

細胞周期進行抑制機構の研究（cAMPによるG2期進行抑制機構とp19^{ARF}によるG1期停止機構の解析）

黒川 量雄
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞増殖学講座
（竹家 達夫 教授）

目次

1. 序論	4
1.1 細胞増殖と細胞周期進行	4
1.2 細胞周期進行のエンジン(サイクリン/サイクリン依存キナーゼ複合体)	4
1.3 G1/S 期移行の制御	6
1.4 G2/M 期移行の制御	7
1.5 本研究のテーマ	10
2. 第1部 cAMP による G2 期進行抑制の分子機構の解析	12
2.1 背景	13
2.2 材料と方法	18
2.2.1 細胞培養と cAMP 処理	18
2.2.2 同調培養	18
2.2.3 フローサイトメトリーによる細胞周期の解析	18
2.2.4 分裂指数の測定	18
2.2.5 抗体	19
2.2.6 細胞抽出液の調製と免疫沈降及びウェスタンブロッティング	19
2.2.7 キナーゼアッセイ	19
2.2.8 定量的 RT-PCR	20
2.2.9 細胞内蛋白質のラベル及びパルスチェイス実験	21
2.3 結果	22
2.3.1 cAMP は、マウスマクロファージ細胞の G2/M 期進行を阻害する	22
2.3.2 cAMP は、サイクリン B1/Cdc2 複合体の活性化を遅延させる	25
2.3.3 cAMP は、G2 期におけるサイクリン B1 蛋白質の蓄積を遅延させる	27
2.3.4 cAMP は、G2 期におけるサイクリン B1 mRNA の蓄積に影響しない	31
2.3.5 cAMP は、G2 期のサイクリン B1 蛋白質を不安定化させる	33
2.4 考察	37
3. 第2部 p19 ^{ARF} による G1 期停止の分子機構の解析	42
3.1 背景	43
3.2 材料と方法	47
3.2.1 ベクターの構築	47
3.2.2 細胞培養とトランスフェクション法	47
3.2.3 フローサイトメトリーによる細胞周期の解析	48
3.2.4 抗体	48
3.2.5 細胞抽出液の調製と免疫沈降及びウェスタンブロッティング	48
3.2.6 MDM2 <i>in vitro</i> translation	49
3.2.7 キナーゼアッセイ	49
3.2.8 細胞内蛋白質のラベル及びパルスチェイス実験	49

3.2.9	蛍光抗体法	50
3.3	結果	51
3.3.1	p19 ^{ARF} は、マウス繊維芽細胞を主に G1 期で停止させる	51
3.3.2	p19 ^{ARF} は、G1 サイクリン依存キナーゼの活性を抑制する	55
3.3.3	p19 ^{ARF} は、サイクリン D1/Cdk 複合体の構成を替える	59
3.3.4	p19 ^{ARF} によって発現誘導された p21 ^{cip1} は、サイクリン D1/Cdks 複合体に結合する	59
3.3.5	p19 ^{ARF} は、MDM2 と結合し、p53 とは結合しない	61
3.3.6	p19 ^{ARF} は、p53 の安定性を増加させる	65
3.3.7	p19 ^{ARF} は、p53 を核内に留める	68
3.4	考察	72
4.	謝辞	77
5.	参考文献	78

1.1 細胞増殖と細胞周期進行

生物が子孫に自身の情報を伝達するためには、細胞の増殖すなわち遺伝情報の複製と細胞分裂が不可欠である。細胞は、G1 期（間期 1）、S 期（複製期）、G2 期（間期 2）、M 期（細胞分裂期）の各時期で分けられる細胞周期を順次進行して増殖する。高等哺乳動物にとっては、細胞の増殖は、子孫に自身の情報を伝達するためだけでなく個体発生や恒常性の維持のうえからも非常に重要である。無秩序な細胞の増殖は、細胞の癌化をもたらし、個体の調和を乱し、最終的には個体の死をまねく。従って、細胞の増殖は厳密な制御下に置く必要があり、実際に細胞周期の各時期で様々な機構によって調節されている。細胞は、増殖因子や外部環境などの外界からのシグナルや、細胞内部の状況に応じて細胞周期を進行、遅延、停止させ、また、自ら死ぬことによって増殖を制御し個体を維持している。細胞増殖因子は、G1 期を通じて要求されるが、一旦細胞周期が G1 期後期に達するとその後は M 期を終了するまで必要とされない (Pardee 1989)。つまり G1 期の進行は増殖因子からのシグナルによって制御されるが、S 期、G2 期、M 期の進行は細胞内部の機構によって制御されている。G1 期は外界からのシグナル（増殖シグナルや増殖抑制シグナル）を受け入れ増殖を行うかどうかを決定する唯一の期間であり、また細胞増殖に留まらず、アポトーシス、老化や分化をも制御している時期であることが明らかにされている。一方、G2/M 期は、細胞分裂によって細胞の増殖が最終的に決定する時期であり、2 つの娘細胞に均一に遺伝情報を伝えるために細胞内部の機構によって正確な遺伝情報の複製、正確な染色体分離、細胞の分裂をモニターして細胞周期の進行を制御する重要な時期である (Murray 1992) (図 1.1)。

1.2 細胞周期進行のエンジン（サイクリン/サイクリン依存キナーゼ複合体）

細胞周期の進行には、サイクリン/サイクリン依存キナーゼ (Cdk) 複合体がエンジンとして働いており (図 1.1)、各時期の進行にはそれぞれの時期特異的に働くサイクリン/Cdk 複合体の秩序だった活性化が必要である。セリン/スレオニンキナーゼである Cdk は、そのみでは活性を持たず、活性調節サブユニットであるサイクリンと結合し、Cdk Activating Kinase (CAK) にリン酸化されることにより活性をもつ (Morgan 1995)。Cdk の発現は、細胞周期を通じてほぼ一定であり、サイクリン/Cdk 複合体の秩序だった活性化は、細胞周期の進行に伴ったサイクリンの順序だった発現と分解、そして Cdk 自身のリン酸化によってもたらされる。一方、サイクリン/Cdk 複合体に直接結合し、その活性を抑制する分子として種々の Cdk インヒビターも明らかになっている (図 1.1)。これら Cdk インヒビターは、主に G1 サイクリン/Cdk 複合体の機能を阻害する。Cdk インヒビターには、2 つのタイプがあり、1 つは、Cip/Kip ファミリー ($p21^{Cip1}$ 、 $p27^{Kip1}$ 、 $p57^{Kip2}$) であり、もう 1 つは、

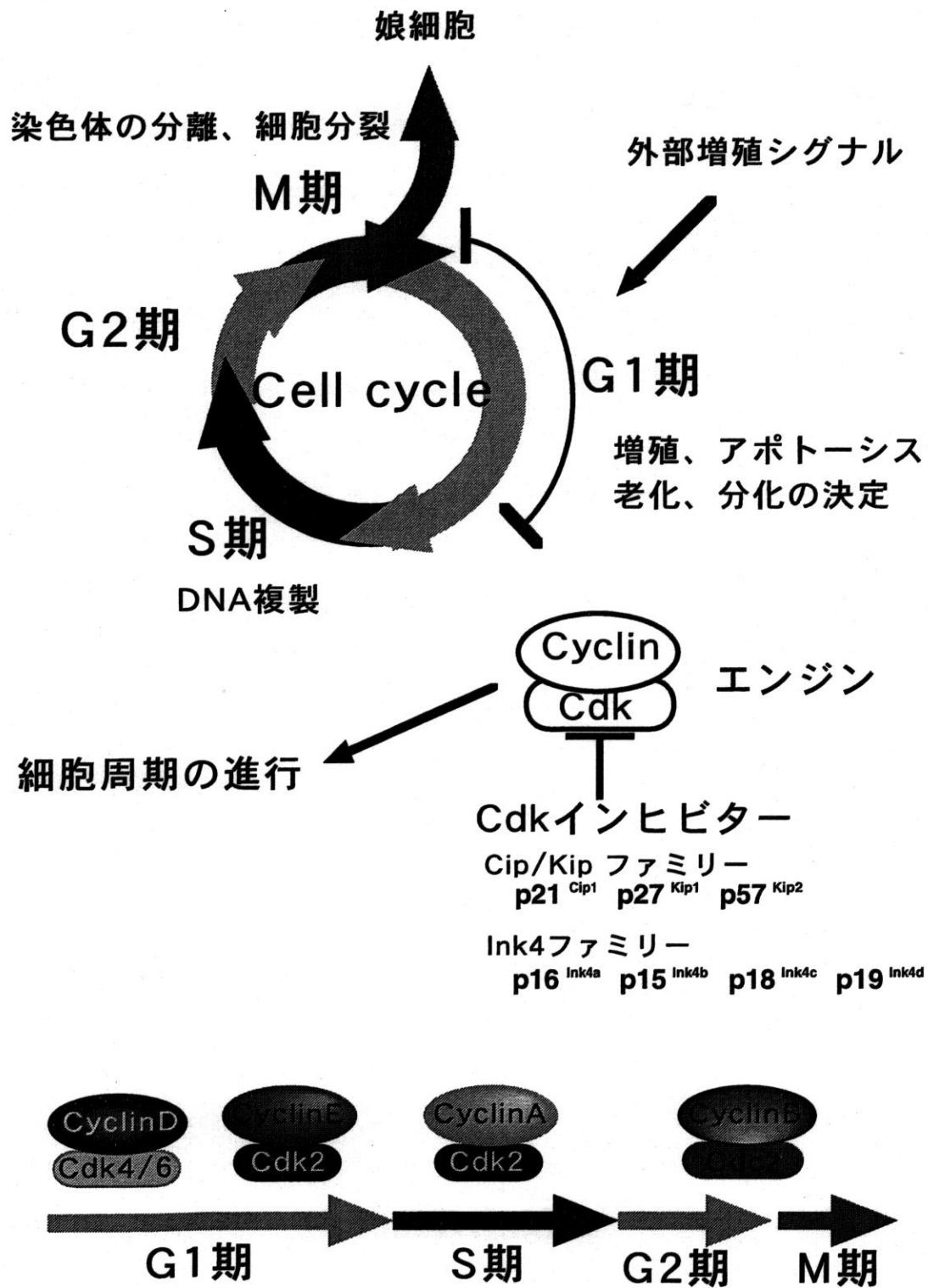


図 1.1 細胞周期と細胞周期進行のエンジン

Ink4 ファミリー(p16^{Ink4a}、p15^{Ink4b}、p18^{Ink4c}、p19^{Ink4d})である。Cip/Kip ファミリーは、幅広くサイクリン/Cdk 複合体のキナーゼ活性を阻害するが (サイクリン B/Cdc2 を除く)、Ink4 ファミリーは、D タイプサイクリン依存キナーゼのみの活性を阻害する。

1.3 G1/S 期の移行の制御

細胞が複製を開始するには、G1 期と S 期の境界に存在する細胞周期の進行にとって 1 つの重要な時期である R 点 (Restriction point) を通過しなくてはならない。細胞は、外界の環境に応じて R 点を通過するかどうかを決定し、一旦この時点を通ると外界の状況に関わらず複製、細胞分裂を行い、細胞周期を 1 周してふたたび G1 期まで戻ってくる (Pardee 1989)。この R 点の通過を制御する因子が G1 サイクリン/Cdk 複合体である (Pines 1993; Sherr 1994)。G1 サイクリンにはサイクリン D (D1、2、3)、およびサイクリン E (E1、2) が存在し (Gudas et al., 1999)、サイクリン D は Cdk4、6 と、サイクリン E は Cdk2 とそれぞれ結合し、G1 期進行を制御する G1 サイクリン/Cdk 複合体として働く (Sherr 1995; Morgan 1995)。サイクリン D の発現は、他のサイクリンと異なり細胞周期に依存せず増殖因子に依存する。増殖因子のシグナルは、増殖因子受容体を介し Ras-MAPK 経路を経てサイクリン D の発現を誘導する。発現したサイクリン D は、増殖因子依存的に Cdk4、6 と結合する。次に CAK によって Cdk のスレオニン残基がリン酸化され、活性を持つサイクリン D/Cdk4、6 複合体となる。サイクリン D/Cdk4、6 複合体は、レチノブラストーマ癌抑制遺伝子産物 (Rb 蛋白質) とその関連遺伝子、p107 および p130 とこれらの LXCXE モチーフを介して結合し、リン酸化することができる (Kato et al., 1993; Ewen et al., 1993; Matsushime et al., 1992)。Rb 蛋白質を不活化させた細胞では、サイクリン D/Cdk4 活性を阻害しても細胞が S 期に進行することから、Rb 蛋白質がサイクリン D/Cdk4 の主な基質であることが明かとなった (Lukas et al., 1995)。サイクリン E は、G1/S 期特異的に発現し Cdk2 と複合体を形成する。サイクリン E/Cdk2 複合体の活性も G1/S 期にピークとなる (Koff et al., 1992; Ohtsubo et al., 1995)。サイクリン E/Cdk2 複合体もサイクリン D/Cdk4、6 複合体と同様に Rb 蛋白質とそのファミリー蛋白質をリン酸化することができ (Sherr, 1995; Weinberg, 1995)、他にも p27 などいくつかの蛋白質をリン酸化する (Sheaff et al., 1997; Clurman et al., 1996; Sherr 1995)。しかし、サイクリン D/Cdk4、6 複合体と異なり、Rb 蛋白質を不活化させた細胞でもサイクリン E/Cdk2 複合体の活性阻害による細胞の S 期進行はみられないことから、サイクリン E/Cdk2 複合体の主な基質は Rb 蛋白質以外の蛋白質であると考えられている (Ohtsubo et al., 1995)。

Rb 蛋白質はその名前が表す様に癌抑制遺伝子産物として同定された。Rb 蛋白質による増殖抑制能は、おもに転写因子 E2F と結合してその活性を抑制することで発揮される (Navins 1992)。E2F は、E2F ファミリー (E2F-1、2、3、4、5) と DP フ

ファミリー (DP-1、2) のヘテロ二量体で機能している(Dyson 1998)。E2F 活性は、G1/S 期の移行期に強く発現し、多くの G1/S 期進行を制御する遺伝子のプロモーター上には、E2F 結合配列が存在する。E2F-1~3 の過剰発現によって休止期の細胞が S 期へと移行し、逆に優勢不能型変異体の過剰発現によって細胞が G1 期で停止することから E2F が、S 期導入を制御する重要な転写因子であると考えられる。E2F-Rb 蛋白質複合体は、転写活性が抑制されているだけでなく、プロモーター上に転写抑制因子複合体を引き込み E2F 結合配列特異的な転写リプレッサーとしても機能している(Weintraub et al.,1995; Tevosian et al.,1997; Zhang et al.,1999;Dyson 1998)。

細胞の G1 期から S 期への移行の機構は、簡潔に示すと以下のようなものである。増殖刺激によってサイクリン D/Cdk4、6 複合体が活性化して Rb 蛋白質をリン酸化する。リン酸化により不活性化した Rb 蛋白質は、転写因子 E2F を放出し、放出された E2F は活性化し、未知の標的遺伝子も含む S 期移行に必要な様々な標的遺伝子の転写を誘導する。このときサイクリン E も E2F によって強く転写誘導され、サイクリン E/Cdk2 複合体が活性化する。サイクリン E/Cdk2 複合体が、Rb 蛋白質をさらにリン酸化し、また S 期開始に必要な基質をリン酸化することにより細胞は、S 期に進行する(図 1.2)。

1.4 G2/M 期移行の制御

細胞分裂をおこなうために細胞が G2 期から M 期に進行するには、サイクリン B/Cdc2 複合体の活性が必要である。サイクリン B には、サイクリン B1、B2 が存在する。サイクリン B は、S 期後半より発現し始め、G2/M 期でピークに達する。発現したサイクリン B は、Cdc2 と結合し、サイクリン B/Cdc2 複合体を形成する。サイクリン B/Cdc2 複合体は、CAK により Cdc2 のスレオニン残基のリン酸化を受け活性化した状態になるが、それと同時に Cdc2 の 14 位のスレオニン残基、15 位のチロシン残基が Wee1、Mik1、Myt1 によりリン酸化され不活性化の状態になり(Featherstone et al.,1991; Lundgren et al.,1991;Mueller et al.,1995; Kornbluth et al.,1994)、その状態のまま G2 期進行に伴って蓄積する。サイクリン B/Cdc2 複合体は、M 期開始直前に Cdc25C により Cdc2 の負のリン酸化部位が脱リン酸化され活性化し(Kumagai et al.,1991; Gautier et al.,1991)、M 期へ細胞を移行させる(図 1.3)。M 期終了直前には、サイクリン B/Cdc2 複合体は、破壊ボックス依存的なサイクリン B の分解によって不活性化し(Glotzer et al.,1991)、細胞分裂を完了する(図 1.3)。この分解は、ユビキチン依存性蛋白質分解機構によって行われる(King et al.,1994; Hoyt 1997; Townsley et al.,1998)。E1 には特異性はなく、E2 にはサイクリン特異的な E2-C が存在するが、細胞周期を通じてその活性は一定である。それに対して E3 は、M 期依存的な活性をもつ APC (Anaphase-Promoting Complex) である(Morgan 1999) (図 1.3)。また、サイクリン B1/Cdc2 複合体は、間期には核外に存在するが、M 期開始時には核内に移行する。サイクリン B1 は、インポーチン β の N 末端側と直接結合して、

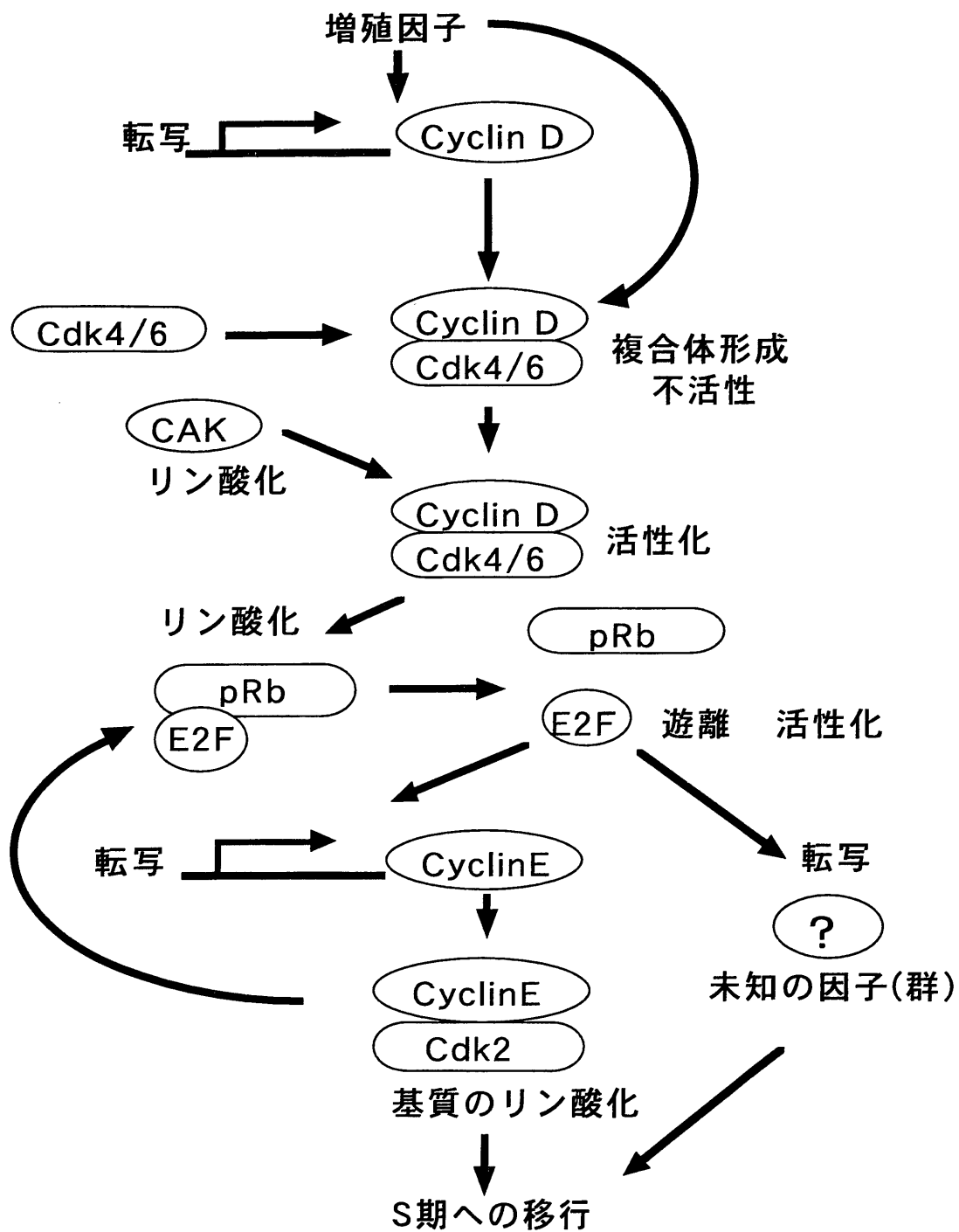


図 1.2 G1 期から S 期への移行

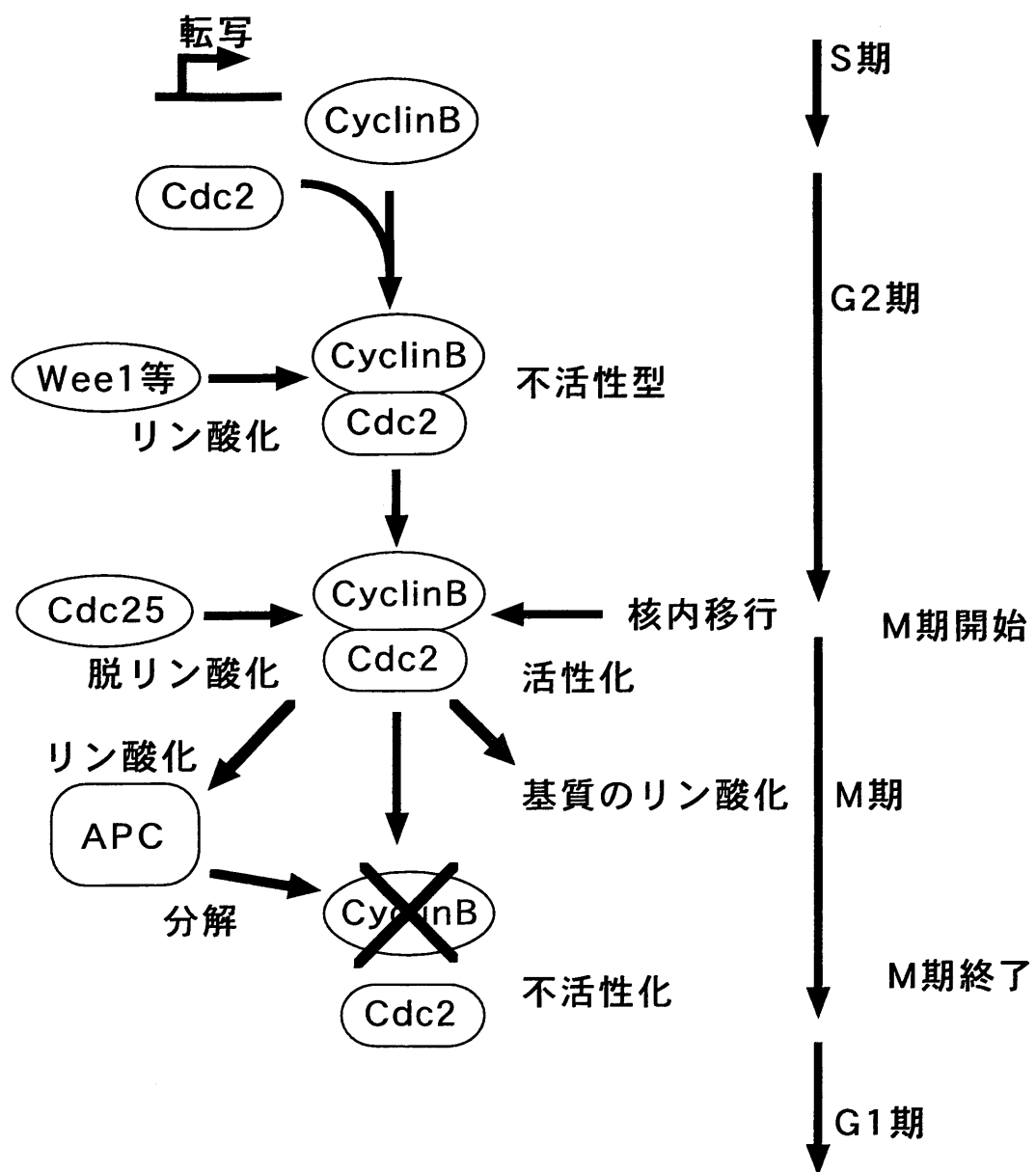


図 1.3 G2 期から M 期への移行

核内に移行し、NES 配列によって CRM1 と結合して核外に移行する(Toyoshima et al.,1998; Hagting et al.,1998; Yang J et al.,1998)。間期では、核内移行の活性より核外移行の活性が高いためサイクリン B1/Cdc2 複合体は、細胞質中に局在するが、M 期開始時には、細胞質局在化配列中の M 期特異的なリン酸化部位がリン酸化され、NES 活性が抑制されて核内に局在する(Li et al.,1997; Pines et al.,1994;Pines 1999)。サイクリン B1/Cdc2 複合体が M 期を実現するための標的としては、核膜崩壊、染色体凝縮、分裂装置形成などがある。これらに対してサイクリン B1/Cdc2 複合体が直接または、キナーゼカスケードを介して間接的に働いていることが考えられている。核膜崩壊に関しては、サイクリン B1/Cdc2 複合体が核ラミナ構成分子ラミンをリン酸化して 2 量体へ脱重合させることが報告されている(Nigg 1993)。しかし、これは核膜崩壊に必須であるが十分ではない。染色体凝縮に関しては、ヒストン H1 や 13S コンデンシンのリン酸化があげられ(Murray 1998)、分裂装置形成については、サイクリン B/Cdc2 複合体によるリン酸化によってセントロソームの微小管形成能を亢進させ、MAP (Microtubule-Associated Protein) の微小管安定化能を減少させることが報告されている(Ookata et al.,1995)。

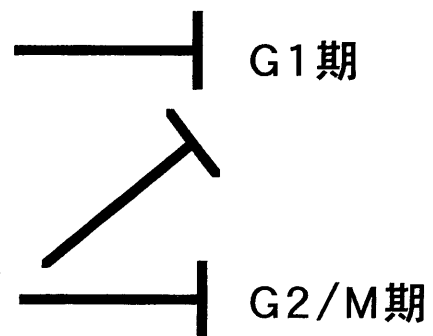
1.5 本研究のテーマ

増殖を抑制する細胞増殖抑制シグナルの作用点は 2 点に大別され、細胞分化、老化や TGF- β 、免疫抑制剤ラパマイシンは G1 期で特異的に作用するが (Pardee 1989;Smith and Pereira-Smith 1996;Massague 1987;Nurse et al.,1994)、DNA 損傷、p53、cAMP、p19^{ARF} は G1 期、G2/M 期の両方で細胞周期進行を阻害する(Murray 1994;Kato et al.,1994; Levine 1997;Quelle et al.,1995) (図 1.4)。G1 期における細胞増殖抑制シグナルの標的は、G1 サイクリン/Cdk 複合体の活性であり、多くの場合、Cdk インヒビターの発現誘導を引き起こして G1 サイクリン/Cdk 複合体を不活性化することが知られている(Sherr 1996;Sherr and Roberts 1995)。G2/M 期に働く細胞増殖抑制シグナルは、主にサイクリン B/Cdc2 複合体の活性を標的としていると考えられるが (Dunphy 1994)、G2 期では、サイクリン B/Cdc2 に直接結合し、その活性を抑制する Cdk インヒビターの存在は確認されていないことから、サイクリン B/Cdc2 の発現や活性、安定性、局在などを制御している可能性がある (図 1.4)。G1 期、G2/M 期の両方で細胞周期進行を阻害する細胞増殖抑制シグナルは、細胞周期の時期特異的に異なる分子を標的として作用しており、その機構の解明は、細胞周期制御機構を理解する上で非常に有効である。本研究では、これら G1 期、G2/M 期の両方で細胞周期進行を阻害するシグナルのなかで cAMP と p19^{ARF} に注目して研究を行い、「第 1 部 cAMP による G2 期進行抑制の分子機構」、「第 2 部 p19^{ARF} による G1 期停止の分子機構」を明らかにしたのでここに報告する。

細胞増殖抑制シグナルの作用点

細胞分化誘導シグナル、細胞
老化誘導シグナル、 $\text{TGF-}\beta$ 、
ラパマイシン

DNA損傷、p53、cAMP、p19^{ARF}



細胞増殖抑制シグナルの標的

G1期

G1サイクリン/Cdk
複合体の活性

G2/M期

サイクリンB/Cdc2
複合体の活性

図 1.4 細胞増殖抑制シグナルの作用点とその標的

2 第 1 部 cAMP による G2 期進行抑制の分子機構の解析

細胞のセカンドメッセンジャーである cAMP は、細胞内のシグナル伝達において様々な細胞種で広く一般的に働いており、多くのホルモンの刺激により細胞内の cAMP 濃度上昇がみられる (Boynton et al., 1983)。このシグナルのほとんどは、PKA (cAMP 依存性蛋白キナーゼ) の活性化に集約される (Justement et al., 1986; Lyengar 1996)。PKA は CREB をリン酸化し、転写活性を上昇させること (Nichols et al., 1992; Meinkoth et al., 1993) 又、Raf-1 をリン酸化し、そのシグナル伝達を阻害することなどが知られている (Hafner et al., 1994)。細胞内の cAMP 濃度上昇が引き起こす作用は、それぞれの細胞種により様々であり、肝細胞では、グリコーゲンの分解の促進、骨細胞では、骨からのカルシウムの吸収などを引き起こす。細胞周期調節に関しては、血球系細胞 (特にマクロファージ細胞) においては、一般的には抑制的に働いている。*Xenopus* 卵では、cAMP レベルの低下が卵成熟を誘起し、MPF (=サイクリン B/Cdc2 複合体) の活性化を促す。さらに、分裂酵母において、cAMP 添加により M 期後半で細胞周期進行が停止する変異体が報告され、この変異体の解析により PKA 活性が、APC の構成蛋白質のひとつに作用し、APC 構成を阻害することが報告された (Yamasita et al., 1996) (図 2.1)。以上のように PKA から下流のシグナル伝達により様々な細胞が様々な応答を起こすことから、PKA から下流のシグナル伝達について興味をもたれる。

マウスマクロファージ細胞は、cAMP による細胞周期進行阻害の制御機構を解析するうえで有効なモデルシステムである (Hamilton 1997)。プロスタグランジン E_2 、3-イソブチルメチルキサンチン (IBMX)、コレラ毒素などの細胞内 cAMP 濃度を上昇させる因子や、デブチルアデノシン 3':5' サイクリックモノフォスフェイト、8 ブロモアデノシン 3':5' サイクリックモノフォスフェイト (8Br-cAMP) などの cAMP のアナログは、骨髓細胞由来マクロファージ (BMM) やコロニー刺激因子 1 (CSF-1) 依存性マウスマクロファージ細胞株、Bac1.2F5A 細胞の増殖を阻害する (Vairo et al., 1990; Kato et al., 1994; Rock et al., 1992)。cAMP に発したシグナルは、マクロファージ細胞の G1/S 期および G2/M 期の進行を阻害していることが示唆された (Kato et al., 1994)。cAMP によって G1 期で停止した BMM 細胞は、マクロファージ細胞の主な D タイプサイクリンであるサイクリン D1 と Cdk4 の発現が抑制されている (Cocks et al., 1992; Vadiveloo et al., 1996)。一方、Bac1.2F5A 細胞では、cAMP によりサイクリン D1 と Cdk4 の発現は抑制されずに細胞周期の進行阻害が引き起こされる (Kato et al., 1994) ことからサイクリン D1 と Cdk4 以外の cAMP のターゲットが存在することが示唆され、実際に cAMP による G1 期停止は、Cdk インヒビター p27^{Kip1} の発現量が増加し、サイクリン D1/Cdk4 複合体に結合してその活性を抑制することによって引き起こされることが示された (Kato et al., 1994)。しかしながら、cAMP による G2/M 期の制御機構は、未だ明らかになっていない。

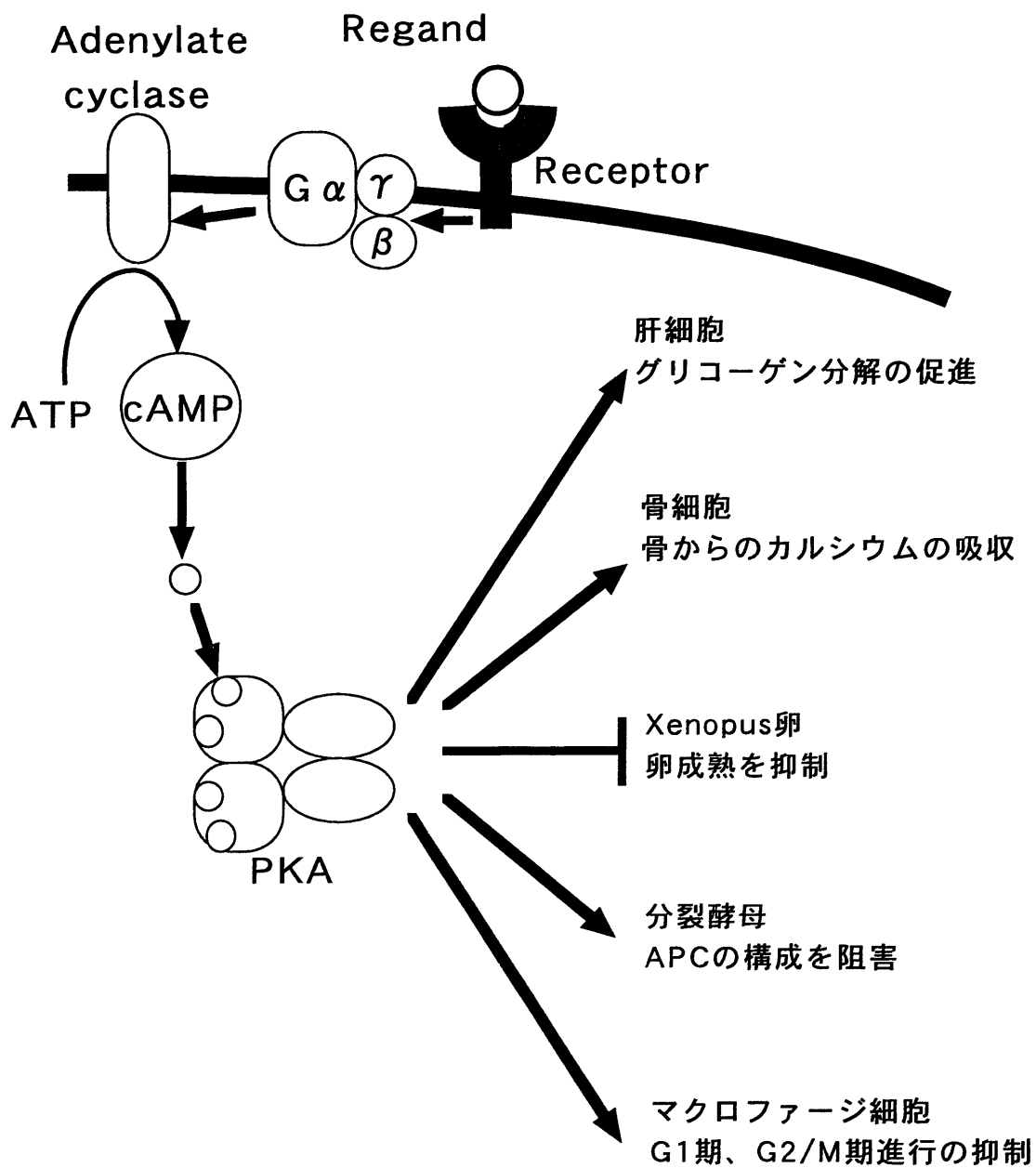


図 2.1 cAMP の細胞への作用

細胞がG2期からM期に進行する際には、サイクリンB/Cdc2複合体が活性化されることが必要であり、M期を終了する際には不活性化することが必要であることが知られている。サイクリンBの発現量は、細胞周期依存的に変化し、S期後半より発現が開始し、G2/M期でピークに達する。発現したサイクリンBは、すぐに細胞内にすでに存在しているCdc2と複合体を形成し、それによりサイクリンB/Cdc2複合体が、G2期進行とともに蓄積する。蓄積したサイクリンB/Cdc2複合体は、M期直前に活性化し、それにより細胞はM期に進行する。M期終了直前には、サイクリンB/Cdc2複合体は、不活性化し、細胞分裂を完了する。サイクリンB蛋白質の細胞周期に依存した発現は、ひとつは、mRNAの量の細胞周期に依存した変動によると考えられる(図2.2)。サイクリンB mRNA量は、S期の途中より徐々に増加し、G2/M期でピークに達し、その後G1期に進行すると徐々に減少する。このmRNA量の調節は転写レベル、安定性のレベルで行われている。サイクリンB mRNAの転写量は、G2/M期で高くなっているが、細胞周期に依存して転写量を調節している因子に関してはほとんど判っていない(Hwang et al.,1995;Cogswell et al.,1995;Piaggio et al.,1995)。サイクリンB mRNAの安定性に関しては、サイクリンB mRNAは、S期、G2/M期では安定であるが、G1期では不安定であることが報告されている(Maitly et al.,1995)。もうひとつのサイクリンB蛋白質の細胞周期依存的発現機構の要因として、サイクリンB蛋白質の細胞周期に依存した分解機構があげられる(図2.2)。サイクリンB/Cdc2複合体は、M期を終了する直前に不活性化されるが、この不活性化は、ユビキチン化されたサイクリンBがプロテアソームにより分解されることによってもたらされる。サイクリンBの分解に働くユビキチン/プロテアソーム経路の因子群の中で時期特異的な分解と基質特異性を決定している分子はAPC/サイクロソームである(King et al.,1995;Sudakin et al.,1995)。APCは7から12個のサブユニットからなる複合体であり(Peters et al.,1996;Zachariae et al.,1996;Zachariae et al.,1998;Yu et al.,1998)、M期終了直前にサイクリンBをユビキチン化し分解へと誘導する。APCは、サイクリンB以外の蛋白質の分解にも働いており、M期中に姉妹染色体の分離を制御する後期抑制因子Pds1(Cut2)の分解も制御している(Cohen-Fix et al.,1996;Yamamoto et al.,1996;Cohen-Fix and Koshland 1997)。このように異なる基質の時期特異的な分解は、APCの活性化因子であるCdc20とHct1の変換によって制御されており、この変換はリン酸化によって調節されている(Visintin et al.,1997;Schwab et al.,1997;Zachariae et al.,1998;Shirayama et al.,1998;Kotani et al.,1999)。また、Cdc20はスピンドルチェックポイントを制御するMad2とも結合することから、APCは、チェックポイント機構にも関与していると考えられている(Elledge 1998;Hwang et al.,1998)。サイクリンBの翻訳は、G2/M期と同様にG1期においても行われており、翻訳レベルでの調節は受けていないが、G1期では、サイクリンBを分解するユビキチン/プロテアソーム経路が活性化した状態を維持しているために、G1期ではサイクリンBのmRNAが

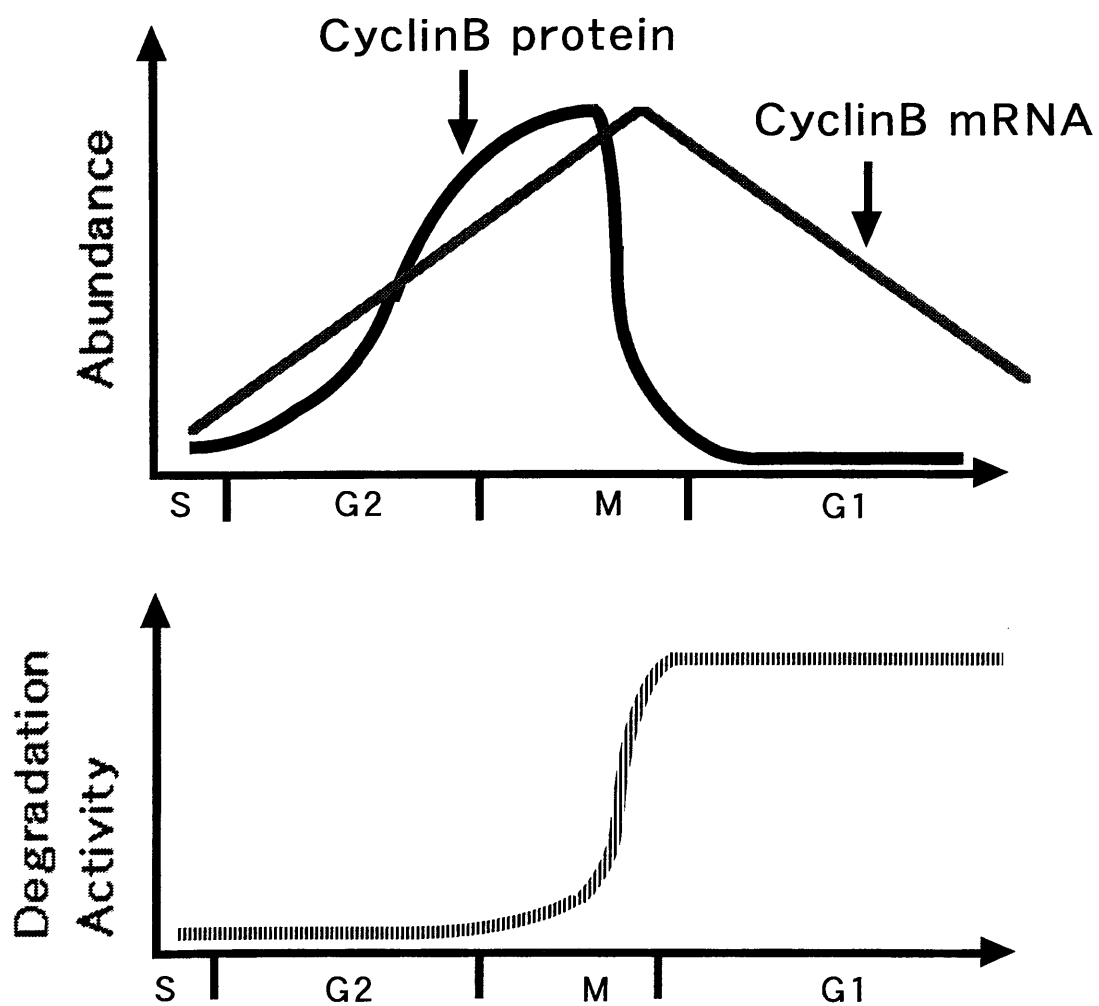


図 2.2 サイクリン B 蛋白質の細胞周期に依存した発現

存在するにもかかわらず、その蛋白質は存在しないのである。この分解機構は、細胞がS期に進行すると初めて不活性化される(Brandeis and Hunt 1996; Lukas et al., 1999)。このような機構によってサイクリン B は、細胞周期に依存した発現様式を示す。サイクリン B/Cdc2 複合体の活性化の制御機構については、Cdc2 の 14 位のスレオニン残基、15 位のチロシン残基が Wee1、Mik1、Myt1 によってリン酸化される負の制御(Featherstone et al., 1991; Lundgren et al., 1991; Mueller et al., 1995; Kornbluth et al., 1994)と、Cdc25C によるこれらの脱リン酸化という正の制御 (Kumagai et al., 1991; Gautier et al., 1991) とによって行われるというモデルが提唱されている (King et al., 1994; Dunphy et al., 1994) 。まず、複合体を形成したサイクリン B/Cdc2 複合体は、CAK により Cdc2 の 161 位のスレオニン残基のリン酸化を受け活性化した状態になり、それと同時に活性を負に制御する Cdc2 の 14 位のスレオニン残基、15 位のチロシン残基がリン酸化され、不活性化されたまま細胞が G2 期を進行につれ蓄積する。次に、M 期開始直前に Cdc2 の負のリン酸化部位が Cdc25 により脱リン酸化され、サイクリン B/Cdc2 複合体が活性化し、細胞を M 期へ移行させる。

本研究では、cAMP に発したシグナルによる Bac1.2F5A 細胞の G2 期進行の遅延及びその分子機構を明らかにした。cAMP は、サイクリン B1 蛋白質の蓄積の遅延によるサイクリン B1/Cdc2 複合体の活性化の遅延をもたらして細胞の G2 期進行を遅延させる。このサイクリン B1 蛋白質の蓄積の遅延は、G2 期において本来安定なサイクリン B1 蛋白質を cAMP に発したシグナルが不安定化することによって引き起こされる。この現象は、cAMP/PKA シグナル経路が細胞周期制御因子の安定性の制御に関わっていることを示している。

分子生物学的な一般的手法に関しては、Molecular Cloning 2nd edition 及び、Current protocols in Molecular Biology を参考にした。

2.2.1 細胞培養と cAMP 処理

マウスマクロファージ由来細胞株 Bac1.2F5A 細胞は、10% ウシ胎児血清 (FBS)(Hyclone)、15% L cell conditioned Medium (LCM)を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)(Gibco BRL)培地で 37℃、CO₂濃度 5%の培養器で培養した。LCM は、L 細胞を 10%FBS を含む DMEM 培地で 37℃、CO₂濃度 5%のインキュベータ内で培養し、コンフルエントになった後、約 2 週間培養し続けた培養液を回収し、0.2 μ m フィルター (KURABO、CORNING) でフィルター滅菌したものを用いた。LCM は、マクロファージ細胞の増殖因子である CSF-1 を含む。NIH3T3 細胞は、10%FBS を含む DMEM 培地で 37℃、CO₂濃度 5%のインキュベータ内で培養した。cAMP 処理は、Bac1.2F5A 細胞の培地を 8Br cAMP(1mM)、IBMX(1mM)、10%FBS、15%LCM を含む DMEM 培地に交換し、37℃、CO₂濃度 5%のインキュベータ内で培養することで行った。

2.2.2 同調培養

細胞を 10%FBS を含む DMEM 培地で 37℃、CO₂濃度 5%のインキュベータ内で 22 時間培養し、全ての細胞を G0/G1 期に停止させた。次に、培地を LCM を含む培地に交換し、同調して細胞周期進行させた。CSF-1 添加 8 時間後、G1 期中期以降期に進行した細胞の培地を 8Br cAMP(1mM)、IBMX(1mM)、10%FBS、15%LCM 含む DMEM 培地 (cAMP 処理) と 10%FBS、15%LCM 含む DMEM 培地 (cAMP 未処理) とに換え、それぞれの培地で培養した細胞から数時間おきにフローサイトメトリー用サンプル、分裂指数用サンプル、キナーゼアッセイ、ウェスタンブロッティング用の細胞抽出液、RT-PCR 用の Total RNA を得た。

2.2.3 フローサイトメトリーによる細胞周期の解析

細胞をフローサイトメトリー試薬 (0.1%クエン酸ナトリウム、0.1%TritonX-100、50 μ g/ml propidium iodide)に懸濁し (細胞 2x10⁶個当り 1 ml)、遮光して室温で 10 分間静置した。DNase free RNase を最終濃度 1 μ g/ml になるように加え、更に遮光したまま室温で 30 分間静置した。propidium iodide の結合した DNA の蛍光をファックスキャン (Becton Dickinson) で測定し、G1 期、S 期 G2/M 期各時期に存在する細胞の割合を解析した。

2.2.4 分裂指数の測定

細胞を PBS で 2 回洗浄し、スクレイパーで細胞を剥がし取り、6000rpm で 5 分間遠心後、0.075M KCl を 1ml に 15 分間室温で懸濁した。次に、氷冷した 500 μ l の Carnoy's fixative 試薬（メタノール：酢酸=3：1）（保存不可）を加え、良く懸濁した。6000rpm で 5 分間遠心し、上清を除き、500 μ l の Carnoy's fixative 試薬を加えた。この操作をもう一度繰り返した後、400 μ l の Carnoy's fixative 試薬を加え懸濁した。dH₂O で湿らせたスライドガラスの縁に 100 μ l の細胞懸濁液をたらし、余分な dH₂O をキムワイプで吸い取り、スライドガラスを風乾した。これを、顕微鏡で観察し、核の数(i)と核膜が壊れ凝集した染色体の数(m)を計測し、M 期の割合 $M_i=m/(m+i)$ を計測した。

2.2.5 抗体

抗サイクリン B1 抗体（ウサギポリクローナル抗体）は、Santa Cruz Biotechnology 社製、抗 Cdc2 抗体（ウサギポリクローナル抗体）は、Upstate Biotechnology Incorporated 社製を使用した。

2.2.6 細胞抽出液の調製と免疫沈降及びウェスタンブロッティング

細胞は、プロテアーゼインヒビター（0.1mM PMSF、5 μ g/ml aprotinin）、フォスファターゼインヒビター（0.1mM Na vanadate、0.1mM NaF）、1mM DTT を含む EBC lysis buffer (50mM Tris pH8.0、120mM NaCl、0.5% NP40、1mM EDTA) で 30 分溶解させた。次に 15000rpm、0℃で 15 分間遠心し、細胞の残骸等を沈殿させて上清を細胞抽出液とした。同数の細胞由来の細胞抽出液各サンプルに各抗体を加え、4℃で 16 時間静置したた後、Protein A-Sepharose beads を加え、4℃で 1 時間攪拌した。その後 10000rpm、0℃で 5 秒間遠心し、免疫沈降複合体/Protein A-Sepharose beads を沈殿させ、上清を除いた。この操作を 3 回繰り返えし免疫沈降複合体を得た。免疫沈降複合体は、4xSDS Sample buffer (200mM Tris-Cl, pH6.8、400mM DTT、8%SDS、0.4% Bromophenol Blue、40% glycerol)を加え、沸騰している水中で 4 分間煮沸した後 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分画した。ゲルより蛋白質を PVDF メンブレン（Millipore）、ニトロセルロースメンブレン（Amersham）に転写し、各抗体でイムノブロットを行った。次に、Protein A-HRP を 1 時間反応させた後、ECL ブロッティング法（Amersham）で蛋白質を検出した。ECL ブロッティング法に関しては、製品使用法に従った。ダイレクトライセイトは、細胞を直接 SDS-Sample buffer(40mM Tris-HCl,pH6.8、0.1M DTT、1% SDS、10% glycerol、0.05% Bromophenol Blue)で融解し、沸騰している水中で 4 分間煮沸した後 15000rpm で 5 分間遠心して調整した。

2.2.7 キナーゼアッセイ

抗 CyclinB1 抗体を用いた免疫沈降により得た CyclinB1 免疫沈降物複合体を

Kinase buffer (50mM HEPES, pH7.5, 10mM MgCl₂) で2回洗った後、基質の5 μ g Histon H1 (Boehringer Mannheim)、[γ ³²P] ATP 3.3 μ Ci (0.12MBq) (NEN) を含む 25 μ l の Kinase buffer (フォスファターゼインヒビター (0.1mM Na vanadate、0.1mM NaF) と 1mM DTT を含む) 中で、30 度、15 分間インキュベートした。次に素早く 4xSDS Sample buffer を加えて、良く攪拌し、沸騰している水中で4分間煮沸し反応を停止させた。次に SDS ポリアクリルアミド電気泳動法により蛋白質を分画し、ゲルを完全に乾燥させた後リン酸化された Histon H1 に取り込まれた [³²P] を Fuji BAS-2000 イメージアナライザーで測定した。

2.2.8 定量的 RT-PCR

細胞を PBS で2回洗浄し、200 μ l の Isogen (Nippon Gene) で融解して Total RNA を抽出した。各 Total RNA 1 μ g より oligo dT プライマー (takara RNA LA PCR Kit AMV) を用いて First strand cDNA を合成した。Total RNA 1 μ g と 100pmol の oligo dT プライマーに DEPC 処理した H₂O を加え全量を 12 μ l にし、70℃で 10 分間インキュベートした。すぐに氷上に移し、4 μ l 5x first strand buffer(Gibco BRL)、2 μ l 0.1M DTT、1 μ l DEPC 処理した H₂O、1 μ l 2.5mM dNTP(Gibco BRL)を混ぜた溶液を加え、室温で2分間静置した。次に、superscript TM II RT(Gibco BRL)を 1 μ l 加え、42℃で 1 時間、インキュベートした。これを、dH₂O で 10 分の 1 希釈したものを用いて以下の PCR をおこなった。

1 サンプル当り forward プライマー 1 μ l(10p mol)、 reverse プライマー 1 μ l(10p mol)、10xPCR buffer 5 μ l、2.5mM dNTP 4 μ l、dH₂O 37.9 μ l を混ぜた反応液を作り、この反応液 1 サンプル分に対し Taq polymerase(TAKARA) 0.3 μ l、抗 Taq polymerase 抗体 (CLONTECH Laboratories,Inc.) 0.3 μ l を加え、良く攪拌し、室温で2分間静置した。これを氷上に置いたサーマルサイクラー (PERKIN ELMER) 用のチューブに 49.5 μ l づつ加え、0.5 μ l の 10 分の 1 希釈 First strand cDNA を加え、良く攪拌し、サーマルサイクラーを 94℃の状態から PCR 反応をおこなった。次に PCR 産物 (サイクリン B1、サイクリン B2 フラグメント 2 μ l) を Sac I (TAKARA)、Sal I (TAKARA) で処理し、サイクリン B1 およびサイクリン B2 の DNA 断片の特異的増幅の確認を行った。PCR 反応によるサイクリン B1、サイクリン B2 の増幅がプラトーに達しないサイクル数および鋳型の cDNA 量を調べた結果、28 回のサイクル数、0.5 μ l で定量的な PCR が行なえることが確認できた。PCR 反応は、94℃ 3 分間後、94℃1 分間、60℃1 分間、72℃2 分間のサイクルを 28 回反応を行い、サイクル終了後、72℃、2 分間反応させた。PCR 反応をおこなった各サンプル 20 μ l を EtBr 含有 1% アガロースゲルで電気泳動し、UV を照射し各バンドの光度を DensitoGraph(ATTO)で測定し、同時に PCR 反応に用いた First strand cDNA 量のコントロールとして GAPDH の特異的プライマー (forward プライマー 10p mol、reverse プライマー 1 μ l(10p mol)) を用いた PCR 反応を行った。

2.2.9 細胞内蛋白質のラベル及びパルスチェイス実験

同調細胞を透析した 10% FBS、15% LCM を含むメチオニンを含まない DMEM で 30 分間培養した。この時同時に cAMP 処理も行った。その後この培地に $60\mu\text{Ci}$ ^{35}S -メチオニン (TRAN ^{35}S -LABEL, 1175Ci/mmol) (ICN) を加えて細胞内蛋白質をラベルした。細胞を PBS で 5 回洗い、培地を完全に取り除いた後、10% FBS、ラベルされていない $25\mu\text{g/ml}$ メチオニンを含む DMEM で各時間培養した。ラベルされた蛋白質は、上記の方法で分画し、測定した。

2.3.1 cAMP は、マウスマクロファージ細胞の G2/M 期進行を阻害する

マウスマクロファージ由来細胞株 Bac1.2F5A 細胞は、CSF-1 に依存して増殖及び生存する (Murray, A.1994)。cAMP のアナログ (ジブチル cAMP、8Br cAMP) や細胞内 cAMP 濃度を上昇させる因子 (プロスタグランジン E₂、IBMX、コレラ毒素) を増殖中の Bac1.2F5A 細胞の培地に添加すると、細胞周期の G1 期、G2/M 期で細胞周期進行が阻害されることが知られている (Murray A. et al., 1994)。一方、ラパマイシン等の他の細胞周期進行阻害剤は、G1 期のみで細胞周期の進行を停止させる (Murray, A.1994)。G2/M 期の進行阻害は、PKA の活性化因子でのみ引き起こされる現象であることから、PKA の活性化が Bac1.2F5A 細胞の G2/M 期進行を阻害すると考えられる。そこで、増殖中の Bac1.2F5A 細胞を細胞内の cAMP 濃度を上昇させる試薬 (8Br cAMP、IBMX) で処理し (以下では、この処理を cAMP 処理と述べる)、G2/M 期の進行阻害を解析した。増殖している Bac1.2F5A 細胞を cAMP 処理後、細胞周期の各時期の割合を 3 時間おきにフローサイトメトリーにより測定した (図 2.3)。その結果、cAMP 処理開始後、G1 期に存在している細胞の割合は、徐々に増加した。逆に、S 期に存在している細胞の割合は徐々に減少していった。一方、G2/M 期に存在している細胞の割合は、cAMP 処理後 9 時間まで増加したが、9 時間をピークにその後徐々に減少した。以上の結果から cAMP 処理による G2/M 期進行阻害は、不可逆的な停止ではなく、G2/M 期における細胞周期進行の一時的な遅延であることが示唆された。

次に cAMP による G2/M 期への影響を詳しく解析するために同調細胞を用いた実験を行った。増殖中の Bac1.2F5A 細胞を CSF-1 を除いた培地で 22 時間培養すると、細胞は増殖を停止するため細胞周期の G0/G1 期で同調させることができる。その後 CSF-1 を添加して増殖を開始させて細胞周期が同調した状態で進行させた。CSF-1 を添加後、数時間おきに cAMP 処理を行い、細胞が G1 期停止をおこさずに S 期に進行できる cAMP 処理の時期を決定した。CSF-1 を添加後 6 時間で cAMP 処理を行うと細胞は、G1 期で停止したが、CSF-1 を添加後 8 時間で cAMP 処理を行ったところ、ほとんどの Bac1.2F5A 細胞は、G1 期で停止せず S 期に進行した (data not shown)。CSF-1 を添加後 8 時間で細胞を cAMP 処理することにより、cAMP の G2/M 期進行への影響を主に解析することが可能となった。そこで Bac1.2F5A 細胞を同調して細胞周期を進行させ、CSF-1 を添加後 8 時間で cAMP 処理し、3 時間おきにフローサイトメトリーで細胞周期の各時期の割合を測定した (図 2.4)。その結果、cAMP 処理細胞、未処理細胞ともに CSF-1 添加 8 時間後から 11 時間後の間に S 期に進行し、その後徐々に S 期より脱出した。CSF-1 添加 17 時間後 cAMP 未処理細胞では 2 度目の細胞周期の開始が見られるが (S 期に存在する細胞の割合の再上昇)、cAMP 処理細胞では 2 度目の細胞周期の開始は見られず、全ての細胞は G1

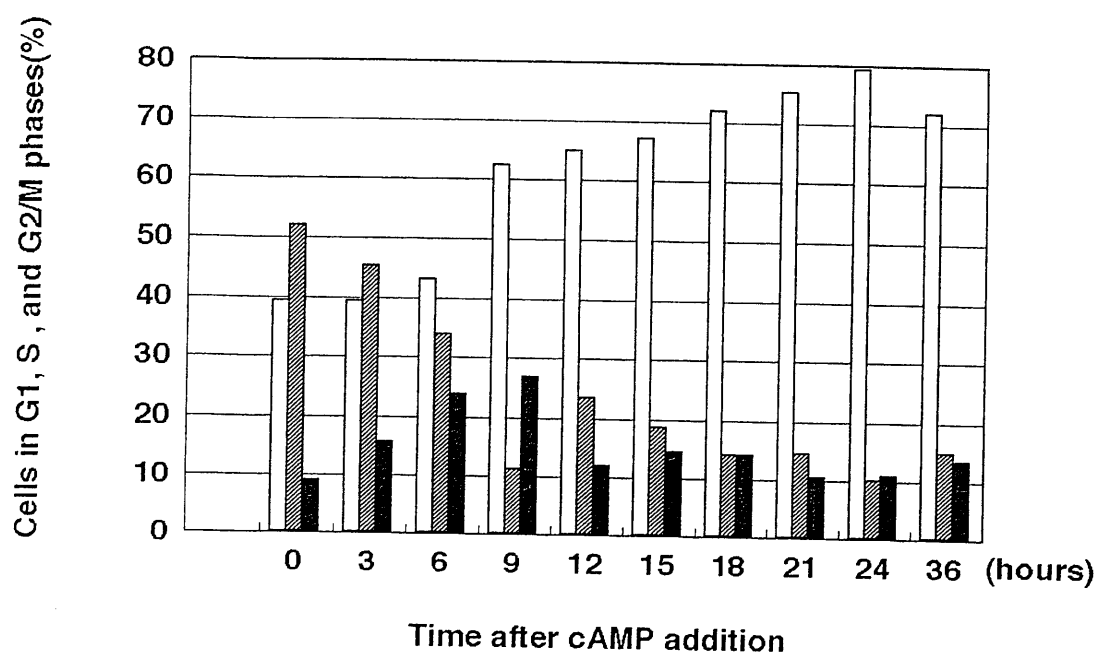


図 2.3 増殖中の Bac1.2F5A 細胞を cAMP 処理した際の細胞周期各時期の細胞の割合の経時変化

増殖中の細胞に cAMP 処理し、処理開始時 (0 時間) から処理後 24 時間まで 3 時間おきと処理後 36 時間の細胞周期の各時期の割合をフローサイトメトリーで解析した。

□ は、G1期の細胞の割合 ▨ は、S期の細胞の割合 ■ は、G2/M期の細胞の割合。

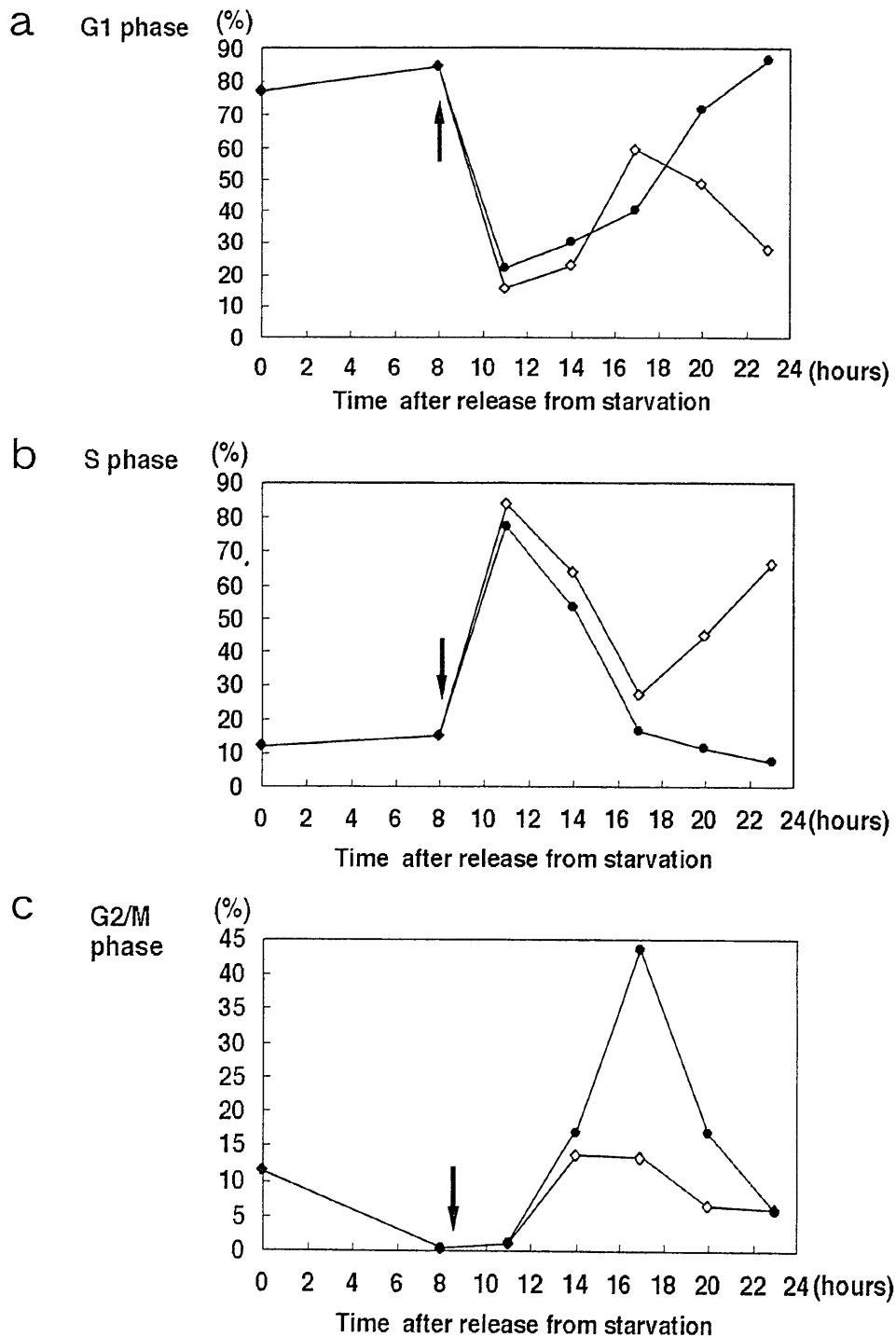


図 2.4 cAMP 処理、未処理細胞の各時期の細胞の割合の経時変化

cAMP 処理、未処理それぞれの条件下での同調培養した細胞の細胞周期の各時期の割合を経時的にフローサイトメトリーで解析した。CSF-1 添加後 8 時間で cAMP 処理を行った。

● は、cAMP 処理細胞。◇ は、未処理細胞。

期で停止したままであった。次に G2/M 期への進行に関しては、cAMP 処理、未処理細胞ともに 11 時間から 14 時間後の間で G2/M 期に存在する細胞の割合の増加（即ち G2/M 期への進行）が開始した。cAMP 未処理細胞は、17 時間から 20 時間後の間には G2/M 期より脱出したが、cAMP 処理細胞では、多くの細胞がまだ G2/M 期に存在していた。cAMP 処理細胞では、未処理細胞で G2/M 期に存在する細胞がピークに達する 14 時間から 17 時間後の間も G2/M 期に存在する細胞は増加し続け、17 時間でピークに達し、その後減少した。即ち cAMP 処理は、細胞の G2/M 期から G1 期の移行を 3 時間程遅延させた。以上のことから、cAMP は、Bac1.2F5A 細胞の S 期の進行および、S 期から G2/M 期への移行には影響しないが、G2 期の進行、G2/M 期の移行、M 期進行、M 期から G1 期への移行のいずれかまたは複数に影響することが明らかになった。

次に、cAMP の影響する G2/M 期中の正確な時期を解析するために、同調した cAMP 処理、未処理細胞の分裂指数（M 期に存在する細胞の割合）を測定した（図 2.5）。細胞が M 期の前中期に進行すると核膜が速やかに崩壊する。その後、終期まで進行すると再び核膜の形成が起きる。この間、染色体は核膜に覆われておらず、むき出しの状態であり、顕微鏡下で染色体を観察することができる。核膜が崩壊して染色体がむき出しになった細胞の割合を示す値が分裂指数である。cAMP 未処理の細胞は CSF-1 添加 13 時間後から M 期に進行し始め、17 時間後前後でその分裂指数はピークを示し、その後徐々に減少した。一方、cAMP 処理細胞では、CSF-1 添加 17 時間後から M 期に進行し始め、21 時間後前後でその割合はピークを示し、その後減少した。則ち、cAMP 処理した細胞では、G2 期から M 期へ移行する時期が、未処理細胞に比べて約 4 時間遅れていた。また、cAMP 処理、未処理細胞の分裂指数の値を比較するとその値は、非常に近い値（3-4%）を示していることから、M 期の進行は遅延していない。これに対して、フローサイトメトリーによる G2 期と M 期の細胞の割合の和である G2/M 期の値は、cAMP 処理細胞では未処理細胞を大きく上回っていた。以上のことから、cAMP による G2/M 期への作用は、G2 期の進行または、G2 期から M 期への移行の遅延であり、その時間は、約 4 時間であることが判明した。

2.3.2 cAMP は、サイクリン B1/Cdc2 複合体の活性化を遅延させる

細胞が G2 期から M 期に進行する際には、サイクリン B/Cdc2 複合体が活性化されることが必要であり、M 期を終了する際には不活性化することが必要であることが知られている（King R.W. et al., 1994）。B タイプサイクリンは、2 種類報告されており、そのうちサイクリン B1 が G2/M 期の移行を制御している（Jackman, M. et al., 1995）。そこで、cAMP のサイクリン B/Cdc2 複合体の活性化への影響を解析した。2.3.1 と同様に Bac1.2F5A 細胞を同調培養し、CSF-1 を添加して同調して細胞周期を進行させた後 8 時間後に cAMP 処理を行った。G2/M 期に進行した細胞より

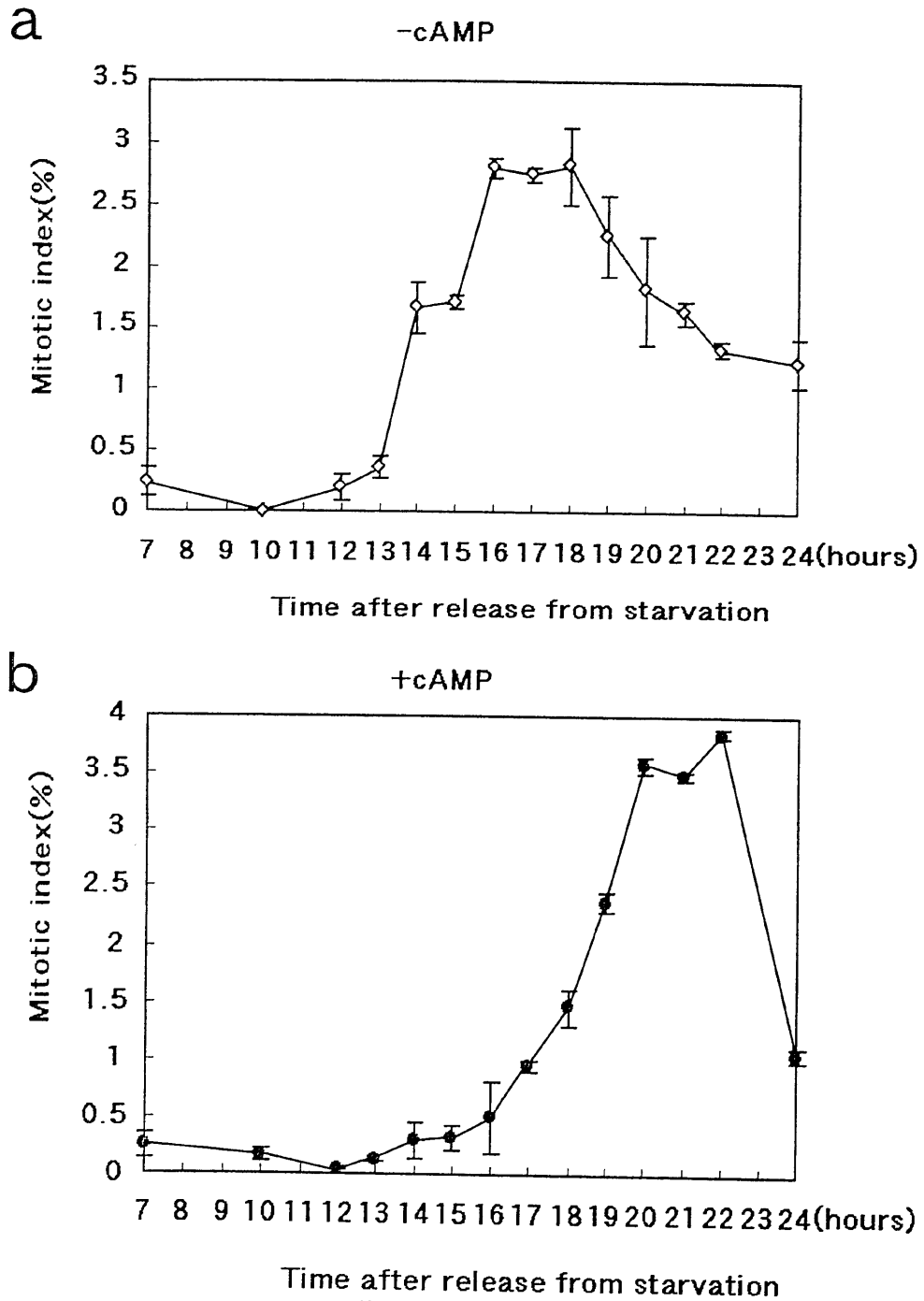


図 2.5 cAMP 処理、未処理細胞の M 期の割合の経時的変化

cAMP 処理、未処理の各条件下で同調培養した細胞の分裂指数を経時的に測定した。時間は、CSF-1 添加後の時間を示し、cAMP 処理は、CSF-1 添加後 8 時間で行った。

a 未処理細胞

b cAMP 処理細胞

細胞抽出液を作成し、サイクリン B1 を特異的に認識する抗サイクリン B1 抗体を用いて細胞抽出液より免疫沈降物を得、ヒストン H1 を基質に *in vitro* キナーゼアッセイをおこないサイクリン B1/Cdc2 複合体の活性を調べた (図 2. 6)。cAMP 未処理細胞では、サイクリン B1/Cdc2 複合体の活性は細胞周期を進行させた後 17 時間でピークに達した。一方、cAMP 処理細胞では、未処理細胞に 4 時間遅れて CSF-1 添加 21 時間後にサイクリン B1/Cdc2 複合体の活性がピークに達した。ピークの時点の前でも高いサイクリン B1/Cdc2 複合体の活性が見られるが、これは免疫沈降中に未知の機構で複合体が一部活性化されるためである。免疫沈降物を氷上で長い間置いておくだけで、サイクリン B/Cdc2 複合体の活性は上昇する (data not shown)。サイクリン B/Cdc2 複合体の活性化には、その活性サブユニットである Cdc2 の活性化させるリン酸化と活性を抑制するリン酸化の除去が必要である。Cdc2 のリン酸化状態は、SDS ポリアクリルアミド電気泳動をおこなうことにより、Cdc2 の移動度の差で検出できる。そこで、サイクリン B1/Cdc2 複合体の活性測定に用いた cAMP 処理細胞、未処理細胞中の Cdc2 のリン酸化の状態を解析したところ、未処理細胞では、細胞周期を進行させた後 17 時間後に Cdc2 の抑制的なリン酸化が減少した。一方、cAMP 処理細胞では、細胞周期を進行させた後 21 時間後に Cdc2 の抑制的なリン酸化が解除されていた (図 2. 7)。則ち cAMP は、サイクリン B/Cdc2 複合体の活性を抑制しないが、活性化を約 4 時間遅延させ、G2 期から M 期への移行を遅延させる。また、サイクリン B/Cdc2 複合体の活性化のピークおよび Cdc2 の抑制的なリン酸化の解除の時期は図 2. 5 の分裂指数のピークとほぼ一致する。

2.3.3 cAMP は、G2 期におけるサイクリン B1 蛋白質の蓄積を遅延させる

次に、cAMP 処理により G2/M 期移行が遅延した際の細胞内のサイクリン B1/Cdc2 複合体の各構成蛋白質の発現量の経時変化を解析した。まず、同調培養した cAMP 処理細胞と未処理細胞のサイクリン B1 タンパク質の発現量の経時的な解析を行った (図 2. 8)。未処理細胞では、S 期の後半 (CSF-1 添加後 11 時間後) よりサイクリン B1 蛋白質の発現が見られ始め、G2 期の間徐々に蓄積し (CSF-1 添加後 11-15 時間後まで)、細胞が M 期に進行した時点 (CSF-1 添加後 15-17 時間後) で、サイクリン B1 蛋白質の発現量はピークに達し、その後速やかに減少した。一方、cAMP 処理細胞では、未処理細胞と同様に S 期の後半 (CSF-1 添加後 11 時間後) よりサイクリン B1 蛋白質の発現が見られ始めたが、サイクリン B1 蛋白質の蓄積の増加速度は未処理細胞に比べて低下していた。cAMP 処理細胞のサイクリン B1 蛋白質発現量のピークは、19 時間前後であり、発現量がピークに達する時間が未処理細胞に比べて約 4 時間遅れていた。サイクリン B1/Cdc2 複合体の形成は、cAMP 処理細胞、未処理細胞ともにサイクリン B1 蛋白質の発現に伴って見られたことから、cAMP 処理による複合体の形成阻害はなかった (data not shown、図 2. 7(Cdc2 のリン酸化は、Cdc2 がサイクリン B と複合体を形成している時のみ見られる))。また、

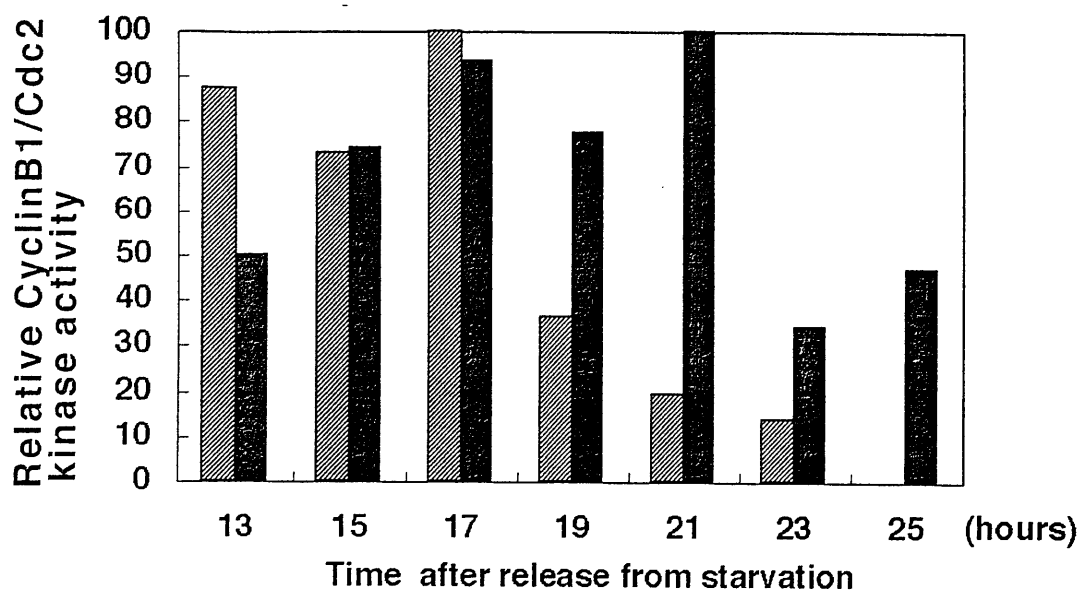


図 2.6 cAMP 処理、未処理細胞のサイクリン B1/Cdc2 複合体の活性の経時変化

cAMP 処理、未処理それぞれの条件下での同調培養した細胞のサイクリン B1/Cdc2 複合体の活性を経時的に測定した。CSF-1 添加後 8 時間で cAMP 処理を行った。

■ は、cAMP 処理細胞。 ■ は、未処理細胞。

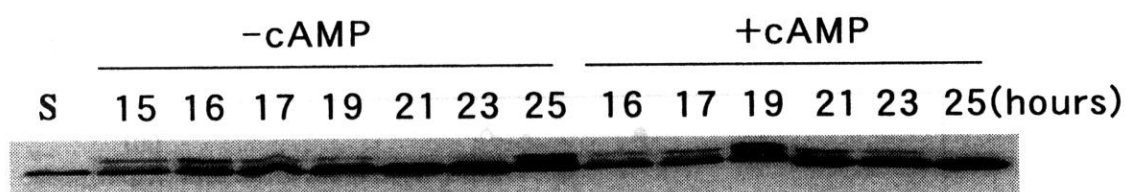


図 2.7 cAMP 処理、未処理細胞の Cdc2 の発現量及びリン酸化状態の経時変化

時間は、CSF-1 添加後の時間を示し、cAMP 処理は、CSF-1 添加後 8 時間で行った。S は、CSF-1 を除去した培地で 22 時間培養した細胞由来の細胞抽出液。

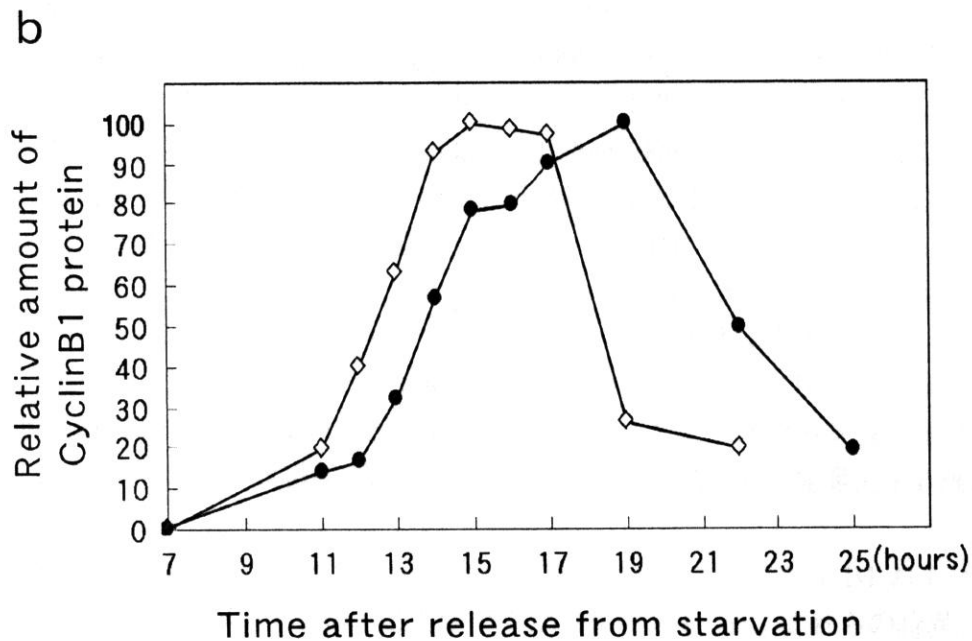
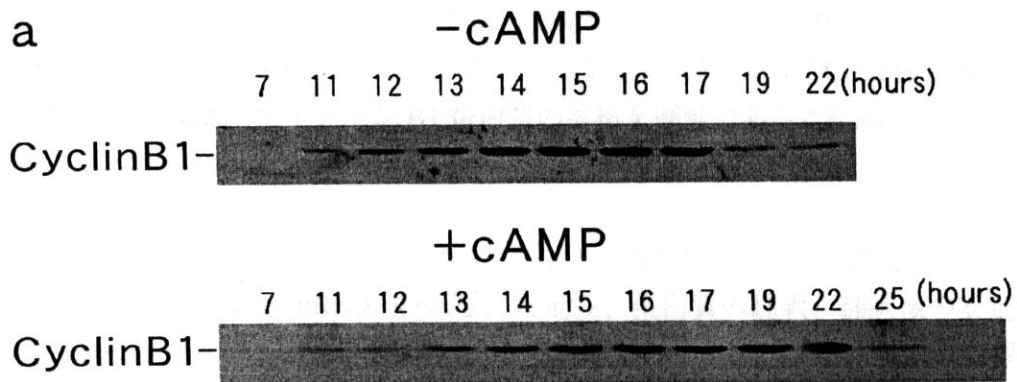


図 2.8 cAMP 処理、未処理細胞のサイクリン B1 蛋白質発現量の経時変化

a cAMP 処理、未処理の同調培養細胞のサイクリン B1 蛋白質発現量。時間は、CSF-1 添加後の時間を示し、cAMP 処理は、CSF-1 添加後 8 時間で行った。

b a のバンドの強度をデンシトグラフで測定した。cAMP 処理細胞、未処理細胞それぞれの最大の強度を 100% とし、各時間のバンドの%を計算し、グラフ化した。

● は、cAMP 処理細胞。◇ は、未処理細胞。

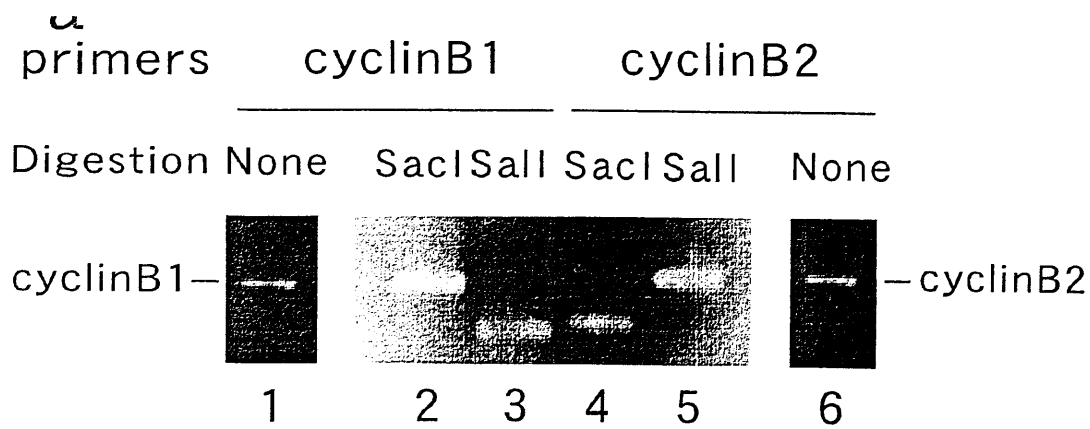
cAMP 処理細胞、未処理細胞で Cdc2 蛋白質発現量の差は、見られなかった (図 2.7)。以上のことから、cAMP に発したシグナルによるサイクリン B1/Cdc2 複合体の活性化の遅延の原因は、サイクリン B1 蛋白質の蓄積を遅延であると結論することができる。

2.3.4 cAMP は、G2 期におけるサイクリン B1mRNA の蓄積に影響しない

蛋白質の発現量は、mRNA の転写、安定性、蛋白質の翻訳、翻訳後の安定性で制御される。そこで、cAMP 処理による G2 期でのサイクリン B1 蛋白質の蓄積の遅延が、サイクリン B1mRNA の転写の阻害、またはサイクリン B1 mRNA の安定性の低下によるものであるかを解析するために、同調培養した cAMP 処理細胞、未処理細胞のサイクリン B1 mRNA の発現量を経時的に解析した。サイクリン B1 mRNA は、細胞が G2 期を進行するに連れて増加し、M 期でピークを示す (Hwang et al., 1995; Cogswell et al., 1995; Piaggio et al., 1995)。その後細胞が G1 期に進行するとサイクリン B1 蛋白質は、劇的に減少するが、サイクリン B1 mRNA は、その蛋白質とは異なり徐々に減少する (Brandeis and Hunt, 1996)。サイクリン B1 は、サイクリン B2 とヌクレオチドレベルで非常に相同性が高く、また、サイクリン B2 の mRNA 発現量の細胞周期を通じての変動は、サイクリン B1 と同様である (Brandeis and Hunt, 1996)。このため、サイクリン B1mRNA の全長、または、長い配列を用いたノザンブロッティングによる解析では、サイクリン B1 およびサイクリン B2 をともに検出し、サイクリン B2 の mRNA 量に影響され、サイクリン B1 mRNA 量の変動を正確に測定出来ないことが予想される。そこで、サイクリン B1 およびサイクリン B2 それぞれに特異的なプライマーを用いた (図 2.9.a) 定量的 RT-PCR 法を行った。

これらの特異的なプライマーを用いた PCR によってサイクリン B1 およびサイクリン B2 の単一バンドを得ることができた (レーン 1、6)。これらの特異的なプライマーにより増幅されたサイクリン B1 およびサイクリン B2 の配列は、それぞれ異なる制限酵素 (Sac I, Sal I) の切断サイトを含む。サイクリン B1 特異的プライマーによる PCR 産物は、SacI では、切断されないが SalI により完全に切断された (レーン 2、3)。また、サイクリン B2 特異的プライマーによる PCR 産物は、SacI で完全に切断され、SalI では切断されなかった (レーン 4、5)。これよりこれらの特異的なプライマーを用いることにより、サイクリン B1 とサイクリン B2 それぞれの mRNA を特異的に増幅できることが確認できた。また、RTase を用いなかった場合、これらの特異的プライマーを用いた PCR では、DNA 断片は得られなかったため、ゲノムの混入はなかった (data not shown)。定量的な PCR を行うため、PCR 反応産物の量が用いた鋳型の cDNA 量と比例している範囲を調べ、この条件下の鋳型の cDNA 量で定量的な PCR を行った (図 2.9.b)。

同調培養した cAMP 処理、未処理 Bac1.2F5A 細胞より total RNA を抽出し、サイ



b

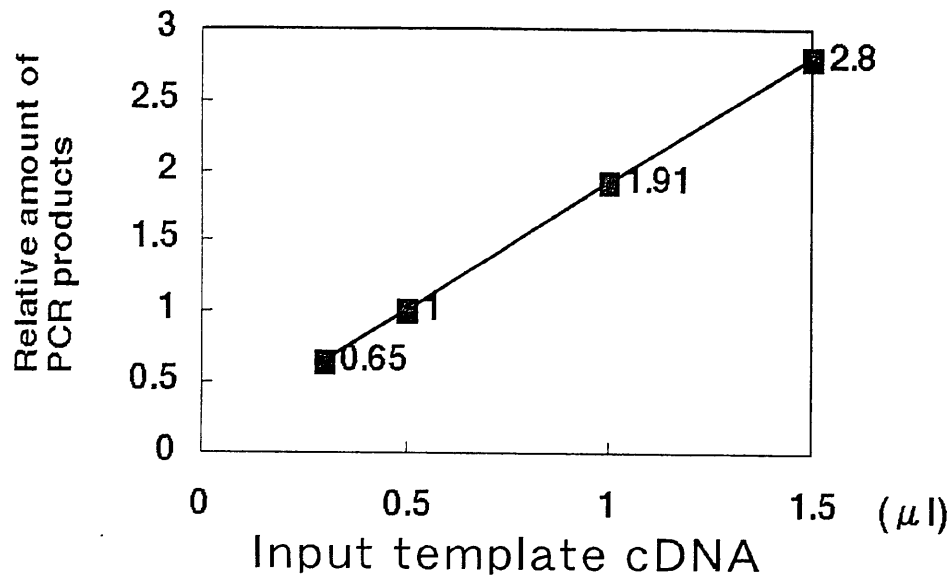


図 2.9.a サイクリン B1、サイクリン B2 特異的プライマーによる PCR 産物とその制限酵素処理による特異的切断

a PCR で増幅したフラグメントを 2 つの異なる制限酵素(SacI、SalI)で酵素処理をおこなった。

レーン 1 (1)サイクリン B1 特異的なプライマーで増幅したフラグメント

レーン 2 (1)を SacI 処理したもの

レーン 3 (1)を SalI 処理したもの

レーン 4 (2)を SacI 処理したもの

レーン 5 (2)を SalI 処理したもの、

レーン 6 (2)サイクリン B2 特異的なプライマーで増幅したフラグメント

図 2.9.b 鋳型 cDNA 量に対する反応産物の量

鋳型 cDNA 量を $0.5 \mu\text{l}$ ずつ増加させたときの PCR 反応産物の量をデンストグラフで測定した。

クリン B1 得意的なプライマーを用いた定量的 RT-PCR を行いサイクリン B1 mRNA の発現量の経時変化を測定した (図 2.9.c)。cDNA の量のコントロールとして細胞周期の各時期で mRNA の発現量の変動がない GAPDH の特異的プライマーを用いた PCR で確認した (data not shown)。cAMP 処理、未処理細胞ともに S 期の後半 (CSF-1 添加後 11 時間後) で、微量のサイクリン B1 mRNA が発現しており、その後 G2 期を進行するにつれ発現量は増加した。CSF-1 添加後 17 時間後までサイクリン B1 mRNA 発現量の値の変化は、cAMP 処理、未処理細胞ともに同様の挙動を示したことから、G2 期の間 (CSF-1 添加後 11-15 時間後)、cAMP は、サイクリン B1 mRNA の蓄積に影響しない。一方、cAMP 未処理細胞ではサイクリン B1 mRNA は M 期進行後も増加し、M 期から G1 期に移行する時期でピークに達してその後減少したが、cAMP 処理細胞では、M 期でのサイクリン B1 mRNA の蓄積が若干阻害された。以上の結果から、cAMP は、サイクリン B1 mRNA の発現量に影響して G2 期中のサイクリン B1 蛋白質の蓄積を遅延させるものではないことが判明した。

2.3.5 cAMP は、G2 期のサイクリン B1 蛋白質を不安定化させる

cAMP は、G2 期においてサイクリン B1 mRNA の発現の挙動を変えず、また、サイクリン B1 蛋白質の翻訳にも影響しなかった (data not shown)。そこで、次に cAMP 処理による G2 期におけるサイクリン B1 蛋白質の安定性への影響を解析した (図 2.10)。G2 期でのサイクリン B1 蛋白質の安定性を解析するため、同調培養した Bac1.2F5A 細胞を S 期後期に進行させ (CSF-1 添加後 11 時間)、³⁵S メチオニンで 1 時間細胞内の蛋白質を標識し、その後 ³⁵S メチオニンを除去し過剰な標識されていないメチオニン存在下で培養し、cAMP 処理細胞、未処理細胞の標識されたサイクリン B1 蛋白質の残存量を抗サイクリン B1 抗体で免疫沈降し測定した。サイクリン B1 蛋白質は、細胞が M 期より G1 期に進行するとすみやかに分解される (King et al; 1994)。そこで正確な測定を行うために cAMP 未処理細胞の培地にノコダゾールを添加した。ノコダゾールは、細胞の G1 期への移行を阻害するが、サイクリン B1 蛋白質の分解を直接阻害しない。ノコダゾールを培地に添加することによりシャーレから離れる丸い細胞が増加した。このため cAMP 未処理細胞のサイクリン B1 蛋白質量も若干の減少が見られた。cAMP 未処理細胞と cAMP 処理細胞のサイクリン B1 蛋白質の安定性を比較すると、cAMP 処理細胞ではサイクリン B1 蛋白質の安定性著しく低下していた。解析をおこなった期間、cAMP 処理細胞はシャーレから浮遊せず、また、G2/M 期に存在し、G1 期へ移行していないことを確認している。また、cAMP 処理と同時にノコダゾール処理を行った場合でも同様にサイクリン B1 蛋白質が著しく不安定化された (data not shown)。

以上の結果より、cAMP に発する細胞内シグナルの活性化により G2 期のサイクリン B1 蛋白質が不安定化され、その結果としてサイクリン B1 蛋白質の蓄積の遅延、サイクリン B1/Cdc2 複合体の活性化の遅延、細胞の G2 期から M 期への移行

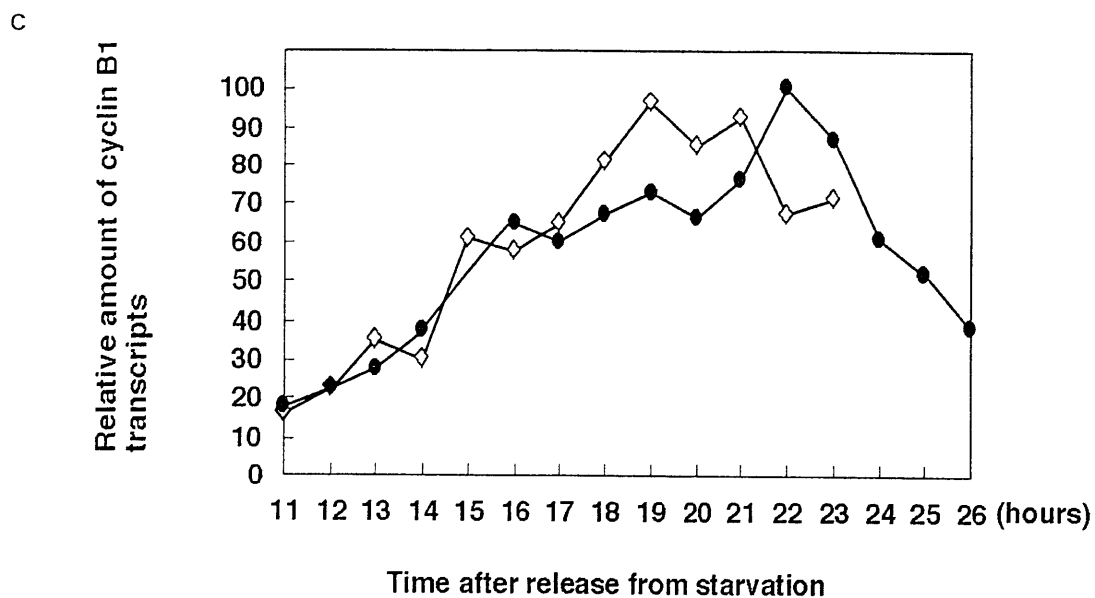


図 2.9.c cAMP 処理、未処理細胞のサイクリン B1 mRNA 量の経時変化

cAMP 処理、未処理細胞より得た cDNA を鋳型にし、サイクリン B1 特異的なプライマーを用いた PCR 反応を行い、サイクリン B1 mRNA 量の経時変化を測定した。Densitograph で各時間のバンドの強度を測定し、cAMP 処理、未処理細胞それぞれの強度の最大値を 100% として各時間の強度を%で表した。

● は、cAMP 処理細胞。◇ は、未処理細胞。

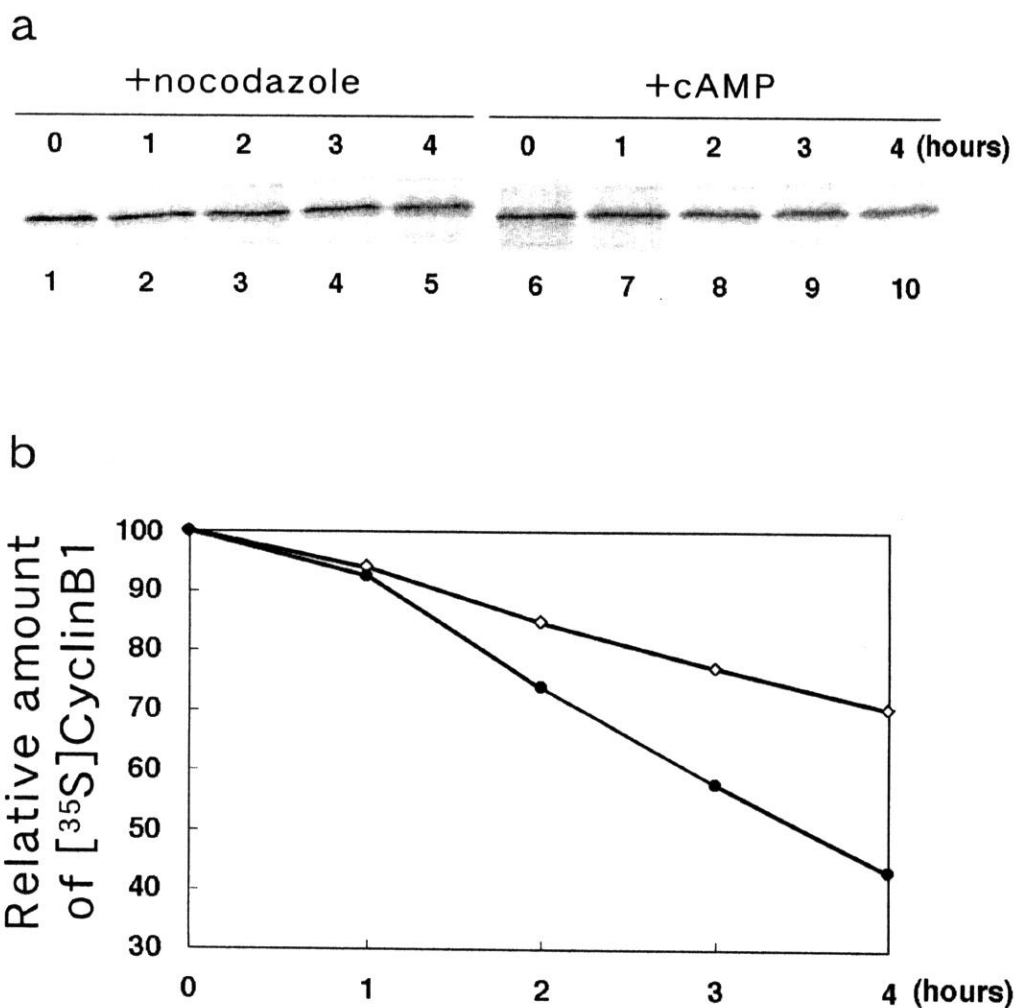


図 2.10 cAMP 処理、未処理細胞の G2 期におけるサイクリン B1 蛋白質の安定性

- a パルスチェイス法によって cAMP 処理、未処理細胞の G2 期におけるサイクリン B1 蛋白質の半減期を測定した。
- b a の値を測定し、グラフに表した。チェイス開始時のサイクリン B1 蛋白質の存在量を 100% として各時間のサイクリン B1 蛋白質の存在量の割合で示した。未処理細胞のノコダゾール処理を行わなかった場合も同様の結果が得られた。

● は、cAMP 処理細胞。◇ は、未処理細胞。

の遅延がもたらされると結論できる。

細胞のセカンドメッセンジャーである cAMP は、多くのホルモンの刺激により細胞内濃度が上昇し、細胞内のシグナル伝達において様々な細胞種で広く一般的に働いている。例えば、肝細胞、筋肉細胞においては、アドレナリンがグリコーゲンの分解を引き起こすが、この際に cAMP がセカンドメッセンジャーとして働いている。cAMP に発したシグナルは PKA の活性化を通して下流に伝えられる。PKA の下流で働く経路の 1 つである CREB は、PKA の活性化によりリン酸化され、プロモーター領域に CRE サイトを持つ遺伝子の転写を制御している。また、PKA は、Raf-1 をリン酸化することによって Raf-1 シグナル経路を阻害することも報告されている (Hafner et al., 1994)。細胞の増殖に対する cAMP の効果は、細胞の種類によって異なるが、cAMP/PKA 経路を介したシグナルは、最終的に細胞周期進行を制御する機構に伝達される。血球系細胞では一般的に増殖抑制的に働くことが知られており、cAMP による細胞周期進行阻害の制御機構は、有効なモデルシステムであるマウスマクロファージ細胞を用いてよく理解されている (Kato et al., 1994; Vairo et al., 1990; Rock et al., 1992)。cAMP によって G1 期で停止したマクロファージ細胞では、G1 期進行に決定的な役割を果たしているサイクリン D/Cdk4 複合体のサブユニットの発現の抑制や Cdk インヒビター、p27^{Kip1} の発現誘導によるサイクリン D/Cdk4 複合体キナーゼ活性が抑制されている (Cocks et al., 1992; Vadiveloo et al., 1996)。アンチセンス p27^{Kip1} cDNA 発現ベクターをマクロファージ細胞に導入によって cAMP 存在下でも G1 期から S 期に進行することから (Kato unpublished data)、cAMP による G1 期停止には、p27^{Kip1} が決定的な働きをしている。

cAMP に発したシグナルは、マクロファージ細胞の G2 期進行をも抑制していることが報告されていたが (Kato et al., 1994)、その作用機序は未知であり、当然分子機構も解明されていなかった。本研究結果より増殖中のマクロファージ細胞に細胞内 cAMP 濃度を上昇させる薬剤を加えると G2/M 期に存在するの細胞数が一時的に増加し、その後減少し、最終的に全ての細胞が、G1 期で停止した。細胞周期を同調した細胞を用いた結果から、cAMP は、細胞の S 期進行、M/G1 期移行には全く影響しないが、G2 期に一時的に細胞を停止させて G2 期から M 期への移行を約 4 時間遅延させることが判明した。この G2 期進行遅延の原因は、サイクリン B1 蛋白質の蓄積の遅延を伴うサイクリン B1/Cdc2 複合体の活性化の遅延であった。蛋白質の蓄積の遅延の原因として mRNA レベルと蛋白質レベルの制御が考えられるが、G2 期でのサイクリン B1 mRNA の発現は、cAMP 添加によって影響されていなかった。G2 期において本来サイクリン B1 蛋白質は安定である。しかし、cAMP 処理した細胞では、サイクリン B1 蛋白質の半減期が著しく短くなっていた。これらの結果は、cAMP に発したシグナルは、サイクリン B1 mRNA の転写、安定性に影響しないが、サイクリン B1 蛋白質を不安定にすることによってサイクリン

B1/Cdc2 複合体の活性化を抑制し G2 期進行を制御することを示している (図 2.11)。

細胞には、DNA 複製の完了と DNA 損傷の修復をモニターする G2 チェックポイントが存在している。DNA 障害などにより G2 チェックポイントが働くと、細胞は、細胞周期の進行が阻害され G2 期に留まり、複製の完了、修復の完了なしに細胞分裂がおきることを防ぐ。この G2 チェックポイントが働いたときのサイクリン B/Cdc2 複合体の制御機構の解析が種々おこなわれている。サイクリン B1/Cdc2 複合体の活性化制御については、Cdc2 の 14 位のスレオニン、15 位のチロシンが Wee1、Mik1、Myt1 によってリン酸化されることによる負の制御と、Cdc25C によるこれらの脱リン酸化という正の制御によって行われるというモデルが提唱されている。出芽酵母の変異株を用いた実験では、Cdc2 の 14 位のスレオニン、15 位のチロシンの各サイクリン B/Cdc2 複合体活性を負に制御するリン酸化部位を置換しても G2 チェックポイントが正常に働くことから G2 チェックポイントにおいて、サイクリン B/Cdc2 複合体の不活性化リン酸化は関与していないことが示唆された (Amon et al.,1992;Sorger and Murray 1992;Booher et al.,1993;Stueland et al.,1993))。しかし、分裂酵母の Wee1、Mik1 の両方を変異させた変異株が、DNA 合成阻害剤ヒドロキシウレア存在化でも G2 期で停止しないこと、それぞれの単独の変異株では、G2 チェックポイントが働くこと、また活性を負に制御するリン酸化部位を置換した場合、ヒドロキシウレア存在化で M 期の遅延が見られないことなどから、分裂酵母における G2 チェックポイントは、不活性化リン酸化が関与していると考えられる (Lundgren et al.,1991; Enoch and Nurse 1990;Rowley et al.,1992;Barbet and Carr 1993)。また、Kumagai らは *Xenopus* extracts を用いた実験から Cdc2 のリン酸化状態とは独立にサイクリン B1/Cdc2 複合体の活性を抑制する画分を報告している (Kumagai and Dunphy 1996)。一方、ほ乳類の細胞における DNA 障害によるチェックポイントでは、p53 が働いていることが報告されている。p53 は、G1 期においては、Cdk インヒビターである p21^{Cip1} を誘導し、それによりサイクリン/Cdk 複合体の活性を抑制し、G1 期停止をもたらす。G2 期においては、14-3-3 σ を発現誘導し、Cdc25C の不活性の状態にして、サイクリン B/Cdc2 複合体の活性化を阻害し G2/M 期進行を抑制する。Maity らは、Hela 細胞を用いてナイトロジェンマスタードなどの薬剤を用いた DNA 損傷による G2 チェックポイントの活性化に伴い、G2/M 期進行阻害がおきることをフローサイトメトリーで観察し、このときサイクリン B1 蛋白質の蓄積の遅延および、サイクリン B1mRNA の蓄積の遅れがあることを報告している (Maity et al.,1996)。以上のように G2 チェックポイントの働く経路は種々存在しており、その際のサイクリン B/Cdc2 複合体の制御は様々である。本研究では、DNA 複製の阻害などが起きないため、G2 チェックポイントは働いていないと考えられるが、Maity らで見られたのと同様のサイクリン B1 蛋白質の蓄積の制御による G2/M 期移行の遅延が、観察された。このことからこの現象は、cAMP/PKA 経路に特異的な現象ではなく、G2 チェックポイントも含む G2/M 期の細胞周期制御機構の一

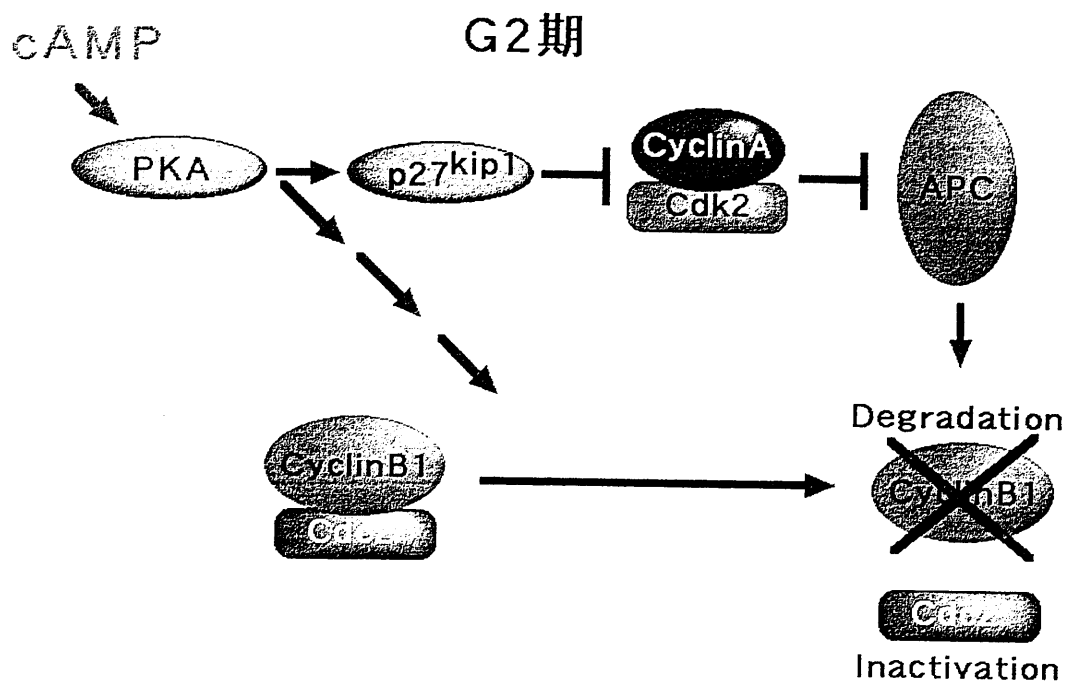


図 2.11 cAMP から発するシグナルによるサイクリン B1 蛋白質の分解機構のモデル

部であり、G2/M 期では、cAMP の経路も含めた種々のシグナル経路が関与して細胞周期進行を制御している。

サイクリン B mRNA 量は、S 期の途中より徐々に増加し、G2/M 期をピークにその後 G1 期に進行すると徐々に減少する。この mRNA 量の調節には転写レベル、mRNA の安定性のレベルでの調節が行われている。サイクリン B mRNA の転写活性は、G2/M 期で高くなっている。しかし、細胞周期に依存して転写活性を調節している因子に関してはほとんど判っていない。本研究により、マクロファージ細胞においては、cAMP の経路で PKA の下流で働く因子が、サイクリン B mRNA の発現調節をおこなっている示唆が得られたため、サイクリン B mRNA の発現制御を理解する手掛かりになると考えられる。

サイクリン B は、M 期を終了するために分解される必要がある。分解には、サイクリン B の N 末にある破壊ボックスと呼ばれる領域が重要であり、ユビキチンプロテアソーム依存性蛋白質分解系により行われる。M 期終期にサイクロソームまたは APC と呼ばれる E3-C リガーゼが特異的に活性化され、サイクリン B1 蛋白質をユビキチン化する。ユビキチン化されたサイクリン B は、26S プロテアソームによって速やかに分解される (King et al, 1995; Hoyt et al, 1997)。分裂酵母においては、cAMP/PKA 経路が APC の形成と活性化を阻害し、M 期終了を阻害することが報告されている (Yamasita et al., 1996)。ほ乳動物細胞では、Polo-like キナーゼが、APC のサブユニットを特異的にリン酸化することによりその活性を正負に制御している

(Kotani et al., 1998)。NIH3T3 細胞では、PKA の活性が M 期の開始と共に速やかに上昇し、M 期初期で最大レベルに達し、M 期前期には減少する (Kotani et al., 1998)。これらの結果は PKA の活性化が APC の活性を阻害し、サイクリン B の分解を抑制することを示しているようである。しかしながら、*Xenopus* の卵抽出液を用いた研究では cAMP/PKA 経路の活性化がサイクリン B 蛋白質の分解開始に必要であり、M 期からの脱出にも必要であることが示された (Grieco et al, 1996)。更に、cAMP の効果は細胞の種類によって各々異なり (Boynton et al., 1998)、又 NIH3T3 細胞に 8Br-cAMP と IBMX を加えても増殖は抑制されない。このことから細胞の種類によって cAMP/PKA 経路は異なる分子を標的の分子と考えられる。マクロファージ細胞は特異的な PKA のターゲットとなる蛋白質を発現しており、それによって cAMP がサイクリン B1 蛋白質の安定性を低下させ、細胞周期進行を阻害するのかもしれない。最近 S 期におけるサイクリン A/Cdk2 複合体の活性が APC の不活性化に必要であり、サイクリン A の免疫除去や、p27^{kpl} の発現によって S 期においてサイクリン B1 の分解が起きることが報告された (Lukas et al., 1999)。Bac1.2F5A 細胞は、cAMP/PKA 経路の活性化によって p27^{kpl} を発現誘導する (Kato et al., 1994)。今回の研究でも cAMP/PKA 経路の活性化によって、細胞が最終的に G1 期で停止することから、p27^{kpl} は、発現誘導されていると考えられる。G2 期における cAMP の p27^{kpl} の発現誘導によってサイクリン A/Cdk2 複合体の活性が抑制され、サイク

リン B1 蛋白質の分解、及び G2 期進行の抑制が引き起こされたのかもしれない。

cAMP は、G1 期では p27^{Kip1} の発現量を増加させて G1 期停止を引き起こし、G2 期ではサイクリン B1 を不安定化して G2 期進行を遅延させる。p27^{Kip1} の発現量の調節には、ユビキチン/プロテアソーム経路を含む細胞周期依存的な分解機構が重要な役割を果たしている (Pagano et al., 1995; Tomoda et al., 1999)。cAMP は、細胞周期の時期特異的に異なる分子の分解に働くユビキチン/プロテアソーム経路を制御し細胞周期の進行を調節している可能性がある。さらにこの G1 期、G2 期両時期での細胞周期進行抑制機構は、関連している可能性があることから (Lukas et al., 1999)、cAMP に発したシグナルの経路の詳細な研究によって今後細胞周期制御機構のさらなる解明が、導かれるかもしれない。

3 第 2 部 p19^{ARF} による G1 期停止の分子機構の解析

Cdk インヒビター $p16^{Ink4a}$ をコードしている *Ink4a* 遺伝子座は、もう 1 つの蛋白質 $p19^{ARF}$ をもコードしていることが明らかになった (Quelle et al., 1995) (図 3.1)。 $p16^{Ink4a}$ と $p19^{ARF}$ の転写産物は異なるエクソン、 $E1\alpha$ 、 $E1\beta$ より転写されるが、エクソン 2、3 を共有する (Mao et al., 1995; Sone et al., 1995; Quelle et al., 1995)。 $p16^{Ink4a}$ と $p19^{ARF}$ は、エクソン 2、3 を共有するが、読み枠が異なるため、 $p19^{ARF}$ のアミノ酸配列は、 $p16^{Ink4a}$ のそれとは全く異なり、また既知の蛋白質との相同性もほとんど無い (Quelle et al., 1995)。しかし、 $p19^{ARF}$ は、 $p16^{Ink4a}$ と同様に細胞周期進行を停止させる機能を持つことが明らかになった (Serrano 1993; Quelle et al., 1995; Haber et al., 1997)。 $p16^{Ink4a}$ は、直接 D タイプサイクリン依存性キナーゼ (Cdk4、Cdk6) と結合し、その活性を抑制し、Rb 蛋白質のリン酸化を阻害して、細胞を G1 期で停止させる (Serrano 1993; Weinberg 1995; Sherr 1996; Sherr and Roberts 1995)。一方、 $p19^{ARF}$ は、既知のサイクリン/Cdk 複合体に結合せず、活性を直接阻害することなかった。しかしながら、マウスの繊維芽細胞に $p19^{ARF}$ を過剰発現すると、細胞は、G1 期のみならず G2/M 期でも停止する (Quelle et al., 1995)。Rb 欠損細胞に $p16^{Ink4a}$ を過剰発現させても細胞周期停止は起きないことから、 $p16^{Ink4a}$ の細胞周期停止機能は、Rb に依存する。一方、p53 欠損細胞やドミナントネガティブ p53 を持つ細胞に $p19^{ARF}$ を過剰発現しても、細胞は $p19^{ARF}$ 依存的な細胞周期進行停止をおこさない (Quelle et al., 1995; Kamijo et al., 1997) ことから、 $p19^{ARF}$ は、p53 に依存して細胞周期を停止させることが示唆された。しかし、 $p19^{ARF}$ による細胞周期停止の分子機構に関しては、未知であった。

癌抑制遺伝子である p53 は、ヒト癌の約 50% で失活がみられることから細胞の正常性を保つ上で非常に重要な役割を持つ転写因子である。増殖中の細胞の p53 の発現量はごく微量であるが、DNA 損傷を引き起こす放射線、紫外線、抗腫瘍剤等によってその発現が上昇し活性化する。p53 の発現量の制御は、主に蛋白質分解機構によっておこなわれている。p53 の生理機能は、DNA に損傷が生じたとき、ひとまず細胞を G1 期、G2/M 期で停止させ、DNA の損傷を修復してから再び細胞周期を進行させるという細胞周期進行の監視役である。DNA 損傷が修復できない場合も、p53 は、アポトーシスを誘導し、細胞の正常性を維持する。G1 期停止をもたらす p53 のターゲットは、Cdk インヒビター $p21^{Cip1}$ であり (el-Deiry et al., 1993)、G2/M 期停止では 14-3-3 σ がターゲットとなる (Hermeking et al., 1997)。アポトーシスに関しては、p53 は、Bax の発現を誘導して細胞にアポトーシスを引き起こす (Yin et al., 1997; McCurrach et al., 1997)。このように、p53 は、細胞の状態に合わせて転写因子として様々な蛋白質を発現誘導し、細胞の増殖を制御している。この p53 の活性を制御する上で中心的な役割を果たす蛋白質が、癌遺伝子産物である MDM2 蛋白質である。MDM2 は、p53 によって発現誘導される蛋白質であり、N 末端領域で p53

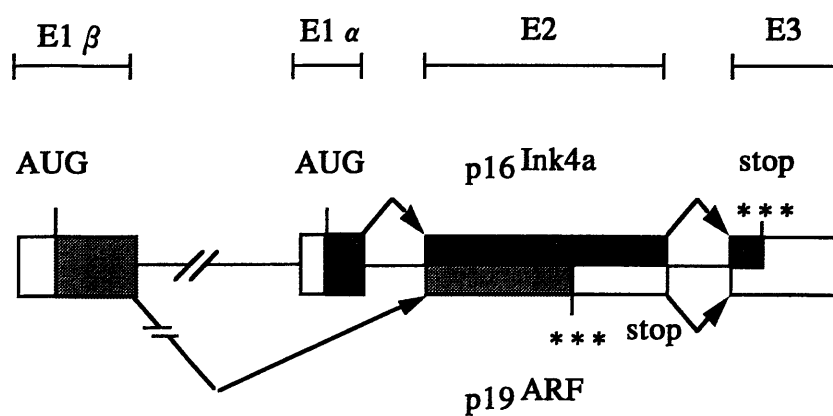


図 3.1 *Ink4a* 遺伝子座の構造

Ink4a 遺伝子座の構造は、異なる 2 つの蛋白質 p16^{Ink4a} と p19^{ARF} の転写産物は、それぞれエクソン 1 α 、エクソン 1 β より転写され、エクソン 2、エクソン 3 を共有する。2 つの蛋白質のエクソン 2、3 の読み枠は異なり、ストップコドンは、p16^{Ink4a} では、エクソン 3 にあり、p19^{ARF} では、エクソン 2 にある。

のN末端領域に結合して、p53の機能を阻害する。その作用機序は、p53の転写活性を阻害する、p53のE3としてユビキチン/プロテアソーム経路による分解に導く、p53を核内から細胞質に核外輸送して核内での転写と細胞質でのユビキチン化を促進するなどである(Haupt et al.,1997; Kubbutat et al.,1997; Honda et al.,1997; Freedman et al.,1998)。このようにp53とMDM2の間にはネガティブフィードバックが存在しており、不必要な細胞周期停止を起こさないためのp53の速やかな分解が保証されている。p19^{ARF}は、p53に依存して細胞周期を停止させることから、DNA損傷を引き起こす刺激によるp19^{ARF}の発現が予想された。しかし、p19^{ARF}はこれらの刺激によって発現誘導されないことから、DNA損傷の経路とは異なる経路で働いていると考えられる(de Stanchina et al.,1998; Kamijo et al.,1999)。

多くのヒトの癌細胞で、*Ink4a* 遺伝子座の欠失、変異がみられる (Hall and Peters 1996; Hunter and Pines 1994; Sheaff and Roberts 1995; Sherr 1996)。多くの変異は、エクソン2に起きており、この変異によるp19^{ARF}の機能への影響が調べられたが、エクソン2の変異は、p16^{Ink4a}の機能を欠失させるがp19^{ARF}の機能に影響しなかった(Quelle et al.,1995)。この結果から、初めp19^{ARF}は、p16^{Ink4a}とは異なり、ヒトの癌の原因ではないと考えられた。しかし、エクソン1βのみのノックアウトマウスが作成され、そのマウスが癌を高発現したこと、またこのノックアウトマウス由来のMEF細胞がRasの過剰発現単独で悪性形質転換したことから、p19^{ARF}も癌抑制能を持つ蛋白質であることが示唆された(Kamijo et al.,1997)。以上のように、*Ink4a* 遺伝子座は、p16^{Ink4a}とp19^{ARF}の2つの蛋白質によって細胞の癌化を抑制している重要な働きをになう遺伝子座である。

Ras、Myc、E2F-1等の細胞由来の増殖シグナルやE1A等のウイルス由来の増殖シグナルは、細胞の増殖を促進するだけでなく、アポトーシスも誘導することが知られていた。これらの増殖シグナルによるアポトーシスがp19^{ARF}を介して引き起こされることが明らかになった(Zindy et al.,1998; de Stanchina et al.,1998; Bates et al.,1998; Palmero et al.,1998)。正常な細胞にこれらの増殖シグナルを過剰発現させると、p53依存的なアポトーシスが誘導されるが、p53欠損細胞と同様にp19^{ARF}欠損細胞でもこのアポトーシスは誘導されなかった。また、これらの増殖シグナルを細胞に作用させたときのp19^{ARF}の発現を解析したところ発現量の増加がみられた。p19^{ARF}は、高増殖シグナルによって発現誘導され、p53の活性化を介して、アポトーシスを誘導する。即ちp19^{ARF}は、過剰な増殖刺激によって不死化および形質転換する細胞を未然に除去する機能を果たしていると考えられている。

本研究では、p19^{ARF}によるG1期停止の分子機構を明らかにした。p19^{ARF}は、マウスの線維芽細胞を主にG1期で停止させる。このG1期停止は、p19^{ARF}によるG1サイクリン/Cdk複合体の活性抑制によってもたらされる。p19^{ARF}は、細胞内のほとんどのMDM2蛋白質と結合し、MDM2によるp53の分解を阻害してp53を活性化。活性化したp53は、Cdkインヒビターp21^{Cip1}を発現誘導し、p21^{Cip1}は、G1サ

イクリン/Cdk 複合体に結合してその活性を阻害して細胞を G1 期に停止させる。

分子生物学的な一般的手法に関しては、Molecular Cloning 2nd edition 及び、Current protocols in Molecular Biology を参考にした。

3.2.1 ベクターの構築

マウスの肺組織より Isogen(Nippon Gene)を用いて Total RNA を抽出した。この Total RNA 1 μ g を鋳型とし、random oligo Primer と Avian Myeloblastosis Virus reverse transcriptase と Takara RNA LA PCR Kit(AMV)を用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型に p19^{ARF} のコーディング領域を特異的に増幅可能なプライマー (5'-CATATGGGTCGTCAGGTTCTTGG-3' と 5'-GGATCCGTGCTTGAGCTGAAGCTATG-3'、センスプライマーの配列は、開始コドンの ATG を含むエクソン 1 β の配列より作製し、アンチセンスプライマーの配列は、終止コドンを含むエクソン 2 の配列より作製した (Quelle et al.,1995)) を使用して、変性 (94°C、1 分)、アニリング (56°C、1 分)、伸長 (72°C、2 分) の条件で 40 サイクルの PCR 反応を行って、マウス p19^{ARF} 転写産物を得た。得られたマウス p19^{ARF} 転写産物は、pGEM-T プラスミド(Promega)にクローニングした後、シーケンスを行って報告されているマウス p19^{ARF} のコーディング領域と同一の配列であることを確認した。次に、マウス p19^{ARF} のコーディング領域をフレームを合わせて、HA タグ (YPYDVDPDYASLGPP) を持つ発現ベクター (藤沢博士に頂いた) に一旦挿入し、さらに開始コドン、HA タグ、マウス p19^{ARF} のコーディング領域を含む配列を羊メタルチオネインプロモーターと neo gene を持つ発現ベクター (pMT-CB6+) (Cook et al.,1996) に挿入した。

3.2.2 細胞培養とトランスフェクション法

マウス NIH3T3 細胞は、10% Fetal Bovine Serum(FBS) (Hyclone)を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) (Gibco BRL) 培地で 37°C、CO₂ 濃度 5%のインキュベータ内で培養した。この NIH3T3 細胞は、*INK4A* 遺伝子座を欠失しているが、p53 遺伝子は正常である。発現ベクターの細胞へのトランスフェクションは、リン酸化カルシウム-DNA 沈澱法 (Chen and Okayama,1987) により行った。次に、1mg/ml の G418 を含む培地で細胞を培養し、発現ベクターの導入された細胞を選択した。発現ベクターの導入された単一の細胞由来のクローンは、クローニングリング(Iwaki Glass) を使用して細胞を回収し、重金属を含む培地で培養して HA-p19^{ARF} の発現を確認した。メタルチオネインプロモーターを持つ発現ベクターから蛋白質発現誘導条件は、低密度 (10%程度) で細胞をプレートに展開し 24 時間培養した後、100 μ M の ZnSO₄ を含む培地でそれぞれの処理時間培養した。本研究で使用したマウス NIH3T3 細胞の分裂時間は、100 μ M の ZnSO₄ によって影響されないことを確認してある。

3.2.3 フローサイトメトリーによる細胞周期の解析

細胞をフローサイトメトリー試薬 (0.1%クエン酸ナトリウム、0.1%TritonX-100、50 μ g/ml propidium iodide) に懸濁し (細胞 2×10^6 個当り 1 ml)、遮光して室温で 10 分間静置した。DNase free RNase を最終濃度 1 μ g/ml になるように加え、更に遮光したまま室温で 30 分間静置した。propidium iodide の結合した DNA の蛍光をファックスキャン (Becton Dickinson) で測定し、G1 期、S 期 G2/M 期各時期に存在する細胞の割合を解析した。

3.2.4 抗体

ウサギポリクローナル抗体 (抗サイクリン A、B1、E、抗 Cdc2、抗 Cdk2、抗 Cdk4、抗 p21^{cip1}) とマウスモノクローナル抗体 (抗サイクリン D1) は、Santa Cruz Biotechnology 社製を使用した。マウスモノクローナル抗体 (抗 HA タグ、クローン 12CA5) は、Boehringer Mannheim 社製、マウスモノクローナル抗体 (抗 pRb) は、Pharmingen 社製を使用した。マウスモノクローナル抗体、羊ポリクローナル抗体 (抗 p53) は、Oncogene Research 社製を使用した。ウサギポリクローナル抗体 (抗サイクリン D2、D3、抗 Cdk6) は、CJ Sherr 博士、マウスモノクローナル抗体 (抗 MDM2) は、AJ Levine 博士より提供して頂いたものを使用した。

3.2.5 細胞抽出液の調製と免疫沈降及びウェスタンブロッティング

細胞は、プロテアーゼインヒビター (0.1mM PMSF、5 μ g/ml aprotinin)、フォスファターゼインヒビター (0.1mM Na vanadate、0.1mM NaF)、1mM DTT を含む EBC lysis buffer (50mM Tris pH8.0、120mM NaCl、0.5% NP40、1mM EDTA) で 30 分溶解させた。次に 15000rpm、0℃で 15 分間遠心し、細胞の残骸等を沈殿させて上清を細胞抽出液とした。同数の細胞由来の細胞抽出液各サンプルに各抗体を加え、4℃で 16 時間静置した後、Protein A-Sepharose beads (ウサギポリクローナル抗体用)、抗マウス IgG 抗体を結合させてある Protein A-Sepharose beads (マウスモノクローナル抗体用)、抗羊 IgG 抗体を結合させてある Protein A-Sepharose beads (羊ポリクローナル抗体用) を加え、4℃で 1 時間攪拌した。その後 10000rpm、0℃で 5 秒間遠心し、免疫沈降複合体/Protein A-Sepharose beads を沈殿させ、上清を除いた。この操作を 3 回繰り返して免疫沈降複合体を得た。免疫沈降複合体は、4xSDS Sample buffer (200mM Tris-Cl, pH6.8、400mM DTT、8%SDS、0.4% Bromophenol Blue、40% glycerol) を加え、沸騰している水中で 4 分間煮沸した後 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分画した。ゲルより蛋白質を PBDF メンブレン (Millipore)、ニトロセルロースメンブレン (Amersham) に転写し、各抗体でイムノブロットを行った。1 次抗体としてマウスモノクローナル抗体を用いた場合は、抗マウス IgG 抗体で、羊ポリクローナル抗体を用いた場合は抗羊 IgG 抗体で 2 次抗体反応を行った。

後、Protein A-HRP を 1 時間反応させ、ECL ブロットニング法 (Amersham) で蛋白質を検出した。ECL ブロットニング法に関しては、製品使用法に従った。ダイレクトライセイトは、細胞を直接 SDS-Sample buffer(40mM Tris-HCl, pH6.8、0.1M DTT、1% SDS、10% glycerol、0.05% Bromophenol Blue)で融解し、沸騰している水中で 4 分間煮沸した後 15000rpm で 5 分間遠心して調整した。

3.2.6 MDM2 *in vitro* translation

マウス MDM2 cDNA(AJ Levine 博士に提供して頂いた)を TNT T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate Systems kit (Promega)を利用して、ラベルしていないメチオニンで *in vitro* 転写、翻訳をおこなってコントロールのマウス MDM2 を得た。

3.2.7 キナーゼアッセイ

(Cdk2 複合体の *in vitro* キナーゼアッセイ) 抗 Cdk2 抗体を用いた免疫沈降により得た Cdk2 免疫沈降物複合体を Kinase buffer (50mM HEPES, pH7.5、10mM MgCl₂) で 2 回洗った後、基質の 5 μ g Histone H1 (Boehringer Mannheim)、[γ ³²P] ATP 3.3 μ Ci (0.12MBq) (NEN) を含む 25 μ l の Kinase buffer (フォスファターゼインヒビター (0.1mM Na vanadate、0.1mM NaF) と 1mM DTT を含む) 中で、30℃、15 分間インキュベートした。素早く 4xSDS Sample buffer を加えて、良く攪拌し、沸騰している水中で 4 分間煮沸し反応を停止させた。次に SDS ポリアクリルアミド電気泳動法により蛋白質を分画し、ゲルを完全に乾燥させた後リン酸化された Histone H1 に取り込まれた [³²P] を Fuji BAS-2000 イメージアナライザーで測定した。

(Cdk4 複合体の *in vitro* キナーゼアッセイ) 細胞をプロテアーゼインヒビター (0.1mM PMSF、5 μ g/ml aprotinin)、フォスファターゼインヒビター (0.1mM Na vanadate、0.1mM NaF)、1mM DTT を含む Tween buffer (50mM HEPES, pH7.5、150mM NaCl、2.5mM EGTA、1mMEDTA、0.1% Tween-20)(Matsushime et al.,1994)で融解し、液体窒素で凍結させた後氷水上で溶解し 1 時間氷上で静置して細胞抽出液を得た。この細胞抽出液より抗 Cdk4 抗体を用いて免疫沈降物複合体を得て Cdk4 複合体の *in vitro* キナーゼアッセイに用いた。Cdk4 免疫沈降物複合体を Kinase buffer で 2 回洗った後、基質の GST-pRb、3.3 μ Ci (0.12MBq) [γ ³²P] ATP (NEN) を含む 30 μ l の Kinase buffer (フォスファターゼインヒビター (0.1mM Na vanadate、0.1mM NaF) と 1mM DTT を含む) 中で、30 度、30 分間インキュベートした。素早く 4xSDS Sample buffer を加えて、良く攪拌し、沸騰している水中で 4 分間煮沸し反応を停止させ、次に SDS ポリアクリルアミド電気泳動法により蛋白質を分画し、ゲルを完全に乾燥させた後リン酸化された GST-pRb に取り込まれた [³²P] を Fuji BAS-2000 イメージアナライザーで測定した。GST-pRb の調整は、(Matsushime et al.,1994)に従った。

3.2.8 細胞内蛋白質のラベル及びパルスチェイス実験

細胞を ZnSO_4 存在下、非存在下で透析した 10% FBS を含むメチオニンを含まない DMEM で 30 分間培養し、その後この培地に $180 \mu\text{Ci } ^{35}\text{S}$ -メチオニン (TRAN³⁵S-LABEL, 1175 Ci/mmol) (ICN) を加えて細胞内蛋白質をラベルした。細胞を PBS で 5 回洗い、培地を完全に取り除いた後、10% FBS、ラベルされていない $25 \mu\text{g/ml}$ メチオニンを含む DMEM で各時間培養した。ラベルされた蛋白質は、上記の方法で分画し測定した。

3.2.9 蛍光抗体法

細胞をガラスプレート上で ZnSO_4 含有、非含有の DMEM で 48 時間培養した。その後、細胞を PBS で 2 回洗い、3% PFA を含む PBS を加え、室温で 10 分間静置して固定した。次にプレートを PBS で 2 回洗い、0.5% TritonX を含む PBS を加え、室温で 10 分間静置した後、プレートを PBS で 2 回洗い、5% BSA を含む PBS を加え、室温で 30 分間静置した。5% BSA を含む PBS を除き、5% BSA を含む PBS で希釈した各抗体（抗 HA 抗体 2000 倍希釈、抗 p53 抗体（羊ポリクローナル抗体）は、500 倍希釈、抗 MDM2 抗体は、250 倍希釈）で、室温、1 時間処理した。PBS で 2 回洗った後、5% BSA を含む PBS で 100 倍希釈した抗マウス IgG (Fluorescein-linked, Amasham)(抗 HA タグ抗体、抗 MDM2 抗体用)、抗ウサギ IgG (Fluorescein-linked, Amasham)(抗 p53 抗体用)を加え室温で 30 分静置した。抗 p53 抗体処理した細胞は、1 次抗体処理後、1000 倍希釈した抗羊 IgG 抗体で前処理を行った。その後細胞を PBS で 2 回洗い、vectashield/Glycerol 1:1 (Burlingame) でコーティングし、共焦点レーザースキャン顕微鏡で観察し写真を取った。

3.3.1 p19^{ARF}はマウス繊維芽細胞を主に G1 期で停止させる

p19^{ARF}の細胞周期進行への影響及びその機構を解析するために、p19^{ARF}を細胞外からのシグナルにより発現誘導できる細胞株 (NIH-ARF) の構築を行った。マウスの正常な精巢 cDNA ライブラリーより RT-PCR 法を用いてマウス p19^{ARF}のコーディング領域の cDNA を単離した (図 3.2)。この cDNA に HA タグを付加し、メタルチオネインプロモーターを持つ発現誘導ベクター、MT-CB6+ (Cook et al.,1996) に挿入した (図 3.2)。メタルチオネインプロモーターは、細胞内の重金属イオンを細胞外に放出させるメタルチオネインのプロモーターであり重金属イオンにより活性化する。目的の蛋白質を組み込んだ MT-CB6+を持つ細胞は、培地に重金属イオンを添加することによって細胞内に目的の蛋白質を発現する。この HA-p19^{ARF}発現誘導ベクターを *Ink4a* 遺伝子座を欠失している NIH3T3 細胞に導入した。MT-CB6+は、neo 遺伝子を持つため MT-CB6+を導入した細胞は、G418 に耐性である。そこで、HA-p19^{ARF}発現誘導ベクターを導入した NIH3T3 細胞を G418 存在下で培養し、HA-p19^{ARF}発現誘導細胞クローン (NIH-ARF) をいくつか得た。NIH-ARF 細胞の 1 つのクローンの培地に重金属 (ZnSO₄) を添加し、HA-p19^{ARF}の発現を解析した結果、NIH-ARF 細胞は、培地に ZnSO₄を添加した時のみ HA-p19^{ARF}を発現した (図 3.3.a)。残りのいくつかの NIH-ARF 細胞でも同様の結果を得た。

p19^{ARF}の細胞増殖への影響を解析するため、培地に ZnSO₄を添加した時と ZnSO₄を添加していない時の細胞数を増加の割合を経時的に計測した結果、NIH-ARF 細胞では ZnSO₄を添加により細胞の増殖が抑制された (data not shown)。NIH3T3 細胞では、ZnSO₄の添加による細胞の増加速度への影響がみられなかったことから、p19^{ARF}は、細胞増殖を抑制することが明らかになった。次に、p19^{ARF}の細胞周期進行への影響を解析するため、48 時間 ZnSO₄を添加した培地で細胞を培養し、細胞周期の各時期の割合をフローサイトメトリーにより解析した (図 3.3.b)。その結果、NIH-ARF 細胞では、G1 期の割合が増加し、S 期の割合が減少した。G2/M 期の割合はほとんど変化しなかった。以上の結果より p19^{ARF}は、マウス線維芽細胞を主に G1 期で停止させることが示唆された。

次に HA-p19^{ARF}の発現の変動を測定するため、NIH-ARF 細胞の培地に ZnSO₄を添加し HA-p19^{ARF}の発現量を経時的に計測した (図 3.3.c)。HA-p19^{ARF}の発現は ZnSO₄添加 3 時間後よりみられ始め、25 時間後に発現量は最大に達し、その一定になった。次に HA-p19^{ARF}の発現に伴う細胞周期の各時期の割合の経時変化をフローサイトメトリーで解析した (図 3.3.d)。ZnSO₄添加後 72 時間後に至るまで、G1 期の割合は、連続的に増加し、S 期の割合は、徐々に減少した。一方、G2/M 期は、ZnSO₄添加後若干の増加を示したが、G1 期、S 期の変化に比べ非常に小さい変化であった。図 3.3.b、図 3.3.d の結果より、増殖中のマウス繊維芽細胞において p19^{ARF}は、

ATGGGTGCGCA	GGTTCCTTGGT	CACTGTGAGG	ATTTCAGCGGG	CGGGCCGCCC	50
ACTTCCAAGAG	AGGGTTTCT	TGGTGAAGTT	CGTGGGATCC	CGGAGACCCA	100
GGAACAGCGAG	CTGGGCTCTG	GCTTTGTGTA	ACATGTTGTT	GAGGCTAGAG	150
AGGATCTTGA	GAAGAGGGCC	GCAACCGAAT	CCTGGACACAG	GTGATGATGA	200
TGGGCAACGT	TCACGTAGCA	GCTCTTCTGC	TCAACTACGG	TGCAGATTGG	250
AACTGCGAGG	ACCCCACTAC	CTTCTCCCGC	CCGGTGCAAG	ACGCAGCGCG	300
GGAAGGCTTC	CTGGACACGC	TGGTGGTGCT	GCACGGGTCA	GGGGCTCGGC	350
TGGATGTGGG	CGATGCGTGG	GGTGGCTTGC	CGCTCGACTT	GGCCCAAGAG	400
CGGGGACATC	AAGACATCGT	GCGATATTTC	CGTTCCGCTG	GGTGCTCTTT	450
GTGTTCGGCT	GGGTGGTCTT	TGTGTACCGC	TGGGAACGTC	GCCCAGACCG	500
ACGGGCATAG	CTTCAGCTCA	AGCAC			525

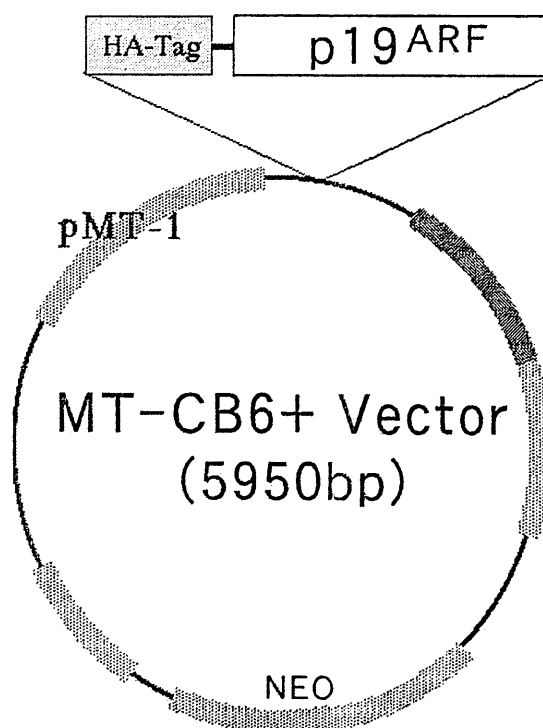


図 3.2 p19^{ARF} のコーディング領域の cDNA 配列と発現ベクターの構造

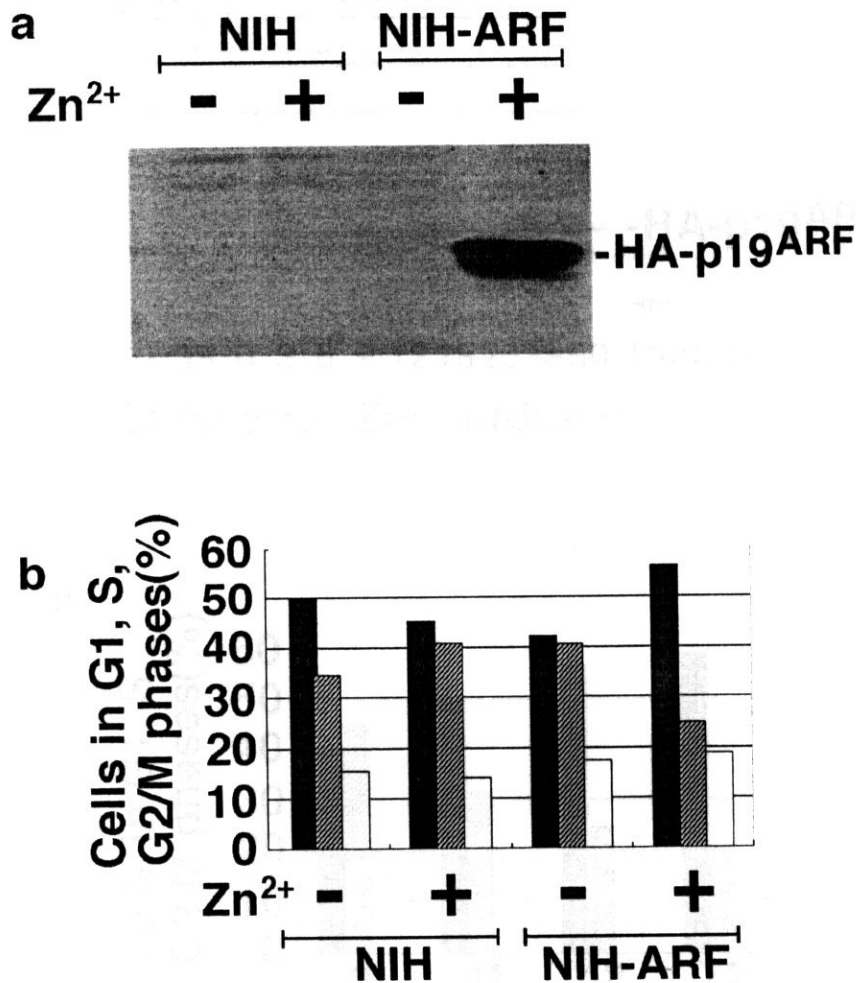


図 3.3.a HA-p19^{ARF} の発現誘導

培地に重金属 (ZnSO₄) を添加し、48 時間培養した NIH3T3、NIH-ARF 細胞の HA-p19^{ARF} 発現を解析した。NIH-ARF 細胞でのみ特異的に HA-p19^{ARF} の発現がみられる。

図 3.3.b p19^{ARF} を発現誘導した細胞は、G1 期で停止する。

培地に重金属 (ZnSO₄) を添加 (非添加) した条件で 48 時間培養した NIH3T3、NIH-ARF 細胞の細胞周期の各時期の割合をフローサイトメトリーで解析した。細胞を G1 期で主に停止させることが明らかになった。

■ は、G1期の細胞の割合 ▨ は、S期の細胞の割合 □ は、G2/M期の細胞の割合。

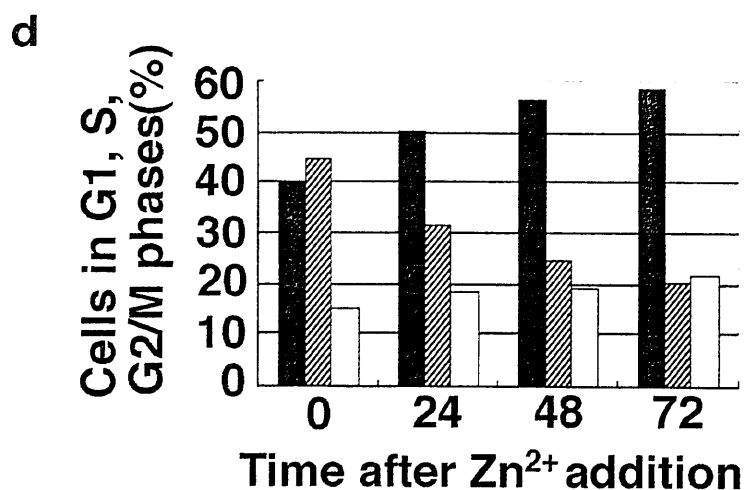
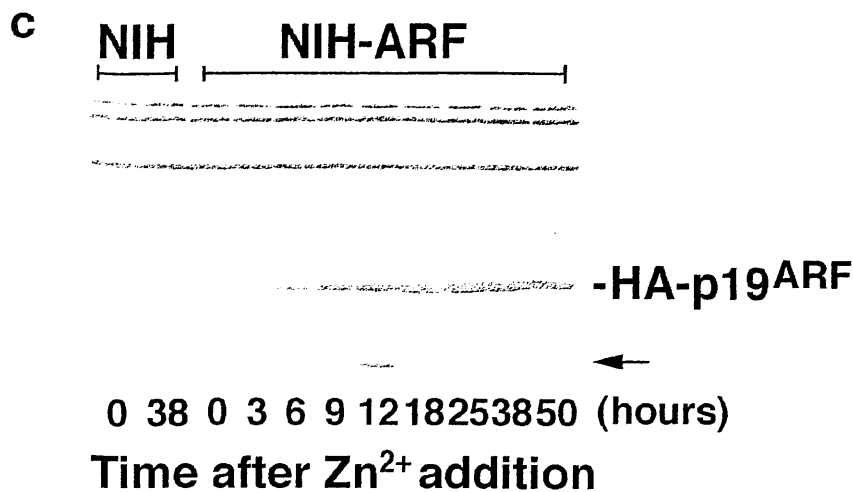


図 3.3.c p19^{ARF} 発現の経時変化

培地に重金属 (ZnSO₄) を添加後 50 時間まで培養した NIH-ARF 細胞と NIH3T3 細胞 (NIH3T3 細胞は、0 時間と 38 時間のみ) の HA-p19^{ARF} 発現を経時的に解析した。HA-p19^{ARF} の発現は 6 時間よりみられ 25 時間で最大に達しその後、一定になる。
←は、抗 HA 抗体に抗体に特異的に反応する蛋白質である。

図 3.3.d NIH-ARF 細胞の細胞周期の各時期の割合の経時変化

培地に重金属 (ZnSO₄) を添加して培養した NIH-ARF 細胞の細胞周期の各時期の割合を 0 時間から 72 時間まで 24 時間おきにフローサイトメトリーで解析した。

■ は、G1期の細胞の割合 ▨ は、S期の細胞の割合 □ は、G2/M期の細胞の割合。

図 3.3.c で培地に ZnSO_4 を添加した後 25 時間まで HA-p19^{ARF} より移動度の大きい (分子量の小さい) バンドが確認された (図 3.3.c 矢印)。細胞が G1 期で停止するに伴い、この蛋白質の発現はみられなくなる。この蛋白質は、HA タグを持つことから HA-p19^{ARF} が特異的な部位で切断された分解産物であると考えられる。そこで、培地に ZnSO_4 を添加 24 時間後と 48 時間後における HA-p19^{ARF} の安定性をパルスチエイス法により解析した。その結果、p19^{ARF} の安定性に大きな違いはみられなかった (data not shown)。

3.3.2 p19^{ARF} は、G1 サイクリン依存キナーゼの活性を抑制する

p19^{ARF} の発現誘導によりマウス繊維芽細胞は主に G1 期で停止する。そこで、次に G1 期から S 期への細胞周期の進行を調節する因子への p19^{ARF} の影響に注目した。細胞が G1 期より S 期へ進行するには、G1 サイクリン/Cdk 複合体 (サイクリン D/Cdk4.6、サイクリン A.E/Cdk2) の活性化が必要である (Sherr 1996)。そこで、p19^{ARF} の G1 サイクリン/Cdk 複合体の活性への影響を解析した (図 3.4.a、b)。NIH3T3 細胞、NIH-ARF 細胞を ZnSO_4 存在下、非存在下で 48 時間培養後、それらの細胞の等量の細胞抽出液より Cdk4、Cdk2 複合体を免疫沈降し、GST-Rb、HistonH1 を基質にそのキナーゼ活性を解析した。その結果、 ZnSO_4 非存在下で培養した NIH3T3 細胞、NIH-ARF 細胞の Cdk4、Cdk2 活性には差がみられないが、 ZnSO_4 存在下の NIH-ARF 細胞では、それらの活性が著しく抑制されていた。この結果から、p19^{ARF} 発現誘導による G1 期停止は、G1 サイクリン/Cdk 複合体の活性抑制によるものであることが判明した。

さらに詳細に p19^{ARF} による G1 期停止と G1 サイクリン/Cdk 複合体の活性抑制機構を調べるため、種々の G1 期進行、G1 期/S 期移行で働く因子の発現量を解析した (図 3.5)。増殖中の細胞では、Rb 蛋白質は、高リン酸化状態で存在し、一方、増殖を停止した細胞では低リン酸化状態で存在する。このリン酸化状態の差は、SDS PAGE での Rb 蛋白質の移動度の差で判定でき、低リン酸化型 Rb 蛋白質は、高リン酸化型 Rb 蛋白質よりその移動度が大きい。p19^{ARF} 発現誘導細胞では、Rb 蛋白質は、移動度の大きい低リン酸化状態であり、図 3.4.a、図 3.4.b と同様に Rb 蛋白質をリン酸化する G1 サイクリン/Cdk 複合体の活性が抑制されていることを示した。Cdk2 の発現量は、p19^{ARF} 発現によって変化しないが、その活性調節サブユニットであるサイクリン A の発現量は、著しく減少していた。また、Cdk2 のもう 1 つの活性調節サブユニットであるサイクリン E も同様に発現量が減少していた (data not shown)。したがって、p19^{ARF} による Cdk2 の活性抑制は、p19^{ARF} が Cdk2 の活性調節サブユニットの発現量を減少させるためであることが示された。一方、G1 期で働くもう 1 つの Cdk である Cdk4 の発現量は、p19^{ARF} 発現によって変化せず、繊維芽細胞におけるその活性調節サブユニットであるサイクリン D1 (Quelle et al., 1993; Sherr, 1996; Matsushime et al., 1994) の発現量は、むしろ若干増加していた。

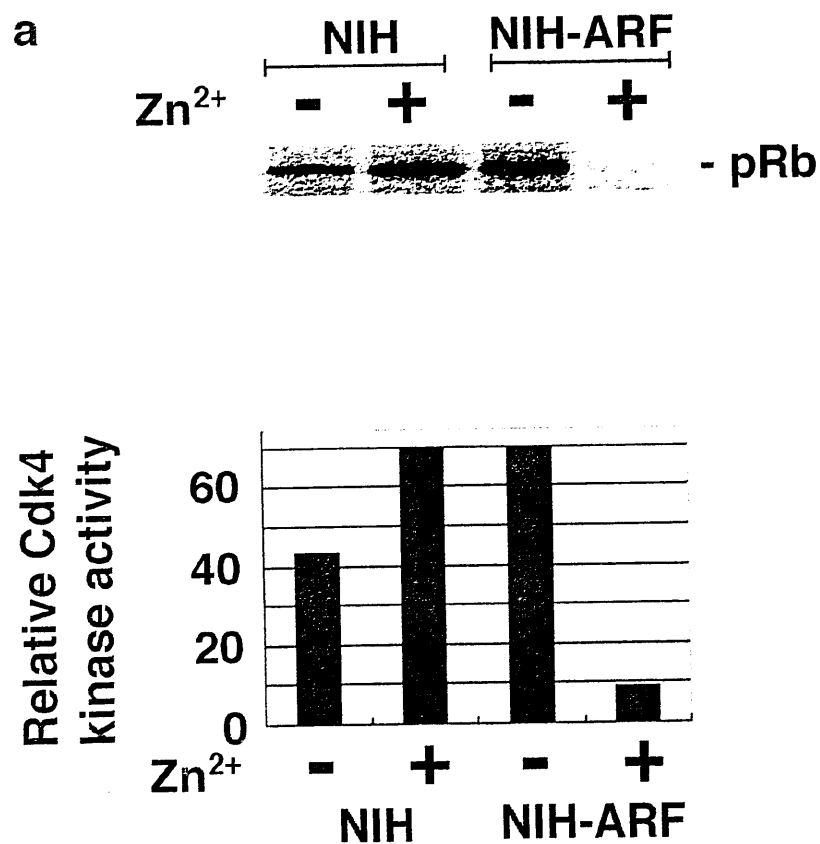


図 3.4.a p19^{ARF} は、サイクリン D1/Cdk4 のキナーゼ活性を抑制する。

培地に重金属 (ZnSO₄) を添加 (非添加) した条件で 48 時間培養した NIH3T3、NIH-ARF 細胞のサイクリン D1/Cdk4 複合体キナーゼ活性を GST-pRb を基質に測定した。p19^{ARF} 発現細胞では、著しく活性が低下している。

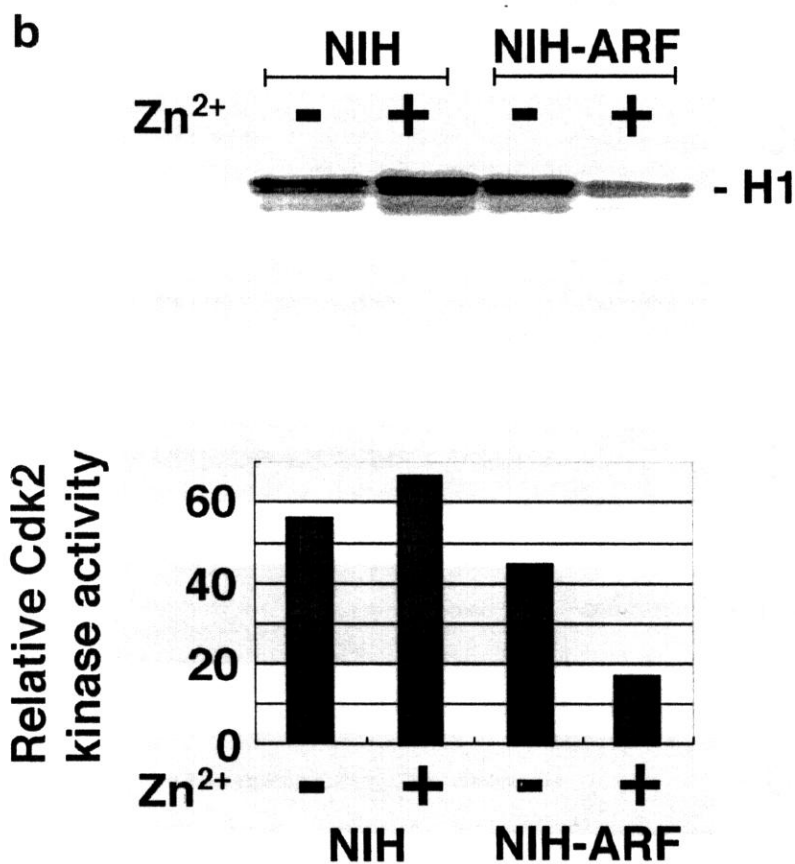


図 3.4.b p19^{ARF} は、Cdk2 のキナーゼ活性を抑制する。

培地に重金属 (ZnSO₄) を添加 (非添加) した条件で 48 時間培養した NIH3T3、NIH-ARF 細胞の Cdk2 キナーゼ活性をヒストン H1 を基質に測定した。HA-p19^{ARF} 発現細胞では、著しく活性が低下している。

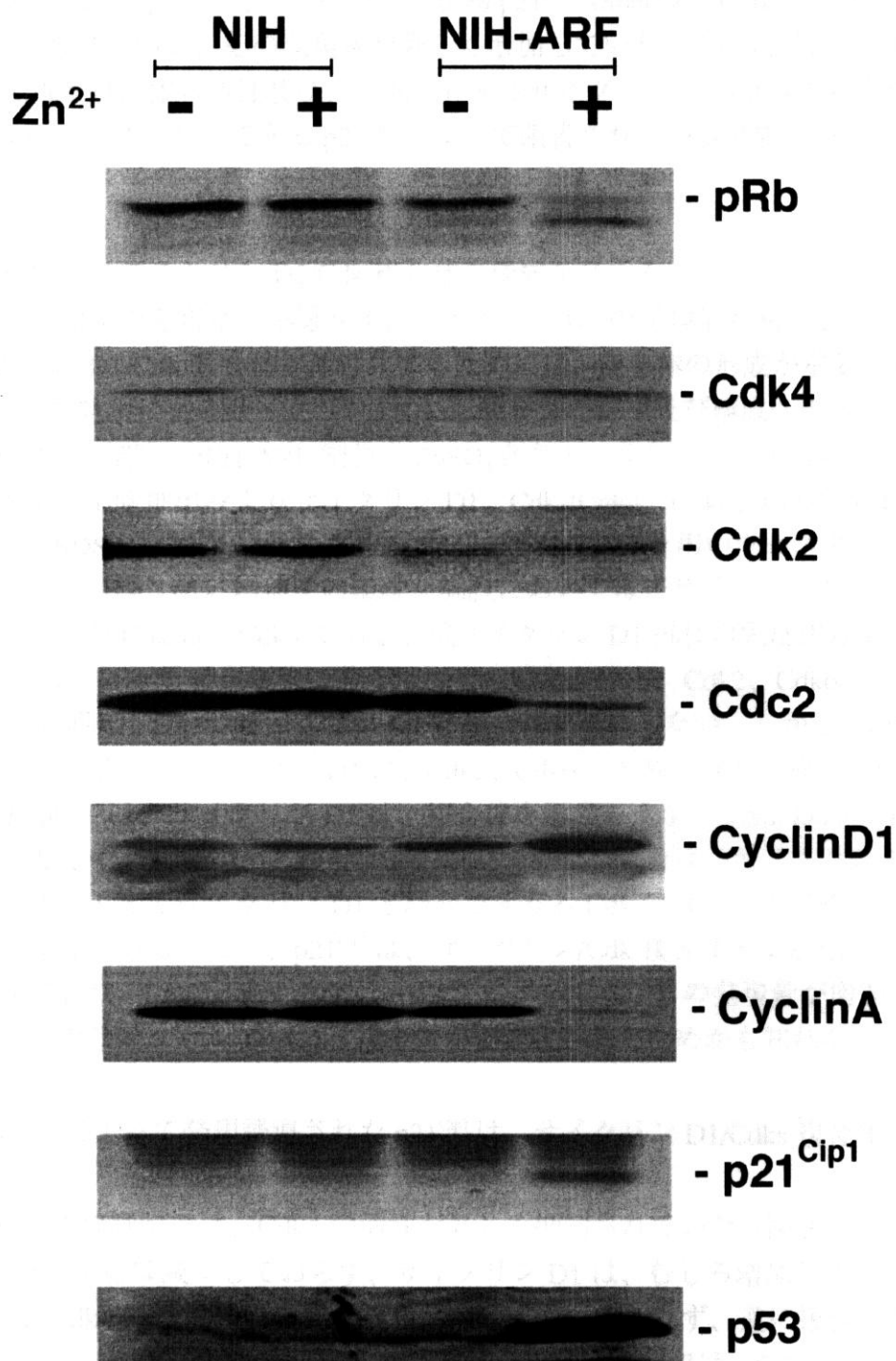


図 3.5 G1 期進行、G1/S 期移行で働く種々の蛋白質の発現量への p19^{ARF} の影響

培地に重金属 (ZnSO₄) を添加 (非添加) した条件で 48 時間培養した NIH3T3、NIH-ARF 細胞の種々の G1 期進行、G1/S 期移行で働く蛋白質の発現量を解析した。

癌抑制蛋白質である p53 とその標的遺伝子産物 p21^{Cip1} (Sherr and Roberts,1995) は、p19^{ARF} 発現細胞において、その発現量が著しく増加していた。この結果より、サイクリン D1/Cdk4 複合体の活性及び、一部存在するサイクリン A、E/Cdk2 複合体の活性は、Cdk インヒビターである p21^{Cip1} によって阻害されている可能性が考えられる。

3.3.3 p19^{ARF} は、サイクリン D1/Cdk 複合体の構成を替える

p19^{ARF} は、Cdk4 の発現量に影響せず、サイクリン D1 の発現量も減少させなかった。サイクリン D1/Cdk 複合体が活性化するためには、複合体の形成が重要である。そこで、p19^{ARF} 発現によるサイクリン D1/Cdk 複合体の形成及び構成への影響を解析した。NIH3T3 細胞、NIH-ARF 細胞を ZnSO₄ 存在下、非存在下で 48 時間培養後、それらの等量の細胞抽出液よりサイクリン D1、Cdks(Cdk4、Cdk6、Cdk2、Cdc2)を免疫沈降し、SDS PAGE 後、それぞれの Cdk に対する抗体を用いウエスタンブロットを行なった (図 3.6)。増殖中の繊維芽細胞においては、サイクリン D1 と複合体を形成する主な Cdk は、Cdk4 である。抗サイクリン D1 抗体の免疫沈降産物中の Cdk4 の量は、p19^{ARF} 発現細胞で若干増加していた。一方、Cdk2、Cdk6 は、増殖中の繊維芽細胞においてサイクリン D1 と複合体を形成しない。しかし、p19^{ARF} 発現細胞においては、サイクリン D1 は、Cdk2、Cdk6 とも複合体を形成していた。p19^{ARF} 発現細胞では、サイクリン D1 は、複合体を形成しえない Cdc2 以外のすべての Cdk(Cdk4、Cdk2、Cdk6)と複合体を形成していた。これは、サイクリン D1 の発現量の増加によってサイクリン D1 と結合できうる Cdk のほとんどが結合した結果である可能性がある。また、p21^{Cip1} は、サイクリン/Cdk 複合体を安定化することが報告されており (Labaer et al.,1997)、p19^{ARF} によって p21^{Cip1} の発現量が増加した結果、すべてのサイクリン D1/Cdks 複合体が安定化されたためかも知れない。

3.3.4 p19^{ARF} によって発現誘導された p21^{Cip1} は、サイクリン D1/Cdks 複合体に結合する

p19^{ARF} 発現誘導細胞では、Cdk4 の活性が著しく抑制されていた (図 3.4.a)。しかし、Cdk4 の発現量は減少しておらず、サイクリン D1 は、むしろ増加していた (図 3.5)。また、Cdk4 の活性化に必要な複合体の形成も阻害されず、逆に複合体形成は促進されていた (図 3.6)。しかし、p19^{ARF} 発現誘導細胞では、Cdk インヒビターである p21^{Cip1} の発現量増加がみられたことから (図 3.5)、p19^{ARF} による Cdk4 の活性抑制は、p19^{ARF} によって発現が誘導された p21^{Cip1} がサイクリン D1/Cdk4 複合体へ結合することによってその活性を抑制したためである可能性が考えられた。そこで、p19^{ARF} 発現誘導細胞より細胞抽出液を得、種々のサイクリン、Cdk に対する抗体で免疫沈降し、その免疫沈降産物中の p21^{Cip1} 量を抗 p21^{Cip1} 抗体を用いたウエスタンブロットによって解析した。その結果、抗サイクリン D1 抗体の免疫沈降産物は、

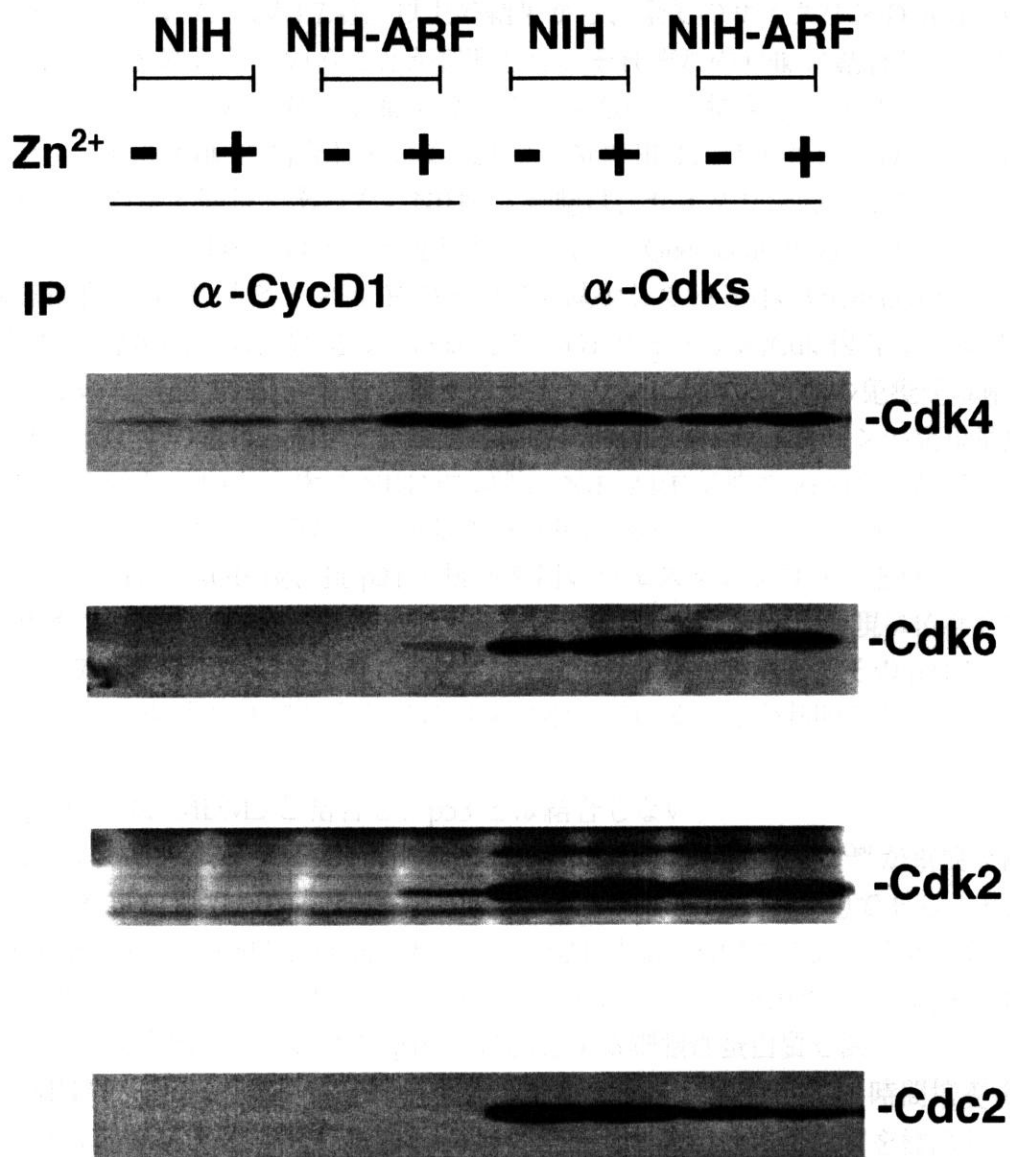


図 3.6 p19^{ARF} は、サイクリン D1 と Cdk の複合体を形成を促進する。

培地に重金属 (ZnSO₄) を添加 (非添加) した条件で 48 時間培養した NIH3T3、NIH-ARF 細胞のサイクリン D1 と種々の Cdk との複合体形成を免疫沈降によって解析した。p19^{ARF} 発現細胞では、サイクリン D1 と Cdk4、Cdk6、Cdk2 との複合体形が促進されている。

非常に多くの $p21^{Cip1}$ と結合していた。また、抗 Cdk2、4、6 抗体の免疫沈降産物も $p21^{Cip1}$ と結合していた (図 3.7.a)。以上の結果から、全てのサイクリン D1/Cdk 複合体は、 $p21^{Cip1}$ と結合していることが判明した。それぞれの Cdk に結合している $p21^{Cip1}$ の量の比は、それぞれの Cdk のサイクリン D1 との結合比とほぼ一致していた。また、これら Cdk に結合している $p21^{Cip1}$ の量の和は、サイクリン D1 に結合している $p21^{Cip1}$ の量と同量であった。NIH3T3 細胞は、サイクリン D1、D2 を発現しているがサイクリン D3 はほとんど発現していない (Quell et al.,1993)。また、 $p19^{ARF}$ 発現誘導細胞では、サイクリン A、E の発現量も減少している (図 3.5, data not shown)。 $p19^{ARF}$ 発現誘導細胞では、発現している全ての G1 サイクリン/Cdk 複合体に $p21^{Cip1}$ が結合していた (図 3.7.b)。さらに種々のサイクリンに対する抗体の免疫沈降産物に含まれる $p21^{Cip1}$ の量は、 $p19^{ARF}$ 発現誘導細胞における G1 サイクリンの発現量比とほとんど一致していた。次に NIH3T3 細胞、NIH-ARF 細胞を $ZnSO_4$ 存在下、非存在下で 48 時間培養後、それらの等量の細胞抽出液よりサイクリン D1、Cdc2 を免疫沈降し、SDS PAGE 後、抗 $p21^{Cip1}$ 抗体を用いウェスタンブロットを行なったところ、サイクリン D1 複合体への $p21^{Cip1}$ の結合量の増加は、 $p19^{ARF}$ 発現に依存していた (図 3.7.c)。以上の結果より、 $p19^{ARF}$ は、 $p21^{Cip1}$ を発現誘導し、その $p21^{Cip1}$ がサイクリン D/Cdk 複合体に結合して活性を抑制していることが判明した。

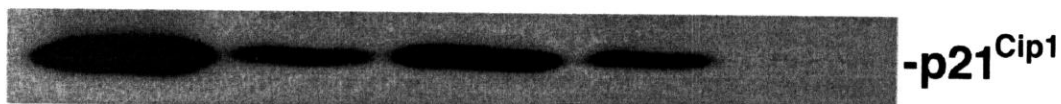
3.3.5 $p19^{ARF}$ は、MDM2 と結合し、p53 とは結合しない

これまでに、 $p19^{ARF}$ による G1 期停止では、Cdk インヒビター $p21^{Cip1}$ が重要な働きをしている事が判明した。また、 $p21^{Cip1}$ は、p53 の標的遺伝子産物であることから (Sherr and Roberts,1995;Levine,1997)、この $p21^{Cip1}$ は、 $p19^{ARF}$ によって発現量が増加した p53 によって発現誘導されたと考えられる。そこで、 $p19^{ARF}$ による p53 の発現量の増加機構を解析するために $p19^{ARF}$ に結合する細胞性蛋白質を調べた (図 3.8.a)。NIH3T3 細胞、NIH-ARF 細胞を $ZnSO_4$ 存在下、非存在下で 48 時間培養後、さらに培地に ^{35}S メチオニンを添加し 24 時間培養して細胞内の蛋白質を標識した。これらの細胞の等量の細胞抽出液より抗 HA 抗体を用いて HA- $p19^{ARF}$ を免疫沈降し、SDS PAGE によって免疫沈降産物を分離した。その結果、 $p19^{ARF}$ は、いくつかの細胞性蛋白質と結合していた。

これら $p19^{ARF}$ 結合蛋白質の移動度は、それぞれ 120、90 (ダブレット)、65、60、56、54、35kDa であった。このなかで 54kDa の移動度は、p53 の移動度と近似しており、また、90kDa の移動度は、p53 の分解に働く MDM2 (Honda et al.,1998) の移動度と近似している。そこで、 ^{35}S メチオニンで 15 分間細胞内の蛋白質を標識した NIH3T3 細胞、 $p19^{ARF}$ を発現した NIH-ARF 細胞の細胞抽出液を用い HA- $p19^{ARF}$ 、p53、MDM2 を免疫沈降し、その免疫沈降産物を SDS PAGE により分離した (図 3.8.b)。54kDa の $p19^{ARF}$ 結合蛋白質の移動度は、p53 の移動度より小さかったが、90kDa の $p19^{ARF}$ 結合蛋白質の移動度は、MDM2 の移動度とほぼ一致した。また、抗 MDM2

a

IP α -D1 α -Cdk2 α -Cdk4 α -Cdk6 α -Cdc2



b

IP α -D1 α -D2 α -D3 α -E α -A α -B1



図 3.7.a p19^{ARF} 発現細胞では、p21^{Cip1} がサイクリン D1/Cdks 複合体に結合している。

培地に重金属 (ZnSO₄) を添加して 48 時間培養した NIH-ARF 細胞のサイクリン D1 と種々の Cdk と p21^{Cip1} との結合を免疫沈降法によって解析した。p19^{ARF} 発現細胞では、サイクリン D1、Cdk2、Cdk4、Cdk6 と p21^{Cip1} が結合している。各 Cdk に結合している p21^{Cip1} の量比は、それぞれの Cdk のサイクリン D1 への結合比とほぼ一致していた。

図 3.7.b p19^{ARF} 発現細胞では、p21^{Cip1} が各サイクリンと結合している。

培地に重金属 (ZnSO₄) を添加して 48 時間培養した NIH-ARF 細胞の種々のサイクリンと p21^{Cip1} との結合を免疫沈降法によって解析した。p19^{ARF} 発現細胞では、サイクリン D2、D3、E と p21^{Cip1} の結合がみられる。

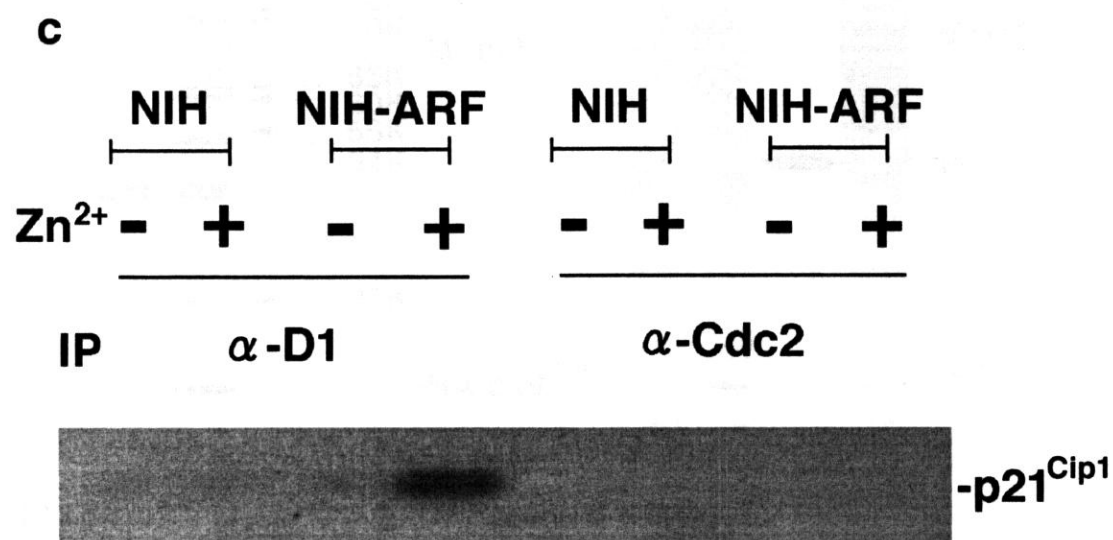


図 3.7.c $p19^{ARF}$ は、 $p21^{Cip1}$ のサイクリン D1/Cdks 複合体への結合を促進する。

培地に重金属 ($ZnSO_4$) を添加 (非添加) の条件で 48 時間培養した NIH3T3、NIH-ARF 細胞のサイクリン D1/Cdks 複合体と結合しているの量を免疫沈降法によって解析した。 $p19^{ARF}$ は、 $p21^{Cip1}$ のサイクリン D1/Cdks 複合体への結合量を増加させる。

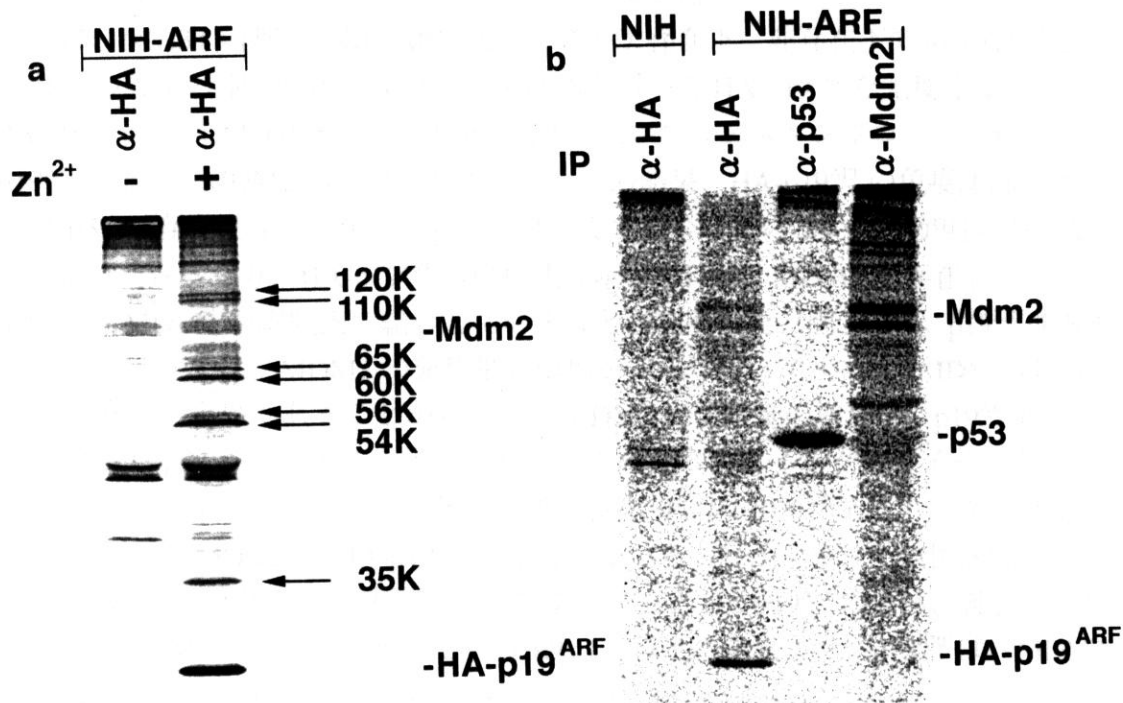


図 3.8.a p19^{ARF} は、いくつかの細胞性蛋白質と結合する。

培地に重金属 ($ZnSO_4$) を添加 (非添加) した条件で NIH-ARF 細胞を 48 時間培養した後、³⁵S メチオニン存在下で 24 時間培養して細胞内の蛋白質を標識し、免疫沈降法により p19^{ARF} に結合する細胞性蛋白質を解析した。p19^{ARF} は、120、90 (ダブルット)、65、60、56、54、35kDa の移動度の蛋白質と結合する。

図 3.8.b p19^{ARF} に結合する 54kDa の移動度の蛋白質及び 90kDa の移動度の蛋白質と p53、MDM2 の移動度の比較

培地に重金属 ($ZnSO_4$) を添加 (非添加) した条件で NIH-ARF 細胞を 48 時間培養した後、³⁵S メチオニン存在下で 15 分間培養して細胞内の蛋白質を標識し、免疫沈降法により p19^{ARF} に結合する 54kDa の移動度の蛋白質及び 90kDa の移動度の蛋白質と p53、MDM2 の移動度の比較をした。90kDa の移動度の蛋白質の移動度は、MDM2 の移動度と同じであるが、54kDa の移動度の蛋白質の移動度は、p53 のそれと異なる。

抗体の免疫沈降産物中には、54kDa の p19^{ARF} 結合蛋白質の移動度とほぼ同様の移動度を持つ蛋白質が存在した (図 3.8.b)。図 3.8.b では、抗 MDM2 抗体の免疫沈降産物中には、HA-p19^{ARF} のバンドの強度が弱い、これは、15 分間の標識では、十分量の HA-p19^{ARF} を標識できないためであり、また、MDM2 と結合している HA-p19^{ARF} の量が少ないためであると考えられる (以下参照)。

次に、NIH3T3 細胞、NIH-ARF 細胞を ZnSO₄ 存在下、非存在下で 48 時間培養後、それらの等量の細胞抽出液より抗 HA 抗体を用いて HA-p19^{ARF} を免疫沈降し、SDS PAGE の後、抗 MDM2 抗体、抗 p53 抗体を用いてウェスタンブロットを行なって p19^{ARF} と p53、MDM2 の結合を解析した。その結果、HA-p19^{ARF} の免疫沈降産物中には p53 は存在せず、p19^{ARF} と p53 はほとんど結合していないことが明らかになった (図 3.9.a)。一方、HA-p19^{ARF} の免疫沈降産物中には、MDM2 が存在しており、p19^{ARF} と MDM2 が細胞内で結合していることが判明した (図 3.9.b)。p19^{ARF} を発現している細胞では、MDM2 の発現量の増加がみられた (図 3.9.b)。MDM2 は、p53 の標的遺伝子産物であることから、この MDM2 の発現量の増加は、p19^{ARF} により活性化した p53 によるものと考えられる。このとき、ダイレクトライゼイトで用いた細胞抽出液量は、免疫沈降に用いた細胞抽出液量の 20% であることから細胞内のほとんどの MDM2 が HA-p19^{ARF} と結合していることが示された (図 3.9.b)。反対に抗 MDM2 抗体の免疫沈降産物に含まれている HA-p19^{ARF} の量は、細胞内に存在する HA-p19^{ARF} の一部であった (図 3.9.c)。以上の結果より、p19^{ARF} は、MDM2 を含むいくつかの細胞性蛋白質と結合しているが p53 とは、ほとんど結合しないことが明らかになった。また、細胞内の MDM2 は、ほぼすべて分子が p19^{ARF} に結合している判明した。則ち、p19^{ARF} の発現細胞では、p53 と結合できうる MDM2 の量は、著しく減少する。p19^{ARF} は、MDM2 の p53 への結合を阻害する機構により、p53 の活性化を引き起こしていると結論できる。

3.3.6 p19^{ARF} は、p53 の安定性を増加させる

MDM2 は、p53 に結合し p53 を分解することにより、p53 の活性を抑制する (Momand et al.,1992;Haupt et al.,1997;Kubbutat et al.,1997;Honda et al.,1997)。図 3.9.b の結果から、細胞内のほとんどの MDM2 は、p19^{ARF} に結合しており、p19^{ARF}、p53、MDM2 の 3 量体がほとんど存在しない。そこで、p19^{ARF} 発現細胞における p53 の安定性を解析し、あわせて MDM2 の安定性の解析もおこなった。NIH3T3 細胞、NIH-ARF 細胞を ZnSO₄ 存在下で 48 時間培養後、³⁵S メチオニンで 15 分間細胞内の蛋白質を標識した。その後 ³⁵S メチオニンを除去し過剰な標識されていないメチオニン存在下で培養し、標識蛋白質の存在量を測定した。等量の細胞抽出液より標識した p53、MDM2 を抗 p53 抗体、抗 MDM2 抗体で免疫沈降し、SDS PAGE により分離し、p53、MDM2 の ³⁵S 活性の強度を測定した。増殖中の NIH3T3 細胞内の p53 は、すみやかに分解され、その半減期は、約 20 分であった。一方、p19^{ARF} を発現

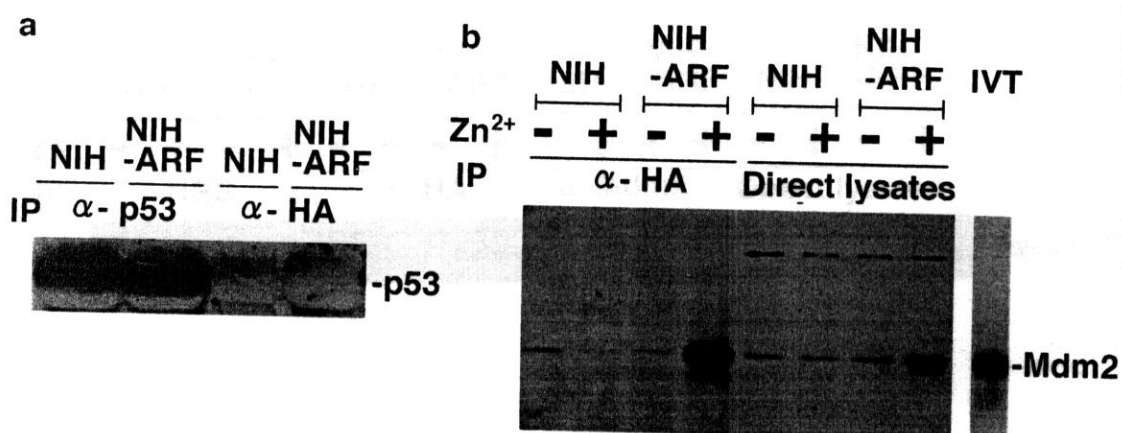


図 3.9.a p19^{ARF} は、p53 と結合しない。

NIH-ARF 細胞を培地に重金属 (ZnSO₄) を添加した条件で 48 時間培養した後、免疫沈降法により p19^{ARF} と p53 との結合を解析した。p19^{ARF} は、p53 と複合体を形成しない。

図 3.9.b p19^{ARF} は、MDM2 と結合する。

NIH-ARF 細胞を培地に重金属 (ZnSO₄) を添加した条件で 48 時間培養した後、免疫沈降法により p19^{ARF} と MDM2 との結合を解析した。p19^{ARF} は、MDM2 と複合体を形成している。p19^{ARF} 発現細胞では、MDM2 の発現量が増加している。また、細胞内のほぼ全 MDM2 が p19^{ARF} と結合している。

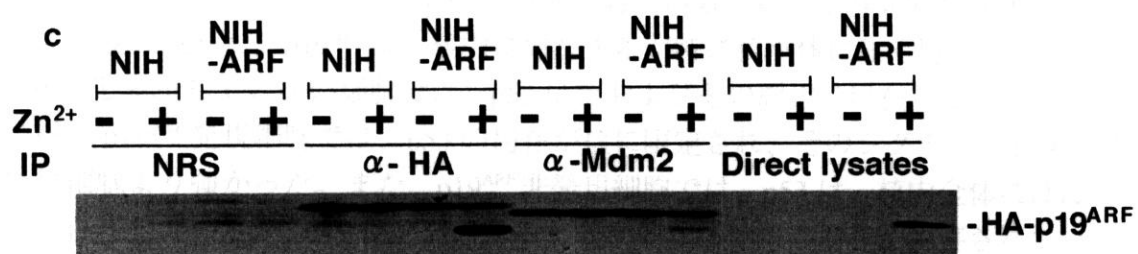


図 3.9.c 細胞内の MDM2 のほとんどが p19^{ARF} と結合しているが、その p19^{ARF} は、細胞内の p19^{ARF} の一部に過ぎない。

NIH-ARF 細胞を培地に重金属 (ZnSO₄) を添加した条件で 48 時間培養した後、免疫沈降法により MDM2 に結合している p19^{ARF} の量を測定した。細胞内の全 p19^{ARF} のなかで MDM2 に結合している量は一部である。

誘導した細胞では、p53 は著しく安定化され、その半減期は 90 分以上であった (図 3.10)。MDM2 は、増殖中の NIH3T3 細胞と比較して p19^{ARF} を発現誘導した細胞では、若干不安定であったが (図 3.11)、その発現量自体は、増加していた (図 3.9.b)。図 3.9.b、図 3.11 の結果から、p19^{ARF} は、細胞内の MDM2 と結合し p53 へ結合しうる MDM2 を減少させ、p53 の安定化させてその発現量を増加させる機能を持つと結論づけられる。

3.3.7 p19^{ARF} は、p53 を核内に留める

MDM2 は、p53 を核内から細胞質に核外輸送することによって p53 の機能を阻害することが報告されている。そこで、p19^{ARF}、p53、MDM2 の細胞内局在を免疫染色法によって解析した (図 3.12)。NIH-ARF 細胞を ZnSO₄ 存在下、非存在下で 48 時間培養後、固定し、p19^{ARF}、p53、MDM2 各蛋白質に対する特異的な抗体をもちいて免疫染色した。p19^{ARF} は、核内に局在するが特に核小体に強く局在していた。p19^{ARF} を発現していない細胞では、p53 は核およびその周辺に局在していた。それに対し p19^{ARF} 発現細胞では、p53 の局在が核に限定され、そのシグナルも p19^{ARF} 非発現細胞より強かった。また、p19^{ARF} 非発現細胞では、p53 は、核内全体にほぼ均一に存在しているが、p19^{ARF} を発現すると p53 の核小体への局在が阻害されていた。

一方、MDM2 は、p19^{ARF} の発現誘導によってそのシグナルが若干強くなったが、その局在自体は、あまり変化しなかった。

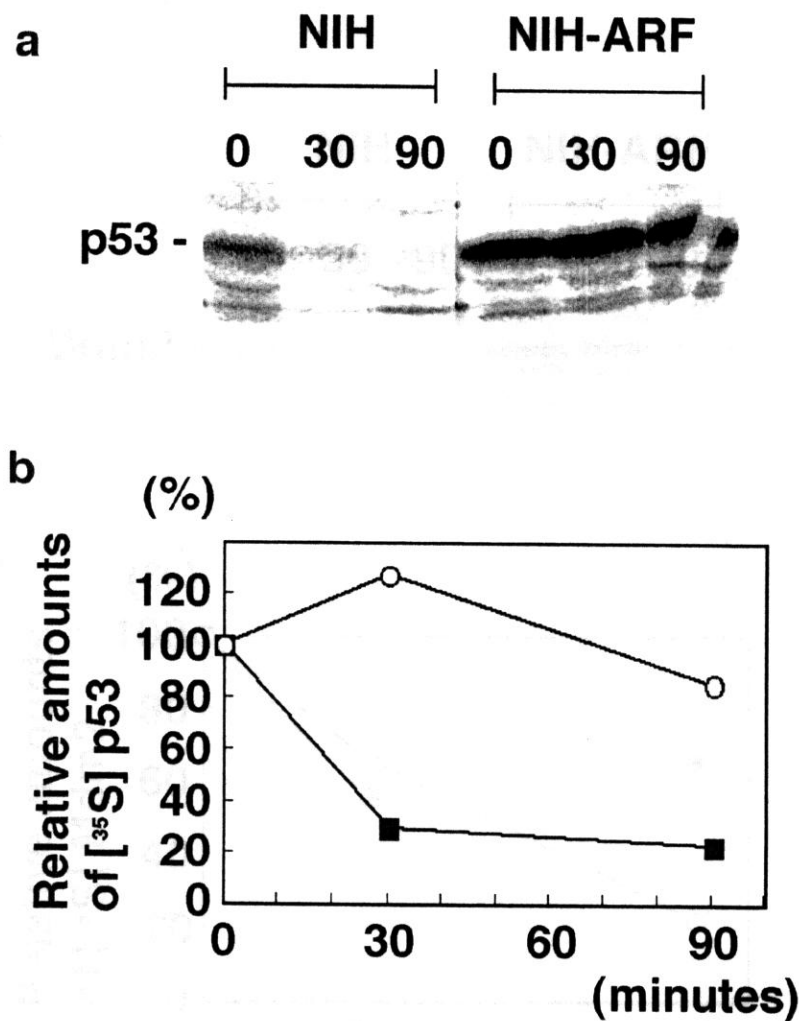


図 3.10 p19^{ARF} は、p53 を安定化する。

a b 培地に重金属 (ZnSO_4) を添加した条件で NIH3T3、NIH-ARF 細胞を 48 時間培養した後、 ^{35}S メチオニン存在下で 15 分間培養して細胞内の蛋白質を標識した。 ^{35}S メチオニンを除去し過剰な標識されていないメチオニン存在下で培養した後、p53 を免疫沈降し、p53 の半減期を測定した。p19^{ARF} を発現した細胞では、p53 が著しく安定化されている。

■ は、NIH3T3細胞
○ は、NIH-ARF細胞

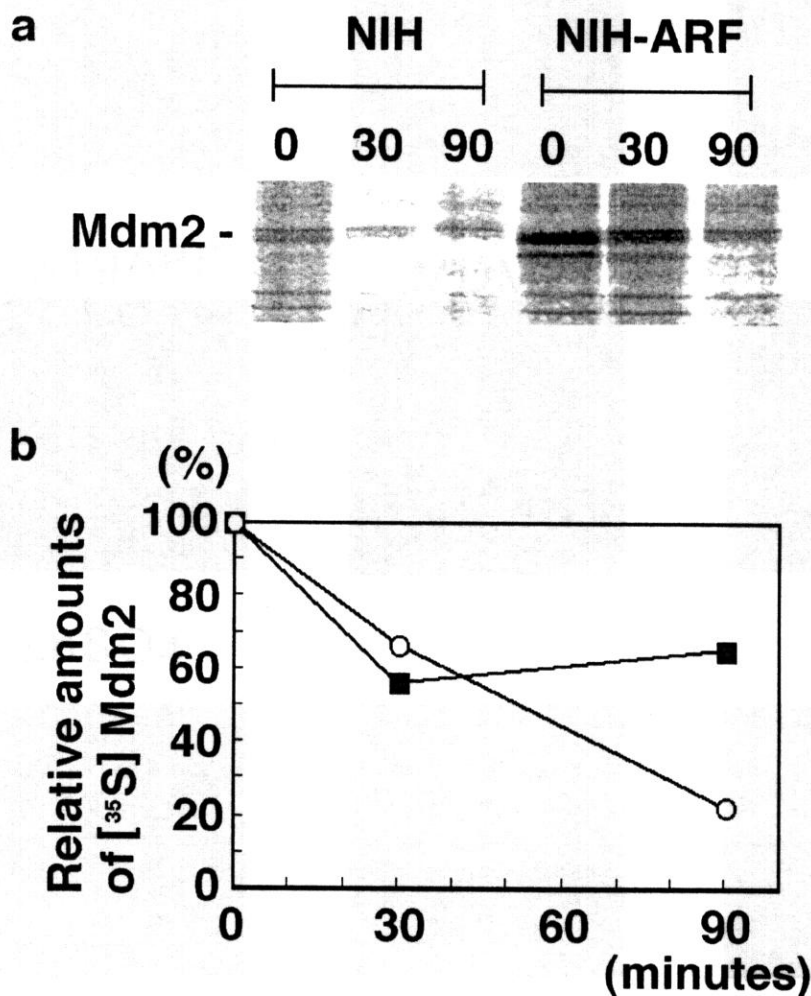
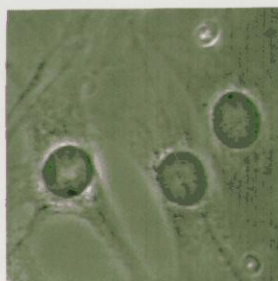


図 3.11 p19^{ARF} は、MDM2 を一部不安定する。

a b 培地に重金属 (ZnSO₄) を添加した条件で NIH3T3、NIH-ARF 細胞を 48 時間培養した後、³⁵S メチオニン存在下で 15 分間培養して細胞内の蛋白質を標識した。³⁵S メチオニンを除去し過剰な標識されていないメチオニン存在下で培養した後、MDM2 を免疫沈降し、MDM2 の半減期を測定した。p19^{ARF} を発現した細胞では、MDM2 が若干不安定である。

■ は、NIH3T3細胞
○ は、NIH-ARF細胞

-ZnSO₄



p19^{ARF}



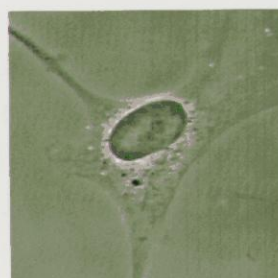
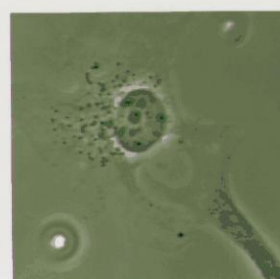
MDM2



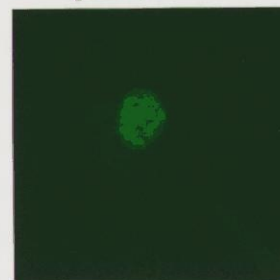
p53



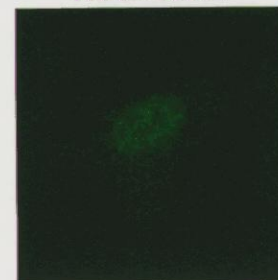
+ZnSO₄



p19^{ARF}



MDM2



p53

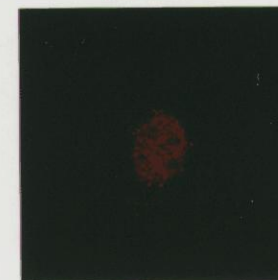


図3.12 p19^{ARF}、MDM2、p53の細胞内局在の解析

培地に重金属 (ZnSO₄) を添加した条件でNIH3T3、NIH-ARF細胞を48時間培養した後、p19^{ARF}、MDM2、p53の細胞内局在を蛍光抗体法で解析した。

Ink4a 遺伝子座は、 $p16^{Ink4a}$ と $p19^{ARF}$ の全く異なる二つの蛋白質をコードしていることが明らかになった。 Cdk インヒビター $p16^{Ink4a}$ は、直接 D タイプサイクリン依存性キナーゼ ($Cdk4$, $Cdk6$) と結合し、その活性を抑制する。 $p16^{Ink4a}$ は、細胞を G1 期のみで停止させる。一方、 $p19^{ARF}$ は、 $p53$ の上流で機能して細胞を G1 期、G2/M 期の両方で停止させることが示唆された。そこで、私は培地に重金属イオンを加えることによって $p19^{ARF}$ の発現を制御できる細胞の構築を行い、 $p19^{ARF}$ による細胞周期進行阻害の機構の解明を目指した。この細胞株を用いた実験では、重金属イオンの細胞への毒性がない環境で $p19^{ARF}$ を発現させることが可能であることから、 $p19^{ARF}$ の細胞周期進行への影響および細胞内の細胞周期制御因子への影響を調べる上で非常に有効なシステムである。

$p19^{ARF}$ は、細胞周期の G1 期、G2/M 期両方で細胞を停止させることができると考えられている。しかし、本研究では、マウスの線維芽細胞では、 $p19^{ARF}$ は、細胞を主に G1 期で停止させた。これは、普通に増殖中の細胞を用いた場合、 $p19^{ARF}$ が発現した際に G1 期の細胞のほうが G2/M 期の細胞より多く存在しているために主に G1 期停止するのかもしれない。又は、 $p19^{ARF}$ が細胞を G2/M 期で停止させるには、G1 期停止させる時よりもより多く発現していなくてはならないのかもしれない。Quelle らが最初に $p19^{ARF}$ による G1 期、G2/M 期停止を報告したとき、普通に増殖している細胞を用いた場合よりサイクリン D1 を過剰発現した細胞を用いた場合のほうが $p19^{ARF}$ による G2/M 期停止がよりはっきりと確認できていた。本研究の結果から、 $p19^{ARF}$ による G1 期停止は Cdk インヒビター $p21^{Cip1}$ によるサイクリン D1/ $Cdk4$ 複合体の活性抑制によるものであることが判明した。したがって、サイクリン D1 を過剰発現した細胞では過剰なサイクリン D1/ $Cdk4$ 複合体が存在するために、その活性を抑制するにはより多くの Cdk インヒビター $p21^{Cip1}$ が必要となり、その結果 $p19^{ARF}$ による G1 期停止に対して抵抗性を持つと考えられる。この時 $p53$ によって制御される 14-3-3 σ などの G2/M 期進行阻害因子の活性へは、影響しないため G2/M 期停止がみられると思われる。Quelle らは、 $p19^{ARF}$ により細胞の形態が丸くなり、接着が悪くなることを報告している。しかし、本研究では、 $p19^{ARF}$ の発現による細胞の形態変化はあまり見られず、また接着も正常であった。本研究結果と Quelle らの実験結果との違いは、 $p19^{ARF}$ の発現システムによると考えられる。Quelle らは、 $p19^{ARF}$ の発現システムとしてレトロウィルスをもちいた発現システムを用いていた。一般に、このシステムでは蛋白質の発現量が非常に高くなってしまふ。そのために細胞の形態に異常を生じさせてしまったと思われる。一方、本研究で用いたメタルチオネインプロモーターによる蛋白質発現システムは、レトロウィルスをもちいた発現システムに対して蛋白質の発現量は低い。従って、細胞の形態に異常をもたらさずに、細胞周期停止に必要な十分な量の $p19^{ARF}$ を発現できた結果

であると思われる。

本研究で、 $p19^{ARF}$ の発現は、G1 サイクリン依存性キナーゼ (Cdk4、Cdk2) の活性を抑制することが明らかになった。Cdk2 の活性調節サブユニットであるサイクリン A の発現は、著しく抑制されていた。また、一部存在するサイクリン E/Cdk2 複合体には、 $p21^{Cip1}$ が結合し、その活性が抑制されていた。反対に Cdk4 の活性調節サブユニットであるサイクリン D1 の発現量は、増殖中の細胞よりも増加していた。サイクリン D1/Cdk4 複合体による Rb 蛋白質のリン酸化がおきる G1 期中期では、サイクリン A の発現は見られないことから、サイクリン A の発現抑制は、 $p19^{ARF}$ によって細胞が G1 期中期で停止するためである。サイクリン D1 は、細胞周期進行に依存してその発現量はほとんど変化しないが、G1 期中期で若干増加する。従って、サイクリン D1 の発現増加の原因の一つとして $p19^{ARF}$ による G1 期中期での停止が考えられる。しかし、NIH-ARF に SV40 の LargeT を過剰発現した細胞では、 $p19^{ARF}$ の発現による G1 期停止は見られなかったがサイクリン D1 の増加が見られたことから、 $p19^{ARF}$ がサイクリン D1 の発現を増加させる機能を持っていると予想される (data not shown)。Inoue らは、転写因子 DMP1 が $p19^{ARF}$ の転写因子として働いていることを報告した。DMP1 は、サイクリン A、B、C、H 等とは結合せず、D タイプサイクリンに特異的に結合する。この D タイプサイクリンの DMP1 への結合は、Cdk との結合、活性に関わらない D タイプサイクリンの Cdk 非依存的な機能である。D タイプサイクリンは、DMP1 の転写活性ドメインに結合し、その転写能を阻害する。 $p19^{ARF}$ がサイクリン D1 の発現を増加させることにより自らの過剰な発現を制御するネガティブフィードバックが存在していることを示唆する。D タイプサイクリンは、Cdk2、4、5、6 それぞれと結合することができ、増殖中の繊維芽細胞やマクロファージ細胞においてサイクリン D1 は、主に Cdk4 と結合している。本研究では、増殖中の線維芽細胞でサイクリン D1/Cdk4 複合体以外の複合体 (サイクリン D1/Cdk2、サイクリン D1/Cdk6) は、存在していなかった。しかしながら、 $p19^{ARF}$ を発現させるとサイクリン D1 は、Cdk2、Cdk6 とともに複合体を形成した。また、これらの複合体にも $p21^{Cip1}$ が結合していた。 $p21^{Cip1}$ は、サイクリンと Cdk の複合体の形成を促進し、複合体の安定化をもたらすことが報告されており、本研究でのサイクリン D1/Cdk2、6 複合体も $p19^{ARF}$ によって発現量が上昇した $p21^{Cip1}$ によって形成されたと考えられる。しかし、 $p19^{ARF}$ の下流にサイクリンと Cdk の複合体形成を促進する機構が存在するのかもしれない。

本研究で $p19^{ARF}$ を発現誘導し G1 期で停止した細胞内では、 $p19^{ARF}$ が MDM2 と結合していることを明らかにした。また、この時は、 $p19^{ARF}$ は、p53 とは結合していなかった。Pomerantz らや Zhang らは、 $p19^{ARF}$ 、MDM2、p53 を過剰発現した細胞内でこれら 3 つの蛋白質が複合体を形成していることを報告した。Kamijo らは、MDM2 を含まずに $p19^{ARF}$ が直接 p53 と結合していることを示した。以上の差異は、それぞれの研究の条件の違いにより、それぞれの複合体の安定性が異なる結果生じ

たものであるとも考えられる。p19^{ARF}発現細胞では、MDM2が不安定化されているにもかかわらず、細胞内のMDM2の発現量自体は増加している。つまりp19^{ARF}によるp53の蛋白質安定化及び活性化は、MDM2の不安定化によるp53分解活性の阻害ではなく、p19^{ARF}のMDM2、またはp53への結合による。本研究では、p19^{ARF}が細胞内のほとんどのMDM2と結合し、p53と複合体を形成しなかった。したがって、p19^{ARF}は、MDM2を吸収し、MDM2がp53に結合できないようにする機構でp53を安定化し活性化するのである(図3.13)。

MDM2の主要な機能は、p53の機能を負に制御する(転写活性の抑制、分解)ことであるが、他にもいくつかの機能を持っている。MDM2は、p53以外にもRb蛋白質、転写因子E2F-1/DP1、リボソームL5蛋白質、SV40LargeT抗原、TATA結合蛋白質、cell fate regulator Numb、転写コアクチベータp300などと結合する。Rb蛋白質に対しては、MDM2は、その増殖抑制能を抑制する。p300は、MDM2/p53と3量体を形成し、p53の分解を促進し、Numbもこの分解に関与していることが示唆されている。p19^{ARF}のMDM2への結合によって、MDM2とこれらの蛋白質の結合やその機能が影響されるかもしれない。Brownらは、MDM2が、細胞をG1期停止させることを報告した。このG1期停止の機能に必要な領域は、p53結合サイトを含まない細胞周期停止ドメイン(155位-220位のアミノ酸残基、270位-324位のアミノ酸残基)である。この細胞周期停止ドメインは、p19^{ARF}との結合領域(155位-220位のアミノ酸残基とC末端領域)と一部重複している。このことは、p19^{ARF}/MDM2複合体がp53に依存しない経路で働く可能性を示している。本研究によりp19^{ARF}がp53に依存してp21を誘導しG1サイクリン/Cdk複合体の活性を抑制してG1期停止をもたらすことが明らかになったが、このp53依存的な経路と依存してない経路でG1期停止をもたらしている可能性もある。

p19^{ARF}の細胞内の局在は、核内であり、特に核小体に主に存在していた。p19^{ARF}を発現した細胞では、p53の核外への移行が阻害されていた。最近p19^{ARF}が、核小体に局在することによってMDM2を核小体に留め、MDM2の機能を抑制してp53の蛋白質量を増加し、転写活性を上昇させることを報告した(Zhang et al.,1998; Weber et al.,1999;Stott et al.,1998; Tao and Levine 1999)。しかし、本研究では、p19^{ARF}は核質にも局在しており、また、MDM2が核小体に主に局在する傾向はみられなかった。Hondaらは、p19^{ARF}が結合したMDM2は、p53に対するE3としての機能が著しく抑制されていることを報告した(Honda et al.,1999)。従って、p19^{ARF}のMDM2の機能阻害能は、MDM2を核小体に留めるためだけによるのではなく、MDM2への結合によってMDM2のp53へも結合能を阻害し、E3としての機能を抑制することにあると考えられる。

Ink4a 遺伝子座は、p16^{Ink4a}とp19^{ARF}の異なる二つの蛋白質によってRb経路とp53経路の両方を制御する遺伝子座であることが明らかになった。癌細胞において遺伝子の欠失や変異を調べると、この2つの経路のどちらかの欠失が見られない癌細胞

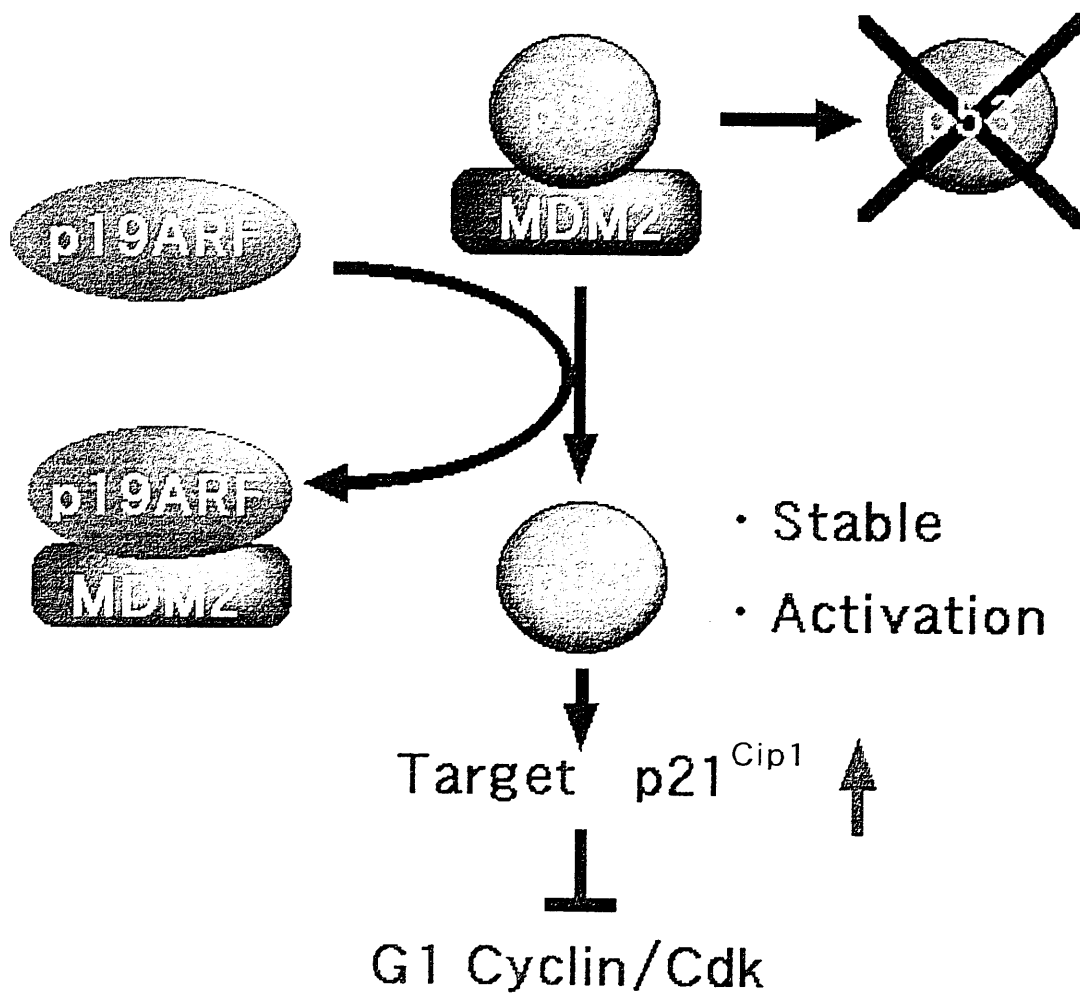


図 3.13 p19^{ARF} による G1 期停止の分子機構のモデル

はない。したがって、*Ink4a* 遺伝子座の発現を制御することは、細胞が正常に増殖するうえで非常に重要である。p16^{Ink4a} と p19^{ARF} のプロモーターは、それぞれ独立しており異なるが、最近、Polycomb group 遺伝子が *Ink4a* 遺伝子座の p16^{Ink4a} と p19^{ARF} の両方のリプレッサーであることが報告された (Jacqueline, J.L. et al, 1999)。今後、DMP-1 や、Polycomb group 遺伝子などの *Ink4a* 遺伝子座の転写の制御を明らかにすることによって、細胞周期の制御、アポトーシス、細胞老化等の細胞増殖の制御機構を総合的に解明できると思われる。

本研究を遂行するにあたり、懇切な御指導を賜りました奈良先端科学技術大学院大学、細胞増殖学講座の竹家達夫教授、種々具体的な御指導を賜りました加藤順也助教授、田中利明助手に、心から感謝の意を表します。特に加藤順也先生には、5 年の間様々な面から非常に多くの指導をして頂きました。研究者としての考え方や行動を真摯に教えて頂き本当に感謝しております。私が今後研究者として生きていけたならばそれは加藤先生の指導のおかげであると思います。

また、数々の有益な助言を与えてくださった細胞増殖学講座の秋月さん、友田君、荒田君、小川君、そして後輩の皆さんに厚く御礼申し上げます。

2000 年 1 月 黒川 量雄

Bates S., Phillips A.C., Clark P.A., Stott F., Peters G., Ludwig R.L., and Vousden K.H. (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* **395**, 124-5.

Brandeis M., and Hunt T. (1996). The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *EMBO J* **15**, 5280-5289.

Chapman D.L., and Wolgemuth D.J. (1993). Isolation of the murine cyclin B2 cDNA and characterization of the lineage and temporal specificity of expression of the B1 and B2 cyclins during oogenesis, spermatogenesis and early embryogenesis. *Development* **118**, 229-240.

Chen C., and Okayama H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **8**, 2745-2752.

Chen X., Ko L.J., Jayaraman L., and Prives C. (1996). p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* **10**, 2438-2451.

Clurman B.E., Sheaff R.J., Thress K., Groudine M., and Roberts J.M. (1996). Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev* **10**, 1979-1990.

Cogswell J.P., Godlevski, M.M., Bonham, M., Bisi, J., and Babiss, L. (1995). Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter. *Mol Cell Biol* **15.5**, 2782-2790.

Cohen-Fix O., and Koshland D. (1997). The metaphase-to-anaphase transition: avoiding a mid-life crisis. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 800-806.

Cohen-Fix O., Peters J.M., Kirschner M.W., and Koshland D. (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev* **10**, 3081-3093.

Cook D.M., Hinkes M.T., Bernfield M., and Rauscher F.J. 3rd. (1996). Transcriptional activation of the syndecan-1 promoter by the Wilms' tumor protein WT1. *Oncogene* **13**, 1789-99.

de Stanchina E., McCurrach M.E., Zindy F., Shieh S.Y., Ferbeyre G., Samuelson A.V., Prives C., Roussel

M.F., Sherr C.J., and Lowe, and S.W. (1998). E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 12,15,2434-42.

Della Valle V., Duro D., Bernard O., and Larsen C.J. (1997). The human protein p19ARF is not detected in hemopoietic human cell lines that abundantly express the alternative beta transcript of the p16INK4a/MTS1 gene. *Oncogene* 15,2475-2481.

Dunphy W.G. (1994). The decision to enter mitosis. *Trends Cell Biol* 4,202-207

Dyson N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12,2245-2262.

el-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W., and Vogelstein B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75,817-825.

Elledge S.J. (1998). Mitotic arrest: Mad2 prevents sleepy from waking up the APC. *Science* 279,999-1000.

Ewen M.E., Sluss H.K., Sherr C.J., Matsushime H., Kato J-Y., and Livingston D.M. (1993). Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73,487-497.

Featherstone C., and Russell P. (1991). Fission yeast p107wee1 mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature* 394,808-811.

FitzGerald M.G., Harkin D.P., Silva-Arrieta S., MacDonald D.J., Lucchina L.C., Unsal H., O'Neill E., Koh J., Finkelstein D.M., Isselbacher K.J., Sober A.J., and Harber D.A. (1996). Prevalence of germ-line mutations in p16, p19ARF, and CDK4 in familial melanoma: analysis of a clinic-based population. *Proc Natl Acad Sci USA* 93,8541-8545.

Freedman D.A., and Levine A.J. (1998). Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol* 18,7288-7293.

Gautier J., Solomon, M.J., Booher, R.N., Bazan, J.F., and Kirschner, M.W. (1991). cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell* 67,197-211.

Glotzer M., Murray A.W., and Kirschner M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349,132-138.

- Gudas J.M., Payton M., Thukral S., Chen E., Bass M., Robinson M.O., and Coats S. (1999). Cyclin E2, a novel G1 cyclin that binds Cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers. *Mol Cell Biol* **1**, 612-22.
- Haber D.A. (1997). Splicing into senescence: the curious case of p16 and p19ARF. *Cell* **91**, 555-558.
- Hafner S., Adler H.S., Mischak H., Janosch P., Heidecker G., Wolfman A., Pippig S., Lohse M., Ueffing M., and Kolch W. (1994). Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. *Mol Cell Biol.* **14**, 6696-6703.
- Hagting A., Karlsson C., Clute P., Jackman M., and Pines J. (1998). MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J* **17**, 4127-4138.
- Haupt Y., Maya R., Kazaz A., and Oren M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-299.
- Hengst L., and Reed S.I. (1996). Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* **271**, 1861-1864.
- Hermeking H., Lengauer C., Polyak K., He T.C., Zhang L., Thiagalingam S., Kinzler K.W., and Vogelstein B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* **1**, 3-11.
- Holland E.C., Hively W.P., DePinho R.A., and Varmus H.E. (1998). A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice. *Genes Dev* **12**, 3675-3685.
- Honda R., and Yasuda H. (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J* **18**, 22-7.
- Honda R., Tanaka H., and Yasuda H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* **420**, 25-27.
- Hoyt M.A. (1997). Eliminating all obstacles: regulated proteolysis in the eukaryotic cell cycle. *Cell* **91**, 149-151.
- Hwang A., Maity A., McKenna W.G., and Muschel R.J. (1995). Cell cycle-dependent regulation of the cyclin B1 promoter. *J.Biol.Chem.* **270**, 28419-28424.

Hwang L.H., Lau L.F., Smith D.L., Mistrot C.A., Hardwick K.G., Hwang E.S., Amon A., and Murray A.W. (1998). Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science* **279**, 1041-1044.

Inoue K., Roussel M.F., and Sherr C.J. (1999). Induction of ARF tumor suppressor gene expression and cell cycle arrest by transcription factor DMP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3993-3998.

Jackman M., Firth M., and Pines J. (1995). Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J* **14**, 1646-1654.

Jacobs J.J., Kieboom K., Marino S., DePinho R.A., and van Lohuizen M. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* **397**, 164-168.

Kamijo T., van de Kamp E., Chong M.J., Zindy F., Diehl J.A., Sherr C.J., and McKinnon P.J. (1999). Loss of the ARF tumor suppressor reverses premature replicative arrest but not radiation hypersensitivity arising from disabled atm function. *Cancer Res* **59**, 2464-2469.

Kamijo T., Weber J.D., Zambetti G., Zindy F., Roussel M.F., and Sherr C.J. (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8292-8297.

Kamijo T., Zindy F., Roussel M.F., Quelle D.E., Downing J.R., Ashmun R.A., Grosveld G., and Sherr C.J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* **91**, 649-659.

Kato J.-Y., Matsushime H., Hiebert S.W., Ewen M.E., and Sherr C.J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* **7**, 331-342.

Kato J.-Y., Matsuoka M., Polyak K., Massague J., and Sherr C.J. (1994). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* **79**, 487-496.

King R.W., Jackson P.K., and Kirschner M.W. (1994). Mitosis in transition. *Cell* **79**, 563-571.

King R.W., Peters J.M., Tugendreich S., Rolfe M., Hieter P., and Kirschner M.W. (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* **81**, 279-88.

- Kiyono T., Foster S.A., Koop J.I., McDougall J.K., Galloway D.A., and Klingelutz A.J. (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* **396**,84-88.
- Koff A., Giordano A., Desai D., Yamashita K., Harper J.W., Elledge S., Nishimoto T., Morgan D.O., Franza B.R., and Roberts J.M. (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* **257**,1689-1694.
- Kornbluth S., Sebastian B., Hunter T., and Newport J. (1994). Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34cdc2 on threonine 14. *Mol.Biol.Cell.* **5**,273-282.
- Kotani S., Tanaka H., Yasuda H., and Todokoro K. (1999). Regulation of APC activity by phosphorylation and regulatory factors. *J Cell Biol* **146**,791-800.
- Kotani S., Tugendreich S., Fujii M., Jorgensen P.M., Watanabe N., Hoog C., Hieter P., and Todokoro K. (1998). PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell* **1**,371-380.
- Kubbutat M.H., Jones S.N., and Vousden K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**,299-303.
- Kumagai A., and Dunphy W.G. (1995). Control of the Cdc2/cyclin B complex in *Xenopus* egg extracts arrested at a G2/M checkpoint with DNA synthesis inhibitors. *Mol.Biol.Cell.* **6**,199-213.
- Kumagai A., and Dunphy W.G. (1991). The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* **64**,903-914.
- Lee T.H., and Kirschner M.W. (1996). An inhibitor of p34cdc2/cyclin B that regulates the G2/M transition in *Xenopus* extracts. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**,352-356.
- Levine A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**,323-331.
- Li J., Meyer A.N., and Donoghue D.J. (1997). Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**,502-507.
- Lukas J., Bartkova J., Rohde M., Strauss M., and Bartek J. (1995). Cyclin D1 is dispensable for G1 control in

- retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity. *Mol Cell Biol* **15**,2600-2611.
- Lundgren K., Walworth N., Booher R., Dembski M., Kirschner, M., and Beach D. (1991). *mik1* and *wee1* cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of *cdc2*. *Cell* **64**,1111-1122.
- Lyengar R. (1996). Gating by cAMP: Expanded Role for an Old Signaling Pathway. *Science* **271**,461-463.
- Maity A., Hwang A., Janss A., Phillips P., McKenna W.G., and Muschel R.J. (1996). Delayed cyclin B1 expression during the G2 arrest following DNA damage. *Oncogene* **13**,1647-1657.
- Maity A., McKenna W.G., and Muschel R.J. (1995). Evidence for posttranscriptional regulation of cyclin B1 mRNA in the cell cycle and following irradiation in Hella cells. *EMBO J* **14**,603-609.
- Massague J. (1987). The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell* **49**,437-438.
- Matsushime H., Ewen M.E., Strom D.K., Kato J-Y., Hanks S.K., Roussel M.F., and Sherr C.J. (1992). Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34^{PSK}-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* **71**,323-334.
- Matsushime H., Quelle D.E., Shurtleff S.A., Shibuya M., Sherr C.J., and Kato J-Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **14**,2066-2076.
- Matsushime H., Roussel M.F., Ashmun R.A., and Sherr C.J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* **65**,701-713.
- McCurrach M.E., Connor T.M., Knudson C.M., Korsmeyer S.J., and Lowe S.W. (1997). *bax*-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**,2345-2349.
- Meinkoth J.L., Alberts A.S., Went W., Fantozzi D., Taylor S.S., Hagiwara M., Montminy M., and Feramisco, J.R. (1993). Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biochem* **127**,179-186.
- Morgan D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* **374**,131-134.
- Morgan D.O. (1999). Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nat Cell Biol* **1**,E47-E53.

- Morgan D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-134.
- Mueller P.R., Coleman T.R., Kumagai A., and Dunphy W.G. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* **270**, 86-89.
- Murray A. (1994). Cell cycle checkpoints. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 872-6.
- Murray A.W. (1992). Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* **359**, 599-604.
- Murray A.W. (1998). How to compact DNA. *Science* **282**, 425-427.
- Nevins J.R. (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**, 424-429.
- Nichols M., Weih F., Schmid W., DeVack C., Kowenz-Leutz E., Luckow B., Boshart M., and Schutz G. (1992). Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP induced gene transcription. *EMBO J* **11**, 3337-3346.
- Nigg E.A. (1993). Targets of cyclin-dependent protein kinases. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 187-193.
- Nourse J., Firpo E., Flanagan W.M., Coats S., Polyak K., Lee M.H., Massague J., Crabtree G.R., and Roberts J.M. (1994). Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* **372**, 570-573.
- Ohtsubo M., Theodoras A.M., Schumacher J., Roberts J.M., and Pagano M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* **15**, 2612-2624.
- Okamoto K., and Beach D. (1994). Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J* **13**, 4816-2482.
- Ookata K., Hisanaga S., Bulinski J.C., Murofushi H., Aizawa H., Itoh T.J., Hotani H., Okumura E., Tachibana K., and Kishimoto T. (1995). Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J Cell Biol* **128**, 849-862.

- Pagano M., Tam S.W., Theodoras A.M., Beer-Romero P., DelSal G., Chau V., Yew P.R., Draetta G.F., and Rolfe M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* **269**, 682-685.
- Palmero I., Pantoja C., and Serrano M. (1998). p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* **395**, 125-126.
- Pardee A.B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**, 603-608.
- Peters J.M., King R.W., Hoog C., and Kirschner M.W. (1996). Identification of BIME as a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science* **274**, 1199-1201.
- Piaggio G., Farina A., Perrotti D., Manni L., Foschi P., Sacchi A., and Gaetano C. (1995). Structure and growth-dependent regulation of the human cyclin B1 promoter. *Exp Cell Res* **216**, 396-402.
- Pines J. (1993). Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners. *Trends Biochem Sci* **18**, 195-197.
- Pines J. (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* **3**, E73-79.
- Pines J., and Hunter T. (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J* **13**, 3772-3781.
- Pomerantz J., Schreiber-Agus N., Liegeois N.J., Silverman A., Alland L., Chin L., Potes J., Chen K., Orlow I., Lee H.W., Cordon-Cardo C., and DePinho R.A. (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**, 713-723.
- Quelle D.E., Cheng M., Ashmun R.A., and Sherr C.J. (1997). Cancer-associated mutations at the INK4a locus cancel cell cycle arrest by p16INK4a but not by the alternative reading frame protein p19ARF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 669-673.
- Quelle D.E., Zindy F., Ashmun R.A., and Sherr C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**, 993-1000.
- Radfar A., Unnikrishnan I., Lee H.W., DePinho R.A., and Rosenberg N. (1998). p19(Arf) induces p53-dependent apoptosis during abelson virus-mediated pre-B cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13194-13199.

- Schwab M., Lutum A.S., and Seufert W. (1997). Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* **90**,683-693.
- Serrano M., Lee H., Chin L., Cordon-Cardo C., Beach D.,and DePinho R.A. (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* **85**,27-37.
- Sheaff R.J., Groudine M., Gordon M., Roberts J.M.,and Clurman B.E. (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* **11**,1464-1478.
- Sherr C.J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**,551-555.
- Sherr C.J. (1995). D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* **5**,187-190.
- Sherr C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* **274**,1672-1677.
- Sherr C.J. (1998). Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev* **12**,2984-2991.
- Sherr C.J., and Roberts J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **9**,1149-1163.
- Shirayama M., Zachariae W., Ciosk R.,and Nasmyth K. (1998). The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **17**,1336-1349.
- Smith J.R., and Pereira-Smith O.M. (1996). Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science* **273**,63-67.
- Stott F.J., Bates S., James M.C., McConnell B.B., Starborg M., Brookes S., Palmero I., Ryan K., Hara E., Vousden K.H.,and Peters G. (1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* **17**,5001-5014.
- Sudakin V., Ganioth D., Dahan A., Heller H., Hershko J., Luca F.C., Ruderman J.V.,and Hershko A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell* **6**,185-197.
- Tao W., and Levine A.J. (1999). P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of

Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**,6937-41.

Tevosian S.G., Shih H.H., Mendelson K.G., Sheppard K.A., Paulson K.E., and Yee A.S. (1997). HBP1: a HMG box transcriptional repressor that is targeted by the retinoblastoma family. *Genes Dev* **11**,383-396.

Tomoda K., Kubota Y., and Kato J., (1999). Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature* **398**,160-165.

Townsley F.M., and Ruderman J.V. (1998). Proteolytic ratchets that control progression through mitosis. *Trends Cell Biol* **8**,238-244.

Toyoshima F., Moriguchi T., Wada A., Fukuda M., and Nishida E. (1998). Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *EMBO J* **17**,2728-2735.

Visintin R., Prinz S., and Amon A. (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* **278**,460-463.

Weber J.D., Taylor L.J., Roussel M.F., Sherr C.J., and Bar-Sagi D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* **1**,20-26.

Weinberg R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**,323-330.

Weintraub S.J., Chow K.N., Luo R.X., Zhang S.H., He S., and Dean D.C. (1995). Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* **375**,812-815.

Yamamoto A., Guacci V., and Koshland D. (1996). Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J Cell Biol* **133**,99-110.

Yamashita Y., Nakaseko Y., Samejima I., Kumada K., Yamada H., Michaelson D., and Yanagida M. (1996). 20S cyclosome complex formation and proteolytic activity inhibited by the cAMP/PKA pathway. *Nature* **384**,276-279.

Yang J., Bardes E.S., Moore J.D., Brennan J., Powers M.A., and Kornbluth S. (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* **12**,2131-2143.

Yin C., Knudson C.M., Korsmeyer S.J., and Van Dyke T. (1997). Bax suppresses tumorigenesis and

stimulates apoptosis in vivo. *Nature* **385**,637-640.

Yu H., Peters J.M., King R.W., Page A.M., Hieter P.,and Kirschner M.W. (1998). Identification of a cullin homology region in a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science* **279**,1219-1222.

Zachariae W., Shevchenko A., Andrews P.D., Ciosk R., Galova M., Stark M.J., Mann M.,and Nasmyth K. (1998). Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. *Science* **279**,1216-1219.

Zachariae W., Schwab M., Nasmyth K.,and Seufert W. (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* **282**,1721-1724.

Zachariae W., Shin T.H., Galova M., Obermaier B.,and Nasmyth K. (1996). Identification of subunits of the anaphase-promoting complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **274**,1201-1204.

Zhang H.S., Postigo A.A., and Dean D.C. (1999). Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. *Cell* **97**,53-61.

Zhang Y., Xiong Y., and Yarbrough W.G. (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* **92**,725-734.

Zindy F., Eischen C.M., Randle D.H., Kamijo T., Cleveland J.L., Sherr C.J.,and Roussel M.F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* **12**,2424-2433.

Zindy F., Quelle D.E., Roussel M.F.,and Sherr C.J. (1997). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* **15**,203-211.