

## [過程一2]

### 審査の結果の要旨

氏名 新美 晋一郎

造血細胞以外の全ての細胞は、増殖する際に細胞外マトリックス、すなわち足場への接着を必要とする。その接着を無くすと細胞は細胞周期を停止させ、アポトーシスが誘導される。アポトーシスとは、細胞が DNA 損傷などのさまざまなストレスを受けた際に細胞自身が自発的に誘導する細胞死である。特に、細胞が足場への接着を無くした際に誘導されるアポトーシスをアノイキスと呼ぶ。本研究では、Cdc6 がカスパーゼ-9 の活性化によって誘導されるアノイキスを抑制する新規のメカニズムの解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 本解析では、mTORC1 の活性化した細胞として、Tsc2 遺伝子が不活化されたラット線維芽細胞 (Eker REF) もしくは、mTORC1 の活性化因子である Rheb の活性化型変異体 (active Rheb : aRheb) を過剰発現したラット線維芽細胞 (REF-aRheb) を用いた。これらの細胞をメチルセルロース培地中で培養すると、カスパーゼ-3 の活性化が起こり、アノイキスが誘導された。カスパーゼ-3 の上流で働くカスパーゼファミリーを探索した結果、カスパーゼ-9 が mTORC1 の活性化によって誘導されることが明らかとなった。

2. さらにカスパーゼ-9 の活性化に必要なアポトーシス促進因子 Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor 1) の発現の経過を見た所、mTORC1 の活性化した細胞では Apaf-1 の発現が蛋白質・mRNA レベル共に常に高く維持されていることを見出した。

3. Cdc6 を過剰発現させると、カスパーゼ-9 の活性化が強く抑制されることが観察された。Cdc6 の発現は、Apaf-1、プロカスパーゼ-9 の発現に対しては影響しなかった。これらの結果から、Cdc6 はカスパーゼ-9 の活性化を抑制する可能性が浮かび上がり、以降の解析を行った。

4. Cdc6 とアポトーシス複合体の構成因子である Apaf-1、カスパーゼ-9、シトクロム C との結合の経過を見た所、Cdc6 がシトクロム C の付いた Apaf-1 に結合することによって、アポトーシス複合体の形成を抑制することが明らかとなった。

5. ATP加水分解活性の欠失した Cdc6 の変異体 Cdc6<sup>WB</sup>を発現した Eker REF では Apaf-1 の結合能が失われており、カスパーゼ-9 の活性化を抑制することができなかった。さらに、Eker REF の細胞質抽出液を用いた *in vitro* 再構成系においても *in vivo* と同様の結果が確認できた。従って、Cdc6 の ATP アーゼドメインが Apaf-1 への結合に必要であることが判明した。

以上、本論文は Cdc6 が DNA 複製の開始、DNA 損傷による S 期停止の回復を制御する因子であるだけでなく、アポトーシスを抑制する因子であることを明らかにした。これは細胞の生存と死のバランスの制御機構の解明に新しい突破口を開くものと期待されて、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。