

## 審査の結果の要旨

氏名 陳秋紅

本研究では、細胞周期の G1-S 遷移および発ガンにおいて重要な役割を果たしていると考えられる Cdk4 と Cdk6 因子の役割の差異を明らかにするため、第一章では、マウス繊維芽細胞 (BALBc3T3 と C3H10T1/2) において Cdk4 や Cdk6 過剰発現の実験を行い、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。次に、Cdk4 因子は S 期開始に必須であることが知られていることから、Rb 以外に特異的な標的因子の同定をラット繊維芽細胞 (NRK) にて試みた、下記の結果を得ている。

1. 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ィルスプロモーター由来の発現ベクターを用いてマウス繊維芽細胞株 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。
2. 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える限り、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。
3. ドミナントネガティブ変異 Cdk6 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。

4. 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、免疫プ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。
5. 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。

以上、本論文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。本研究は緻密な細胞周期開始制御機構および発癌の根底機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。