

氏名(国籍)	レヌ ワダワ (インド)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博乙第1,032号
学位授与年月日	平成6年12月31日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Cellular Mortality to Immortalization : Identification, Characterization and Biological Activity of Mortalin (細胞の老化と不死化：モータリンの同定、特性及び生物活性)
主査	筑波大学教授 農学博士 村上和雄
副査	筑波大学教授 農学博士 日下部 功
副査	筑波大学併任教授 薬学博士 三井洋司
副査	筑波大学教授 医学博士 渡邊照男

論 文 の 要 旨

癌細胞が無限に増殖可能(細胞の不死化)であるのと対照的に、正常細胞は生体外でも有限の分裂回数(細胞老化)で増殖停止してしまう。そうした現象はさまざまな細胞で認められているが、その原因と機構については全く解明されていない。本研究では、人間由来の細胞と異なって不死化細胞の生じやすいマウス由来の細胞を用いてこの問題の解明に挑戦した。このための研究戦略として先ず最初に行ったことは、有限寿命細胞と無限寿命細胞(不死化細胞)とを細胞融合させて、ハイブリッド細胞クローンをつくることである。そうしたハイブリッドクローンをいくつかとって分裂能力を見たところ、それは有限であることが判った。つまり、細胞の有限寿命性(細胞老化)は、無限寿命性に対して、優性であることを意味した。

この実験系で、有限寿命細胞と無限寿命細胞のそれぞれの特異マーカーをスクリーニングした結果、有限寿命性のマーカーとして66 KDaのタンパクを、又無限寿命性のマーカーとして81 KDa及び33 KDaのタンパクを同定した。このタンパクに対する特異的抗体を作製して、細胞の分裂寿命と不死化現象の重要な側面を解明するに至った。

66 KDa タンパクのcDNAをクローニングし、その配列を解析することによって、本タンパクは、マウスの熱ショックタンパク(hsp 70)ファミリーの新しいメンバーであることが判明した。このタンパクは熱ショックによつ誘導合成されることはないが、細胞内の局在が変化する。この細胞内での局在の違いは、細胞の有限寿命性と無限寿命性の区別にも観察される。即ち、このタンパクが細胞質に存在するのは常に有限寿命性の細胞であるのに対し、無限寿命細胞では、核周囲に存在する。そこ

でこのタンパクをモータリンと命名した。

この細胞質性のタンパク ($p^{66mo t-1}$) と核周囲性のタンパク ($p^{66mo t-2}$) との分子レベルの違いが解析された。その結果、2つのタンパクの細胞内局在性の違い及び生物活性の違いは、これらタンパクのアミノ酸配列がたった2個だけ異なっていることに原因が認められた。

人間由来の細胞においても、このタンパクは66 KDaの分子量を持ち、正常細胞ではやはり細胞質に局在する。一方、いろいろなヒト癌細胞でその分布の違いを見てみると、癌細胞の4つの類型に対応することが明らかとなった。更に、極めて重要なことには、不死化細胞である NIH 3 T 3 細胞に細胞質由来モータリンを発現誘導すると、不死化細胞は老化（有限寿命化）する事が発現された。又、逆に老化して分裂停止した細胞に本モータリンタンパクの抗体を注入すると一時的に分裂の再開することも示された。一方、モータリンの異型として、 $p^{66mo t-2 \cdot 1}$ が同定されたところであるが、この遺伝子は、NIH 3 T 3 細胞へ導入すると腫瘍形成の可能な細胞に変換することが明らかにされた。

以上を総合するとモータリンは細胞の分裂寿命を支配する重要な遺伝子であり、その微細な構造変化によって細胞の不死化、更には癌化にまで至ることが判明した。一方、別の2つのタンパク、p 81 と p 33 も、細胞の分裂制御に重要であると判った。

審 査 の 要 旨

正常細胞は、分裂能力に限界があり、一定の分裂回数を経ると分裂停止することが知られている。その分子機構は未解明なままであるが、遺伝子支配のもとにあることが強く示唆されている。一方、その分裂寿命を越えて無限に増殖することが可能となる不死化現象にも、特定の遺伝子が関与することも推定されており、この分裂の有限性（細胞老化）と不死化との関連についても注目されているところである。

本論文はこうした細胞の老化や不死化の機構解明を目指して、モータリンタンパクとその遺伝子を発見した。即ち、有限分裂の正常細胞、無限寿命の不死化細胞、及びそれらの融合細胞（分裂が有限となる）における蛋白の比較から、有限細胞の細胞質、不死化細胞の核周囲に局在する p 66 を見出し、モータリンと名付けた。その抗体を作成し、cDNA を単離、配列決定したところ、有限細胞からの mot-1 は、不死化細胞の mot-2 と 2 塩基のみ異なり、そのタンパクも 2 アミノ酸のみ異なることを明らかにした。

又、正常細胞の分裂末期（老化）にモータリンの抗体を注入する実験及び不死化細胞に有限細胞の mot-1 を過剰発現させる実験から、モータリンは、細胞の増殖に関与し、老化を誘導する機能を持つこと、その失活は不死化に関わることを明らかにした。

上記の結果から、申著者の発見したモータリンと mot-1 は、細胞分裂の有限性を支配する初めてのタンパク及び遺伝子であると考えられ、細胞の老化と癌化の制御への応用も期待されるものであり、本論文の研究成果は高く評価できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。