

氏 名	かみ く ほ やす ひこ 上 久 保 靖 彦
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2645 号
学位授与の日付	平成 15 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Inhibition of cell growth by conditional expression of kpm, a human homologue of Drosophila warts/lats tumor suppressor (ショウジョウバエの癌抑制遺伝子 warts/lats のヒト相同遺伝子 kpm の条件 付き発現による細胞増殖の抑制)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 畑 龍 俊 教 授 鍋 島 陽 一 教 授 内 山 卓

論 文 内 容 の 要 旨

(目的) kpm はヒト骨髓系前駆細胞 KG-1a よりセリン・スレオニン・キナーゼドメインをターゲットとして degenerate PCR により単離されたキナーゼであり、ショウジョウバエの癌抑制遺伝子 warts/lats およびその哺乳類相同分子 LATS1 と高い相同性を示す。LATS1 においてはノックアウトマウスで軟部腫瘍や卵巣腫瘍が発生することより哺乳類においても癌抑制遺伝子として機能すると考えられている。また過剰発現させた LATS1 は Cdc2 と結合し、Cdc2 と cyclinB の結合を拮抗的阻害することにより細胞周期停止を誘導すると報告されている。一方 kpm に関しては、細胞周期の分裂期特異的にリン酸化され、kpm の一過性発現が S/G2/M 期の細胞の割合を増加させるという観察結果以外のことは知られていない。本研究では kpm の条件付き発現系を作成し、細胞増殖および細胞の生死における kpm の役割について検討した。

(方法) テトラサイクリン応答遺伝子発現誘導システムを用い Hela-Tet-Off 細胞より kpm, kpmK697A (キナーゼ不活型), Luciferase の安定導入株を作成した。kpm の遺伝子発現誘導による細胞増殖、細胞の活性に与える影響を MTT アッセイおよび生細胞数計測にて解析した。kpm 発現による細胞周期の変化は PI 染色および MPM-2 抗原抗体反応を FACS にて解析した。細胞死は DAPI 染色および TUNEL 法にて検出した。kpm 発現下で細胞周期をノコダゾール法にて分裂期早期に同期しその時の Cdc2, cyclinB 等の細胞周期制御蛋白の変化および kpm と Cdc2 の結合の有無をウェスタンブロット法にて確認した。又免疫沈降法にて cyclinB に結合する Cdc2 キナーゼ活性をインビトロキナーゼアッセイ法にて解析した。

(結果と考察) kpm, kpmK697A, Luciferase 安定導入株はテトラサイクリン (ドキシサイクリン) 除去により細胞内生理的存在量の約 100 倍の蛋白を誘導した。kpm の発現に伴って細胞数の減少、細胞死増加が観察されたのに対し、コントロールである Luciferase および kpmK697A のトランスフェクタントでは蛋白の発現後も影響は認められなかった。kpm 発現誘導により細胞周期解析で G2/M 移行期停止が認められ、分裂期細胞比率には変化が認められなかった。さらにこの G2/M 移行期停止の原因を検索したところ、kpm 発現に伴って、Cdc2 および cyclinB の量的変化は認められず、kpm と Cdc2 の結合は確認されなかった、Cdc2-cyclinB のリン酸化型の割合が増加し Cdc2 キナーゼ活性は抑制されていた。Cdc2 の脱リン酸化キナーゼ Cdc25C は不活型 (Ser216 リン酸化型の増加および分裂期型の減少) となっていたことから、kpm は Cdc25C を介して不活型リン酸化 Cdc2-cyclinB キナーゼの割合を増加させることにより制御する可能性が示唆された。同時に kpm 発現時間に依存して sub-G1 (死細胞) 比率の増加が認められた。kpm 発現によるこの細胞死は DAPI 染色で核の分断化及び凝集を認めると共に TUNEL 陽性である事よりアポトーシスであることが確認された。これらは Luciferase, kpmK697A 誘導では変化を認めなかったことより、kpm のキナーゼ活性に依存することが示唆された。以上の結果より、kpm がそのキナーゼ活性に依存的に細胞周期の制御およびアポトーシスの誘導に関与することが明らかとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

kpm はショウジョウバエの癌抑制遺伝子 warts/lats と高い相同性を示し、細胞周期や細胞形態を制御する遺伝子ファミ

リーに属するが、kpmの細胞内機能はほとんど解明されていない。本研究で申請者はテトラサイクリン応答遺伝子発現誘導システムを用いて、kpm発現誘導の細胞増殖に及ぼす影響とその分子機構を検討した。

kpmの発現誘導に伴って細胞増殖は抑制された。その原因をFACSにて解析したところ、kpm発現誘導により細胞周期はG2/M移行期停止を示した。G2/M期制御因子であるCdc2-cyclinBキナーゼは、リン酸化型（不活性型Cdc2）の割合が増加し、キナーゼ活性は抑制された。この時Cdc2を脱リン酸化し活性化するCdc25Cフォスファターゼの不活性型が増加していた。このことによりkpmはCdc2-cyclinBをCdc25Cを介して制御しG2/M移行期停止することが示された。同時に認められた細胞死はDAPI染色およびTUNEL法にてアポトーシスであることが確認された。コントロールであるLuciferaseおよびkpmK697A（キナーゼ不活型）ではそのどちらの現象も認められなかったことから、kpmはそのキナーゼ活性依存的に細胞周期をG2/M移行期停止しアポトーシスを誘導することが解明された。

本研究は細胞周期制御の解明に貢献し、細胞生物学の進展に寄与するところが大きい。従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年6月24日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。