

審査の結果の要旨

アティッシュ ランジャン モハンティ

ATISH RANJAN MOHANTY

p27^{KIP1}は、細胞周期の G1 期から S 期への進行の過程で、主に Cdk2 の活性を負に制御する CDK 不活化因子である。これまで幾多の研究にも拘らず、この過程で染色体の複製開始に必須な Cdk2 の活性化がどのように制御されているかは、不明であった。最近、当所属研究室で、G1 期で p27^{KIP1}によって不活化された Cdk2 が Cdk2 に結合した p27^{KIP1}の C-末端がリン酸化を受けると、染色体上の複製開始点に複製前複合体を充填させる AAA+ ATPase である Cdc6 が、不活化された Cdk2 に結合し ATP の加水分解エネルギーを利用して結合している p27^{KIP1}を外し、Cdk2 を活性化することが見出された。一方、細胞が G1 期から S 期へ進行する際、p27^{KIP1}は、主に KIS キナーゼによってセリン 10 残基のリン酸化を、PIM および ROCK キナーゼによって C-末端のスレオニン残基のリン酸化を受けることが知られている。

本研究は、p27^{KIP1}のリン酸化による p27^{KIP1}の Cdk2 の不活化能への影響を生化学的、分子生物学的に検討し以下の結果を得た。

1. 大腸菌で発現させた組換え p27^{KIP1} および PIM1 あるいは活性型 ROCK1 と繊維芽細胞で発現させ精製した KIS を用いた In Vitro 実験で、KIS によるセリン 10 残基のリン酸化を行わない限り、PIM1 あるいは ROCK1 による p27^{KIP1}の C 末端のリン酸化が起きないことを見出した。
2. Cdk2 に結合した p27^{KIP1}について同様の実験を行ったが、結果は同じであった。
3. In Vitro 実験結果の確認として、セリン 10 残基をリン酸化を受けないアラニン残基に変えた変異 p27^{KIP1}を繊維芽細胞で発現させ C 末端のリン酸化の有無を調べたところ、正常な p27^{KIP1}と異なり C 末端のリン酸化が全く見られず、In Vitro の実験結果と

一致していた。

4. 次にリン酸化による p27^{KIP1} の Cdk2 不活化能への影響を組換え Cdk2/サイクリン A 複合体を用いて In Vitro 実験で調べたところ、未リン酸化型やセリン 10 リン酸化型の p27^{KIP1} と異なり、セリン 10 と C 末端にリン酸化された p27^{KIP1} は、Cdk2 の不活化能を消失していることが判明した。
5. 一方、Cdk2 に結合した p27^{KIP1} については、両残基がリン酸化された場合でも Cdk2 は不活化されたままであったが、この場合、Cdc6 によって ATP 依存性に結合した p27^{KIP1} が取り除かれ、Cdk2 の活性化が起こった。

以上の結果ら、p27^{KIP1} による Cdk2 の活性制御に関して、リン酸化を介した新しい制御機構の存在を明らかにした。本研究は、これまで知られていなかった機構により Cdk2 の活性が制御されていることを発見したもので、発がん機構の解明に大きく貢献するものと期待され、学位の授与に値すると考えられる。