

## 論文の内容の要旨

論文題目 **Spatiotemporal Dynamics of Cyclin-Dependent Kinase 2 Regulation in the Cell Cycle**

和訳 細胞周期におけるサイクリン依存性キナーゼ 2 制御の時空間的動態

東京大学医科系研究科

平成15年入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

フィリップ オリヴィエ デジレ      ロラン  
氏名 PHILIPPE      Olivier      Désiré      Laurent

### <序論>

DNA 複製は、複製開始点と呼ばれるクロマチン DNA 上の特異的な配列で開始される。DNA 複製は、通常、replisome あるいは複製工場 (replication factories、RF) と呼ばれている巨大なタンパク質複合体の中でおこなわれる。RF は、BrdU などの取り込み実験により可視化され、未固定細胞でも観察されている。さらに RF は、染色体 DNA を除去した後も核内に残存していることから、核内構造に結合していると考えられている。

複製開始点における DNA 複製を制御するために二つの制御機構が存在している。一つはライセンス機構であり、この機構によりそれぞれの開始点は必ず一回、しかも一回だけ活性化されるように制御されている。二つ目は、サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) によるリン酸化制御である。哺乳類の DNA 複製の制御においては Cdk2 が中心的な役割を担っている。Cdk2 は、複製過程の開始および進行とともに、再複製の抑制にも重要な役割を果たしている。

Cdk2 は、様々な制御因子によって正と負の調節を受けていることが明らかにされている。(1) Cdk2 は、調節サブユニットであるサイクリン A あるいは E と結合することにより活性化される。(2) Cdk2 は、活性型および抑制型のリン酸化制御を受ける。サイクリン活性化キナーゼ (CAK) 複合体 (Cdk7-サイクリン H) は、Cdk2 の Thr160 をリン酸化し、Cdk2 を活性化する。これに対して、Wee1 は Tyr15/Thr14

をリン酸化し、Cdk2 活性を抑制する。この抑制的リン酸化は、Cdc25 脱リン酸化酵素により脱リン酸化され、その結果 Cdk2 が活性化される。(3) さらに、Cdk2 の活性は、Cdk 抑制タンパク質 (p21 および p27) が結合することにより抑制される。

以上のように Cdk2 の制御機構について詳細な研究がおこなわれているにもかかわらず、Cdk2 がどのようにして個々の開始点における DNA 複製を制御しているかについては不明の点が多く残されている。DNA 複製の開始には、低いレベルの Cdk2 キナーゼ活性が必要であり、Cdk2 活性が高い場合には、逆に複製を抑制することが知られている。Cdk2 活性は S 期の進行とともに増加することが知られている。しかしながら、S 期においては、複製開始前、複製中および複製終了後の様々な段階の開始点が混在していることから、核全体における Cdk2 活性の総量を制御する単純な機構では、Cdk2 がどのようにして個々の複製開始点を制御しているかを説明できない。したがって、Cdk2 は個々の複製開始点において局所的な制御を受けていると推定される。

すでに様々な手法によって、Cdk2 が RF に存在することが示されている。この巨大タンパク質複合体は、個々の DNA 複製開始点における DNA 複製の時空間的な制御を可能にするための微少環境を提供すると考えられる。Cdk2 が RF において制御を受けているならば、Cdk2 が、RF の中で Cdk2 制御因子と相互作用していると考えられる。従来、RF を構成する因子の解析には、免疫組織化学的手法が用いられてきたが、この手法では複合体を構成する因子の相互作用を定量的に解析することは困難である。そこで本研究では、生化学的細胞分画法を用いて、核構造に結合した Cdk2 を抽出し、Cdk2 制御因子との相互作用を解析することを目指した。その目的のために、界面活性剤を用いて核構造に結合していない可溶性タンパク質を除去した後、穏やかな塩処理によって核構造結合因子を抽出する方法を開発した。この方法を用い、界面活性剤処理に対して可溶性および非可溶性 (核内構造結合) Cdk2 複合体を分離し、S 期におけるその活性と複合体構成因子の変化を解析した。

## <結果>

### (1) 非イオン性界面活性剤処理による核構造結合および非結合可溶性因子の分離

RF に存在する Cdk2 複合体を解析するためには、細胞質および核質に存在する (NS に結合していない) 分画を除く必要がある。RF および染色体 DNA を含む核構造に結合したタンパク質複合体は、界面活性剤処理に対して抵抗性であることが知られている。そこでまず非イオン性界面活性剤 (0.1% Triton X-100) で処理することにより、核内構造に結合していない可溶性タンパク質を抽出する条件を検討した。

(i) 対照として用いた細胞質マーカー GAPDH は可溶性分画に、核内構造に結合しているヒストン H1 $\alpha$  およびラミン B1 は不溶性分画に検出された。

(ii) G1 期にクロマチンに結合することが知られているライセンス因子 Mcm2 は可溶性分画と不溶性分画の両方に検出された。

(iii) 核質にのみ局在するマーカーは知られていない。そこで、上記の Triton X-100 を用いた方法と、核膜より細胞質を優先的に可溶化する界面活性剤 (digitonin) を用いた方法とを比較することにより、NS に結合していない核タンパク質の抽出効率を調べた。その結果、GAPDH、ヒストン H1 $\alpha$  およびラミン B1 については差が認められなかったが、digitonin 処理では多くの Mcm2 が不溶性分画に残存していたのに対し、Triton X-100 処理では一部を除いて大部分が抽出された。以上の結果から、Triton X-100 を用いた方法により、核内の可溶性タンパク質を効率的に抽出できることが分かった。

## (2) 高濃度塩処理による核構造結合因子と Cdk2 複合体の可溶化

次に、界面活性剤処理後、不溶性分画に残存したタンパク質を 350 mM の塩処理によって抽出した。その結果、残存した Cdk2-サイクリン A 複合体および Mcm2 のほとんどが抽出されること、この塩処理によって Cdk2 複合体の活性が影響を受けないことが確認された。

以上、(1) と (2) の結果から、Triton X-100 処理とそれに続く塩処理を用いた細胞分画法により、細胞質および核質のタンパク質が除去され、核構造に結合した Cdk2 複合体が抽出されることが分かった。

## (3) S 期における Cdk2 の活性化

S 期における Cdk2 活性の制御を調べるため、NIH3T3 細胞を接触阻止により G0 期に静止させ、別の培養皿に播種することにより細胞周期を同調させた。FACS 解析により、この方法により高い細胞周期の同調性が得られること、19 時間に S 期が開始し、29 時間に G2/M 期に入ること、Cdk2 の活性化が 19 時間から認められることを確認した。

## (4) 核内構造に結合した DNA 複製因子の動態

次に上記の細胞分画法を用いて、NIH3T3 細胞の S 期 (19 から 29 時間) における DNA 複製に関与する因子を解析した。その結果、核構造結合分画において、PCNA の量が S 期中期の 24 時間にピークに達すること、一方、ライセンス因子 Mcm2 および Mcm7 は、S 期の進行とともに次第に減少することがわかった。以上の結果は、過去の報告と一致しており、本研究で用いた細胞分画法が核構造に結合した複合体の解析に使用できると結論した。

## (5) 核内構造内における Cdk2 とその制御因子の相互作用

次に Cdk2 と Cdk2 制御因子との相互作用を免疫沈降法で解析し、核構造結合および非結合分画における相違を比較した。

- (i) まず、Cdk2 抗体による免疫沈降後、残った抽出液中の Cdk2 量を調べ、ほとんど残存が認められないことを確認した。したがって、以下はこの方法を用いて Cdk2 とその制御因子との相互作用の検討をおこなった。
- (ii) S 期の進行とともに核構造に結合した Cdk2 の増加が認められた。また移動度の早い Cdk2 (Thr160 リン酸化型、後述) のみ、核構造結合分画に結合していた。その動態は、Cdk2 キナーゼ活性およびサイクリン A2 との結合の増加と一致していた。
- (iii) これに対して、核構造に結合した Cdk2 とサイクリン E2 との結合はほとんど認められなかった。したがって、核構造に結合した Cdk2 の活性化には、主にサイクリン A2 が関与していると結論した。
- (iv) 一方、核構造に結合していない大部分の Cdk2 は、サイクリン A2 と結合していないことが分かった。
- (v) リン酸化特異的抗体を用いて、Cdk2 のリン酸化状態を検討した結果、Thr160 の活性型リン酸化を受けた Cdk2 のみが核構造に結合していることが分かった。
- (vi) しかしながら、Thr160 がリン酸化された Cdk2 は Thr15 抗体によっても検出された。したがって、核構造に結合している Cdk2 には、Thr160 リン酸化型 (活性型) および Thr160・Thr15 リン酸化型 (不活性型) の二つのリン酸化型が存在すると考えられる。
- (vii) さらに核構造結合 Cdk2 は CDK 阻害因子 p21 との結合していた。したがって、核構造結合 Cdk2 は Cdk2 活性の高い S 期においても抑制的制御を受けていることが明らかになった。
- (viii) 一方、核構造結合 Cdk2 は Thr15 の抑制的リン酸化を脱リン酸化する Cdc25A と結合していた。さらに Cdk2 と結合した Cdc25A の量は S 期における Cdk2 活性の増加と一致していた。
- (ix) 核構造結合 Cdk2 は、Thr160 のリン酸化を受けているにもかかわらず、このリン酸化に関与するサイクリン H と Cdk7 とも結合していることが分かった。さらに核構造結合分画でのみそれらのタンパク質と Cdk2 との結合が認められた。
- (x) 最後に、核構造結合 Cdk2 は、その基質である Cdc6 とも結合していた。その結合量は、DNA 複製の盛んな S 期中期で最大であった。したがって、Cdk2 抗体による免疫沈降物には Cdk2 の制御のみではなく、DNA 複製に関与する因子も含まれていることが示された。

#### <結論と考察>

以上の結果から、核構造に結合した Cdk2 が正と負の両方の制御を受けていること

が示唆された。核構造に結合した Cdk2 の活性は S 期の進行とともに増加し、その活性化にはサイクリン A2 との結合が重要であることが確認された。核構造結合 Cdk2 は、活性型リン酸化型 (Thr160) であったが、少なくとも一部は抑制的リン酸化 (Thr15) も受けており、さらに p21 とも結合していた。以上の結果は、核構造に結合した Cdk2 のうち一部は不活性化状態であることを示しており、必要なときに活性化を受ける可能性が示唆された。事実、その可能性を支持する結果として、Cdk2 を活性化する Cdc25A、および Cdk 活性化キナーゼの構成因子 (cyclin H および Cdk7) も核構造結合 Cdk2 と結合していることが明らかになった。以上の事実は、核内構造に結合した巨大なタンパク質複合体である RF 内において Cdk2 活性が制御されていることを示唆するとともに、RF 内での局所的な Cdk2 活性の制御により、個々の複製開始点における DNA 複製が制御されている可能性を支持するものである。この制御機構を明らかにするためにはさらなる解析が必要であるが、本研究で用いた細胞分画法はそのための有効な手段の一つとなると考えられる。