

【122】

氏名(本籍)	みやもと のりまさ 宮本 憲 優 (韓 国)
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	博 甲 第 912 号
学位授与年月日	平成 3 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
審査研究科	医 学 研 究 科
学位論文題目	<i>in vitro</i> SV40 DNA 複製系を用いた癌抑制蛋白 p53 の性状解析 (Dissertation 形式)
主査	筑波大学教授 医学博士 三 輪 正 直
副査	筑波大学教授 医学博士 阿 部 帥
副査	筑波大学教授 医学博士 辻 井 博 彦
副査	筑波大学教授 理学博士 坂 内 四 郎
副査	筑波大学助教授 医学博士 藤 井 敬 二

## 論 文 の 要 旨

### 〈目 的〉

p53 は、1979年に Lane らによって、SV40 ウイルスが感染した細胞のなかで、SV40 の初期遺伝子産物である large T 抗原と結合して存在する因子として発見された分子量 53,000 ダルトンの蛋白質である。その後、大腸癌や肺癌などさまざまなヒトの腫瘍で、p53 遺伝子の欠失、および変異が高頻度に見いだされ、更に 1989 年に Finlay らは、発癌遺伝子の ras および myc による細胞の形質転換を p53 遺伝子が抑制することを示し、実験的にも p53 が形質転換抑制能をもつことが示された。

また p53 が結合する相手の SV40 の large T 抗原は、細胞の形質転換を誘導する因子であり、SV40 の DNA 複製開始因子でもあるので、p53 の SV40 DNA の複製系への効果が注目されている。しかし、霊長類の p53 については、不活性な蛋白質が用いられたため、否定的な結果しか得られていない。そこで本研究では、活性のある p53 を霊長類より高度に精製し、SV40 の DNA 複製への影響を詳細に解析した。

### 〈方 法〉

- 1) SV40 ウイルスを感染させたアフリカミドリザル由来の COS-1 細胞抽出液から、抗 large T 抗原モノクローナル抗体 sepharose ビーズカラムを用いて、p53-large T 抗原複合体、large T 抗原の精製を試みた。
- 2) *in vitro* SV40 DNA 複製系を利用して、霊長類由来の p53 が SV40 の DNA 複製に与える影響を解析した。

3) SV40 DNA 複製系の各段階においての p53 の作用機構を調べた。

〈結果〉

- 1) 従来精製が困難であった霊長類の p53 を、抗体カラムと DEAE-sepharose カラムクロマトグラフィーにより SV40 の large T 抗原との複合体として精製できた。
- 2) p53-large T 抗原複合体は、*in vitro* SV40 の DNA 合成を阻害した。
- 3) p53 は、large T 抗原の SV40 DNA 複製開始領域への特異的な結合、ATPase の活性、unwinding の活性および DNA helicase の活性に影響を与えなかった。しかしながら、large T 抗原と DNA polymerase  $\alpha$  との結合を弱める作用があることを見出した。

〈結論〉

発現量が僅かであり、およそ20分で分解してしまうために、精製が困難であった霊長類の p53 を精製した。それを用いて、従来 SV40 の DNA 複製を阻害しないと考えられてきた霊長類の p53 もげっ歯類由来のものと同様に、SV40 の DNA 複製を阻害することを見出した。更に p53 による、DNA 複製の阻害は large T 抗原と DNA polymerase  $\alpha$  との結合力を弱めることによるとの知見を得た。

## 審 査 の 要 旨

本研究は形質転換を抑制する因子である p53 をアフリカミドリザル由来の細胞から初めて精製し、それが DNA 複製に与える影響を、*in vitro* の SV40 DNA 複製系を用いて生化学的に詳細な解析を行ったものである。従来 SV40 の DNA 複製を阻害しないと考えられてきた霊長類由来の p53 が、げっ歯類由来のものと同様に SV40 の DNA 複製を阻害することを明らかにした点、および、アフリカミドリザル由来の p53 による SV40 の DNA 複製の阻害機構を明らかにした点で高く評価される。また、p53 が種によらず一般的に SV40 の DNA 複製を阻害することを示唆した点は、p53 が宿主細胞でも DNA 複製に関する調節因子である可能性を示し、現在未知である真核細胞の DNA 複製開始因子、および DNA 複製開始領域の発見に貢献する可能性がある。

よって、著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。