

【別紙 1】

論文内容の要旨

論文題目 **Cdk6-cyclin D3 complex evades inhibition by inhibitor proteins and uniquely controls cell's proliferation competence**

日本語訳 **Cdk6-サイクリン D3 複合体はサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパクによる抑制を受けず、細胞の増殖能を特異的に促進する**

氏名 ジェイ・リン
Jie Lin

哺乳動物細胞では、細胞周期の開始にサイクリン D 依存性キナーゼが必要である。しかしながら、多くの間質系細胞では、機能が重複していると思われる 3 種の D 型サイクリンと同様に構造がよく似た Cdk4 と Cdk6 がパートナーキナーゼとして発現している。Cdk6 は発現が低く Cdk4 と類似の構造を持つことから、線維芽細胞では、重要な機能を担っていないと考えられてきた。しかしながら、私は、Cdk6 とサイクリン D3 複合体は、他の組み合わせと異なり、サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパクである p21^{Cip1} や p27^{Kip1} による阻害を受けず、増殖抑制下やストレス受容下での細胞の増殖能を制御できる極めて重要な役割を果たしていることを見出した。

Cdk6-D3 複合体のみが、足場消失によって引き起こされる G1 期停止時に活性を保持している。

発癌刺激による細胞周期開始制御機構の解明を進めていくなかで、Cdk4 と異なり Cdk6 キナーゼが、p21^{CIP1} and p27^{KIP1} サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパクが豊富に発現している、足場消失に伴う G1 期停止の状態を維持していることを見出した。用いた細胞は、Cdk4 あるいは Cdk6 を 3-5 倍高発現するように発現 cDNA を導入した NRK-49F 細胞株のクローンである。足場の無いメチルセルロース培地で培養すると細胞は G1 期に停止するが、その後発癌刺激となる EGF と TGF- β で

刺激すると足場が無い状態で S 期に進行し増殖することができる。EGF と TGF- β で刺激した後 3 時間までは、Cdk4 はサイクリン D と結合し、活性を抑えるチロジン残基のリン酸化がないにもかかわらず、活性を持たなかった。これに対して、Cdk6 はすでに 0 時間で活性化されていて、発癌刺激を加えてもほんの少し活性の上昇が見られるのみであった。この NRK 細胞には、サイクリン D1, D2, D3 のいずれも発現しているが、Cdk6 と複合体を形成し活性を保持しているのは、D3 のみであった。このことは、Cdk6 の過剰発現細胞に更にサイクリン D3 あるいは D1 を過剰発現させた細胞の解析によって確認された。Cdk6 と D3 を過剰発現させた細胞から回収した D3 と複合体を形成したキナーゼは、0 時間および 3 時間でフルの活性を持っていたのに対し、Cdk6 と D1 を過剰発現細胞では、D3 および D1 と複合体を形成したキナーゼいずれも活性を持たなかった。なお、Cdk4 を高発現させた細胞では、いずれのサイクリンの高発現と組み合わせても、Cdk4 は活性をもたなかった。

Cdk6-D3 複合体は p27^{KIP1} and p21^{CIP1} とほとんど結合せず、不活化を免れる。

足場消失による G1 期停止時、p27^{Kip} は Cdk4 および Cdk6 を高発現した NRK 細胞で発現が誘導されるが、発癌刺激時には、次第に減少する。そこで、サイクリン D 依存性キナーゼの選択的不活化に p27^{Kip1} や p21^{Cip1} が関与している可能性を検討した。両高発現細胞から免疫沈降させたサイクリン D3 と結合した p27 は D1 と結合した p27 より著しく少なかった。とくに、Cdk6 と結合した D3 にはほとんど結合しなかった。一方、p21 は、キナーゼパートナーには関わり無く D1 とのみ結合が認められた。更に、p27 の免疫沈降実験から、ほとんどの Cdk6-D3 複合体は、足場消失による G1 期停止に p27 が大量に発現誘導されるにもかかわらず、p27 には結合していなかった。更に、試験管内での p27 添加による不活化実験から、Cdk6-D3 の複合体は不活化されなかった。

Cdk6 と D3 を高発現している細胞は、接触阻止や血清飢餓に抵抗性を示す。

Cdk6-D3 複合体が阻害因子による不活化を免れることから、Cdk6, Cdk4, 共にシングル、および Cdk6/D3, Cdk6/D1, Cdk4/D1 あるいは Cdk4/D3 の二重高発現株の性状について検討した。増殖培地で

は、ももの NRK 細胞は 3×10^4 cells/cm² の細胞濃度で増殖が停止したのに対して、Cdk6/D3 高発現株では、2~4 倍の細胞密度まで増殖した。Cdk6 の単独高発現株では、1.5 倍程度であった。これに対して、D1 を更に高発現した株では、Cdk6 の高発現の効果が打ち消され、ももの NRK 細胞より増殖できる細胞密度は低下した。一方、Cdk4 の高発現株では、増殖できる細胞密度は、NRK 細胞の半分程度であった。この Cdk4 高発現効果は、D3 の過剰発現では打ち消すことはできなかった。

これらの高発現株は、血清飢餓に対しても同じような挙動を示した。0.05% の血清中で Cdk6/D3 株は、血清刺激中の NRK 細胞とほぼ同じ割合で S 期に進行し、血清飢餓に抵抗性を示した。上記と同様に、Cdk4 単独および Cdk4/D3 高発現株では、むしろ G1 期停止が促進された。Cdk6-D3 の効果は、更に Balb/c3T3 細胞や NIH3T3 細胞でも再現された。

Cdk6 タンパクは増殖因子刺激によって誘導される。

Cdk6-D3 複合体は、p27 や p21 による不活化を受けないことから、増殖抑制時に外界からの増殖刺激に応答し細胞の増殖開始の初発制御因子としての役割が浮かび上がった。そこで、血清飢餓で G0 期に停止した細胞を増殖因子で刺激し増殖開始時の Cdk6-D3 の役割を検討した。G0 期に停止した BALB/c 3T3 および C3H10T1/2 細胞は、S 期に進行するのに二つの増殖因子を必要とする。一つは、コンピテンス因子と呼ばれ、platelet-derived growth factor (PDGF) がそれに当たる。他方は、進行因子と呼ばれ、EGF がそれに当たる。G0 期の BALB/c 3T3 細胞および C3H10T1/2 細胞を PDGF で処理すると、Cdk6 が著しく誘導され、同時に Cdk6-D3 の活性化が起こった。したがって、少なくとも一部の線維芽細胞では、Cdk6-D3 が増殖開始の初発制御因子として重要な役割を果たしていることが明らかになった。

結論

私は、Cdk6-cyclin D3 複合体が、1) 他の D 型サイクリンとパートナーキナーゼとの組み合わせのうち極めてユニークな性質を持ち、p27 や p21 キナーゼ阻害タンパクによる不活化を受けないこと、2) したがって、増殖抑制状況下で細胞の増殖能を制御する役割を果たしていること、3) 少なくとも一部の線維芽細胞では増殖因子による誘導を受け、増殖開始時の初発制御因子として働いていること、を明らかにした (図1)。その後、関連実験の共著者によって、この複合体を高発現させると紫外線発や化学物質による発癌の頻度が飛躍的に上昇することが明らかとなった。この発見によって、増殖抑制化の細胞の G1-S 期遷移制御機構の解明に、重要な突破口を開くと共に、ヒトの多段階発癌機構の一端の解明にも重要な手掛かりを得られる物と期待される。

Cdk6-cycD3 Controls Growth Competence

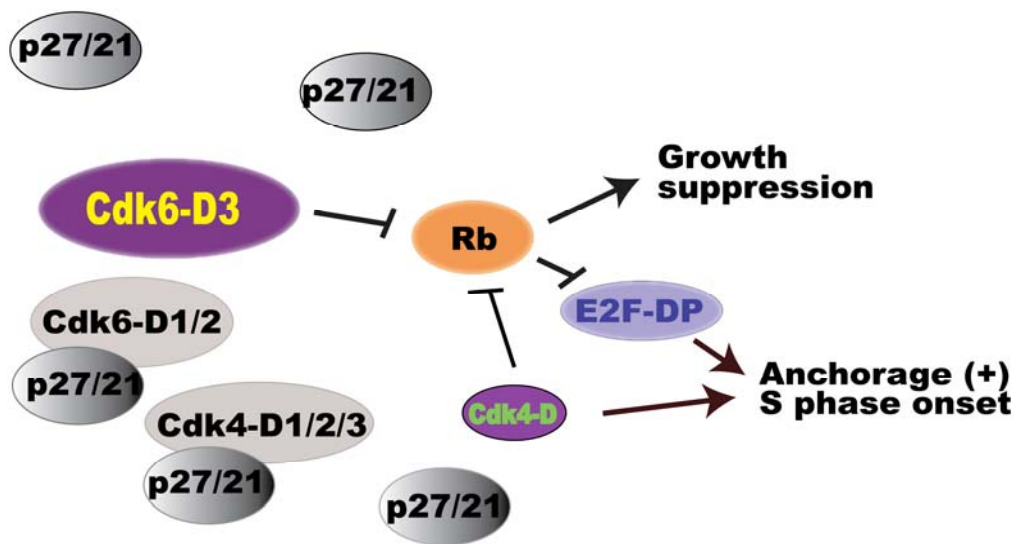


図1. Cdk6-cyclin D3 複合体は、 $p27^{KIP1}$ や $p21^{CIP1}$ による不活化を受けず、増殖抑制下で細胞の増殖能を制御できる。