

審査の結果の要旨

ソウミヤ シリバスタバ
SAUMYA SRIVASTAVA

Cyclin-dependent kinase activating kinase (CAK) は、サイクリン依存性キナーゼの T ループ領域をリン酸化する酵素で、ほとんどすべてのサイクリン依存性キナーゼの活性化に必須であるとともに、転写開始因子 TFIIH の必須サブユニットでもある。CAK は Cdk7 とサイクリン H とアッセンブリー因子である MAT1 からなる複合体である。これまで多くの研究にも拘らず、その活性を制御する機構はその存在すら疑われるほど未知であった。

本研究は、細胞周期開始時に働くサイクリン D 依存性キナーゼである Cdk4 および Cdk6 の T ループ領域のリン酸化を指標に、CAK の活性制御の可能性を探り以下の結果を得た。

1. Cdk4 および Cdk6 の T ループ領域の非リン酸化型変異タンパクを細胞に発現させ、正常型とともに等電点ゲル電気泳動と SDS ゲル電気泳動を組み合わせた二次元電気泳動を行い T ループ領域のリン酸化型の泳動位置をまず同定した。
2. mTORC1 の特異的阻害剤であるラパマイシンと MEK の特異的阻害剤である PD184352 で細胞を同時に処理すると、足場消失による G1 期停止の有無にかかわらず、T ループ領域のリン酸化が消失ないし減弱した。それぞれ単独の処理では効果はなかった。
3. 両阻害剤による同時処理を行うと、細胞内の Cdk7、サイクリン H、MAT1 の量には変化なかったが、Cdk7 と結合しているサイクリン H の量が著しく

減少した。

4. mTORC1 の下流因子である S6 キナーゼの阻害剤 H89 と PD184352 との同時処理でも T ループ領域のリン酸化が消失ないし減弱した。
5. S6 キナーゼのリン酸化標的配列様の配列が MAT1 に存在しショウジョウバエ MAT1 まで進化的に保存されていることを見出した。
6. この部位をリン酸化類似型であるグルタミン酸に変えた変異 MAT1 を発現させ、両阻害剤に対する感受性を調べたところ、Cdk4 の T ループリン酸化、CAK のアッセンブリーへの影響を見る限り、感受性を消失していた。
7. 正常型を発現させた場合、両阻害剤によって著しい細胞死誘導が起こるのに対し、上記の変異 MAT1 を発現させた細胞では、細胞死が著しく抑制されていた

以上の結果ら、MAT1 が少なくとも S6 キナーゼによりリン酸化を受け、活性化される機構の存在が浮かび上がった。本研究は、これまでその存在すら疑われてきた CAK の活性制御機構の存在の可能性を明らかにしたもので、細胞外シグナルにより細胞の増殖制御の全貌の解明に貢献するもので、学位の授与に値すると考えられる。