (DFMO) の pRb を発現していない細胞の増殖および細胞周期に対する効果およびその機構についてヒト網膜芽細胞種 (Y79) を用いて初めて解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. DFMO 無添加 (コントロール)、5 mM DFMO、5 mM DFMO および 20 μ M プトレシンを添加した 3 群を比較して増殖抑制効果を解析した。72 時間後および 96 時間後に 5 mM DFMO 群の細胞数はコントロールに比して有意に抑制された。この効果は 20 μ M プトレシン添加により完全に回復し、DFMO の増殖抑制効果がポリアミン特異的に引き起こされていることが示された。生存率はいずれの群においても変化はなかった。すなわち DFMO は細胞死を引き起こさなかった。そこで、DFMO による細胞周期への効果を解析した。48 時間後および 72 時間後に DFMO (5 mM) は細胞周期の G1 期および S 期停止を引き起こした。
2. 細胞周期を制御する主要なファミリーである CDK インヒビターおよび pRb ファミリー蛋白の発現の変化を調べた。CDK インヒビターのうち p27 の発現

が DFMO により増加していることが確認された。pRb が Y79 において発現していないことをウエスタンブロットで確認した。次に p107 の発現について解析したところ、DFMO は p107 の脱リン酸化を引き起こした。P130 についてはリン酸化、発現量ともに変化はみられなかった。

3. p107 は転写因子 E2F-4、c-Myc、B-Myb と結合してそれらの転写活性を抑制することにより細胞周期を制御すると考えられているため E2F-4、c-Myc、B-Myb との複合体につき免疫沈降法で調べた結果、p107 と E2F-4 との複合体が DFMO 処理により増加していた。なお、p107 と c-Myc および B-Myb との複合体は検出できなかった。また、p107 と E2F-1, 2, 3, 5 の結合についても解析したが、いずれの複合体も検出できなかった。
4. ゲルシフト法にて E2F 結合配列への p107-E2F-4 複合体の結合の増加を確認した。また E2F プロモーター活性への効果をレポーターアッセイにより解析したところ、E2F プロモーター活性が DFMO により有意に抑制されていることが判明した。

以上、本論文は DFMO が pRb を発現していない細胞の増殖を抑制することを初めて報告したとともに、その細胞周期制御において pRb によらない新しい機構を提唱するものであり、今後の研究に大きく貢献するものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられた。