

## 審査の結果の要旨

氏名 荒川 志穂

本研究では、発がんの根底機構を解明する上で非常に重要な、足場シグナルによる細胞の G1-S 期遷移制御様式を解析するため、足場消失時と同様の表現をもたらした PI3K の阻害剤である LY294002 (LY) 処理を施し、以下の結果を得ている。

1. PI3K の阻害剤である LY294002 (LY) で処理すると、NRK は G1 期に停止し、特徴的に Cdc6 タンパク質の発現が消失した。この現象は EGF+TGF- $\beta$  (E T) 刺激によって回復したが、PI3K の活性阻害そのものを解除したためではなかった。この LY 処理による G1 停止時の Cdc6 の発現消失が、いかなる機構でもたらされているかを検討したところ、通常 of 細胞周期中とは異なることが明らかになった。LY 処理による G1 停止時の Cdc6 発現消失は転写抑制によってももたらされているが、CMV プロモーターを用いて Cdc6 を恒常的に発現させても LY 処理によって Cdc6 の消失は起こる事から強力なタンパク質分解系が働いている事が示された。また、この Cdc6 分解は、ALLN で処理した場合に最も効率よく抑制されたことから、パパイニン族タンパク質分解酵素によってもたらされていることが明らかとなり、足場消失時と同様のメカニズムである可能性が示唆された。
2. Cdc6 分解をもたらす酵素はパパイニン族タンパク質分解酵素の中 of の酵素であるのかを更に詳細に検討した。カテプシン L 特異的阻害剤によって、LY 処理による Cdc6 分解は抑制された。また、*in situ* of のカテプシン L 活性測定によっても、LY 処理による細胞質内カテプシン L の活性が認められた。さらに、ALLN や ET 刺激によってカテプシン L の活性は消失し、このことは Cdc6 分解と相関があった。これらより、Cdc6 分解をもたらす酵素はカテプシン L もしくはその類似体であることがわかり、LY 処理によって抑制を受けるシグナル経路と足場消失によって抑制をうけるシグナル

経路およびその下流の Cdc6 発現の制御機構は同一である可能性が極めて高いと考えられた。

3. Cdc6 分解を制御するシグナルをさらに詳細に解析を行った。LY294002 は PI3K の他に mTOR も抑制することから、この因子の関与を、特異的インヒビターである rapamycin 処理で検討したところ、Cdc6 タンパク質分解ならびに *in situ* でのカテプシン L 活性の両者ともに抑制された。従って、カテプシン L による Cdc6 分解には mTOR が関与していることが明らかになった。また、AKT の恒常活性型を、アデノウイルスを用いて過剰発現させて LY294002、rapamycin、wortmannin で処理したところ、wortmannin のみが Cdc6 分解を抑制出来たことから、PI3K-mTOR のシグナル経路が Cdc6 分解を制御していることが示された。
4. 足場消失時の PI3K-mTOR のシグナル経路の活性化状態を検討したところ、AKT ならびに S6K のリン酸化は維持されており、足場消失によって遮断されるシグナル経路は mTOR より下流であることが示された。また、ET 刺激を加えると LY 処理によって PI3K, mTOR 両者が不活化されているにもかかわらず Cdc6 の発現がみられた。これらのことから、次のモデルが考えられた。足場存在下では通常 PI3K-mTOR シグナル経路を介して、リソソームからのカテプシン L 放出が抑制されている。しかし、足場消失時には mTOR より下流のシグナル経路の遮断がおこり、リソソームからのカテプシン L (および同類のカテプシン) が放出され、Cdc6 の分解が起こる。ET による発がん刺激の制御点はその足場消失のブロックポイントの下流に位置し、これはカテプシン L による Cdc6 分解を抑制するものと考えられる。

以上、本論文は足場シグナルと発がんシグナルと細胞周期の S 期進行制御の接点を明らかにした。本研究は、発がんの根底機構を解明する上で非常に重要な、足場シグナルによる細胞の G1-S 期遷移制御様式の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。