

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目：**Treatment with a PI3 kinase inhibitor shuts down Cdc6 expression via the same mechanism as used upon anchorage deprivation**

和訳：PI3K 阻害剤による処理は足場消失時と同様の機構で Cdc6 タンパク質の発現抑制をもたらす

指導教官：岡山博人 教授

東京大学大学院医学系研究科 医学博士課程 分子細胞生物学専攻

平成 13 年 4 月 入学

氏名：荒川志穂

ほ乳類の成体体細胞は、血球系の細胞を除き通常浮遊条件下では増殖できない。しかしながら、がん化に伴い足場非依存的増殖能を獲得し、浮遊条件下でも増殖可能となる。この能力は腫瘍形成および転移能とよく相関することから、発がん機構の根底をなすと古くから考えられている。非がん細胞が増殖に足場を要求するのは、細胞周期のなかで G1-S 遷移期のみである。したがって、足場シグナルによる細胞の G1-S 期遷移制御の解明は、発がんの根底機構を解明する上で必要不可欠といえる。

増殖刺激に伴い、細胞が S 期を開始するには、G1 期サイクリン依存性キナーゼである Cdk4/6 および Cdk2 が必要である。Cdk4/6 の主たる標的因子は Rb タンパク質で、リン酸化によって失活し、かわりに E2F-DP 転写因子複合体が活性化され、複製開始点の活性化に必須な cdc6 を含むいくつかの S 期の開始と進行に必須な遺伝子の発現を促す。Cdk2 は、Cdk4/6 に協力し Rb の不活化を促すと共に、複製開始に関わる因子のリン酸化を通じて、S 期開始を促進する。

浮遊条件下で培養し G1 期に停止した繊維芽細胞では、Cdk2、Cdk4/6 の不活化のみならず、複製開始に必須な Cdc6 タンパク質の発現が完全に遮断されることが、最近当研究室によって明らかにされた。この制御は、Rb 非依存性転写抑制と、これまで知られていたユビキチン・プロテアゾームとは異なるパピイン族のタンパク分解酵素による分解の二つの機構によってもたらされている。このような Cdc6 の発現制御は、これまでその存在がまったく知られていない。そこで本研究では、Cdc6 の発現を制御するシグナル経路の解明を目指した。その結果、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ(PI3K)-mTOR のシグナル経路が Cdc6 の転写活性化と分解抑制に必要不可欠であることを見出した。

ラット腎臓由来の正常繊維芽細胞である NRK-49F は EGF と TGF- β の共存下では可逆的に足場

非依存性増殖を行う。この細胞を研究対象として G1-S 期の遷移制御機構の解明を行った。PI3K の阻害剤である LY294002(LY)で処理すると、NRK は G1 期に停止し、特徴的な事には、Cdc6 タンパク質の発現が消失する。この現象は EGF+TGF- β (ET)刺激によって回復するが、PI3K の活性阻害そのものを解除したためではない。

次に、この Cdc6 の発現消失がいかなる機構でもたらされているかを検討した。通常の細胞周期の中では Cdc6 の発現は、主に Rb 依存的な転写抑制の解除とユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解によって制御されていることが知られている。LY 処理による G1 停止時の Cdc6 発現消失は転写抑制によってもたらされているが(図 1A)、CMV プロモーターを用いて Cdc6 を恒常的に発現させても LY 処理によ

って Cdc6 の消失は起こる事から(図 1B)強力なタンパク質分解系が働いている事がわかった。また、この Cdc6 分解は、ALLN (パパイニン族タンパク質分解酵素の阻害剤) で処理した場合に最も効率よく抑制された(図 1B)。このように、足場消失による G1 期停止時の Cdc6 分解制御のメカニズムと類似していた。また、Balb/c3T3 および C3H10T1/2 細胞においても同様の結果が得られた。したがって、LY 処理による Cdc6 タンパクの分解機構は細胞種に依らない現象であるものと考えられた(図 1C,D)。

足場消失によって Cdc6 の発現消失がもたらされる事は前述の通りであるが、これまでの当

研究室の解析により、パパイニン族タンパク質分解酵素の中でも、リソソームのカテプシン L もしくはその類似体によって Cdc6 が分解されることが明らかになった (神野ら私信)。これに基づき、Cdc6 恒常発現株に LY を作用させ、カテプシン L 特異的阻害剤を投与したところ、Cdc6 の分解が効率よく抑制された(図 1E)。したがって、足場消失時と同様に、LY 処理による Cdc6 分解はカテプシン L によってもたらされているものではないかと考えられた。更にこれを裏付けるため、*in situ* でのカテプシン L 及びカテプシン B の活性を測定した。その結果、LY 処理により細胞質内カテプシン L の活性は上昇し、特に核周辺にドット状の染色として観察された。これはリソソームから放出されるカテプシンを捉えたものと推測される。また、このカテプシン L の活性は、Cdc6 の発現を起こす ET 刺激によって抑制された。すなわち、Cdc6 の発現パターンと完全な逆相関が見られた。一方、カテプシン B では LY 処理に依って活性が上昇するものの、ET 刺激によって活性の抑制は見られなかった。

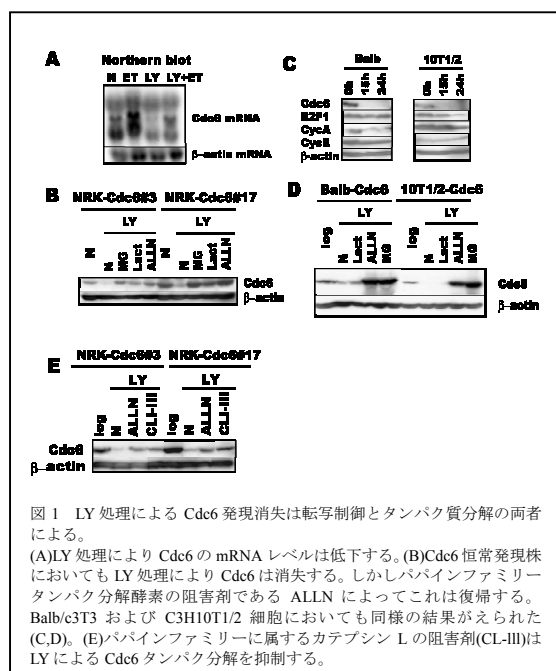


図 1 LY 処理による Cdc6 発現消失は転写制御とタンパク質分解の両者による。(A)LY 処理により Cdc6 の mRNA レベルは低下する。(B)Cdc6 恒常発現株においても LY 処理により Cdc6 は消失する。しかしパパイニンファミリータンパク質分解酵素の阻害剤である ALLN によってこれは復帰する。Balb/c3T3 および C3H10T1/2 細胞においても同様の結果がえられた(C,D)。(E)パパイニンファミリーに属するカテプシン L の阻害剤(CL-III)は LY による Cdc6 タンパク分解を抑制する。

これらの事から LY 処理によって抑制を受けるシグナル経路と足場消失によって抑制を受けるシグナル経路およびその下流の Cdc6 発現の制御機構は同一である可能性が極めて高いと考えられた。

LY は、元来 PI3K の特異的阻害剤として開発されたが、同じ濃度で、PI3K の下流の因子でありなおかつ PI3K 超族の一員である mammalian target of rapamycin (mTOR) の活性を阻害することが報告されている。このことは、LY の効果が mTOR を抑制することによって発揮されている可能性を示している。そこで次に、mTOR が Cdc6 の分解制御に関与しているか否か及び、PI3K シグナルが Cdc6 の分解制御に

必須であるか否か、更に、そうであれば mTOR を介しているか否かを検討した。mTOR の特異的阻害剤である rapamycin (RM) で処理すると増殖抑制が起こり(図 2A)、このとき Cdc6 タンパク質は消失する(図 2B)。また、PI3K の特異的阻害剤である wortmannin (WM) で処理しても Cdc6 のタンパク質消失は認められた(図 2B)。Cdc6 恒常発現株においても同様に RM および WM によって Cdc6 の発現が消失し、ALLN もしくは ET の共存によって Cdc6 の発現消失は復帰した(図 2C)。さらに *in situ* でのカテプシン L 活性を測定したところ、RM と WM 処理した場合においていずれも細胞質のカテプシン L の活性は上昇し、ALLN もしくは ET の共存によって抑制された(図 3)。

よって、LY 処理と WM もしくは RM の処理がもたらす Cdc6 の分解は同じ制御系によるものであり、足場消失時の Cdc6 の分解制御と一致するものと考えられる。すなわち、PI3K 及び mTOR シグナルは、足場シグナルによる発現制御と同じ機構を介して Cdc6 の発現に必要な不可欠な役割を果たしていることが明らかになった。

次に、PI3K は mTOR を介して Cdc6 の発現制御に関与しているのか、もしくは独立で関与しているのかを検討した。通常のシグナル経路では PI3K と mTOR の中間に位置すると考えられている AKT の恒常活性化型を、アデノウイルスを用いて過剰発現させ、LY、WM

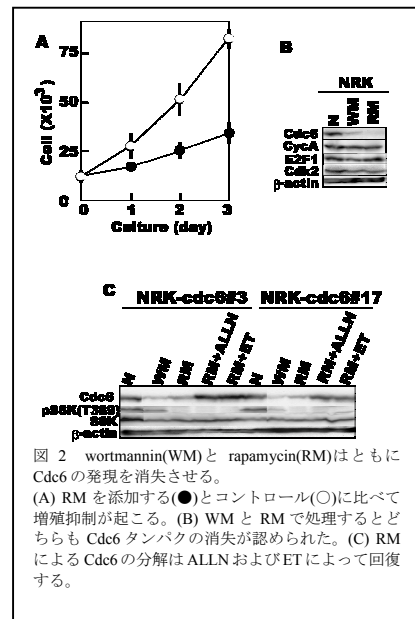


図 2 wortmannin(WM)と rapamycin(RM)はともに Cdc6 の発現を消失させる。(A) RM を添加する(●)とコントロール(○)に比べて増殖抑制が起こる。(B) WM と RM で処理するとどちらも Cdc6 タンパク質の消失が認められた。(C) RM による Cdc6 の分解は ALLN および ET によって回復する。

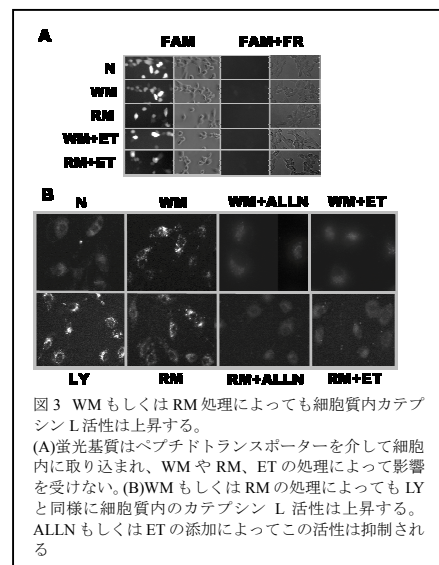


図 3 WM もしくは RM 処理によっても細胞質内カテプシン L 活性は上昇する。(A) 蛍光基質はペプチドトランスポーターを介して細胞内に取り込まれ、WM や RM、ET の処理によって影響を受けない。(B) WM もしくは RM の処理によっても LY と同様に細胞質内のカテプシン L 活性は上昇する。ALLN もしくは ET の添加によってこの活性は抑制される。

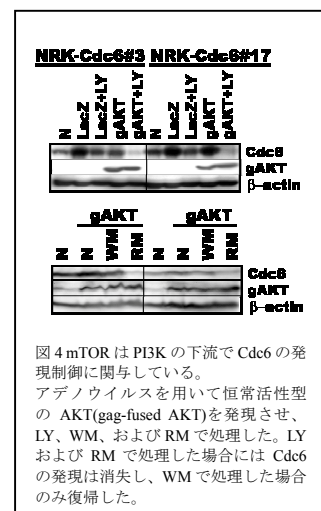


図 4 mTOR は PI3K の下流で Cdc6 の発現制御に関与している。アデノウイルスを用いて恒常活性化型の AKT(gag-fused AKT)を発現させ、LY、WM、および RM で処理した。LY および RM で処理した場合には Cdc6 の発現は消失し、WM で処理した場合のみ復帰した。

およびRMで処理した。もしもPI3Kシグナルが専らmTORを介してCdc6の発現制御を行っているならば、RMの効果を抑止できない一方、WMの効果は完全に抑止できるはずである。更に、LYの効果も全く抑止できないはずである。図4に示す通り、WMで処理した場合のみCdc6の分解を復帰できたことより、PI3KはmTORを介してCdc6の発現を制御していると結論付けられた。

これより、PI3K-mTORのシグナル経路がCdc6の分解を抑止しており、足場消失時のCdc6分解は、このシグナル経路の遮断によって引き起こされていると考えることができる。しかし、足場のシグナルによる制御ポイントはmTORの下流であるはずである。なぜなら、足場消失によりAKTのリン酸化およびS6Kのリン酸化レベルはわずかな減少を伴うが、維持されており、またET刺激によってもその活性は顕著な上昇をもたらさないからである。しかし、ET刺激を加えるとLY処理によってPI3K, mTOR両者が不活化されているにもかかわらずCdc6の発現がみられた。

これらのことより、足場シグナルと発がんシグナルと細胞周期のS期進行制御の接点が明らかとなり、図5のモデルが考えられた。足場存在下では通常PI3K-mTORシグナル経路を介して、リソソームからのカテプシンL放出が抑止されている。しかし、足場消失時にはmTORより下流のシグナル経路の遮断がおり、リソソームからのカテプシンL（および同類のカテプシン）が放出され、Cdc6の分解が起こる。ETによる発がん刺激の制御点はその足場消失のブロックポイントの下流に位置し、これはカテプシンLによるCdc6分解を抑止するものと考えられる。

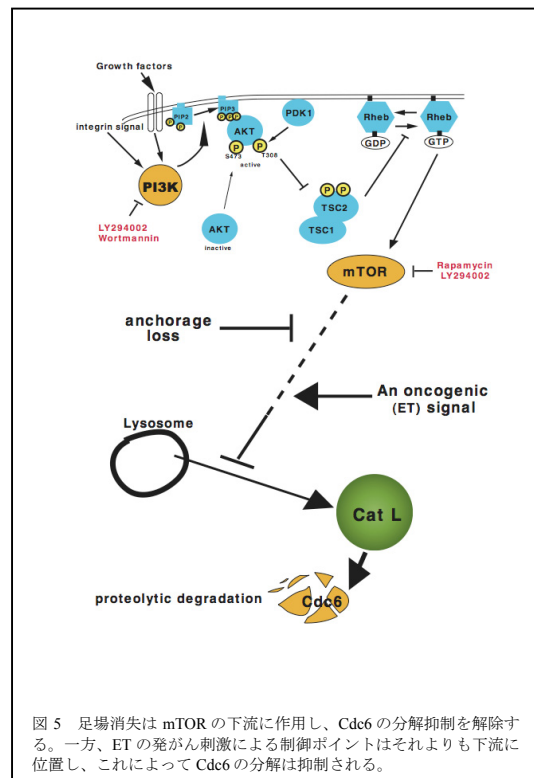


図5 足場消失はmTORの下流に作用し、Cdc6の分解抑止を解除する。一方、ETの発がん刺激による制御ポイントはそれよりも下流に位置し、これによってCdc6の分解は抑止される。