

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 宮坂 隆

本研究は、癌抑制因子の候補である Tob の分子メカニズムを解明するために、HeLa. S3 細胞から Tob が形成する複合体を精製し、複合体に含まれるタンパク質群を質量分析によって同定したものであり、下記の結果を得ている。

- 1、大量培養が可能な浮遊系の HeLa. S3 細胞を用い、Tob-FLAG 安定発現細胞株を樹立した。その細胞株は、親株や Mock プラスミドを導入したコントロール細胞株に比べ、増殖速度が抑制されていることが示された。
- 2、ゲルろ過によって、安定発現した Tob-FLAG が、HeLa. S3 細胞でタンパク質複合体を形成していることが確認された。特に、細胞を核と細胞質に分画した抽出液では、両画分における複合体の大きさに違いがあることが示された。
- 3、細胞増殖抑制活性をもつ Tob の機能や作用機構を詳細に解析していくために、抗体を用いたアフィニティー精製と質量分析法を組み合わせることによって、Tob 複合体構成タンパク質群を同定した。これにより、Tob と CCR4-Not タンパク質複合体との相互作用が示された。また、Tob 複合体構成タンパク質として RNA 結合タンパク質群が同定されたことから、Tob が mRNA 代謝の制御に関わっていることが示唆された。他にも、TAB182 を同定しており、Tob がテロメアの伸長の調節に関わっていることが示唆された。

- 4、CCR4-Not 複合体中で、複合体形成の足場となることが推定されている Cnot1 について、RNAi 法による解析を行った。その結果、Cnot1 が HeLa 細胞の生存に必須なタンパク質であることが示された。
- 5、COS7 細胞を用いた免疫沈降実験によって、Cnot1 のデリーションミュータントとの相互作用を調べた結果、Caf1/Cnot7 は、酵母での報告と一致して Cnot1 の N 末端側保存領域と相互作用することが示された。一方、Caf1/Cnot7 と相互作用することからも、Tob は Cnot1 の N 末端側に相互作用することが推測されたが、Tob は Cnot1 の N 末端だけでなく C 末端にも相互作用することがわかった。このことから、Tob が CCR4-Not 複合体と相互作用することによって、転写や mRNA deadenylation に関与することが推測された。
- 6、Tob を安定発現した細胞株では、EGF レセプターの発現がタンパク質レベルで低下していることが示された。ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイにより、Tob が Cnot7/Caf1 と協調的に、mRNA の 3'-UTR を介して、EGFR の発現を抑制している可能性が示唆された。

以上、本論文は、これまで核で転写を制御していると考えられてきた Tob が、CCR4-Not 複合体を介して、転写ならびに mRNA プロセッシングに幅広く関わり、細胞増殖を制御していることを提唱している。本研究は、転写制御ならびに、転写後の mRNA のプロセッシングによる、細胞の増殖抑制メカニズム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。