

審査結果の要旨

氏名 朴 貞河

本研究は 発癌の根底機構である足場依存性・非依存性 S 期開始機構を明らかにするため、ラット胎性線維芽細胞にて、足場への接着のシグナルと Tsc1/Tsc2-Rheb-mTORC1 経路を連結の探索を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. Tsc1/Tsc2の活性化キナーゼAMPKを活性化する小分子AICARを用いて足場がある状態で増殖しているラット胎性線維芽細胞を処理すると、足場を消失したときと同じように、強制発現させたCdc6、サイクリンAおよび3種のD型サイクリンが消失あるいは著しく減少した。このことは、確かにTsc1/Tsc2-Rheb-mTORC1経路が足場シグナルを伝達していることと矛盾しない。
2. 足場認識受容体であるインテグリン下流因子関連の阻害剤の効果を検討した結果、FAKを阻害するスタウロスポリン、Rho結合キナーゼを阻害するY27632、アクチンの脱重合化を引き起こすサイトカラシンDが足場消失と同じ効果を引き起こすが、Tsc2が不活化しているEkerラット線維芽細胞には効果がないことを見出した。
3. Tsc2タンパクにはスプライシングの違いにより数種のバリエーションがある。この中でエクソン25と31が欠損したアイソフォーム4は、Ekerラットに戻すと結節性硬化症の発症が抑えられ、多くの細胞で発現していることが知られている。そこでEkerラット胎性線維芽細胞にこのアイソフォームを戻したところ、足場消失に対する上記G1期因子の発現消失が復活した。そこで、この細胞を用いてスタウロスポリン、Y27632およびサイトカラシンDに対する感受性を検討したところ、Y27632に対してのみ感受性を維持し、上記G1期因子の発現消失が起こった。
4. 使用したラット胎性線維芽細胞で発現しているTsc2のバリエーションを同定した結果、エクソン25のみを含むアイソフォーム3又はエクソン25と以下31を含むアイソフォーム1であることが判明した。したがって、スタウロスポリンとサイトカラシンDに対する感受性を発揮するには、エクソン25と31のいずれかあるいは両者が必要であると判断された。

5. 以上の結果から、足場シグナルを繋ぐ因子の最有力候補としてRho結合キナーゼが浮かび上がった。そこで、Cdc6と活性型変異Rho結合キナーゼを強制発現させたラット線維芽細胞とコントロールとしてCdc6と野生型Rho結合キナーゼを強制発現させたラット線維芽細胞を作製し、足場消失時の当該G1期因子に対する効果を検討したところ、活性型Rho結合キナーゼを発現している細胞では、Ekerラット細胞と同じく、当該G1期因子の発現消失が抑制されていることが判明した。
6. Tsc2のアミノ酸配列を検索したところ、アミノ酸1200～1203の部位にRho結合キナーゼによるリン酸化部位のコンセンサス配列に酷似した配列があり、この配列はマウスやヒトのみならず牛やショウジョウバエのTsc2にまでも保存されていることが判明した。
7. この配列のリン酸化部位に相当するThr¹²⁰³をアラニンに変えた変異Tsc2アイソフォーム4を作製し、Cdc6と活性型Rho結合キナーゼの両者を強制発現しているEkerラット胎性線維芽細胞で発現させたところ、野生型Tsc2では、活性型Rho結合キナーゼに反応して足場非存在下でも当該G1因子は安定して発現したが、変異型Tsc2を発現させた場合、活性型Rho結合キナーゼの効果が失われて、これらの因子の発現が消失した。

以上の結果から、発現している Tsc2 のバリエーションの種類に関わらず、足場からの細胞周期開始制御のシグナルの大部分は、Rho 結合キナーゼを介して、Tsc2 に繋がることが判明した。すなわち、本研究で初めて Rho 結合キナーゼが足場シグナルと Tsc1/Tsc2-Rheb-mTORC1 経路を繋ぎ、この経路が細胞周期開始を制御する足場シグナルの主たる伝達経路であることを明らかにした。これは発癌の根底機構の解明に新しい突破口を開く重要な成果と考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。