

氏 名（本籍）	おお ね だ きぬ こ 大 根 田 絹 子
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 2 3 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 （ 博 士 課 程 ） 内 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	細 胞 増 殖 と 不 死 化 に お け る ヌ ク レ オ シ ド ニ リ ン 酸 キ ナ ー ゼ / Nm23 の 役 割 に つ い て の 考 察

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員	教 授 豊 田 隆 謙	教 授 帯 刀 益 夫
	教 授 小 野 哲 也	

## 論文内容要旨

ヌクレオシド二リン酸キナーゼ (Nucleoside diphosphate kinases : 以下 NDP キナーゼ) は、リン酸基転移酵素として、細胞内 NTP プールを維持する housekeeping 酵素である。しかし、近年本酵素が、形態形成、分化、癌転移を制御し、細胞内情報伝達系の調節因子、転写因子として機能することが明らかになり、多彩な機能を有する蛋白として、新たな角度からの研究が進行している。

本論文では、細胞増殖における本酵素の役割を明らかにすることを目的として、1) 細胞が無限増殖性を獲得する不死化の過程と、2) 血清による増殖誘導に伴い細胞周囲が進行する過程に注目し、本酵素の量的変動を、mRNA 発現量、蛋白量、酵素活性のそれぞれについて解析した。

初めに、不死化に伴う本酵素の発現量の変化を、四種の正常二倍体ヒト線維芽細胞 (TIG-3, KMS-6, WI-38, IMR-90) と、それぞれの不死化細胞株を用いて検討したところ、mRNA 発現量、蛋白量、酵素活性のいずれにおいても、親株の正常細胞と比較して、不死化細胞で、NDP キナーゼの増加が認められた。さらに、本酵素の細胞老化における役割について解析するため、集団倍加数 (Population Doubling Levels ; PDL) の異なる TIG-3 (PDL17.6 と 59.3) を用いて、NDP キナーゼ A, B の mRNA 発現量を検討したが、PDL の相違による mRNA 発現量の差は認めなかった。

次に、細胞周期の進行における本酵素の役割を解析するため、TIG-3 を用い、血清飢餓条件下で増殖を停止している細胞を、血清により増殖刺激したときの NDP キナーゼの変動を、経時的に解析した。mRNA 発現量は、血清刺激後から 6 時間までについて検討したが、この時間までには両アイソフォームともに経時的変動はみられなかった。蛋白量は、血清刺激後 18 時間後に最大となり、その後減少する傾向が、両アイソフォーム蛋白で認められた。しかし、酵素活性は、蛋白量が増加していた時間においても変動がみられず血清刺激後 48 時間までほぼ一定の値を示した。蛋白量、酵素活性の変動について、同様の実験をラット線維芽細胞 3Y1 を用いて行った。蛋白量の変動は TIG-3 と同様、血清刺激後 18 時間が最大となりその後減少する傾向を示したが、酵素活性は、TIG-3 と異なり増加する傾向を示し、24 時間後に血清添加時の 1.14 倍、48 時間後に 1.21 倍となった。血清刺激後の NDP キナーゼ酵素活性が、正常細胞である TIG-3 では変動せず、不死化細胞である 3Y1 では増加していたことから、TIG-3 の不死化細胞株 TIG-3SVts、ラット線維芽細胞の初代培養である REF (Rat Embryonic Fibroblast) について、培養血清濃度の異なる条件での酵素活性を比較した。REF では血清濃度による酵素活性の差は認めなかった。一方 TIG-3SVts では、対数増殖期の細胞の NDP キナーゼ活性が血清飢餓培養時の 1.27 倍に増

加していた。

次に、これまで生化学的に検討してきた不死化、細胞周期に伴う NDP キナーゼ蛋白の変動量がごく僅少であったため、NDP キナーゼ蛋白の細胞内での局在部位が変化しているかどうかについて、免疫組織学的に解析した。しかし、TIG-3 を培養血清濃度の異なる条件で比較した検討、TIG-3 と TIG-3SVts とを比較した検討のいずれについても、NDP キナーゼの細胞内局在部位に大きな変化は認められなかった。

また、本酵素の役割をより積極的に解析する手段である遺伝子導入法を用いて、ラット好塩基性白血球細胞 (RBL2H3 細胞) に、ラット NDP キナーゼ $\beta$  を過剰発現させた細胞におけるフェノタイプの変化を観察した。遺伝子導入細胞 4 クローンの酵素活性は野生型細胞の約 2 倍に上昇していた。しかし、遺伝子導入細胞の形態、増殖速度、血清要求性は、野生型細胞に較べて変化なく、免疫刺激によるセロトニン分泌反応についても、導入遺伝子産物の効果を十分に確認できなかった。

今回の検討により、ヒト線維芽細胞の不死化の過程において、NDP キナーゼが、mRNA 発現量、蛋白量のみならず酵素活性においても増加していることが明らかになった。このことは、不死化において NDP キナーゼが、細胞内情報伝達系の調節因子など酵素として機能していることを示唆している。一方、細胞周期に伴う NDP キナーゼの変動は、正常細胞と不死化した細胞とで異なっており、それぞれにおける本酵素の役割が異なっていることが示唆された。特に、正常細胞である TIG-3 においては、NDP キナーゼ蛋白が、酵素としての機能とは独立した何らかの役割を果たしていることが考えられた。

## 審査結果の要旨

ヌクレオシドニリン酸キナーゼ（以下 NDP キナーゼ）は、細胞内 NTP プールを維持するハウスキーピング酵素であるが、近年、細胞内情報伝達系の調節因子や転写因子として機能し、形態形成や癌転移を制御することが明らかにされ、多彩な機能を有する蛋白として注目されている。本論文は、このような背景をふまえて、細胞増殖における本酵素の役割を明らかにする目的で、細胞が無限増殖性を獲得する不死化の過程と、増殖誘導に伴い細胞周期が進行する過程における本酵素の量的変化を解析したものである。不死化に伴う本酵素の発現量の変化は四種の正常二倍体ヒト線維芽細胞（TIG-3, KMS-6, WI-38, IMR-90）と、それぞれの不死化細胞株を用いて検討しており、mRNA 発現量、蛋白量、酵素活性のいずれにおいても、親株の正常細胞と比較して、不死化細胞で本酵素の発現が増加していることを示している。次に、細胞周期の進行における本酵素の役割を解析するため TIG-3 を用い、増殖停止している細胞を血清により増殖誘導した時の本酵素の発現量の変化を経時的に解析している。その結果、NDP キナーゼ蛋白量は血清による増殖刺激により一過性に増加するが、酵素活性は蛋白量の増加を反映せず一定であることを示した。更に、共に不死化細胞である TIG-3SVTs とラット線維芽細胞株 3Y1 においては血清刺激に反応した酵素活性の増加がみられるのに対して、ラット線維芽細胞の初代培養細胞では TIG-3 と同様に酵素活性が不変であることを示し、本酵素の細胞周期における役割が正常細胞と不死化した細胞とで異なっている可能性が示唆された。このような詳細な検討は、本酵素の細胞増殖制御における役割を考察するうえで重要な知見を含んでいる。特に本酵素の発現量の増加が、癌化の初期過程の一つともいふべき不死化の過程においてみられたことは、新しい所見として注目される。本論文では更に、免疫組織学的手法を用いて本酵素の細胞内局在を観察し、また遺伝子導入法を用いて本酵素の遺伝子を過剰発現させた細胞におけるフェノタイプの変化についても検討を加えている。今回の検討結果は、本酵素の機能を具体的に示すには言っていないが、これらの手法を用いた本酵素についての解析はこれまで十分に行われていなかったことから、今後これらの手法を用いて本酵素の役割を解析していくうえで示唆に富む知見を含むものである。NDP キナーゼの新しい機能が近年次々に明らかにされ脚光を浴びている一方、それぞれの機能発現に至る機序はこれまで十分に解析されていない。このような状況のなかで、本論文は、細胞増殖の制御における NDP キナーゼの役割について、詳細かつ多角的に解析を進めている点で評価し得るものであり、十分に学位論文に値すると判断する。