

論文の内容の要旨

論文題目 Differential Roles for Cdk4 and Cdk6 in Controlling G1-S
Transition and Oncogenic Transformation

和訳 G1-S 遷移および発ガンにおける Cdk4 と Cdk6 の異なった役割

指導教官 岡山 博人 教授

東京大学医学系研究科

平成13年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 陳 秋紅

細胞周期開始制御には、少なくとも2種類のサイクリン依存性タンパクリン酸化酵素、Cdk4/6 と Cdk2 が係わっている。アミノ酸配列の類似がきわめて高い Cdk4 と Cdk6 は、発現している細胞種は異なるが、いずれも細胞周期の開始時には発現誘導された D 型サイクリン (D1, D2, D3) と結合し活性化される。活性化された Cdk4/Cdk6 およびサイクリン E と結合して活性化された Cdk2 は Rb タンパクをリン酸化し不活化する。それによって E2F-DP 転写因子複合体は Rb から開放され、複製開始点の活性化に必須な Cdc6 遺伝子を初めとして S 期進行に必要な遺伝子の発現を誘導し S 期が始まる。少なくとも哺乳動物線維芽細胞では、

Cdk4 および Cdk6 が共に活性化されるにもかかわらず、なぜか Cdk4 は S 期の開始に不可欠である。Rb の不活化は Cdk6 でも起こることから、このことは、Cdk4 に特異的な S 期開始に必須な標的が Rb 以外に少なくともひとつ存在することを意味している。一方、サイクリン D3 と結合した Cdk6 は p27、p21、p16 等の CKI による阻害を受けず、増殖抑制下で細胞の増殖能を制御するきわめて特異な役割を担っている。

以上の結果を踏まえ、第一章の研究では、静止期の細胞でも活性があるサイトメガロウイルスプロモーター由来の発現ベクターを用いてマウス線維芽細胞株 BALBc3T3 および C3H10T1/2 細胞の Cdk4 および Cdk6 の安定高発現株を作成し、培養皿上のフォーカス形成を指標に調べることによってこれらの Cdk の高発現が、紫外線照射や強力な化学発癌剤である 3MCA による発癌に与える影響を検討した。その結果、Cdk6 の高発現株のみに多数のフォーカス形成が観察される一方、Cdk4 の高発現は、むしろこれらの物理・化学発癌を抑制することが判明した。

そこで、Cdk6 が発癌効率を上げるように働く相棒のサイクリンを同定するために、BALBc3T3 および C3H10T1/2 細胞の Cdk6 高発現株にサイクリン D3 あるいはサイクリン D1 を導入し、安定高発現株を作成し、発癌効率に与える影響を検討した。その結果、サイクリン D3 と Cdk6 を導入した細胞の発癌効率が Cdk6 のみの場合よりも著しく増大したことが分かった。これに対して、サイクリン D1 を導入した細胞では、紫外線照射と 3MCA の量に係わらず、トランスフォーメーションを強く抑制した。すなわち、フォーカス形成アッセイで見ると、増殖抑制下で細胞の増殖能を高めることができる Cdk6-D3 複合体のみが発癌に対する感受性を著しく高めることを見いだした。

次に、Cdk6 キナーゼ活性のないおよびサイクリン D3 を導入した上述の 2 種類の細胞において、同じ条件下で検討した。その結果、紫外線照射や 3MCA の誘導下でもトランスフォーメーションフォーカスの形成が全く見られなかった。したがって、発癌の昂進には Cdk6 のキナーゼ活性は必須であると結論づけられた。さらに、Cdk6-D3、Cdk6-D1、Cdk4-D1 複合

体の高発現株を足場がない状態で G1 期に停止させ、キナーゼ活性を調べた。Cdk6-D3 場合のみがキナーゼ活性が維持していることが分かった。以上のことから、Cdk6-D3 複合体が p27 の CKI に阻害されず、増殖抑制下で細胞の増殖能を高めることができる結果、物理・化学発癌に対する感受性を著しく高めると考えられた。

第二章では、Cdk4 の更なる標的因子の同定を試みた。アデノウイルスを介してドミナントネガティブ変異 Cdk4 を発現させたラット線維芽細胞株 NRK を G1 期に停止させ、血清刺激後 G1 から S 期への進行に必須な因子の発現を、免疫ブロットを用いて検討した。その結果、E2F-DP に依存した E2F-1 とサイクリン A などと複製開始点の活性化に必須な Mcm や Cdt1、Geminin などの因子の発現は変わらなかったが、Cdc6 発現のみが特異的に抑制されていることが分かった。

次に、Cdc6 発現のどの段階に Cdk4 が必要かを調べた。アデノウイルスを介してドミナントネガティブ変異 Cdk4 を発現させたラット線維芽細胞株 NRK においては、Cdc6 mRNA の誘導が著しく抑制されていることが判明した。さらに、ラット NRK 細胞の Cdc6 高発現株を用い、Cdk4 の不活化による Cdc6 タンパク質レベルへの影響を調べた結果、Cdk4 の不活化は Cdc6 蛋白質の安定性に影響を与えなかった。このことから、Cdk4 が Rb のリン酸化とは別に、cdc6 遺伝子の転写を制御していると考えられた。

以上の結果を踏まえ、S 期開始に Cdc6 転写制御が Rb 以外に Cdk4 の特異的な標的になっているかを調べた。抗 Cdk4 抗体の微量注入およびアデノウイルスを用いたドミナントネガティブ変異 Cdk4 発現による内因性 Cdk4 を不活化した NRK 細胞においては、S 期開始が阻止されたが、Cdc6 を持続発現させた NRK 細胞では、いずれの方法で Cdk4 を不活化させても、あたかも何の操作も施していないかのように S 期を開始した。したがって、S 期開始に関わっている Cdk4 の新たな標的は、Cdc6 遺伝子のみで、その転写活性化に Cdk4 活性が必要不可欠であると結論付けられた。

これらの成果は、これまで重複していると考えられた Cdk4 と Cdk6 が細胞周期開始制

御において異なった役割を演じていることを始めて明らかにしたもので、緻密な細胞周期開始制御機構の全貌ならびに発癌の根底機構の解明に新しい突破口を開くものと期待される。