

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 小林 公平

本研究は哺乳動物の発癌過程において重要な役割を演じていると考えられているがん抑制遺伝子 p53 の新たな機能を明らかにするために、主にマウス由来の培養細胞を用いて足場非依存性増殖機構の観点から解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 恒常的に Cdc6 mRNA を発現させた p53 ノックアウトマウス由来のマウス胎仔繊維芽細胞 (p53<sup>-/-</sup>MEF) では足場消失時に Cdc6 タンパクの分解が抑制されていたのに対し、コントロール細胞の p27 ノックアウトマウス由来のマウス胎仔繊維芽細胞 (p27<sup>-/-</sup>MEF) では Cdc6 タンパクは速やかに分解されていた。その他、内因性の cyclin A の分解も p53<sup>-/-</sup>MEF では発現が延長していた。検討した細胞は足場非存在下では増殖していないことはサイトメトリ一解析でも確認できていた。p27<sup>-/-</sup>MEF の足場消失時には p53 の誘導はわずかに認められるのに対し、p21 の発現は全く認められなかった。p53<sup>-/-</sup>MEF で Cdc6 を恒常的に発現させた細胞に p53 の組換えアデノウイルスで p53 を発現させ足場非存在下にすると、Cdc6 タンパクと cyclin A の発現低下が認められた。以上の結果から、足場非存在下での Cdc6 タンパクや cyclin A の分解には p53 が関与していることが示された。

2. 足場非存在下での Cdc6 タンパクと cyclin A の分解系を明らかにするためにさまざまなプロテアーゼ阻害剤を用いて同定することを試みた。その結果、ユビキチン/プロテアソーム系で分解されることが示され、そのユビキチン/プロテアソーム系のうち Cdh1-APC 系の関与が示唆された。

3. 足場非存在下での NRK 細胞では細胞質中のカテプシン L 様活性の上昇を認めることは既に神野らにより示されているが、p27<sup>-/-</sup>MEF でも同様にカテプシン L 様活性の上昇を認める一方、p53<sup>-/-</sup>MEF では上昇が認められなかったことから、足場非存在下でのカテプシン L 様の活性化にも p53 の関与が示唆された。

4. 足場非存在下での Cdc6 と cyclin A 遺伝子の転写制御に p53 の関与があるか、real time RT-PCR を用いて p53<sup>-/-</sup>MEF と p27<sup>-/-</sup>MEF で検討した結果、転写制御には p53 は関与していないことが示された。

5. 腫瘍抑制機能を維持しているが、アポトーシス機能のないマウス p53 の変異体 (p53<sup>R172P</sup>) を持った細胞では足場非存在下で Cdc6 や cyclin A は分解されることから、p53 の腫瘍抑制機能には今まで知られているアポトーシス機能の他に足場非存在下での Cdc6 タンパク分解機構も関与していることが示された。

以上、本論文はマウス由来の培養細胞において、足場非依存下での Cdc6 タンパク分解における p53 の必要性について明らかにした。本研究は p53 の癌抑制機能のうちこれまで言われてきた機能とは違い新規の機能について述べたものであり、発癌のメカニズムを解明する上で今後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思われる。