

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Cdc6 controls recovery from DNA damage-induced S phase arrest

和 訳 Cdc6 は DNA 損傷による S 期停止からの回復を制御する

指 導 教 官 岡山 博人 教授

東京大学医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 關 秋明

概要：

染色体複製の S 期で DNA 損傷を受けると、細胞はその場で停止して、DNA 損傷を修復する。しかし、損傷が激しい場合、修復を終了後も S 期停止が持続し、回復すなわち細胞周期進行の再開が著しく遅延する。本実験は、この回復には DNA 複製開始複合体の形成に必要な Cdc6 が決定的な役割を果たしていることを明らかにした。

正常ラット腎臓繊維芽細胞 (NRK) が、S 期で MMS (methyl methane sulfonate) による DNA 損傷を受けると、DNA 損傷修復時の細胞周期停止に必須な DNA 損傷チェックポイント因子である CHK1 のリン酸化が見られた。しかしながら、S 期停止は、損傷修復の終了を示す CHK1 リン酸化の消失後も長く続き、その後 S 期進行は再開した。S 期停止時、Cdk2 は p53 に依存して誘導された p21 によって不活化され、Cdc6 タンパク発現レベルは低くなったが、S 期進行の再開と共に Cdk2 の活性化と Cdc6 タンパクの再蓄積が起こるこ

とを見出した。そこで、Cdc6 を高発現する NRK 細胞を作成し、Cdc6 強制発現の効果を検討した。その結果、同じ損傷を受けたにもかかわらず、Cdk2 の再活性化並びに S 期進行の回復が、著しく早まることが判明した。 *In Vitro* で合成した Cdc6 が NRK 細胞から抽出した活性のない Cdk2 を *In Vitro* で ATP 依存的に活性化できることも本実験で初めて見出した。また、ATPase 欠損変異型 Cdc6 は *in vitro* でも *in vivo* でも Cdk2 を活性化できないことも判明した。

以上の結果から、Cdc6 は DNA 複製開始に重要な役割のほかに、DNA 損傷による S 期停止の回復も制御する重要な因子であると結論つけられた。

背景：

細胞のゲノムは生活環境から絶えず UV や化学物質など様々な損傷を受けている。細胞は、DNA 損傷を受けると、チェックポイント機構が働き細胞周期をいったん停止させ、その間 DNA を修復する。この DNA 損傷チェックポイント機構がうまく働かないと、切断、転座、異数化等の染色体異常や、細胞死や癌化が引き起こる。細胞は S 期で DNA 損傷を受けると、損傷センサーである ATR, ATM が活性化され、損傷チェックポイント因子である Chk1 をリン酸化し活性化する。活性化された Chk1 は、Cdc25A フォスファターゼをリン酸化し分解に導く。その結果、Cdk2 の 15 位チロシン残基の脱リン酸化が進まず、Cdk2 の活性化が抑えられる。同時に、損傷センサーによって p53 が活性化されその結果誘導される p21 によって更に Cdk2 の活性が抑えられ未発火の複製開始点の活性化が抑制される。加えて、ATR は、複製開始に必須な Cdc7 をリン酸化し、複製開始点の活性化を抑える。細胞の DNA は嚴重に損傷される時、修復が終わった後も、細胞周期はすぐに回復しない。私はこの回復遅延の原因を調べた。

方法と結果：

1 G_0 に同調された正常ラット繊維芽細胞 (NRK) を血清刺激後 G_1 から S 期へ進行させ、 S 期に入った細胞に MMS を与えて、DNA 損傷を引き起こした。Cdc6 は S 期停止に伴って著しく分解された。この時、Chk1 のリン酸化、P53 および p21 の発現と Cdk2 活性の消失も見られた。 S 期進行と Cdk2 活性は Chk1 リン酸化シグナル消失の後約 10 時間で回復した。この結果は、細胞周期は DNA 損傷修復終わった後も何らかの原因ですぐ回復できないことを示している。Cdc6 の再発現が S 期再開のタイミングと一致したことに注目した。

2 次に、Cdc6 が S 期再開に関与している可能性を検討した。Cdc6 高発現 NRK 細胞に MMS を加えて、細胞は S 期に停止したが、Chk1 のリン酸化シグナルの消失後直ちに S 期進行を始めた。P53 と P21 は野生型 NRK 細胞と同じように全細胞でまだ大量に発現しているにも関わらず、Cdc6 高発現 NRK 細胞の Cdk2 活性は細胞周期回復のタイミングと同じように早く回復した。

3 この現象は特定の DNA 障害剤や特定の細胞だけに起こるではないことを確認するために、NRK 細胞と Cdc6 高発現 NRK 細胞に cisplatin による DNA 損傷及びマウス繊維芽細胞 C3H10T1/2 と Cdc6 高発現 C3H10T1/2 細胞に MMS による DNA 損傷の S 期停止と回復を検討した。再び、Cdc6 高発現細胞は Cdk2 の活性化と共に S 期停止からの細胞周期の回復が著しく亢進するのを確認した。

4 DNA 損傷の際、ATR の活性化によって ATR-Chk1-Cdc25 シグナル経路と ATR-P53-P21 シグナル経路によって Cdk2 活性が抑えられて、 S 期停止が起こる。そこで、Cdk2 活性抑制機構を検討した。まず、 S 期に入った マウス繊維芽細胞 (MEF) と MEF の P21^{-/-}細胞を用いて検討した。その結果、MEF 細胞は、NRK 細胞 C3H10T1/2 と同じように挙動し、Cdk2 の不活化と長期の S 期停止が見られたが、P21^{-/-}MEF では、Cdk2 の不活化が起こらずに、迅速な S 期停止からの回復が見られた。なお、いずれの細胞でも、DNA 損傷時の Cdk2Y15 リン酸化レベルの有意な上昇は、認められなかった。更に、野生型 Cdk2 と脱リン酸化変異型 Cdk2F15 の高発現 NRK 細胞とでは、 S 期停止と再開のタイミングに有意な差異は見られな

かった。以上の結果から、誘導された P21 が Cdk2 の活性抑制の主たる責任機構であると考
えられた。

5 Cdc6 高発現細胞での Cdk2 活性の迅速回復の機構を検討した。そのために、C
末端に His-Tag を付いた Cdc6 を In Vitro Transcription- translation 系を用いて作成し、
Ni-NTA を用いて精製した。コントロールとして、未挿入のベクターを同様に処理し、Ni-NTA
で精製した。MMS 処理によって S 期に停止した NRK 細胞から免疫沈降した活性のない Cdk2
と精製した Cdc6 を *In Vitro* 反応した。その結果、精製した Cdc6 は ATP 依存的に Cdk2 を
活性化できることがわかった。また、*in vitro* で作成、精製した ATPase 欠損変異型 Cdc6
は Cdk2 を活性化できないことも判明した。

6 Cdc6 と ATPase 欠損変異型 Cdc6 を tet-off system で発現をコントロールでき
る細胞内に導入した。MMS による DNA 損傷の時、Doxycycline を入れない状態で、野
生型 Cdc6 を大量発現するときの Cdk2 の活性化と S 期停止の回復の亢進するに対して、
ATPase 欠損変異型 Cdc6 を大量発現しても Cdk2 の活性化と S 期停止からの細胞周期の回復
の亢進が見られなかった。

結論と考査：

以上の結果より、Cdc6 は今までよく知られている DNA 複製開始制御因子のほかに、
初めて、DNA 損傷による S 期停止の回復を制御する重要な因子であることがわかった。更に、
本研究で初めて Cdc6 が Cdk2 を活性化できることを明らかにした。これは Cdc6 と Cdk2 の
相互作用ならびに細胞周期制御機構の全貌の解明に新しい突破口を開くものと期待される。