

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2006～2010

課題番号：18109003

研究課題名（和文）：足場依存性・非依存性細胞増殖の分子機構

研究課題名（英文）：Molecular Mechanism of Anchorage-Dependent and
- Independent Proliferation

研究代表者

岡山 博人（OKAYAMA HIROTO）

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40111950

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：足場、細胞周期、細胞間マトリックスタンパク、Cdc6、APC/C^{Cdh1}

1. 研究計画の概要

がん細胞の普遍的性質の一つに、足場非依存性増殖能がある。生体の細胞の中で、造血細胞以外のすべての細胞は、細胞間マトリックスタンパクを足場にして増える。足場を除くと、これらの細胞は G₁ 期に停止し、死に至る。しかし、がん化に伴い、細胞は足場なしに増える能力を獲得し、転移が可能となる。したがって、足場による細胞増殖制御の解明が、発がん機構の解明の鍵となる。

本研究では、足場に依存した S 期開始の制御機構の全貌の解明を目指す。特に、足場消失時の G₁ 期停止機構と足場シグナルの伝達経路ならびにそれによる停止制御の本体を分子レベルで明らかにする。

2. 研究の進捗状況

Cdc6 タンパクの分解制御を行なう足場シグナル伝達経路の解明

我々は以前に足場消失時の G₁ 期停止機構のひとつが、染色体複製に必須な Cdc6 タンパクの分解であることを明らかにした。今回 Cdc6 の分解制御を行なう足場シグナル伝達経路の解明を大きく前進させた。以前に、遺伝性良性腫瘍である結節性硬化症の原因遺伝子である Tsc1/Tsc2 から Rheb、mTOR と連なるシグナル伝達経路が Cdc6 の発現制御に深く関わっている可能性を指摘したが、このことの確証をラット胎性線維芽細胞および Tsc2 変異線維芽細胞を用いた実験で得た。さらに、この経路による Cdc6 分解制御機構の実態が明らかになった。以下がその実験根拠である。1) Tsc2 の変異線維芽細胞では、

足場をなくしても Cdc6 は分解されない。しかしその状態で mTOR を阻害すると、Cdc6 の分解が起こる。2) Tsc2 の不活化変異を持つラット線維芽細胞では、足場が消失しても Cdk4 は活性化を維持し、その結果 APC/C^{Cdh1} の阻害タンパクである Emi1 が発現したままになる。3) 同レベルの Emi1 をラット胎性線維芽細胞に強制発現させると、足場をなくしても Cdc6 はかなり安定化する。4) 代わりに Tsc2 が不活化された線維芽細胞に Cdh1 を過剰発現させると、mTOR が活性化されているにもかかわらず、足場がないと Cdc6 は消失する。

G₁ 期細胞周期制御因子の操作による足場非依存性細胞増殖の誘導

当研究計画でのもう一つの試みは、G₁ 期で働く細胞周期制御因子の操作のみで足場非依存性細胞増殖を誘導できるかとの問に答えることである。サイクリン D とその依存性キナーゼのうち、Cdk6 とサイクリン D3 の組み合わせは、阻害タンパクによる阻害がかからず、足場が無い状態で Rb を不活化し、E2F 転写因子を活性化できることを以前に見出した。そこで、これまで解析に用いていた NRK ラット線維芽細胞株にこの二つと Cdc6 を強制発現させたところ、足場の無いメチルセルロース培地で、ほぼ HeLa 細胞と同じ速さで増殖することが判明した。ただ、同様の試みをマウスあるいはラットの胎性線維芽細胞で行なったところ、1 週間ほどは増殖できるがその後増殖を停止した。その主な原因は、初代培養細胞では分解活性が恐ろしく高く Cdc6 の発現を維持できないためと判断された。

p53 がん抑制遺伝子による Cdc6 の不安定化

p53 の強力ながん抑制の機構に関しては、よく知られたアポトーシス誘導能だけでは説明できない。申請書に、p53 が足場消失時の Cdc6 の不安定化に必要であることを述べたが、その機構について、APC/C^{dh1}ではなく未同定の SCF の機能に関わっている可能性を示す結果を得ている。しかし、SCF が未同定であるために、その機構に関しては不明である。ただ、ヒトがんで見つかっている 2 つの p53 変異では、共にがん抑制機能を部分的に保持しているも関わらず、アポトーシス誘導能とは乖離した性質を持つことが知られている。一つは、アポトーシス誘導能が消失しているが、がん抑制能を一部保持、他方はアポトーシス誘導能を保持しているが、がん抑制能が一部消失している。解析の結果、前者は、Cdc6 の不安定化能を有し、後者は消失していることが判明した。したがって、これら細胞周期因子の分解促進が、p53 のがん抑制能の一端を任している可能性が極めて高いことが明らかになった。

Cdc6 タンパクの新しい生理機能の発見

Cdc6 は G₁ 期で ATP エネルギーを利用してゲノム DNA の複製に必須な複製前複合体の形成を行なう因子で、酵母から哺乳類までよく保存されている。今回われわれは、この因子が S 期開始および進行の制御に関わる全く新しい生理機能を持つことを見出した。すなわち、DNA 障害時に p53 依存性に発現誘導される p21 によって不活性化された Cdk2 から ATP の加水分解エネルギーを利用して p21 を剥がし、活性化する機能を有することを *in vitro*, *in vivo* の実験で明らかにした。この機能には、Cdc6 中の ATPase ドメインとサイクリンと結合する Cy ドメインが必要である。さらに、培養細胞を用いた実験から、Cdc6 が DNA 損傷に伴う p21 依存性 S 期内チェックポイント機構の利用の可否の決定と DNA 傷害による S 期停止からの回復の制御をしていることを見出した。

3 . 現在までの達成度

当初の計画以上に進展している。

(理由)

研究経過の項で述べたように、当初の当研究課題の到達目標である、発がんの根底機構である足場による細胞周期 G₁-S 遷移制御機構のほぼ全貌の解明が視野に入ってきた。特に次の 3 点については、当初の期待以上に進展した部分である。1 . 足場からのシグナルが Cdc6 の安定性を制御する機構およびそれに至るシグナル伝達経路の全貌が見え始めたこと。2 . 不完全ではあるが、G₁ 期細胞周期因子の操作によって、マウスお

よびラット胎性線維芽細胞の足場非依存性増殖を誘導できる手立てが見つかったこと。3 . これまで謎であった癌抑制遺伝子 p53 の癌抑制機能をうまく説明できる新規の作用点を見出したこと。これらの成果に加えて、これまでの細胞周期制御の常識を根底から覆す、全く予知されなかったことない Cdc6 の新しい生理機能を見出した。すなわち、p21 によって不活性化された Cdk2 から ATP の加水分解エネルギーを利用して p21 を剥ぎ取り、Cdk2 を活性化する能力を持つことを見出したことである。これは、全く想定されなかったことのない Cdk2 の活性化機構の発見でもある。

4 . 今後の研究の推進方策

残りの 2 年間で、足場依存性ならびに非依存性細胞周期開始制御機構の全貌の解明を目指す。加えて、新たに浮かび上がってきているさらに 2 種類の Cdc6 タンパクの生理機能の解明を進める。

5 . 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Cdc6 Determines Utilization of p21^{WAF1/CIP1}-dependent Damage Checkpoint in S Phase Cells. Kan, Q., Jinno, S., Kobayashi, K., Yamamoto, H., and Okayama, H. J. Biol. Chem. 283, 17864-17872 (2008). 査読有
2. ATP-dependent activation of p21^{WAF1/CIP1}-associated Cdk2 by Cdc6. Kan, Q., Jinno, S., Yamamoto, H., Kobayashi, K., and Okayama, H. 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105, 4757-4762 (2008). 査読有
3. Chemical DNA damage activates p21^{WAF1/CIP1}-dependent intra-S checkpoint. Kan, Q., Jinno, S., Yamamoto, H., and Okayama, H. FEBS Lett. 30, 5879-5884 (2007). 査読有
4. Wilms tumor 1-associated protein regulates G₂/M transition through stabilization of cyclin A2 mRNA. Horiuchi, K., Umetani, M., Minami, T., Okayama, H., Takada, S., Yamamoto, M., Aburatani, H., Reid, P. C., Housman, D. E., Hamakubo, T., and Kodama, T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 17278-17283 (2006). 査読有

[その他]

ホームページ

<http://www.cellcycle.m.u-tokyo.ac.jp/>