

## 論文の内容の要旨

申請者氏名 荒田幸信

高等動物細胞の細胞周期制御因子の一つである E2F は G1 期から S 期への移行において中心的な役割を果たしているが、その機構の詳細は不明である。そこで、申請者は、生理的なレベルで E2F-1 因子を発現誘導できる細胞株を構築し、S 期誘導の分子メカニズムを解析した。

まず、E2F-1 誘導により S 期が開始する際、G1 サイクリンであるサイクリン E の発現が著しく上昇したのに対し、サイクリン D1 のレベルには僅かな上昇しかみられなかった。これに伴い、サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) の活性の上昇がみられた。さらに、各種 Cdk に対する特異性が異なる Cdk インヒビターを同時に発現させる実験から、E2F-1 による S 期誘導には Cdk2 が関与することを明かにした。

次に、DNA 複製の開始制御に関わることが知られている MCM (4 および 7) に注目し、E2F-1 誘導による影響を調べた。MCM は E2F の標的遺伝子の一つであるが、MCM 蛋白質のレベルには変化が見られなかった。しかし、クロマチンに結合した MCM 蛋白質量の上昇が見られた。さらに、DNA ポリメラーゼをクロマチンに運ぶために必要な Cdc45 蛋白質量は E2F-1 誘導により著しく亢進されるとともにクロマチン結合量も上昇していた。この時、Cdk2 に対する化学的阻害剤であるブチロラクトン 1 を添加すると、MCM のクロマチン結合は阻害されなかったが、Cdc45 のクロマチン結合は著しく阻害された。これらのことから、MCM のクロマチン結合には Cdk2 活性は必要ないが、Cdc45 の結合には Cdk2 活性が必要であることを示した。

次に、上と同様にサイクリン E 誘導株を構築し、S 期誘導への影響を調べたところ、サイクリン E 誘導により BrdU の取り込みは亢進したが、フローサイトメトリーによる S 期進行は確認出来なかった。このことから、サイクリン E の機能は S 期開始に十分であるが、進行には不十分であることがわかった。その際、サイクリン E の発現誘導により、Cdk2 の活性の上昇がみられたが、MCM4 および Cdc45 のクロマチン結合量の増加はごくわずかであった。

以上の結果より、E2F-1 により S 期が開始・進行する際、その下流では少なくとも 2 つの経路が活性化されること、その一つは Cdk2 活性依存的、他の一つは非依存的であることが明かとなった。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 荒田幸信

高等動物細胞の G1 期から S 期への移行制御において中心的な役割を果たしている転写因子 E2F の作用機構についての解析を進める目的で、申請者は、E2F-1 因子を生理的なレベルで発現誘導できる細胞株を構築し、S 期誘導の分子メカニズムを解析した。

まず、E2F 誘導により S 期が開始する際、G1 サイクリンであるサイクリン E の発現が著しく上昇すること、それに伴いサイクリン依存性キナーゼ (Cdk) の活性の上昇がみられることなどを明らかにした。さらに、各 Cdk に対する特異性が異なる Cdk インヒビターを同時に発現させる実験から、E2F-1 による S 期誘導には Cdk2 が関わることを示した。

次に、DNA 複製開始の制御に関わる MCM (4 および 7) に注目し、E2F-1 誘導による影響を調べた。その結果、クロマチンに結合した MCM 蛋白質量の上昇を見い出すとともに、DNA ポリメラーゼをクロマチンに運ぶために必要な Cdc45 蛋白質量も誘導されていることを見い出した。その際、Cdk2 に対する化学的阻害剤であるブチロラクトン 1 を添加すると、MCM のクロマチン結合は阻害されなかったが、Cdc45 のクロマチン結合は著しく阻害されたことから、MCM のクロマチン結合には Cdk2 活性は必要ないが、Cdc45 の結合には Cdk2 活性が必要であることを明かにした。

これらの知見をさらに詳細に分析するために、サイクリン E 誘導株を構築し、S 期誘導への影響を調べたところ、サイクリン E 誘導により BrdU の取り込みは亢進したが、フローサイトメトリーによる S 期進行は確認出来なかった。このことは、サイクリン E の機能は S 期開始に十分であるが、進行には不十分であることを示している。なお、その際、サイクリン E の発現誘導により、Cdk2 の活性の上昇がみられたが、MCM4 および Cdc45 のクロマチン結合量の上昇は極わずかであった。

以上の結果より、E2F-1 により S 期が開始・進行する際、その下流では少なくとも 2 つの経路が活性化されること、その一つは Cdk2 活性依存的、他の一つは非依存的であること、などが明かとなった。

以上のように、本論文は、動物細胞の細胞周期制御機構、特に G1 期から S 期に移行する機構について新しい知見を得たもので、学術上貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものとして認めた。