

審査の結果の要旨

氏名 小川原 陽子

Akt は種々の増殖因子やサイトカインの刺激などにより活性化し、基質のリン酸化を介して生存、増殖を促進することが様々な系で知られている。Akt はウイルス性癌遺伝子 v-Akt の細胞性ホモログとして同定されたセリン/スレオニンキナーゼであり、様々な癌において活性化や遺伝子増幅していることが報告されている。Akt による癌化においては、その生存・増殖促進能が寄与していると考えられるが、Akt が生存、増殖を促進するメカニズムの全容は必ずしも明らかになっていない。

細胞は DNA 損傷を受けると、その損傷が少ない場合には細胞周期の停止を誘導し DNA 損傷の修復を行う。損傷が甚大な場合にはアポトーシスを誘導し、DNA に変異が蓄積して細胞が癌化することを防いでいる。その際に中心的な役割を果たしているのが癌抑制遺伝子 p53 と E2F1 である。p53 は細胞が DNA 損傷を受けた際に活性化し、細胞周期の停止やアポトーシス、DNA 損傷の修復を誘導する転写因子である。また、細胞周期の G1→S 期の進行に重要な E2F1 も、細胞が DNA 損傷を受けた際に活性化してアポトーシスを誘導する転写因子である。当研究室では、Akt が etoposide や γ 線照射等の DNA 損傷により誘導されるアポトーシスを抑制することを見い出している。DNA 損傷依存的アポトーシスの抑制は Akt による癌化促進に寄与していると考えられることから、そのメカニズムを解明することにより、癌治療への応用につながることを期待される。そこで本研究では、Akt が DNA 損傷依存的なアポトーシスを抑制するメカニズムを解明することを試み、p53 と E2F1 に着目して解析を行った。

第 1 章では、研究の背景、既往の研究および本研究の意義について述べた。

第 2 章では、Akt による Mdm2 リン酸化を介した p53 制御について解析した。当研究室では既に、細胞に p53 を発現することにより誘導されるアポトーシスが、恒常的活性型の Akt を共発現させることにより抑制されることを見い出している。そこで、Akt がどのようなメカニズムで p53 により誘導されるアポトーシスを抑制しているのかを検討した。まず、Akt が p53 タンパク質の分解を促進することを明らかにした。その際の Akt の基質を検討し、p53 のタンパク質量の制御において中心的な役割を果たすユビキチンリガーゼ Mdm2 に注目した。Mdm2 は p53 をユビキチン化し 26S プロテアソーム系による分解を促進することにより、p53 分解において重要な役割を果たしている。Mdm2 には Akt によるリン酸化の基質のコンセンサス配列が Ser166 と Ser186 に存在し種間で幅広く保存されており、Akt が実際にこれらの Mdm2 のサイトをリン酸化することを *in vivo* および *in vitro* で示した。次に、Akt が Mdm2 をリン酸化することによる Mdm2 の p53

に対するユビキチンリガーゼ活性への影響を調べるために MCF7 細胞において *in vivo* ユビキチン化アッセイを行い、Akt が Mdm2 の Ser186 依存的に p53 のユビキチン化を促進することが明らかにした。さらに、Akt が Mdm2 リン酸化を介して p53 のタンパク質を制御しているかどうかを調べ Akt が Mdm2 の Ser186 依存的に p53 タンパク質の量を減少させていることを明らかにした。以上の結果から、Akt が Mdm2 の Ser186 をリン酸化することにより Mdm2 の p53 に対するユビキチンリガーゼ活性を上昇させ、p53 タンパク質の分解を促進することが示唆された。

第 3 章では、Akt による Mdm2 リン酸化を介した E2F1 制御について解析した。まず、Akt が E2F1 タンパク質を制御しているかどうかを調べ、Akt が E2F1 タンパク質の量を減少させていることを示した。Akt がどのようにして E2F1 タンパク質の量を減少させているのかを検討し、E2F1 タンパク質減少への関与が示唆されている Mdm2 に着目した。Mdm2 を発現させると E2F1 タンパク質の量が減少すること、および、Mdm2 をノックダウンもしくはノックアウトすると E2F1 タンパク質の量が増えることから、Mdm2 が E2F1 タンパク質を減少させるのに必要かつ十分であることが明らかになった。さらに、Mdm2 が E2F1 に対するユビキチンリガーゼであること、そして Akt が Mdm2 の Ser166 と Ser186 をリン酸化することにより Mdm2 の E2F1 に対するユビキチンリガーゼ活性を上昇させていることが *in vivo* および *in vitro* でユビキチン化アッセイを行うことにより明らかになった。

第 4 章では、本研究を総轄し、今後の研究の展望を述べた。

以上のように、提出者は、Akt が DNA 損傷依存的なアポトーシスを抑制するメカニズムを解析し、そして Akt が Mdm2 をリン酸化することにより p53 と E2F1 の分解を促進していることを示した。これらの成果は、Akt の活性化や遺伝子増幅は癌の悪性化と密接に関連していることから、今後新たな癌治療法の開発へとつながることが期待されるものである。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。