

哺乳動物及び昆虫の細胞における、G0 期から S 期への移行における DNA トポイソメラーゼ II の必要性

ホサイン＝ムクダディール＝シャヒド

2001 年 10 月 1 日 入学

指導教官 関水と久

DNA トポイソメラーゼは、DNA 複製、染色体分離、クロマチンの再構成、転写、及び組み換えに必須な役割を果たしている。本研究において私は、DNA トポイソメラーゼ II が、静止期にある哺乳動物細胞が分裂期に移行する際に必要であることを示した(Hossain ら、2002)。典型的な真核細胞の細胞周期は4つの段階、G1 期（間期 1）、S 期（DNA 合成期）、G2 期（間期 2）、及び M 期（染色体分裂期）に分けられる。これとは別に、細胞周期から脱した状態として、G0 期がある。生体となった哺乳動物の多くの細胞は G0 期の段階にある。哺乳動物細胞には2つの DNA トポイソメラーゼ II のアイソフォーム、 α 及び β 、が存在している。当教室の秋光らは、DNA トポイソメラーゼ II α の遺伝子ノックアウトマウスを作出し、初期胚の発生が 4 ないし 8 細胞期において停止することを報告した(Akimitsu ら、2003)。このときの細胞の DNA はカテネーションと呼ばれる構造をとり、細胞周期は見かけ上 G1 期であった。この結果は、DNA トポイソメラーゼ II α がマウス初期胚の細胞周期進行に必要であることを遺伝学的に示したものである。哺乳動物細胞が静止期から分裂サイクルに入るための DNA トポイソメラーゼ II の必要性を理解するため私は、いろいろな刺激により静止期にある細胞が分裂を開始する過程に対する、ICRF-193 という薬剤の効果を検討した。その結果、私は、血清飢餓状態にある哺乳動物細胞に対する血清の再添加により誘導される DNA 合成が ICRF-193 に対して感受性であることを見いだした。この薬剤は、DNA の切断を導かずに、DNA トポイソメラーゼの触媒作用を阻害する作用を有している。マイトジェン作用のあるリポポリサッカライド(LPS)によるマウスの脾臓細胞の分裂誘導や、Swiss 3T3 細胞の分裂の接触阻止からの解除、における DNA 合成の誘導に対しても ICRF-193 は阻害作用を示した。DNA トポイソメラーゼ II α のポイントミューテーションにより ICRF-193 耐性となった哺乳動物細胞株である、CHO/159-1 や NYH/187 では、血

清飢餓状態に対する血清添加によるトリチウムで標識したチミジンの取り込みでみた G0 期から S 期への移行が ICRF-193 に対して耐性であった。ICRF-193 は、M 期や G1 期で停止状態にある細胞が DNA 合成能を回復することに対しては阻害作用を示さなかった。これらの結果は、哺乳動物細胞が G0 期から S 期に移行する段階において、DNA トポイソメラーゼ II を必要とする段階があることを示している。ICRF-193 による G0 期から S 期への移行の阻害に対する分子機構を知るために、私は、S 期への移行に必要であるとされる遺伝子の発現を RT-PCR 法により検討した。その結果私は、血清飢餓状態にある CHO 細胞や NYH 細胞に血清を添加した場合の *dbf4* 及び *cylinA* 遺伝子の発現誘導が ICRF-193 により阻害されることを見いだした。これに対して、DNA トポイソメラーゼ II α 遺伝子のポイントミューテーションにより ICRF-193 耐性となった CHO/159-1 細胞や NYH/187 細胞では、阻害は見られなかった。これらの結果は、DNA トポイソメラーゼ II α が哺乳動物細胞における血清添加による *dbf4* 及び *cylinA* 遺伝子の発現誘導に必要であることを示している。

次に私は、上に述べた DNA トポイソメラーゼ II の必要性が、他の真核生物である昆虫や酵母でも見いだされるか否かを検証した。その結果、哺乳動物で見いだされたと同様、ICRF-193 は、ショウジョウバエのシュナイダー2 細胞における G0 期から S 期への移行を阻害した。また、G1 期から S 期への移行は阻害しなかった。DNA トポイソメラーゼ II のシュナイダー細胞における G0 期から S 期への移行における必要性をさらに検証するため私は、G0 期の細胞を用いた RNAi の実験をおこなった。図 4 に示すように、G0 期での静止状態からの DNA 合成は、DNA トポイソメラーゼ II の RNAi により阻害された。これらの結果は、ショウジョウバエのシュナイダー細胞における G0 期から S 期への移行に、DNA トポイソメラーゼ II が必要であることを示している。これとは別に私は発芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では、G0 期から S 期への移行に対して、DNA トポイソメラーゼ II は必要ではないことを示した (Hossain ら、2004)。私は、DNA トポイソメラーゼ II は哺乳動物や昆虫のような多細胞生物において、G0 期から S 期への移行に必要な遺伝子に特異的な転写に必要ではないか、という可能性を考えている。酵母のような単細胞の真核生物においては、この必要性がないと思われる。細胞周期の M 期において、DNA トポイソメラーゼ II の活性低下による「分裂制御機構の崩壊」により細胞死が誘導されることが知られている。多細胞の真核生物においては、ほとんどの細胞が G0 期にあると考えられるが、

そのような細胞が再分裂を開始して M 期で細胞死を引き起こさないようにするために、G0 期から分裂期に移行する場合に DNA トポイソメラーゼに依存した過程が担保されているのではないかと私は考えている。