

Title	G1 phase arrest induced by Wilms tumor protein WT1 is abrogated by cyclin/CDK complexes.
Author(s)	工藤, 哲大
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39900
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	工藤 哲夫 大
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 12429 号
学位授与年月日	平成 8 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	G 1 phase arrest induced by Wilms tumor protein WT 1 is abrogated by cyclin/CDK complexes. (癌抑制遺伝子 WT 1 による細胞増殖抑制は cyclin/CDK 複合体により解除される)
論文審査委員	(主査) 教授 秋山 徹 (副査) 教授 羽倉 明 教授 野島 博

論文内容の要旨

【目的】 WT 1 遺伝子はウィルムス腫瘍に欠損の見られる染色体領域 11p13 よりクローニングされた。遺伝子産物は C 末に 4 つのジンクフィンガー構造からなる DNA 結合ドメインをもつ転写因子と考えられる。また、WT 1 遺伝子より、選択的スプライシングにより複数種の産物がつくられる。スプライス領域は 2 か所あり、上流のスプライス領域 (Splice-1) は 17 アミノ酸を含み、その有無で転写調節活性が異なる。下流のスプライス領域 (Splice-2) は第 3 と第 4 ジンクフィンガーの間の KTS の 3 アミノ酸で、その有無により、DNA 結合特異性が異なる。これらのスプライシングの組み合わせにより、4 種類の産物がつくられる。WT 1 による転写調節のターゲットの候補としては、PDGF-A 鎖、IGF-1 I 等が報告されている。われわれは、WT 1 遺伝子の欠損や不活化がウィルムス腫瘍を引き起こすことから、WT 1 の細胞増殖抑制活性を検討してみた。

【方法ならびに成績】 まず、サル繊維芽細胞株 CV 1 に、発現ベクターに組み込んだ WT 1 の各スプライスバリエーションの cDNA をトランスフェクションし、ネオマイシン耐性コロニーの出現頻度を調べた。その結果、WT 1 発現ベクターは、コントロールベクターに比べて、コロニーの形成を有意に抑制した。この抑制性は splice-1 をスプライスされていないバリエーション splice-1 (+) で特に強かった。この結果より、WT 1 が細胞増殖を抑制している可能性が示唆された。そこで、血清飢餓により G 0 期に同調したマウス繊維芽細胞株 NIH 3 T 3 に、WT 1 発現ベクターをマイクロインジェクションし、血清添加に伴う細胞周期の S 期への進行に及ぼす効果を調べた。S 期へ進行した細胞は、プロモデオキシウリジン (BrdU) の取り込みにより検出した。その結果、WT 1 を強制発現した細胞は BrdU の取り込みが抑制されることが明らかとなった。また、この抑制性はコロニーアッセイの場合と同じく WT 1 - splice-1 (+) で強く、コントロール細胞が 80% 以上の BrdU の取り込み率を示すのに対して 5% 以下に抑えた。ウィルムス腫瘍で検出された、WT 1 の DNA 結合ドメインが 1 アミノ酸置換した遺伝子ではこのような S 期進行抑制は示さなかった。

次に、WT 1 による細胞増殖抑制の作用点が細胞周期のどこにあるのかを調べるために、G 0 期の NIH 3 T 3 に血清添加後継続的に WT 1 発現ベクターをインジェクションし、BrdU の取り込みを調べた。その結果、WT 1 の作用点は G 1 後期にあることが示された。アフィディコリンにより G 1 - S の境界に細胞周期を同調し、WT 1 をインジェクションした場合には、BrdU の取り込みを抑えず、WT 1 は S 期自身の進行を阻害するわけではないと考えられた。

次に WT 1 による細胞増殖抑制の機構を明らかにするために、G 1 後期に作用し、細胞周期調節に中心的な役割を

果たす cdk 4, cdk 2, cyclinD 1, cyclinE 等の cDNA を WT 1 cDNA と共に NIH 3 T 3 にインジェクションし、BrdU の取り込みを調べた。その結果、これらの因子単独では、cyclinE のみが WT 1 による S 期進行阻害を部分的に解除したのみだった。しかし、cdk 4 / cyclinD 1 / WT 1 または cdk 2 / cyclinE / WT 1 を同時にインジェクションすると、WT 1 による阻害は起こらず、100% に近い BrdU 取り込み率を示した。この結果より、WT 1 による細胞増殖阻害は、cdk 4 や cdk 2 などの抑制を介して行われている可能性が考えられた。そこで、それらのキナーゼ活性と蛋白の発現を調べた。

NIH 3 T 3 に WT 1 とマーカーとなる細胞表面抗原 D A F の発現ベクターをエレクトロポレーションにより導入し、血清飢餓後、血清添加により G 1 後期に同調した細胞を D A F 抗体を用いてセルソーターで選別した。得られた WT 1 発現細胞を抗 cdk 4 または cdk 2 抗体で免疫沈降し、Rb (retinoblastoma) 蛋白を基質としてキナーゼ活性を調べた。その結果、WT 1 発現細胞は、コントロールと比べて cdk 4, cdk 2 共に、活性が低かった。また cdk 4, cdk 2, cyclinD 1, の発現をウェスタンブロットにより調べると、いずれの蛋白量もコントロールと変わらない事が明らかとなった。しかし cdk 2 については、非活性型である 33k の蛋白が多く、活性型の 32k の蛋白が減少していた。これらの結果より、WT 1 が cdk の活性化を発現レベルでは阻害せずに活性を抑制し、その結果として S 期への進行を阻害していると考えられた。

〔総括〕 WT 1 はコロニーアッセイ、インジェクションアッセイいずれの方法でも細胞増殖を抑制した。その活性は WT 1 - splice - 1 (+) において顕著であった。細胞周期上での WT 1 の作用は、G 1 後期に cdk 2, cdk 4 キナーゼの活性化を抑制することにより G 1 - S の移行を制御しているものであると考えられた。

論文審査の結果の要旨

WT 1 遺伝子は Wilms 腫瘍の原因遺伝子の一つと考えられているが、その細胞増殖、分化における役割はほとんど明らかになっていない。本研究では WT 1 遺伝子が細胞増殖制御に果たす役割を検討し、本遺伝子が細胞周期の G 1 期から S 期への進行を阻害することにより細胞増殖を強力に抑制する活性をもつことを明らかにした。さらにその分子機構を解析し、1) WT 1 遺伝子を過剰発現させた細胞では cyclin / C D K の発現レベルはあまり変化しないにもかかわらず活性が低下していること、および 2) cyclin / C D K を同時に過剰発現すると WT 1 による細胞周期の進行阻害がみられなくなることを明らかにし、WT 1 遺伝子は cyclin / C D K の活性を制御することにより細胞周期の進行を調節していることを示した。これらの知見は、WT 1 遺伝子の失活による細胞の癌化が、細胞周期の G 1 期から S 期への進行の調節機構の異常によっておこるものであることを示唆すると考えられる。本研究は WT 1 遺伝子の細胞周期制御における役割を初めて明らかにしたものであり、学位に値するものと考えられる。