

氏名(本籍)	すぎ はら えい じ (愛知県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第4177号		
学位授与年月日	平成18年11月30日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>Suppression of Centrosome Amplification after DNA Damage Depends on p27 Accumulation</b> (p27 タンパク質の蓄積による DNA 損傷後の中心体数異常の抑制)		
主査	筑波大学教授	理学博士	岡村直道
副査	筑波大学教授	医学博士	加藤光保
副査	筑波大学講師	博士(理学)	依馬正次
副査	筑波大学講師	博士(理学)	三輪佳宏
副査	筑波大学講師	博士(理学)	横関健昭

## 論文の内容の要旨

### (目的)

中心体は細胞周期と密接に同調し、G1期からS期にかけて2個に複製し、分裂期にて染色体の両端に配置され、染色体を均等に分配する機能を持つ。中心体の異常によって中心体が過剰に複製されると、分裂期にて染色体の分配異常が生じ、多くのがん細胞でみられる染色体不安定性が起こると考えられている。正常細胞はDNA損傷時、細胞周期停止やDNA修復、アポトーシスといった機構が働く。細胞周期が停止した時、中心体の過剰な複製も停止することが細胞の生存にとって非常に重要である。しかしながら、DNA損傷時における中心体複製制御の分子機構はほとんど明らかになっていない。私はこれまでにがん遺伝子MYCNを導入した神経芽腫の細胞株においてDNA損傷後に中心体数異常が生じることを明らかにしてきた。本研究はDNA損傷後、MYCNによって制御される分子機構に着目し、DNA損傷時における中心体複製制御の分子機構を解明することを目的とした。

### (対象と方法)

神経芽腫細胞株(SHEP)、MYCNもしくはempty vectorを導入したSHEP株(SEHP/MYCN, SHEP/vector)、マウス胎児線維芽細胞(MEF)、p27<sup>-/-</sup>-MEF、p53<sup>-/-</sup>-MEF、ヒト正常線維芽細胞(NB1RGB)を対象として研究を行った。各細胞株はDNA損傷として $\gamma$ 線もしくはDoxorubicin処理を行い、その後のタンパク質の動向をウェスタンブロット法、免疫沈降法、RNA量はRT-PCRを行い、検出した。中心体は $\gamma$ -tubulinの免疫染色で検出した。DNA含有量はPI染色によるFlow cytometryにて検出した。p27発現ベクターや各種siRNAは常法通り、遺伝子導入を行った。

### (結果)

中心体複製制御に関わる因子の発現量をSEHP/MYCN細胞とSEHP/vector細胞において $\gamma$ 線照射後、

経時的に調べたところ、p27 が SEHP/MYCN 細胞において低下していることがわかった。そこで、p27 発現ベクターを SEHP/MYCN 細胞へ導入し、 $\gamma$  線照射後の中心体数を調べたところ、中心体数異常が抑制された。これらの結果から、MYCN による中心体数異常は p27 の低下が原因であることが示唆された。次に、正常な細胞においても p27 の発現低下は DNA 損傷後の中心体数異常を誘発するのではないかと考えた。そこで、p27<sup>-/-</sup>MEF へ同様に DNA 損傷を与えたところ、有意に中心体数異常が増加した。また、増加した中心体は一对の中心小体を持つことと、p27<sup>-/-</sup>MEF が多倍体化しなかったことから DNA 再複製に伴う中心体数異常でないことがわかった。加えて、p27 の siRNA を処理した NB1RGB 細胞へ  $\gamma$  線を照射しても中心体数異常が増加し、分裂期に多極紡錘体形成による異常な分裂像を呈した。以上の結果から、p27 は DNA 損傷時の中心体数制御に重要であることが明らかになった。次に、p27 の DNA 損傷後の挙動を解析したところ、p27 タンパク量は DNA 損傷後に経時的に増加することがわかった。この増加は p27 のユビキチン結合因子である Skp2 の発現低下と p27 の mRNA の転写増加と相関していた。さらに、MYCN による p27 の発現低下の原因を調べたところ、MYCN はユビキチン-プロテアソーム経路を介して p27 タンパク量を減少させていることがわかった。また、SEHP/MYCN 細胞において Skp2 量が増加していることがわかったので、Skp2 の siRNA を同細胞へ処理したところ、p27 のタンパク量が回復し、DNA 損傷後の中心体数異常が抑制された。これらの結果から、Skp2 増加による p27 タンパク量の低下が MYCN の及ぼす DNA 損傷後の中心体数異常の原因であることが明らかになった。

#### (考察)

本研究の結果から、p27 は DNA 損傷後の中心体数異常を抑制する重要な因子であることがわかった。神経芽腫の予後不良因子である MYCN は Skp2 を介して間接的に p27 のタンパク量を減少させることで DNA 損傷後の中心体数異常を誘発することが分かった。この知見は過去に報告のない MYCN の新しい機能であり、神経芽腫の悪性化の一因である可能性を示唆した。DNA 損傷は抗がん剤、酸化ストレス、炎症反応などで広く見られる現象であり、p27 がこれら DNA 損傷時にタンパクレベルで上昇することによって中心体の過剰複製を抑制し、染色体安定性の維持に貢献するものと考えられる。今後は p27 欠損マウスを使った発がん時における中心体数異常の役割の解明や p53-p21, KLF4 といった別の中心体数制御の経路とどのように関わるかなどを明らかにしていきたいと考えている。

#### (結論)

DNA 損傷時における p27 タンパク質蓄積という中心体数制御の新しいシグナル経路を明らかにした。また、MYCN は p27 を分解に導く Skp2 の上流に位置することを明らかにした。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、細胞周期を負に制御する因子として知られていた p27 の新しい機能として、DNA 損傷後の中心体数制御シグナルとしての役割を初めて明らかにしたものであり、高く評価できる。また、がん遺伝子 MYCN を導入した細胞において DNA 損傷時に認められる中心体数異常の原因が、MYCN によるユビキチン系を介した p27 タンパク質の分解であることも明らかにしている。この知見は、がん細胞に頻繁に認められる染色体数レベルでの異常が、p27 による中心体数制御からの逸脱による可能性を示唆するものであり、非常に興味深く、今後の研究の進展が期待される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。