

審査の結果の要旨

氏名 望月俊宏

本研究は癌の発生、進展の課程で中心的な役割を果たしていると考えられる遺伝子異常の蓄積において個々の遺伝子異常がどのように関連、協調しているかを明らかにするため、協調的発癌作用を示すことが知られている Myc 遺伝子と Pim-1 遺伝子の協調作用の機構解明を、c-Myc 依存性アポトーシスに対する Pim-1 の効果を調べることにより協調的発癌のメカニズム解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ラット線維芽細胞由来細胞株 Rat-1 細胞ならびに血清除去により効率よくアポトーシスを誘導できる c-Myc 高発現 Rat-1 細胞 (Rat-1/c-Myc) に遺伝子導入することにより Pim-1 を過剰発現する Rat-1/Pim-1 細胞ならびに Rat-1/c-Myc/Pim-1 細胞を樹立した。またこれらの細胞株を用いて血清除去によるアポトーシス誘導実験を行った結果、Pim-1 の単独発現では血清除去下でもアポトーシスを誘導しないこと、Pim-1 は血清除去による c-Myc 依存的アポトーシスを抑制せず、むしろこれを増強することが示された。
2. Pim-1 の 67 番目のリジン残基をメチオニンに置換することでセリン/スレオニンキナーゼ活性を失くした変異体 Pim-1(K67M) を作成し、その発

現ベクターを Rat-1/c-Myc 細胞に導入し Rat-1/c-Myc/Pim-1(K67M) 細胞を樹立した。これらの細胞株を用いて血清除去によるアポトーシス誘導実験を行った結果、Pim-1 による c-Myc 依存性アポトーシスの増強にはそのキナーゼ活性が必要であることが示された。

3. Pim-1 による c-Myc 依存性アポトーシスの増強に Caspase-3 様プロテアーゼの活性化が要求されるかどうかを検討した結果、Pim-1 は c-Myc 過剰発現下での血清除去による Caspase-3 様プロテアーゼの活性化を増強することによりアポトーシスを増強していることが示された。
4. Pim-1 キナーゼに結合する細胞性蛋白質の検索を GST と Pim-1 の融合蛋白質を用いて行った所、約 65kDa の蛋白質が Pim-1 に特異的に結合することが明らかとなり、さらにウエスタンブロッティング解析の結果、この約 65kDa のバンドには少なくとも c-Myc の転写標的遺伝子産物で細胞周期関連フォスファターゼである Cdc25A を含んでいることが示された。また Pim-1 と Cdc25A は免疫沈降反応により *in vitro* だけでなく *in vivo* でも同様に結合することが示された。
5. *in vitro* kinase assay、phosphatase assay の結果 Pim-1 が Cdc25A をリン酸化すること、Pim-1 によってリン酸化された Cdc25A はそのフォスファターゼ活性が上昇することが示された。
6. 遺伝子導入により Cdc25A 単独あるいは Pim-1、Pim-1(K67M)とともに Cdc25A を過剰発現する細胞(Rat-1/Cdc25A、Rat-1/Cdc25A/Pim-1、Rat-1/Cdc25A/Pim-1(K67M))を樹立した。これらの細胞の足場非依存性増殖能と血清除去によるアポトーシス誘導に対する感受性を調べた結果、

Cdc25A の過剰発現が足場非依存性増殖とアポトーシス感受性の両者を誘導すること、Pim-1 がそのキナーゼ活性依存的に Cdc25A による足場非依存的増殖ならびにアポトーシス感受性の誘導を増強することが示された。

以上、本論文は Pim-1 キナーゼが c-Myc の標的分子である Cdc25A と結合し、リン酸化を介してその活性を上昇させることによって Cdc25A のもつアポトーシス誘導能やトランスフォーメーション能等の生物学的機能を増強していることを明らかにした。本研究はこれまで提唱されていたアポトーシス抑制に基づく協調的発癌のメカニズムとは異なり、Pim-1 が c-Myc の標的遺伝子産物である Cdc25A を活性化することによるという全く新しいモデルの提唱につながるものであり、多段階発癌で見られる癌遺伝子産物間の相互作用の分子レベルでの理解に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る。