

プロテインキナーゼ阻害剤による
細胞周期の脱制御に関する研究

白井 健郎

①

博士論文

プロテインキナーゼ阻害剤による細胞周期の脱制御に関する研究
Studies on the cell cycle uncoupling by using protein kinase inhibitors

東京大学大学院
応用生命工学専攻
氏 名
指 導 教 官

農学生命科学研究科
平成4年度博士課程進学
臼井 健郎
堀之内 末治

目次

第1章 序論

第1節 真核生物の細胞周期	1
第2節 Checkpoint機構	12
第3節 プロテインキナーゼ阻害剤、スタウロスポリンの 細胞周期阻害活性発見の経緯	14

第2章 多倍体細胞形成誘導

第1節 材料と方法

第1項 使用動物培養細胞株	17
第2項 培地	17
第3項 培養条件	17
第4項 薬剤の細胞周期への効果検定	17
第5項 フローサイトメトリー用サンプル調製	20
第6項 分裂指数 (Mitotic Index) の決定	20
第7項 チミジンの取り込み	20
第8項 ヒストンH1キナーゼ活性測定	21

第9項	p34 ^{cdk2} の定量	21
第10項	蛍光抗体染色	25
第11項	染色体染色法	25
第12項	Cdkキナーゼの免疫沈降と活性測定	25
第13項	コロニー形成効率の判定	26
第14項	使用薬剤	26
第2節	結果	
第1項	序 - DNA re-replication blockについて -	27
第2項	プロテインキナーゼ阻害剤の細胞周期への作用	28
第3項	K-252aによる細胞倍数化機構の解析	34
第4項	スタウロスポリンの多倍数体細胞形成誘導	46
第3節	まとめと考察	62
第3章 K-252aの酵母に対する作用		
第1節	材料と方法	
第1項	使用菌株	65
第2項	培地	65
第3項	プラスミド	65
第4項	培養法	65
第5項	薬剤のMIC (Minimum inhibitory concentration; 生育最小阻止濃度) および細胞周期への作用検定	65
第6項	形態観察	66
第7項	増殖及びCFU (Colony forming unit) の算定	66
第8項	変異処理	73

第9項	遺伝解析	73
第10項	酵母の形質転換及びプラスミド回収	75
第11項	遺伝子操作	76

第2節 結果

第1項	序 酵母の細胞周期変異株と倍数性の維持について	79
第2項	多倍体酵母の誘導	80
第3項	cdc変異株のK-252a感受性	86
第4項	K-252a超感受性変異株の取得と解析	89
第5項	ucm1遺伝子の解析	106

第3節	まとめと考察	115
-----	--------	-----

第4章 未成熟染色体凝縮 (PCC) の誘導

第1節 材料と方法

第1項	使用動物培養細胞株	117
第2項	培地	117
第3項	培養条件	117
第4項	薬剤の細胞周期への効果検定	117
第5項	フローサイトメトリー用サンプル調製	118
第6項	蛍光抗体染色	118
第7項	染色体染色法	118
第8項	透過型電子顕微鏡のサンプル調製	119
第9項	Cdkキナーゼの免疫沈降と活性測定	119
第10項	使用薬剤	119

第2節 結果	
第1項 序 -PCCについて-	121
第2項 スタウロスボリンのPCC誘導活性	123
第3節 まとめと考察	135
第5章 総括	137
Reference	142

平成二年度入学

臼井 健郎

第一章 序論

第一節 真核生物の細胞周期

真核生物の細胞周期はDNA複製を行なうS期と細胞分裂を行なうM期、およびそれぞれの準備期であるG1、G2期から成っており、増殖期の細胞は通常このサイクルをまわり遺伝的に等価な二つの娘細胞に分裂する。

近年になってこの細胞周期の進行を直接に、正に制御しているSer/Thrキナーゼが次々と発見されてきている。これらは主に2つのサブユニットから成り立っており、制御サブユニットをcyclin、触媒サブユニットをCdk (cyclin-dependent kinase) と呼ぶ一連の蛋白群である。動物細胞のCdkにはMPF (M-phase promoting factorまたはMaturation promoting factor) の構成サブユニットとして知られるCdc2 (Cdk1) のほか、Cdk2からCdk6までの細胞周期の進行に直接関わる(と考えられている) Cdkや、これらのCdkの最終的な活性化に関与するCAK (cdk-activating kinase) 構成サブユニットのCdk7 (MO15) が知られている。これらのCdkにはそれぞれ結合するcyclinが決まっており、たとえばCdc2にはcyclinA/Bが結合し、Cdk2にはcyclinA/Eが結合する (Table 1-1-1)。これらの複合体の発見により細胞周期の進行は統一的に議論できるようになってきた。すなわちG1 cyclinと呼ばれるcyclinDがCdk4およびCdk6と、cyclinEが

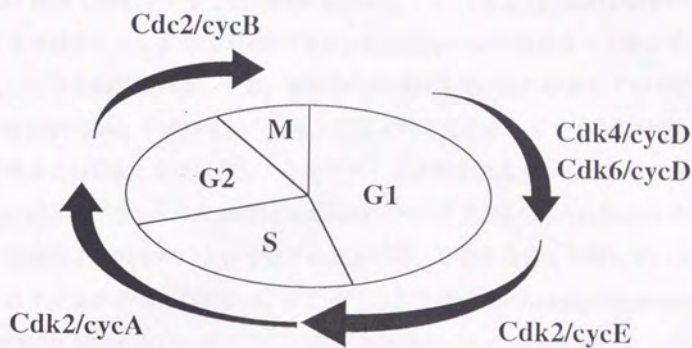


Fig. 1-1-1 細胞周期進行のエンジン Cdk/cyclin複合体

Table 1-1-1 Interaction of CDKs and cyclins

Cyclin	CDKs with which cyclin forms complex	Activity
A	cdc2, cdk2	cdc2, cdk2
B1	cdc2	cdc2
C	unknown	unknown
D1	cdk2, cdk4, cdk5	cdk4
D2	cdk2, cdk4	cdk2, cdk4
D3	cdk2, cdk4, cdk5	cdk2, cdk4
E	cdk2	cdk2
F	unknown	unknown
G	unknown	unknown
H	cdk7 (MO15)	cdk7

Cdk2と結合し活性化することでG1期進行が起こり、Cdk2/cyclinA複合体がS期の進行を誘導する。またG2/M期の進行はCdc2/cyclinBの強力なリン酸化活性によって引き起こされる。一方、細胞周期の進行を逆に負に制御している因子(Cdk inhibitors)が1993年から次々と報告されてきた(1)。これらはCdk/cyclin複合体またはCdkと直接結合し、そのキナーゼ活性を阻害すると考えられる(Fig. 1-1-1)。このように細胞周期進行のエンジンであるCdk/cyclin複合体やその阻害因子は明らかにされてきているものの、この複合体を制御している機構にはまだまだ不明な点が多い。その中でも出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*と動物培養細胞を用いた系ではG1/S期制御機構が、また分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*と*Xenopus*卵を用いた系でG2/M期制御機構がよく研究されている。

(1) G1/S期制御機構

静止期にいる細胞は細胞外の栄養源や増殖因子に反応して増殖サイクルに入り、G1期を進行する。このG1期では外界からの正、及び負の両方のシグナルによりS期へと進行するための制御を受けている。出芽酵母*S. cerevisiae*では遺伝学的な解析により、Startと呼ばれるG1期の制御ポイントの解析がよく行われている(Fig. 1-1-2)。 *S. cerevisiae*のG1期進行にはCDC28 (cdc2に対応)と、G1期で転写の上昇がみられるCln1/2/3との複合体の形成・活性化が必要であることが知られている。この複合体はStart後の出芽など、DNA複製の開始以外のS期の進行を促進する。CDC28/Cln1やCDC28/Cln2複合体は接合フェロモン (α -factor)からのシグナルにより負の活性制御を受けている。そのシグナルは接合フェロモンが受容体に結合することから始まり、三量体G蛋白、MAPキナーゼカスケード、転写因子を介して最終的にCdk inhibitorであるFar1蛋白質の発現を上昇させる。Far1はG1 cyclinであるCln1/2とCDC28の複合体に直接結合し、そのキナーゼ活性を阻害することにより細胞を細胞周期進行をG1期で停止させる。一方Far1による阻害がかからない場合にはCln1/2とCDC28の複合体の活性

化が起こり、転写活性化因子複合体であるSWI4/SWI6およびMBP1/SWI6の活性化を促し、S期進行に関わる遺伝子群の転写を行うと考えられる(2)。またB-type CyclinであるCln5/6もCDC28と複合体を形成しDNA複製の開始を制御する。この複合体の活性はStartを通過するまではCdk inhibitorであるp40^{Scl}が結合することにより阻害されている。Start通過後、p40^{Scl}はubiquitin経路により急速に分解され、CDC28/Cln5、CDC28/Cln6が活性化して細胞はS期へと進行する(3)。

このStartに対応する制御ポイントは動物細胞にも存在する。動物細胞のG1期進行はCdk4 (あるいはCdk6) /cyclinD、Cdk2/cyclinE、Cdk2/cyclinA複合体がこの順に活性化することによって引き起こされると考えられている(4)。このうちG1 cyclinの一つであるcyclinDは増殖因子の存在下で転写の活性化やCdk4あるいはCdk6との複合体形成が誘導されることが明らかとなっている(正の制御)。またCdk4(6)/cyclinD複合体はCdk inhibitorの一つであるp27 (KIP1) が直接結合することにより不活性化になる。さらにTGF- β といったanti-mitogenやDNA損傷を受けた細胞は別のCdk inhibitorのp16 (INK4/ MTS1/ Cdk4I) やp15 (INK4B) を誘導し、これらinhibitorがCdk4(6)/cyclinD/p27複合体からCdk4(6)を奪い不活性化する (Cdk4(6)/p16 またはCdk4(6)/p15 複合体)。余ったcyclinDは分解されるが、p27はさらにCdk2/cyclinE複合体と結合し不活性化する(5)。また以上のような外界からのシグナルによる制御機構とは別に、自身の染色体異常を感知した細胞はがん抑制遺伝子であるp53が活性化(安定化・四量体化・転写能上昇)し、p21 (Cip1/ WAF1/ Sdi1/ Cap20) を誘導する。p21はCdk2/cyclinAと結合し、その活性を阻害する(6)。このような二重三重の負の制御を受けた後に細胞はS期へと進行していくと考えられる (Fig. 1-1-3)。最終的に活性化されたCdk4(6)/cyclinD、Cdk2/cyclinE、Cdk2/cyclinA複合体は順次、がん抑制遺伝子として知られているRB (Retinoblastoma susceptible gene) 産物やその関連遺伝子産物 (p107、p130) をリン酸化していく。RB遺伝子産物はG1初期には低リン酸化状態で存在しており、転写活性化

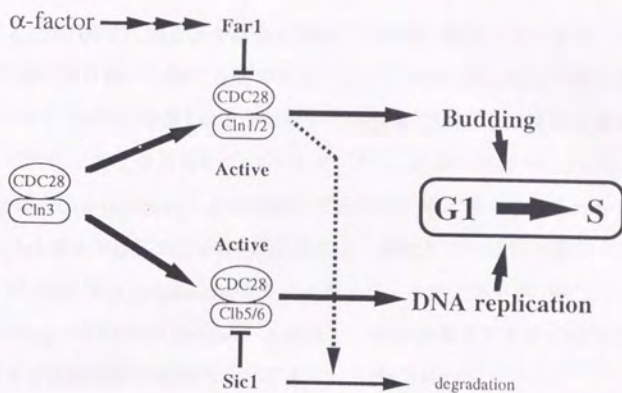


Fig. 1-1-2 *Saccharomyces cerevisiae*におけるG1/S制御

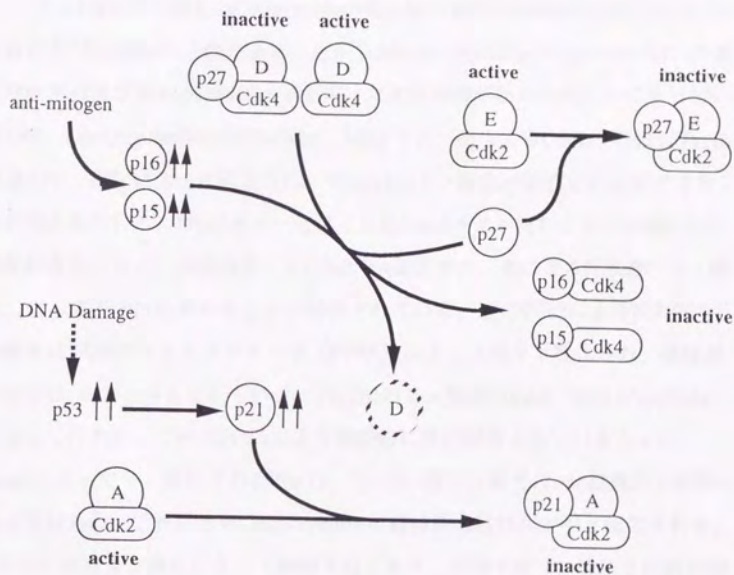


Fig. 1-1-3 Cdk inhibitorsによるCdk/cyclin複合体の多段階の負の制御

因子であるE2F/DRTF1複合体を結合し不活性な状態に維持しているが、Cdk/cyclin複合体により高リン酸化を受けたRBはE2F/DRTF1複合体を分離する (Fig. 1-1-4)。RBから解離したE2F/DRTF1複合体はS期進行に関わる遺伝子群の転写を活性化すると考えられている(7, 8)。さらにS期の進行中にもCdk/cyclin複合体やCdk inhibitorによる制御が行われていると考えられており、Cdk2/cyclinA複合体はE2F/DRTF1複合体をリン酸化しその活性を阻害すること、およびp21はDNA polymerase δ のアクセサリー蛋白であるPCNA (proliferating cell nuclear antigen) と結合し、DNA複製そのものを阻害していると示唆する実験結果が最近得られてきている(9) (Fig. 2)。

(2) G2期制御機構

G2/M期進行に関わるCdc2/cyclinB複合体の活性制御機構は主にCdc2のリン酸化及びcyclinBの分解によることが*Schizosaccharomyces pombe*を用いた遺伝学的解析及び*Xenopus*卵抽出液を用いた生化学的解析から明らかになっている(10)。Cdc2/cyclinBの活性はWee1, Mik1キナーゼによるCdc2のThr14, Tyr15残基のリン酸化によって阻害され、Thr161のリン酸化が活性化に必要であることが知られている。Wee1キナーゼはさらにNim1キナーゼによるC末側のリン酸化により、また一度活性化したCdc2/cyclinBキナーゼによるN末側のリン酸化によって不活性化されることが報告されている。逆にCdc2によるN末側のリン酸化は2A型のフォスファターゼ (PP2A) によって脱リン酸化され、活性型のWee1になると考えられている。Thr161のリン酸化はCAK (Cdk7/cyclinH) によって行われ、これはPP2Aにより間接的に負に制御されているらしい。Wee1によってリン酸化されたThr14, Tyr15の脱リン酸化はcdc25遺伝子産物によって行われ、これによりCdc2/cyclinBの最終的な活性化が引き起こされる。Cdc25もまたリン酸化によって制御されており、M期で高リン酸化され活性型になる。この高リン酸化をはじめに引き起こすキナーゼは不明だが、活性化しCdc2/cyclinBの最終的な活性化が起きるとCdc2/cyclinBキナーゼによりこの高

リン酸化が引き起こされることが知られている。またPP2Aが脱リン酸化を行いCdc25の不活性化を誘導する事が知られている。以上の結果はPP2AがWee1の活性化およびCAKとCdc25の不活性化を通じてM期への進行を阻害すること、また、まだ不明のキナーゼによるWee1の不活性化、Cdc25の活性化を通じてCdc2/cyclinBキナーゼが一度活性化すると、Cdc2/cyclinBキナーゼの強力な活性によりさらにWee1の不活性化、Cdc25の活性化を行い、さらにCdc2/cyclinBキナーゼを活性化するという正のフィードバックにより爆発的なキナーゼ活性の上昇を伴ってM期へと進行することを示している (Fig. 1-1-5)。細胞周期がM期の中期にまで進行するとubiquitin経路によるcyclinBの急速な分解が起き、Cdc2/cyclinBキナーゼは速やかに不活性化する。

以上のように細胞周期進行の直接のエンジンであるCdk/cyclin複合体やそれらの活性を調節しているキナーゼ、フォスファターゼ、Cdk inhibitorは明らかにされ解析が進められている。しかしながら細胞周期の進行にあわせてこれらのCdk/cyclin複合体調節因子の活性をさらに上流で制御している機構にはまだまだ不明な点が多く、これからの解析が待たれている。

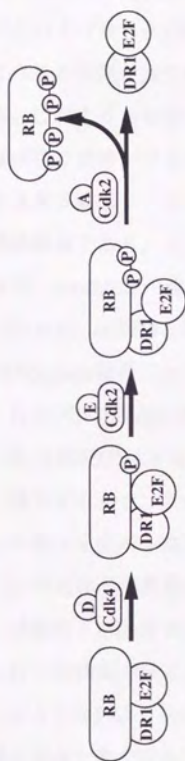


Fig. 1-1-4 CdkキナーゼによるRBのリン酸化

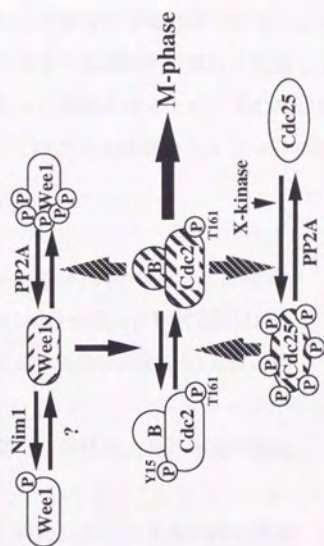


Fig. 1-1-5 G2/M期進行における
Cdc2キナーゼの活性制御機構

第二節 Checkpoint機構

細胞周期は自己を正確に複製し、それを2つに分けることにより自己を倍加させる機構である。しかしながら自己の複製に間違いが存在した場合、細胞は致死に陥ったり異数性あるいは変異した細胞が出現することになる。単細胞生物でこのようなことが起こるとその種が存続できないことを意味し、多細胞生物ではその変異が元で細胞増殖の制御が異常になり、がんを引き起こすことになる。このような事態をさけるために細胞には3つの機構が存在している。1つは損傷や異常が存在するときにそれらを修復する修復系である。2つ目は損傷や異常を検出し、その修復が終了するまで細胞周期の進行を阻害する細胞周期遅延機構である。3つ目は変異の入った細胞を除くためにその細胞を殺す細胞自殺 (apoptosis) 機構である(11)。このような機構のうち2つ目の機構が一般にCheckpoint機構と呼ばれている。

Checkpoint機構にはさらに、

- 1) G1期にDNA損傷があった場合に複製の開始を遅らせる機構
- 2) 未複製DNAあるいはDNA複製に誤りがあった際にDNA複製が完了するまで、または誤りが修正されるまでS期あるいはG2期で進行を止める機構
- 3) 染色体分離異常などのM期の進行に異常があった場合に細胞分裂終了を阻害する機構
- 4) 一度複製を終えた細胞がM期を通過しないまま次のDNA複製に入らないように制御している機構 (DNA再複製ブロック機構)

の四種があると考えられている (Fig. 1-2-1)。

(1) G1期で進行を止める機構

DNAに損傷が入ったままS期に進行するとその損傷が遺伝的に固定されてしまう。このような変異の遺伝的固定を防ぐための機構がG1/S進行の遅延機構であり、がん抑制遺伝子産物p53を介したCdk inhibitor p21の発現誘導が細胞周期停止の原因であることが明らかになっている。興味深いことに別のがん抑制遺伝子産物RBもまたG1/S進行に関わっており、p53と協調的に機能していることが明らかとなってきた。その一つの例にRBが欠損しているときにp53の存在量が増加するとapoptosisが誘導されることがある。この詳しい機構は不明だが、ともにG1/S進行のCheckpointに関わるがん抑制遺伝子産物がapoptosisの機構にも関与していることは興味深い。

(2) S期あるいはG2期で進行を止める機構

同じようにDNA複製が完了しないまま、あるいはDNAに誤りが存在したまま細胞分裂期に進行してしまうとその娘細胞は致死、あるいは何らかの変異が入ったものになる。これを防ぐ機構が二つ目のCheckpoint機構であり、その最終的な標的はCdc2キナーゼのTyr15であると考えられる(12)。Cdc2キナーゼのTyr15は活性中心内のATP-binding domainにあり、このTyrがリン酸化されるとCdc2のキナーゼ活性は阻害される。Tyr15のリン酸化・脱リン酸化の調節は*S. pombe*において詳しく調べられており、リン酸化はWee1とMik1の2つのキナーゼによって(13)、また脱リン酸化はCdc25によって行われている。未複製DNAや損傷DNAによるシグナルはおそらくは最終的にこれらWee1/Mik1、Cdc25に伝えられ、その活性を調節していると考えられているがまだその詳細は不明である。いくつかのUV、X-ray感受性株(rad変異株)ではDNAに変異の入った状態でM期へと進行することが知られており(14-16)、これらがDNA損傷の検出からWee1/Mik1、Cdc25の活性調節までをつなぐものである可能性が高い。

(3) M期で進行を止める機構

M期では凝縮した染色体が紡錘体によって均等に分配される。このとき紡錘体形成に異常が起こったり、染色体の不分離が起きたりすると娘細胞には遺伝情報の不均等分配が生じることになる。このようなことを防ぐために細胞はCdc2/cyclinBの活性を維持し、M期の終了を防ぐ機構を持っている。最近になって*Xenopus*卵抽出液を用いた生化学的手法により、このcyclinBの分解を防ぐ機構にMAPキナーゼの活性化が必要であることが明らかになった(17)。またと*S. cerevisiae*を用いた遺伝学的手法によっても解析が進められているが(18, 19)、現在のところその全体像は不明のままである。

(4) DNA再複製ブロック機構

四つ目の機構であるDNA再複製ブロック機構は1970年にRaoとJohnsonによって行われた細胞融合実験により提出された最も基本的な細胞周期制御機構の一つであり(Fig. 1-2-2)、この機構により細胞周期は決められた一定の順序で進行すると考えられる。

S期の細胞とG1期の細胞とを融合させた場合にG1期の核は直ちにDNA複製を開始する。このことからS期の細胞にはDNA複製を誘導する因子が存在することが示唆された。それに対しS期の細胞とG2期の細胞を融合させた場合、G2期の核は融合した細胞内にDNA複製を誘導する因子が存在するにも関わらず、再びDNA合成を開始せず、S期の核の複製終了を待って同時に核分裂に進行した。このことは一度DNA複製を終えた核は細胞分裂を終了するまで次のDNA複製を行わないように制御している機構(DNA再複製ブロック)が存在する事を示している(20)。最近になってこの機構を最終的に制御している分子はやはりCdc2キナーゼ及びcyclinBであることが明らかとなった(21, 22)。Cdc2/cyclinB複合体が細胞内に存在すると、細胞は自分がG2期にいると認識し、DNA複製には進行しない。しかしこの複合体が分解されるような状況に置くと

細胞はG2期にいと認識できず、DNA合成を開始してしまう。しかしながらこの複合体が存在していることを認識している機構や、G2期で停止している間この複合体を維持している機構は不明のままである。

一方、別の局面からDNA再複製ブロック機構にCdc2/cyclinB複合体以外の物質が関与しているという知見が得られている。これは*Xenopus*の卵抽出液を用いた*in vitro* DNA複製系を用いた研究から予測されたものである。この複製系において核膜を持ったDNAは一度複製を行うが、2回目の複製は誘導されない。しかしながら一度複製を終えた核を界面活性剤で処理し、核膜の一部を壊すと再びDNA複製を行えるようになる。この結果は*Xenopus*卵抽出液中には核膜を通過できない因子が存在しており、この因子はDNAの複製を誘導する活性を持つこと、DNA複製を終えると不活性型（あるいは分解され消失する）に変換されること、再びDNA複製を行うにはM期で核膜が崩壊し、染色体と細胞質が接触することでこの因子が細胞抽出液から補給される、あるいは活性型へと変換されることが必要であることを示している（Fig. 1-2-3）。Laskeyらはこの因子をLicensing factorと命名した(23-25)。この因子もまた最近になって精製され出芽酵母のミニ染色体維持に必要な遺伝子として初めてクローン化されたMCM3遺伝子産物(26, 27)のホモログであることが示された。しかしながらこの遺伝子産物がどのようにDNA複製の誘導に関与するのか、またその活性化や不活性化の機構はどのようなものか、さらにCdc2/cyclinB複合体との関連など、DNA再複製ブロック機構の全体像はまだ不明のままである。

以上のような細胞周期関連の成果は主に酵母の温度感受性株を用いた分子遺伝学的アプローチからであり、温度感受性株を特異的な阻害剤に置き換えての研究は重要な戦略として期待されるにも関わらず、現実にはそのような特異的阻害剤の開発が立ち遅れているために十分には行なわれていない。

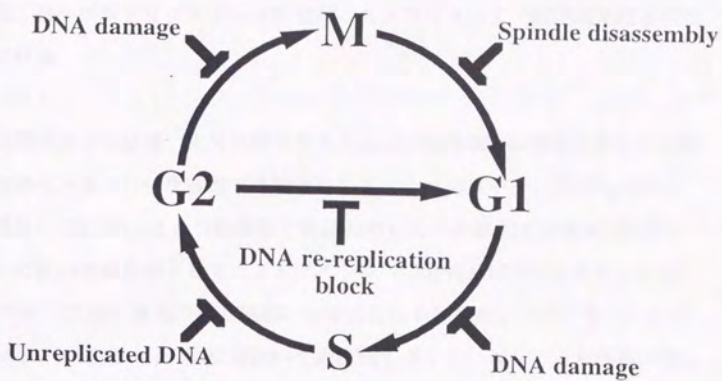


Fig. 1-2-1 チェックポイント機構

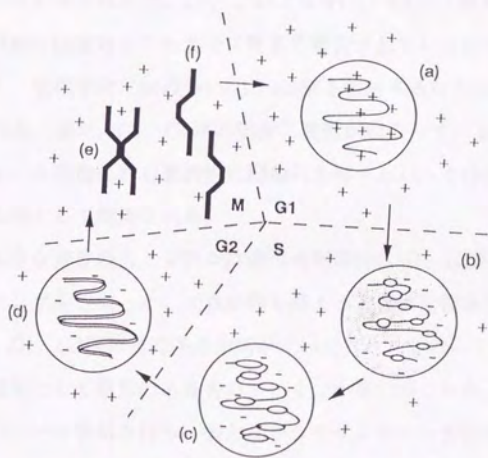


Fig. 1-2-2 Licensing Factorモデル

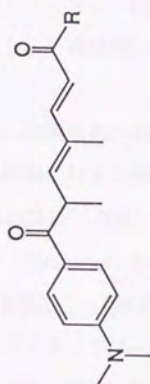
第三節 プロテインキナーゼ阻害剤、スタウロスポリン細胞周期阻害活性 発見の経緯

当研究室では以前、未分化型マウスFriend白血病細胞の増殖を停止させ成熟赤血球へと強力に分化誘導する物質としてトリコスタチン (TS; Fig. 1-3-1) を再発見し(28, 29)、また分裂酵母と数種のカビにのみ作用する極めて抗菌スペクトルの狭い抗真菌剤としてレプトマイシン (LM; Fig. 1-3-1) を発見した(30, 31)。これら二種の薬剤の動物細胞に対する作用を調べたところ、多くのトランスフォーム細胞に対しては選択的な細胞死を導くのに対し、正常細胞に対しては可逆的に増殖を停止させ、薬剤除去とともに再び増殖を開始させることが明らかとなった。この正常細胞に対する静的な増殖停止作用点がどこにあるのかをラット正常繊維芽細胞3Y1を用いて詳細に検討した結果、G1、G2期に特異的であることが示された(32, 33)。このようなG1、G2期に特異的な阻害剤はS期あるいはM期の阻害剤がこれまでに数多く報告されているのとは異なりほとんど例がなく、生化学的に謎の多いG1、G2期を解析する有力な手段となりうると考えられる。また、G1、G2期の制御に異常が起こっていると考えられるトランスフォーム細胞に対し選択的に細胞死を導くといった作用は、副作用の少ない抗がん剤として期待される。

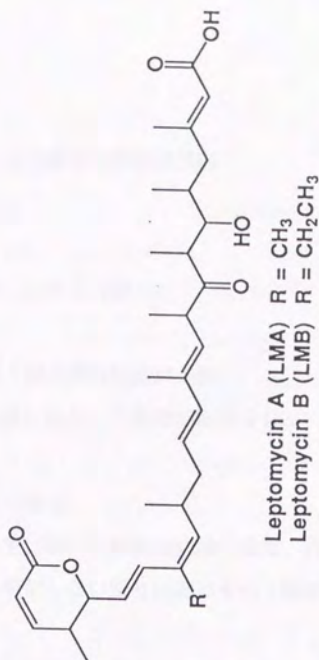
このような背景のもとで我々は細胞周期の特にG1、G2期特異的阻害剤のスクリーニングを行なった。10,000株を超える土壌微生物由来の活性物質を調べた結果、G1、G2期特異的停止作用が見いだされたものの中にプロテインキナーゼ阻害剤として報告のあるものはいくつか見いだされた。その中でもインドロカルパゾール骨格を持ち、強力なプロテインキナーゼ阻害剤として知られているスタウロスポリン (Fig. 1-3-1) はラット正常繊維芽細胞3Y1のG1、G2両期を可逆的に停止させ、特にG2停止からの薬剤除去により高い同調率を伴ったM期進行が観察され、これによりG2期同調培養系を確立することができた。

(34)。

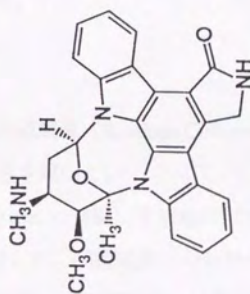
今回我々はスタウロsporinと同じインドロカルバゾール骨格を持つプロテインキナーゼ阻害剤K-252a (Fig. 1-3-1) がG1停止作用は示さず、G2停止作用のみを示し、さらにそのG2停止の間に次のDNA合成をM期を経ずに誘導することで細胞の倍数化を引き起こすこと、またスタウロsporinがトランスフォーム細胞に対してはK-252a同様、M期を完全に欠いた細胞周期の誘導を可能にすることを見いだした。また、スタウロsporinもK-252aも細胞周期をS期で停止させている細胞に対して作用させるとDNAの複製が終わらないうちにM期へと進行するいわゆる未成熟染色体凝縮 (PCC; Premaure chromosome condensation) を引き起こすことも見いだした。前者をM期の無い細胞周期とすれば、後者はS期の無い細胞周期が誘導されたことになる。このことはプロテインキナーゼを阻害することにより細胞周期の脱制御が引き起こされることを示している。本研究はこの二つのプロテインキナーゼ阻害剤によって引き起こされる細胞周期の脱制御について解析したものである。



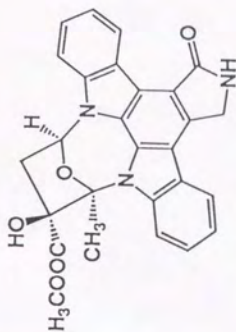
Trichostatin A (TSA) $R = \text{NHOH}$
 Trichostatin C (TSC) $R = \text{NHO-}\beta\text{-D-glucose}$



Leptomycin A (LMA) $R = \text{CH}_3$
 Leptomycin B (LMB) $R = \text{CH}_2\text{CH}_3$



Staurosporine



K-252a

Fig. 1-2-1

第2章 多倍数体細胞形成誘導

第1節 材料と方法

第1項 使用動物培養細胞株

本実験に使用した動物細胞株をTable 2-1-1に示す。

第2項 培地

本研究に用いた動物細胞用の培地、及びPBSの組成をTable 2-1-2に示す。

特に明記しない限り試薬はすべて国産化学の特級を用いた。

第3項 培養条件および細胞継代法

動物細胞の培養は5% CO₂ 37 °Cで培養を行った。接着系の細胞の用いるトリプシン溶液はトリプシン (DIFCO TRYPSIN 1:250 #0152-13-1) をPBSで2%になるように溶解し、ろ過滅菌したものをを用いた。

第4項 薬剤の細胞周期への効果検定

薬剤の動物細胞に対する作用の検定には非同調系 (Random Culture) およびEarly S期同調培養系 (次項) の2種の細胞系を用いた。

薬剤の溶液 (Methanol, Ethanol, DMSO etc. に溶解) を培地に対して1%、あるいは0.1%添加し、細胞への作用を検討した。細胞周期への効果の検討には主にフローサイトメトリーを用いた解析を用い、形態観察には倒立型顕微鏡DIAPHOTO (Nikon社)、および蛍光顕微鏡BH2 (Olympus社) を使用した。

Table 2-1-1

strains	source and phenotype	reference
3Y1-B clone1-6	rat, normal	(35)
HR-3Y1-2	rat, <i>v-Ha-ras</i> -transformed 3Y1	(36)
SR-3Y1-2	rat, <i>v-src</i> -transformed 3Y1	(36)
SV-3Y1-C66	rat, SV40 (SV 68C)-transformed 3Y1	(36)
Ad12-3Y1-Z19	rat, Adenovirus 12-transformed 3Y1	(36)
E1A-3Y1-1	rat, E1A (Adenovirus 12)-transformed 3Y1	(36)
Py-3Y1-S2	rat, Polyoma virus-transformed 3Y1	(36)
Balb/c-3T3	hamster, normal	(37)
HeLa S3	human, cancer origin	(38)
T24	human, cancer origin	(39)
MEL	rat, Friend lymphoma virus-transformed cell	(40)
FM3A	mouse, cancer origin	(41)
CHO	Chinese hamster ovary origin	(42)
BHK21/C13	hamster, normal	(43)
A431	human, cancer origin	(44)
WI-38	human, normal	(45)
WI-38 VA13	human, SV40-transformed WI-38	(46)
IMR-90	human, normal	(47)
CV-1	monkey	
COS-1	monkey, SV40-transformed CV-1	(48)
NIH/3T3	mouse, normal	(49)
<i>c-Raf1</i> -transformed NIH/3T3		(50)
<i>c-erbB2</i> -transformed NIH/3T3		(51)
<i>ras</i> -transformed NIH/3T3		

Table 2-1-2

12 % MEM ¹⁾

イーグルMEM培地 (日水 # 05900)	9.4 g
NaHCO ₃	2 g
Glutamine (日水 # 05908)	0.3 g

10 % Dalbecco modified MEM ²⁾

ダルベッコ変法イーグル培地 (日水 # 05919)	9.5 g
NaHCO ₃	2 g
Glutamine	0.3 g

10 % Ham F12 ³⁾

ハムF12培地 (日水 # 05910)	10.6 g
NaHCO ₃	2 g
Glutamine	0.3 g

2 % ES ⁴⁾

ES培地 (日水 # 05971)	9.7 g
NaHCO ₃	2 g
Glutamine	0.3 g

PBS (Phosphate buffer saline)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

1) それぞれ分別して溶解、オートクレーブした後、混合し、Fetal Calf Serum (Cell Culture Laboratories) を140 ml加える。

2) それぞれ分別して溶解、オートクレーブした後、混合し、Fetal Calf Serum を110 ml加える。

3) 溶解、混合した後、濾過滅菌し、Fetal Calf Serumを110 ml加える。

4) それぞれ分別して溶解、オートクレーブした後、混合し、Fetal Calf Serum を20 ml加える。

第5項 フローサイトメトリー用サンプル調製

フローサイトメトリー用のサンプルは(1)裸核染色あるいは(2)エタノール固定染色により調製した。裸核染色に用いた試薬の組成はTable 2-1-3に示す。測定はすべてEPICS C (Coulter社)を用い、488 nmの励起波長で行った。

(1) 裸核染色

接着系の細胞は、トリプシン処理により細胞浮遊液をつくり、 $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞を遠心で集めた後、また浮遊系の細胞は $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞を直接遠心で集め、50 μ l PBS-NP40溶液に懸濁し、500 μ l NP-PI溶液を加えて染色した。

(2) エタノール固定染色

裸核染色の場合と同様の方法で細胞を集め、300 μ l PBSに懸濁後、 -20°C にしたエタノールを700 μ lをゆっくりと加えて固定し、 -20°C に保存した。固定した細胞はPBSで二度洗った後PBS-PI溶液を加えることで染色した。

第6項 分裂指数 (Mitotic Index) の決定

接着系の細胞では、細胞がM期に進行すると数石上の細胞形態がM期特有の丸く盛り上がった形態に変化する。この形態変化を利用し、分裂指数 (M期の細胞の割合) を顕微鏡観察により決定した。

第7項 チミジンの取り込み

DNA合成期はM期と異なり、形態的にはG1期や、G2期と区別することができない。そのためS期進行はチミジンのDNAへの取り込み量を定量することで確認した。Corning社製の24穴マルチウェルプレート (# 25820) に3Y1細胞 (2 % MEM) をまきEarly S期同調培養を行った後、 $[\text{H}]$ -methyl-thymidine

(Amersham TRK.758) を500 $\mu\text{Ci}/500 \mu\text{l}/\text{well}$ になるように添加し、1時間のパルスラベルを2時間おきにした。取り込みは培地を除き、2回PBSで洗った後に200 μl の10 % TCAを加えて終了させた。取り込み量はまず、サンプルから

TCAを除き200 μ lの1N NaOHを加えることにより溶解して、バイアルに移し、200 μ lの1N HClを加え溶液を中和した後、5 mlのATOMLIGHT (Du Pont, NEF-968) を加え、液体シンチレーションカウンターによって測定した。

第8項 ヒストンH1キナーゼ活性測定

G2/M期進行にはCdc2/cyclinB複合体による強力なH1キナーゼ活性が必要ながことが知られている。またCdkキナーゼは*S. pombe*の*suc1* 遺伝子産物p13^{suc1}と結合することが知られている。この性質を利用し、細胞抽出液からCdkキナーゼを精製し、*in vitro*でこの活性を測定した。用いた溶液の組成はTable 2-1-4に、方法はFig. 2-1-1に示す。細胞抽出液の蛋白量はLowry法により定量し、精製に用いるサンプルの蛋白量をそろえた。またアフィニティー精製に用いたp13^{suc1}-Sephadex beadはDr. Laurent Meijer, Dr. Andre Picardより分与していただいた。基質にはヒストンH1 type S-III (Sigma, H 5505) 及び γ -ATP (Amersham, PB 10218) を用いた。

第9項 p34^{cdc2}の定量

Cdc2遺伝子産物p34^{cdc2}の細胞周期進行による蛋白量の変化、およびそのチロシン残基のリン酸化レベルを抗Cdc2抗体 (MBL, MT-18-3)、および抗リン酸化チロシン抗体Py20 (ICN, 69-137) を用いたウェスタンブロット法により定量した。細胞抽出液からのp34^{cdc2}の精製にはp13^{suc1}-Sephadex beadを用い、Bead bufferで洗った後にSDS sample bufferに懸濁、熱処理したものを15% SDS-PAGEで泳動後PDVF膜 (Millipore, IPVH 000 10) にブロットした。ウェスタンブロットの処理、及び発色はウェスタンブロットキット (Amersham, RPN 1021) を用いた。

Table 2-1-3

PBS-NP40

Nonidet P-40 (BDH Gallard-Schlesinger Chemicals, #56009)

	0.1	ml
PBS	100	ml

NP-PI

Citrate-3Na	1	g
NaCl	0.58	g
Nonidet P-40	1	ml
PI (Propidium Iodide; Sigma, P 4170)	50	mg
Distilled Water	1000	ml

PBS-PI

PI	20	mg
PBS	1000	ml

Table 2-1-4

Homogenize Buffer (pH 7.2)

MOPS (Sigma, M 9381)	25 mM
β -Glycerophosphate (Sigma, G 6251)	60 mM
Nitrophenylphosphate (Sigma, N 3254)	15 mM
MgCl ₂	15 mM
EGTA (Sigma, E 4378)	15 mM
DTT (ナカライテスク 141-12)	2 mM
NaF (和光純薬 192-01972)	0.1 mM
Vanadate (Aldrich, 22,059-0)	0.1 mM
Proteinase Inhibitor Cocktail ¹⁾	0.1 %

Bead Buffer (pH 7.4)

NaCl	250 mM
Tris-HCl (Sigma, T 1503)	50 mM
EGTA	5 mM
EDTA	5 mM
NaF	5 mM
Nonidet P-40	0.1 %
Proteinase Inhibitor Cocktail ¹⁾	0.1 %

Buffer C

MOPS (pH 7.0)	25 mM
β -Glycerophosphate	60 mM
Nitrophenylphosphate	30 mM
MgCl ₂	15 mM
EGTA	15 mM
DTT	1 mM
Vanadate	0.1 mM

1) Proteinase Inhibitor Cocktail

Leupeptine (Sigma, L 2023)	10 mg/ml
Aprotinine (Sigma, A 1153)	10 mg/ml
SBTI (Soy bean trypsin inhibitor; Sigma, T 9128)	10 mg/ml
Benzamidine (Sigma, B 6506)	100 mM

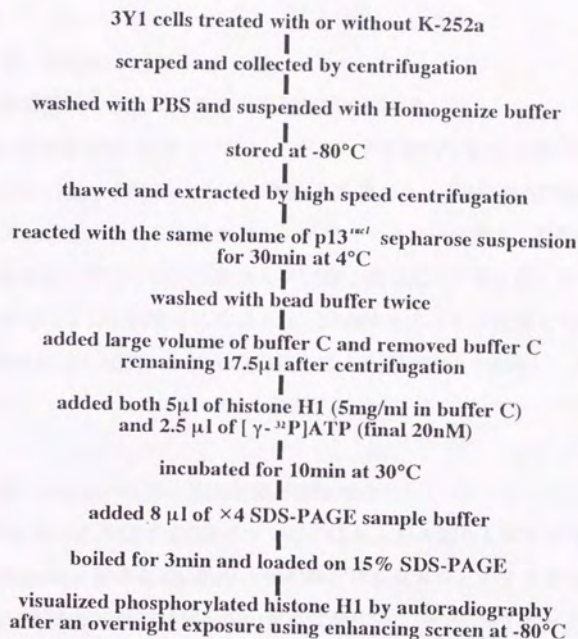


Fig. 2-1-1 p13suc1-beadを用いたCdc2キナーゼアッセイ

第10項 蛍光抗体染色

細胞のチューブリン染色には抗チューブリン抗体、FITC結合抗マウス抗体を用いた。細胞はカバーガラス上で培養し、固定は-20℃メタノールを用いた。核との2重染色にはPBS-PIを用いた。

第11項 染色体染色法

細胞の染色体の染色にはカルノア固定法を用いた。

M期の細胞を細1.5 mlサンプリングチューブを用いて集め（場合によってはColcemidを1 µg/ml添加してM期の細胞を集積した）、0.55% KCl溶液で室温で20分膨潤させた。次に3倍量のカルノア液（メタノール75%、酢酸25%溶液）を加え、30分以上固定した。一度カルノア液で洗った後、水を薄く乗せたスライドガラスにたらし細胞をはじけさせ、染色体を広げる。乾燥した後にギムザ染色（Merck, Art. 9204）あるいはDAPIやHoechst 33258で染色し、顕微鏡で観察した。

第12項 Cdkキナーゼの免疫沈降と活性測定

p13^{suc1}を用いる方法ではCdkキナーゼのほとんどと結合してしまうために、ある特定のcyclinと結合したCdkキナーゼの活性を見ることができない。このため各cyclinに対する特異的抗体を用い免疫沈降することでCdkキナーゼ複合体の分離を行った。各種抗cyclin抗体はSantaCruz社より購入した。免疫沈降に用いた溶液及び方法は文献(52)に従った。

第13項 コロニー形成効率の判定

薬剤を処理した細胞の増殖、及びコロニー形成能を次の方法で判定した。

細胞数はBüker-Türk型の計数板を用いて2連で数え、平均を採った。コロニー形成能の判定は、 2×10^2 個または 4×10^1 個の細胞をそれぞれ4枚の60 mm シャーレ (Corning 25010) にまき、一週間培養した後PBSで洗った後にコロニーを1%クリスタルバイオレット (関東化学1級) 溶液で染色した。

また顕微鏡観察用のコロニーの染色には1%クリスタルバイオレット、またはギムザ染色液を用いた。

第14項 使用薬剤

プロテインキナーゼ阻害剤としてはH7 (生化学工業 120805)、Genistein (EXTRASYNTHES 1097)、Sangivamycin、Toyocamycinを、またインドロカルバゾール系プロテインキナーゼ阻害剤としてスタウロスポリン、K-252a、K-252b、K-252c、KT5720、KT5822およびRK-286Cを用いた。Sangivamycin、ToyocamycinおよびRK-286Cは理化学研究所抗生物質研究室、長田主任研究員より分与していただいた。またRK-286Cを除くインドロカルバゾール系プロテインキナーゼ阻害剤は協和発酵から分与していただいた。

代謝阻害剤としてHydroxyurea (Sigma, H 8627) Actinomycin D (Sigma, A 1410) Colcemid (Demecolcine; Sigma, D 7385) Cycloheximide (Sigma, C 6255) Methotrexate (Sigma, A 6770) Vinblastin (Sigma, V 1377) を用いた。

第2節 結果

第1項 序 -DNA re-replication block について-

細胞周期の調節におけるもっとも重要な目的とは正確にDNAを複製し、それを娘細胞に分配し、子孫細胞へ正しい遺伝情報を伝えることにある。このため真核生物の体細胞ではDNA複製（S期）と染色体の分配（M期）の間に準備期であるG1、G2期を設けており、一連の細胞周期の順序（G1 → S → G2 → M → G1）はかなり厳密に制御されている。もしこの制御が異常をきたし、一度DNA複製を完了した細胞がM期を経ることなく次のDNA合成を行なうと一般に2倍体である動物細胞は4倍体あるいはそれ以上の倍数性を獲得するようになる。このような細胞は致死とは言えないまでも増殖にかなり障害を持つと考えられ、このような事態を防ぐために一度DNA複製を終えた細胞はM期を経なければ次のDNA合成が始められない機構、いわゆるDNA再複製ブロック

（DNA re-replication block）と呼ばれる機構が存在すると考えられる。このようなM期へのS期の依存機構はバランスの取れた増殖を行なうための根幹となる調節機構の一つと考えられるが、現在までのところその詳細は不明のままである。

以前、我々は細胞周期阻害剤のスクリーニングで強力なプロテインキナーゼ阻害剤スタウロスポリンが細胞周期のG1、G2期の進行を阻害することを見いだしたが(34)、今回スタウロスポリンの構造類似体K-252aが、面白いことに上に述べたDNAの再複製を防ぐ機構（DNA re-replication block）を解除し、細胞の倍数化を引き起こすことが分かったため、この作用機作についてスタウロスポリンと対比しながら検討した。

第2項 プロテインキナーゼ阻害剤の細胞周期への作用

細胞周期のG1、G2期に特異的な阻害剤をスクリーニングしたところ、プロテインキナーゼ阻害剤として報告のあった物質がいくつか見いだされた。そこで既知のプロテインキナーゼ阻害剤に細胞周期阻害の活性があるかどうかをラット正常繊維芽細胞3Y1を用いて解析した。対数増殖期の3Y1細胞に各種プロテインキナーゼ阻害剤を加え、24時間後の細胞周期の進行をフローサイトメトリーを用いてDNA含量を定量することにより調べた。用いた薬剤の構造をFig. 2-2-1に示す。

プロテインキナーゼCの阻害剤として報告のあるH7(53)、Sangivamycin(54)にはG1期停止活性が、ホスファチジルイノシトールキナーゼの阻害剤として報告のあるToyocamycin(55)にはG2期停止活性が見いだされた。しかしチロシンキナーゼ阻害剤として知られているGenistein(56)には細胞周期特異的な活性は見いだされなかった (Table 2-2-1)。

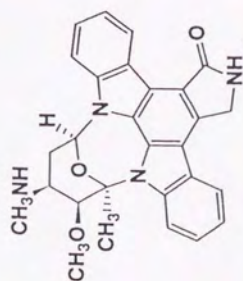
我々の研究室でG1、G2期特異的細胞周期停止活性の見いだされたスタウロスポリンは抗カビ活性物質として最初に報告され(57)、またプロテインキナーゼCの阻害剤として知られている物質であるが(58)、0.02 μM の低濃度でG1停止、0.2 μM の高濃度でG2停止活性が見られた。一方スタウロスポリンの構造類縁体であり、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤として最初に報告されたK-252a(59)では1 μM で4 Cより多いDNA含量を持つ細胞が蓄積していた。現在までにスタウロスポリンやK-252aの様なインドロカルバゾール骨格を持つプロテインキナーゼ阻害剤は数多く知られている。その中でも構造的に極めて類似しているスタウロスポリンとK-252aの細胞周期進行に対する作用が異なっていることは興味深い。そこで次に現在知られている他のインドロカルバゾール系プロテインキナーゼ阻害剤 (Fig. 2-2-2) の細胞周期への作用を3Y1細胞を用いたEarly S期同調培養系を用いて検討した。

Inhibitor	Concentration μM	Percent cell population				Relative cell number
		2C	2-4C	4C	>4C	
None	-	56	23	21	0	267
H7	100	73	9	18	0	91
Sanguinamycin	3.2	76	8	16	0	177
Genistein	37	47	18	35	0	101
Staurosporine	0.2	14	2	79	5	69
	0.02	87	5	8	0	168
K-252a	1	2	4	32	62	126

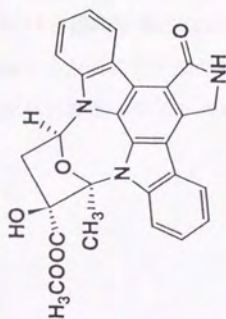
Table 2-2-1 プロテインキナーゼ阻害剤の細胞周期への効果

対数増殖期の3Y1細胞に薬剤処理後、24時間目のDNA含量の分布を示す。

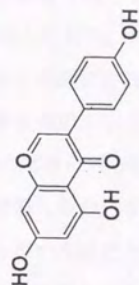
Relative cell numberは薬剤を処理する前の細胞数を100としたときの24時間目の細胞数



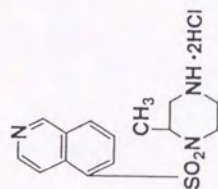
staurosporine



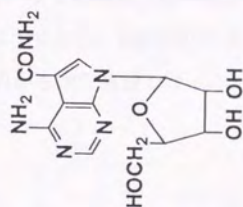
K-252a



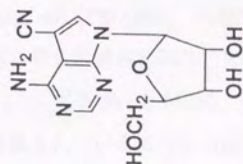
genestein



H7



sangivamycin



toyocamycin

Fig. 2-2-1 プロテインキナーゼ阻害剤の構造

ヒドロキシ尿素 (HU) 除去と同時に各種阻害剤を添加し、24時間後のDNA含量を見たものがFig. 2-2-3に示したフローサイトグラムである。スタウロスポリンの作用と同様にK-252cは高濃度 (2 $\mu\text{g/ml}$) でG2停止、低濃度 (0.5-1 $\mu\text{g/ml}$) でG1停止作用を示したのに対し、他の構造類似体K-252b、KT5720、KT5822は細胞の増殖に何ら影響を与えなかった。K-252b、KT5720、KT5822の3つの薬剤は細胞に取り込まれないことが報告されているので*in vivo*では細胞に対して作用しないためだと考えられる。しかしながらK-252aとRK-286Cでは、スタウロスポリンで見られた低濃度でのG1停止作用は観察されず、1 μM の高濃度でG2停止作用が見られるとともに、24時間以内にさらに次のDNA合成が誘導され、8C DNA含量を持つ細胞が蓄積していた。このような一つの細胞におけるDNA含量の増加はCytochalasin Bなどによる細胞質分裂の阻止によっても引き起こされることが知られている。そこでK-252a、RK-286CによるDNA含量の増加がどのようなメカニズムによるものかを次に検討した。

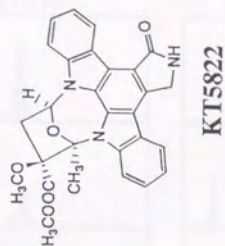
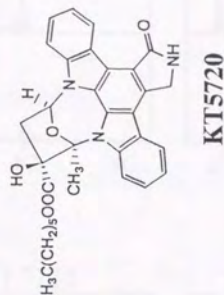
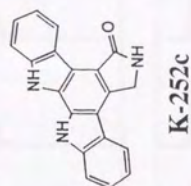
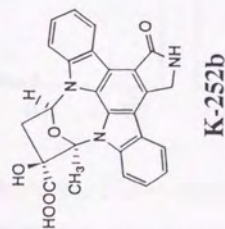
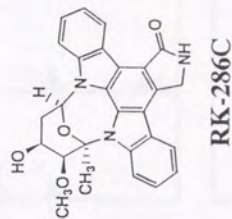
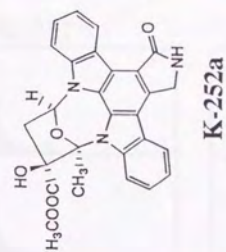
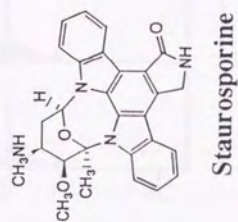


Fig. 2-22 インドロカルバゾール骨格を持つ
プロテインキナーゼ阻害剤の構造

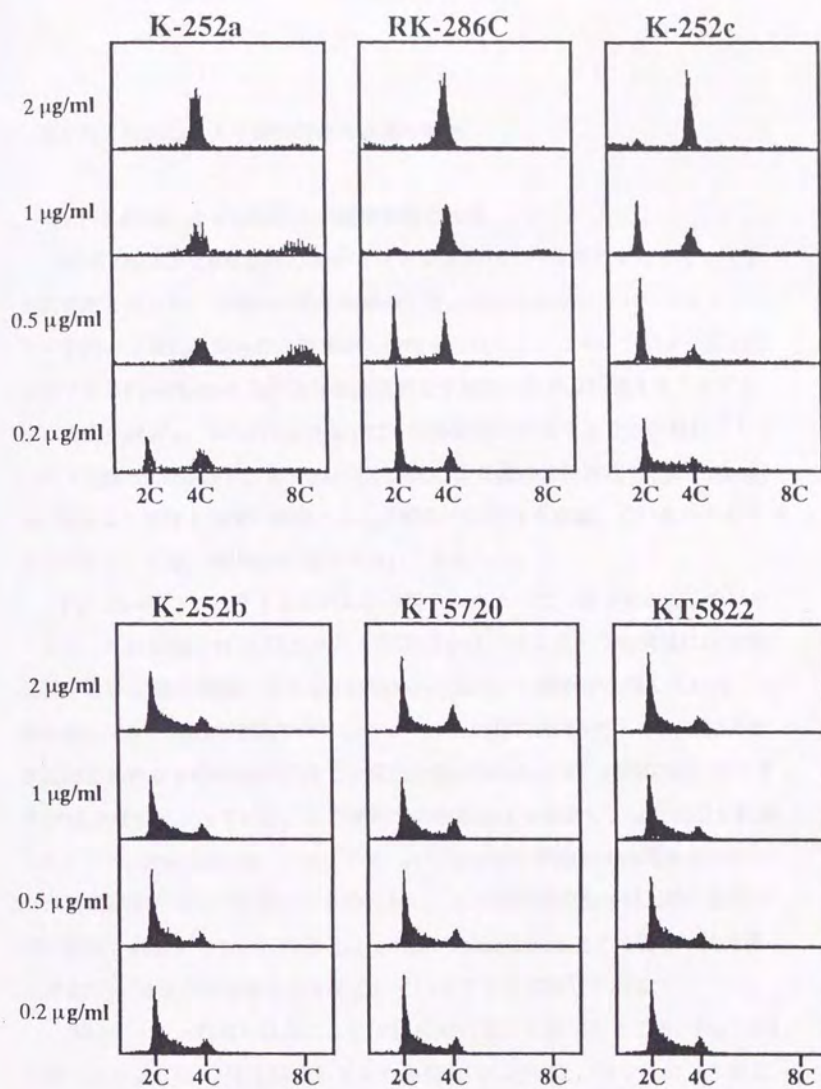


Fig. 2-2-3 インドロカルバズール系プロテインキナーゼ阻害剤の
細胞周期への作用 (Early S期同調培養系を用いて解析)

第3項 K-252aによる細胞倍数化機構の解析

(1) K-252aによるM期のない細胞周期の誘導

前項でK-252aとRK-286Cは他のインドロカルバゾール系のプロテインキナーゼ阻害剤と異なり、細胞の倍数化を誘導した。我々は以前にフローサイトメトリーを用いて細胞周期への各種薬剤の作用を検討したところ、アクチン重合阻害剤であるCytochalasin Bが核分裂は阻害せず細胞分裂のみ阻害することで2核の細胞を誘導し、DNA含量の上では4倍体細胞を形成することを見いだしていた (data not shown)。K-252aとRK-286Cによる細胞の倍数化もCytochalasin Bを処理した細胞と同様の機構によって細胞の倍数化を誘導しているのかどうかについて、Early S期同調培養系を用いて検討した。

Fig. 2-2-4のフローサイトグラムから明らかなように、薬剤を添加しないコントロールの細胞ではHU除去とともにDNA合成が始まり、9時間目には細胞分裂を行いG1期の細胞に当たる2CのDNA含量をもつ細胞が出現していた。それに対してK-252a処理細胞ではコントロールと同様にHU除去とともにDNA合成は行なわれるものの12時間後でも細胞分裂は行なわれず、18時間後にはつぎのDNA合成が始まっていた。この過程での形態変化を観察し、分裂指数を計算したところ (Fig. 2-2-5 B)、コントロールではM期の細胞が9時間をピークとしたM期細胞の増加が観察されるのに対し、K-252a処理細胞ではM期の細胞が全く観察されなかった。このことはK-252aがCytochalasin Bとは異なり核分裂を伴わずにDNAの再複製を引き起こしていることを示唆している。

次にチミジンの取り込みによりDNA合成の進行を調べたところ、Fig. 2-2-4で見られたように、HUを除去してから最初のDNA合成と、コントロールおよびK-252a処理細胞での二回目のDNA合成までの間隔はほぼ同じであった (Fig. 2-2-5 A)。このことは細胞周期の全体としての進行には変化がなく、G2期からつぎにDNA複製を開始するまでの間にラグが存在していることを示している。

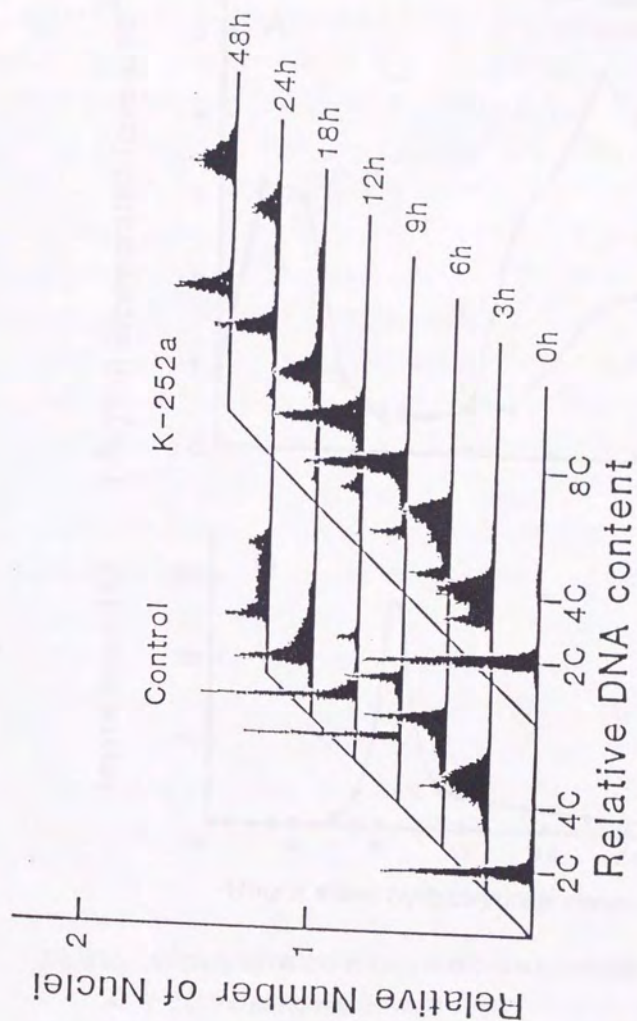


Fig. 2-24 K-252aの細胞周期への効果
Early S期同調培養系を用いた解析

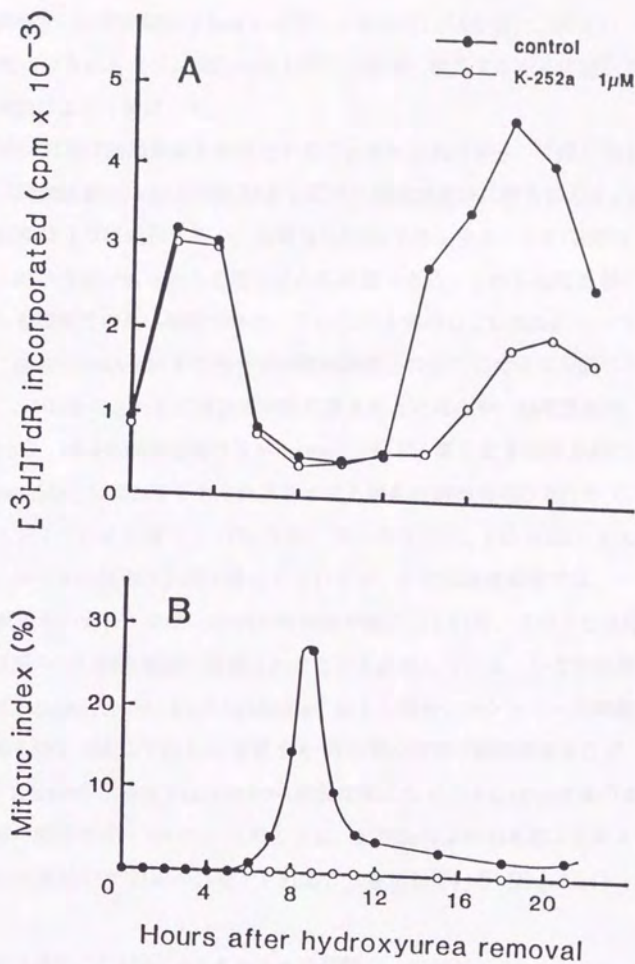


Fig. 2-2-5 K-252a処理細胞でのチミジンの取り込みと分裂指数

A チミジンの酸不溶性画分への取り込み

B 分裂指数

Early S期同調培養系を用いて解析

K-252a処理細胞ではM期が観察されないで、一回目のDNA合成と二回目のDNA合成の間に見られるラグが細胞周期上のどの時期に相当するかを代謝阻害剤との共存実験によって検討した。

細胞周期のG1期は血清刺激を必要とすることが知られており、実際に3Y1細胞のEarly S同調培養系においてHU除去と同時に無血清培地に置き換えるとS期、G2期、M期は正常に進行するが、分裂後のG1期で停止する。またG1期は蛋白質合成、RNA合成がもっとも必要とされる時期であり、これらの阻害剤に対してもっとも感受性の高い時期である。このことを利用してK-252aによって誘導される二回目のDNA合成までのラグが細胞周期上のどこに当たるか調べた (Fig. 2-2-6)。HU除去とともに無血清培地に置き変えた場合や、M期阻害剤であるColcemid、RNA合成阻害剤であるActinomycin D、蛋白質合成阻害剤であるCycloheximideとK-252aをそれぞれ共存させた場合の細胞周期の進行をフローサイトメトリーにより調べた。Fig. 2-2-6に示したように、Colcemidを加えた場合コントロールの細胞はM期で停止しているが、K-252a処理細胞ではColcemidを加えない場合と同様にDNAの再複製が起こっていた。このことはK-252aによりM期のない細胞周期が誘導されたことを意味している。一方無血清処理あるいはActinomycin D、Cycloheximideを加えた場合、コントロール細胞では一度M期を経て分裂してから2C含量をもつG1期の状態で細胞周期進行が停止したが、K-252a処理細胞では次のDNA複製は起こらず、4C DNA含量のままで細胞周期の進行は止っていた。このことは、K-252aにより引き起こされるDNA再複製には機能的なG1期が必要とされることを示している (Fig. 2-2-7)。

(2) 倍数化過程におけるCdc2キナーゼの挙動

最近の研究から分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*の*cdc2*がコードする遺伝子産物p34^{cdc2} (以下Cdc2と略す) がcyclin Bと結合し、以前からMPFあるいはヒストンH1キナーゼと呼ばれていたM期を進行させるキナーゼを構成することが明かにされている。K-252aによって誘導される細胞周期ではこのH1キナー

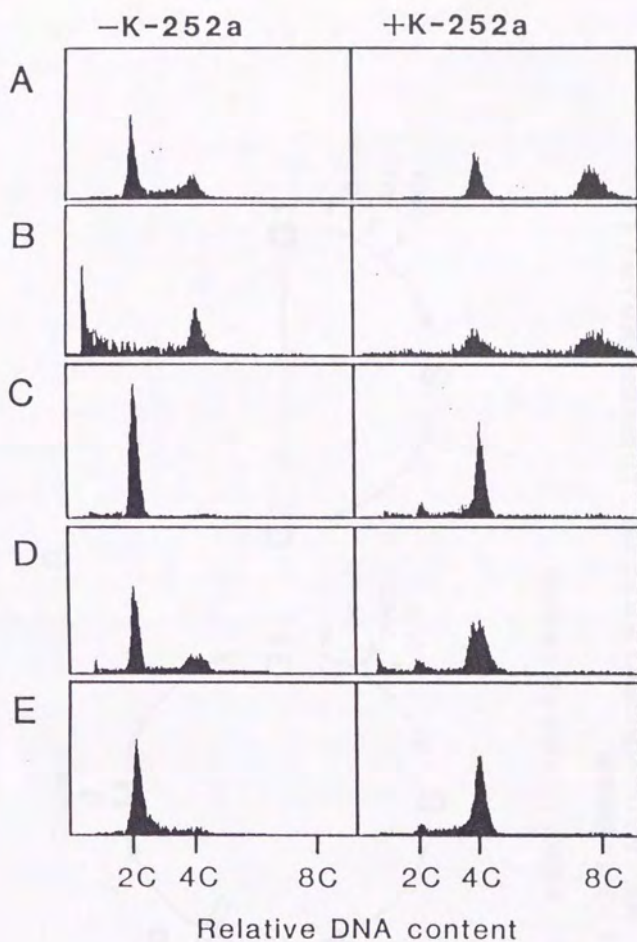


Fig. 2-2-6 K-252aによる倍数化への培養条件の影響

- A. 12 % MEM; B. 12 % MEM + Colcemid 1 μ g/ml;
 C. 0.2 % MEM; D. 12 % MEM + Actinomycin D 10 ng/ml;
 E. 12 % MEM + Cycloheximide 0.2 μ g/ml

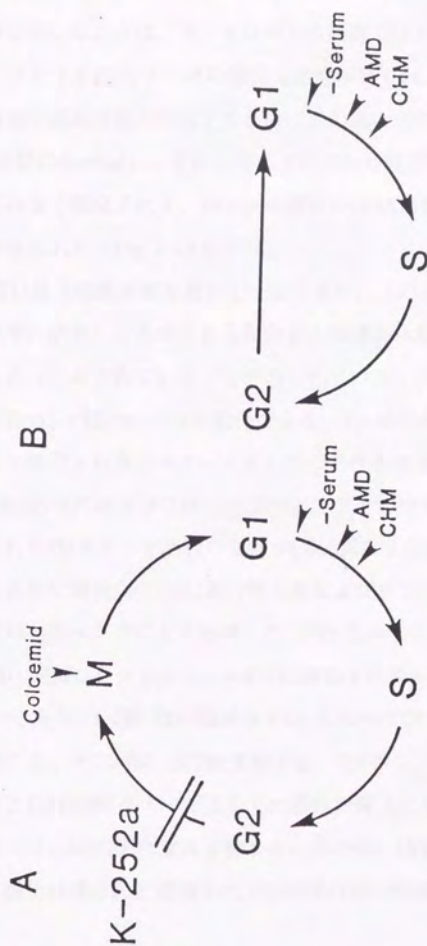


Fig. 2-27 K-252aによって誘導される細胞周期

A. 正常な細胞周期

M期、あるいはG1期の進行を阻害する処理により細胞周期の進行が停止する。

B K-252aによって誘導されたM期の無い細胞周期

G1期の進行を阻害する処理により細胞周期進行は停止するが、M期の阻害はかからない。

ゼの活性化するM期が存在しないため、その活性には興味を持たれる。そこでH1キナーゼの活性はどうなっているのかについてEarly S期同調培養系を用いて次に検討した。

Fig. 2-2-8に示したように、コントロールの細胞ではM期に当たる9から12時間目をピークとするH1キナーゼの強力な活性が見られ、Colcemidを添加した細胞ではM期で細胞周期が停止するためにこの高い活性が維持される (Fig. 2-2-8 Control及びColcemid)。それに対してK-252a処理細胞ではM期における強力な活性化は全く観察されず、18~24時間目のDNA複製の時期に対応して弱い活性化が見られた (Fig. 2-2-8 K-252a)。

Cdc2の蛋白量は細胞周期を通じて一定であり、その活性制御はcyclinと呼ばれる細胞周期に依存して合成される蛋白質との複合体形成およびCdc2蛋白質のリン酸化によってなされていることが示されている。Cdc2のリン酸化の中で重要なものはTyr15とThr161のリン酸化である。Tyr15残基はキナーゼの触媒部位にあり、リン酸化されるとキナーゼとしての活性を失う。またThr161残基のリン酸化はCdc2の最終的な活性化に必須であることが知られている。K-252a処理細胞で見られたH1キナーゼ活性の変動がCdc2蛋白質の量の変動によるものかを検討するために細胞内のCdc2蛋白質の量およびチロシンリン酸化の様子をウエスタンブロッティングにより検討した (Fig. 2-2-9)。

Early S期に同調したコントロールの3Y1細胞では脱リン酸化された形のCdc2がメインであり、G2期 (HU除去後6 h) になって次第にチロシン残基のリン酸化が起こる。次にM期 (HU除去後9 h) でチロシン残基の急速な脱リン酸化が起こると同時にH1キナーゼとしての活性が最大になる。しかしながらK-252a処理細胞ではCdc2の蛋白量は変動しないものの、M期に起こるはずのチロシンの脱リン酸化はほとんど観察されず24時間の長い時間の間に次第に減少していた。

Effect of K-252a on activation of p34^{cdc2} kinase in G2/M

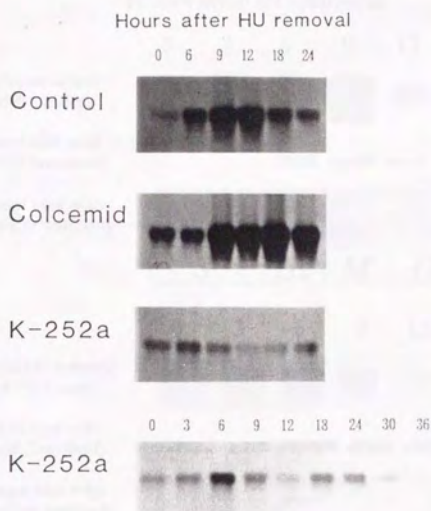


Fig. 2-2-8 細胞内Cdc2キナーゼ活性の変動

Early S期同調培養系を用い、細胞内Cdc2キナーゼ活性をヒストンH1を基質として測定した。

Control: 薬剤無処理

Colcemid: 0 時間目にColcemid 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加

K-252a: 0 時間目にK-252a 1 μM 添加

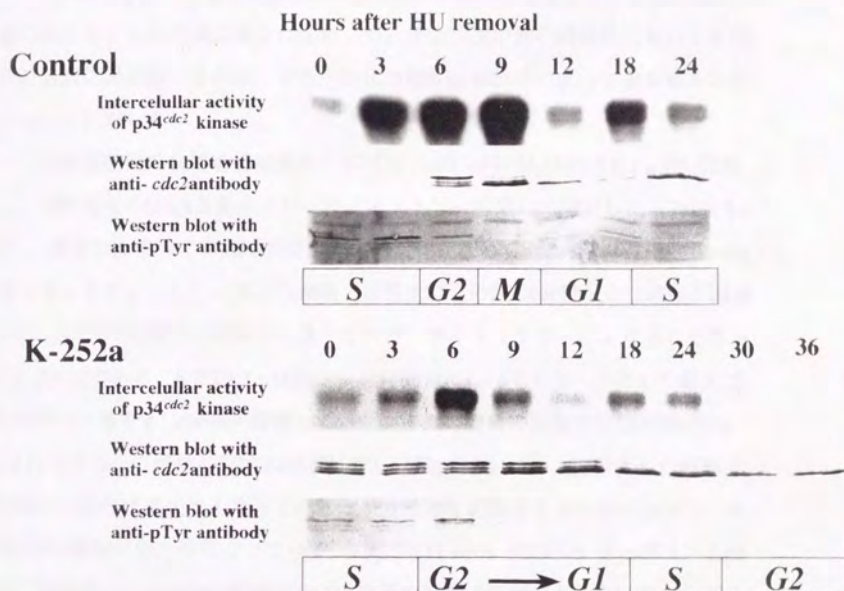


Fig. 2-2-9 細胞内Cdc2キナーゼの蛋白量及び

チロシン残基のリン酸化

Early S期同調培養系を用い、細胞内Cdc2キナーゼ活性をヒストンH1を基質として測定した。また蛋白量、チロシン残基のリン酸化レベルをウエスタンブロットにより定量した。

Control: 薬剤無処理

K-252a: 0 時間目にK-252a 1 μ M添加

(3) 他の細胞系への作用

3Y1細胞を用いた解析ではHU除去後96時間 K-252aを処理しても8C DNA含量の細胞までしか蓄積は見られなかった。そこで次に他の細胞系においても同様の倍数化が進行するのか、また倍数化の程度は細胞系によって差があるのかについて検討した。

対数増殖期の各種培養細胞系にK-252a 1 μ M (FM3A細胞は0.4 μ M) 添加し、48時間後のDNA含量をフローサイトメトリーを用いて測定した (Table 2-2-2)。測定したすべての細胞系で細胞の倍数化が認められ、特に3Y1細胞をv-srcでトランスフォームしたSR-3Y1細胞では最大32 CのDNA含量をもつ細胞が蓄積した。SR-3Y1細胞での倍数化の様子をフローサイトメトリーにより示したのがFig. 2-2-10である。K-252a 1 μ M添加後48時間目には16 Cをピークとした最大32 CのDNA含量をもつ細胞が蓄積していた。またこの時の形態の位相差像がFig. 2-2-11である。二倍体のSR-3Y1細胞に対し (Fig. 2-2-11 A)、倍数化した細胞では核が一核のまま大きくなっているばかりでなく細胞質も全体的に大きく、親株の3Y1細胞に似た形になっている (Fig. 2-2-11 B)。実際にチューブリンと核の二重染色からK-252a処理細胞では未処理の細胞では観察されないチューブリンのネットワークが再構成されていることが分かる (Fig. 2-2-11 D, E)。

また倍数化した細胞の染色体数をカルノア固定により調べたところ、実際に染色体数の増加が観察された (data not shown)。

Cell line	Percent Cell Population (%)					
	2C	2-4C	4C	>4C	>8C	>16C
3Y1	5	7	43	45	0	0
SV-3Y1	6	8	1	78	48	6
SR-3Y1	2	1	4	93	82	45
HR-3Y1	4	6	8	82	66	23
Balb/c-3T3	7	9	7	77	49	19
BHK21	11	10	40	39	8	4
HeLa S3	8	10	52	12	11	0
T24	3	8	15	74	10	0
FM3A	12	10	17	61	22	4

Table 2-2-2 各種培養細胞系に対するK-252aの作用

対数増殖期の各細胞にK-252a 1mM (FM3Aのみ0.4 mM) 添加し、48時間後のDNA含量をフローサイトメトリーにより定量した。

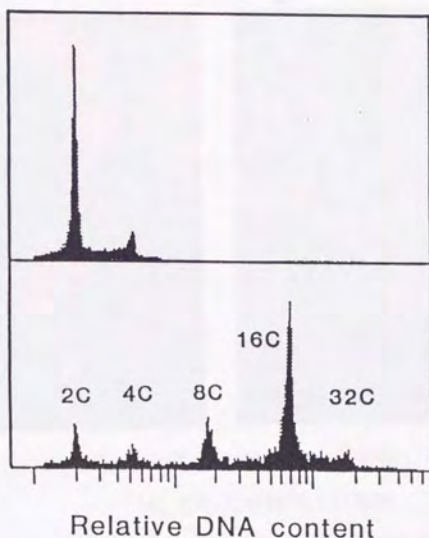


Fig. 2-2-10 SR-3Y1細胞の倍数化

upper panel; 正常 2 倍体細胞

lower panel; K-252aにより倍数化した多倍体細胞

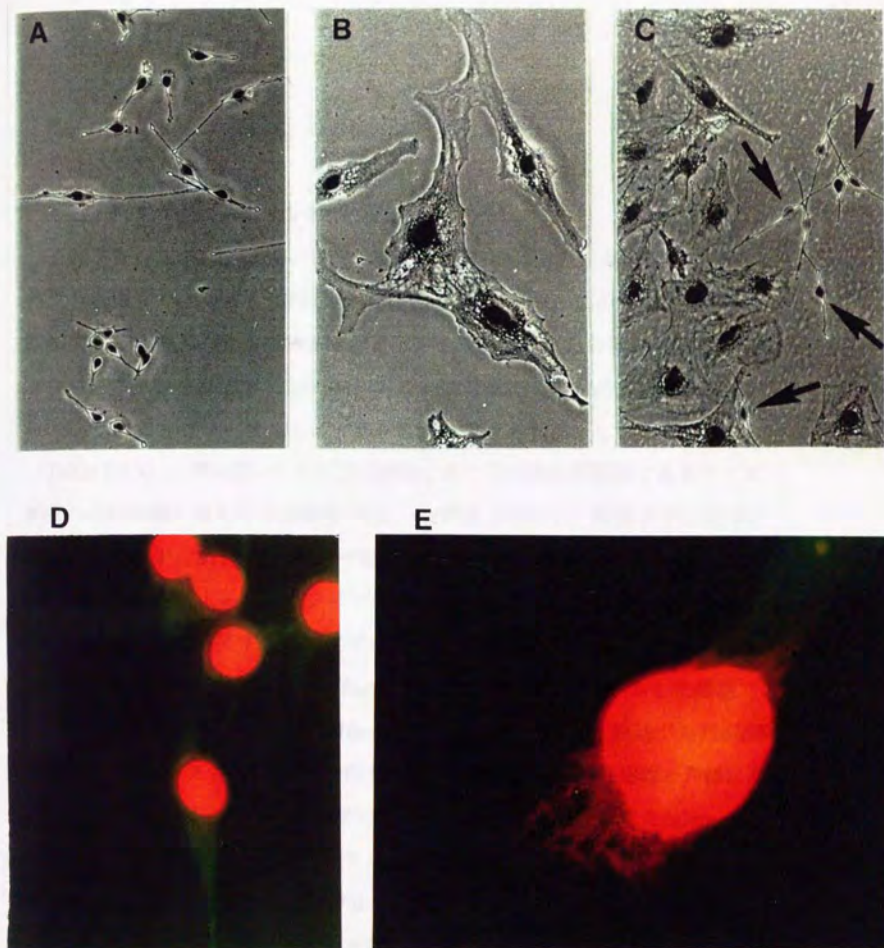


Fig. 2-2-11 K-252aにより倍数化したSR-3Y1細胞の形態

(A), (D): 二倍体SR-3Y1細胞

(B), (E): K-252a処理により倍数化したSR-3Y1細胞

(C): (A)と(B)の混合

(A), (B), (C): ギムザ染色

(D), (E): 核（オレンジ）と微小管（緑）の二重染色

第4項 スタウロスポリンの多倍数体細胞形成誘導

(1) スタウロスポリンの他の細胞系への作用

スタウロスポリンはラット正常繊維芽細胞3Y1に対して高濃度でG2期停止作用、低濃度でG1期停止作用を示す (Fig. 2-2-12) (34)。この作用は細胞の種類に関わらず普遍的な作用であるかどうかを対数増殖期の各種培養細胞系にスタウロスポリンを高濃度 (100 nM) あるいは低濃度 (10 nM) 添加し、48時間後のDNA含量をフローサイトメトリーを用いて測定することで検討した (Table 2-2-3)。興味深いことに3Y1細胞と同じ正常繊維芽細胞であるマウス Balb/c-3T3細胞に対しては高濃度でG1、G2期停止作用を、低濃度でG1期停止作用を示したが、3Y1細胞を*v-src*や様々なDNA virus (adenovirus, SV40, polyoma virus) によってトランスフォームした細胞に対しては低濃度では細胞周期に何ら影響を与えず、高濃度ではK-252aと同様に細胞の倍数化を引き起こした。しかしながら3Y1細胞を*v-Ha-ras*によってトランスフォームした細胞であるHR-3Y1細胞やNIH/3T3 *ras*、*v-Ha-ras*が高発現しているヒト膀胱がんT24細胞、*c-erbB-2*でトランスフォームしたNIH/3T3細胞に対しては正常細胞と同様に高濃度でG1、G2期停止作用、低濃度でG1期停止作用を示した。またAdenovirusの早期発現遺伝子であるE1Aでトランスフォームした細胞 (形態的には正常細胞) に対しては低濃度でのG1期停止作用は見られたが、高濃度ではG1、G2期停止作用は見られず、細胞死を引き起こしていた。このことをまとめるとスタウロスポリンは正常細胞および*ras*、*c-erbB-2*でトランスフォームした細胞に対しては高濃度 (100 nM) でG1、G2停止作用、低濃度でG1期停止作用を示すが、*ras*以外でトランスフォームした細胞に対しては低濃度でのG1期停止活性を示さず、高濃度でK-252a同様に細胞の倍数化を引き起こすことを示している。このことは*ras*以外のがん遺伝子やDNA virusによってトランスフォームされた細胞ではG1、G2期の性質が正常細胞とは大きく違っていることを示していると

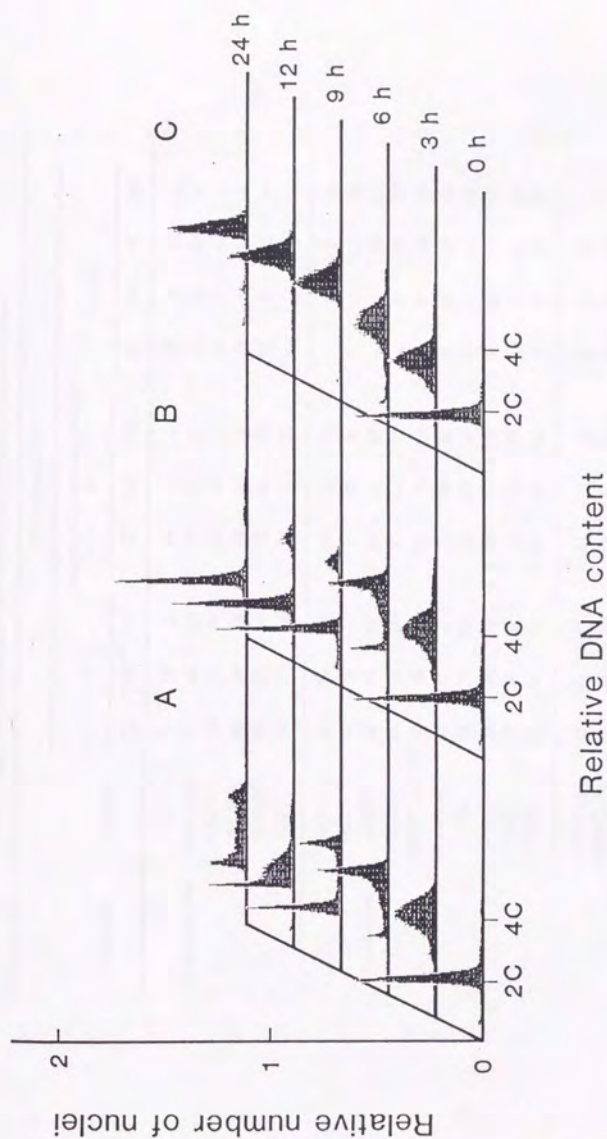


Fig. 2-2-12 3Y1細胞に対するスタウロスポリンの作用 (Early S期同調培養系を用いた解析)

- A 薬剤無処理
- B スタウロスポリン低濃度 (20 nM) 処理
- C スタウロスポリン高濃度 (200 nM) 処理

Table 1 Effect of staurosporine on distribution of DNA content of various cell lines

Phenotype	Cell line	Cell population (%)									
		0		Staurosporine concentration (nM)				100			
		2C	2-4C	4C	2C	2-4C	4C	2C	2-4C	4C	>4C
Nontransformed	3Y1	51	24	25	86	8	6	20	8	71	1
	Balbc-3T3	65	24	11	85	7	8	44	11	44	0
	NIH3T3	80	12	9	85	5	10	43	13	44	0
	WI-38	68	18	14	76	11	13	73	6	21	0
	IMR-90	76	10	14	75	8	17	73	5	22	0
	CV-1	54	20	26	76	5	19	Dead			
Transformed	SV-3Y1	53	29	17	62	21	18	7	10	7	76
	Py-3Y1	60	18	21	71	20	8	3	4	37	56
	Ad-3Y1	63	16	20	60	21	19	4	9	30	57
	SR-3Y1	51	23	26	57	21	22	4	3	6	87
	NIH3T3-ra1	55	28	17	62	9	16	11	5	60	24
	WI-38 VA13	51	22	27	52	24	23	9	10	38	54
	COS-1	56	22	22	58	19	23	4	3	10	83
	HeLa-S3	53	28	19	59	22	19	7	14	12	67
	MEL	45	34	20	48	31	20	10	13	14	62
	FMA	40	36	24	59	28	13	11	11	29	47
	HR-3Y1	45	21	17	83	2	4	36	5	39	7
	NIH3T3-ras T24	54	23	23	76	9	16	55	11	34	0
		54	25	19	90	9	1	44	5	51	0

Table 2-2-3 スタウロスポリンの各種動物細胞株への作用

対数増殖期の細胞に薬剤処理後、48時間目のDNA含量の分布を示す。

考えられる。

このトランスフォーム細胞のスタウロスポリンに対するG1期での停止点の消失および倍数化について、K-252aの場合と同様にSR-3Y1細胞を用いて解析した。

(2) G1期停止点の消失と、細胞の倍数化

スタウロスポリンの作用の濃度による違いをさらに詳しく調べるために、正常細胞の3Y1細胞とv-srcでトランスフォームしたSR-3Y1細胞を用いて次の実験を行なった。

対数増殖期の二つの細胞系にスタウロスポリンを0、5、10、20、50、100 nM添加し、18時間後のDNA含量をフローサイトメトリーにより求めた (Fig. 2-2-13)。スタウロスポリン低濃度 (5-20 nM) 存在下では、3Y1細胞ではほとんどすべての細胞がG1期で停止しているのに対し、SR-3Y1細胞ではこのような細胞周期特異的な停止は観察されなかった。また高濃度 (50-100 nM) 存在下では3Y1細胞はG2停止しているが、SR-3Y1細胞では倍数化が起きていた。このことからスタウロスポリンによるトランスフォーム細胞の倍数化は正常細胞がG2停止する濃度範囲で引き起こされ、SR-3Y1細胞の場合の至適濃度は約 50 nM であることが明らかになった。

次にこの濃度でのSR-3Y1細胞の倍数化の様子を時間をおって調べた (Fig. 2-2-14)。3Y1細胞ではスタウロスポリン添加後12時間でG1、G2期での停止が起こっているのに対し、SR-3Y1細胞では6時間後からすでに8CのDNA含量をもつ細胞が出現し、48時間後には最大32CのDNA含量をもつ細胞が蓄積していた。またこの時の形態はFig. 2-2-15に示すようにK-252aの場合とは全く異なり、核だけが大きく盛り上がり細胞質は縮れた形態をしている。これはスタウロスポリンにはマイクロチューブルを束状 (bundle) 化する性質があるためだと考えられる(60)。

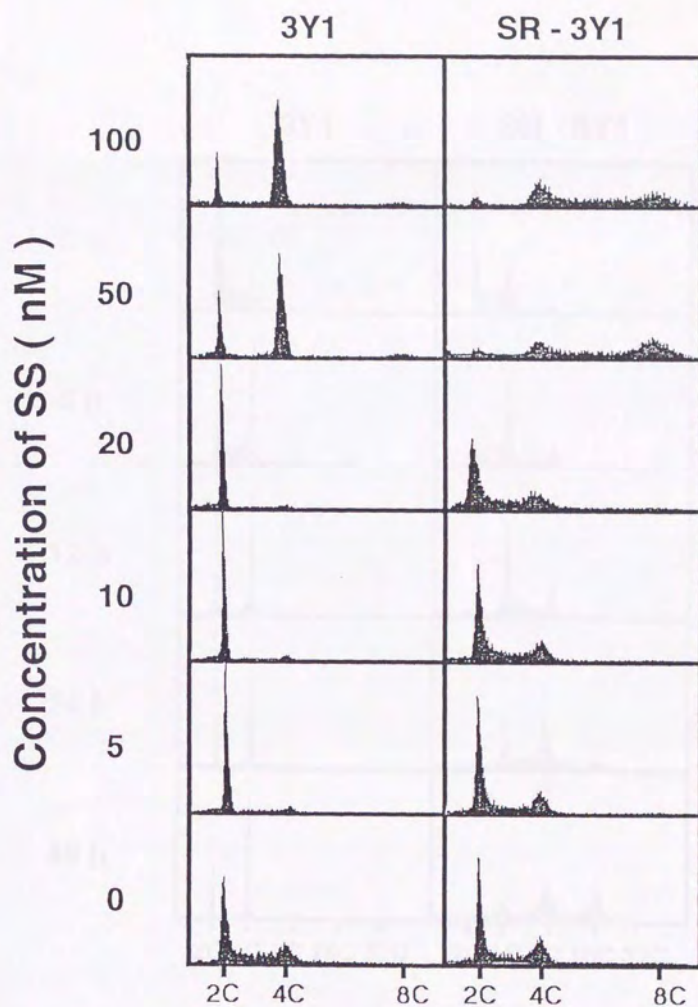


Fig. 2-2-13 スタウロスポリンの濃度効果

対数増殖期の3Y1細胞、SR-3Y1細胞に各濃度のスタウロスポリンを添加し、18時間後のDNA含量をフローサイトメーターにより測定した。

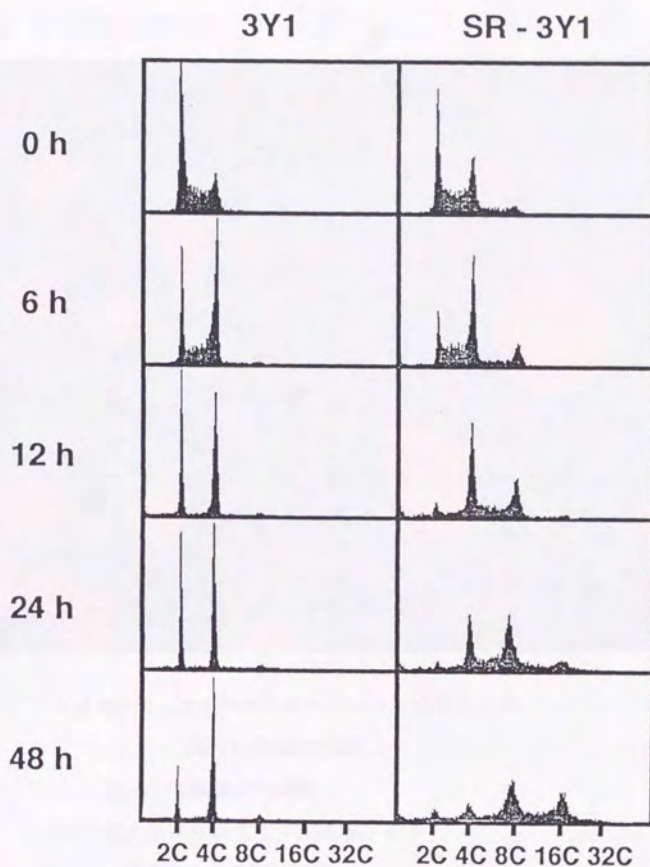


Fig. 2-2-14 スタウロスポリンによって誘導される細胞の倍数化過程
 3Y1細胞、SR-3Y1細胞にスタウロスポリン50 nM添加し、倍数化
 の過程をフローサイトメーターで測定した。

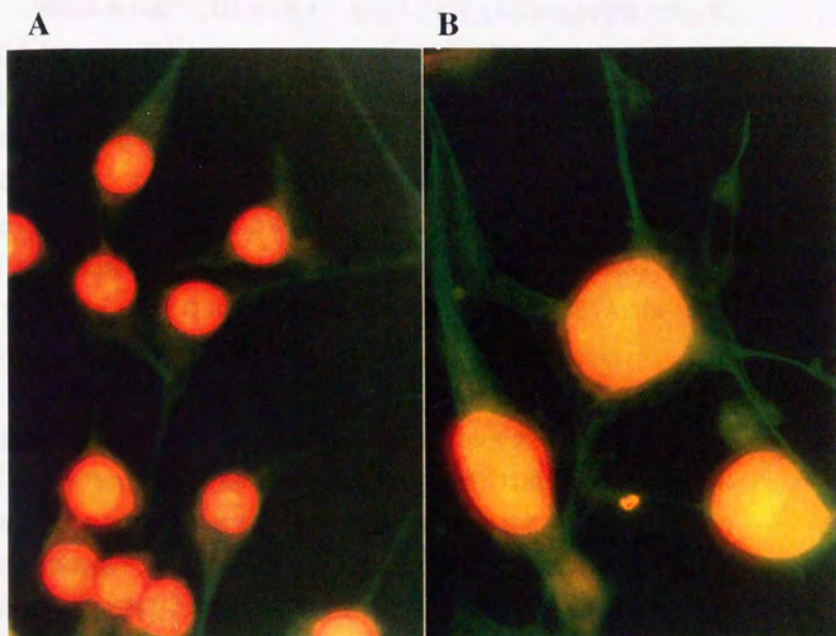


Fig. 2-2-15 スタウロスポリンにより倍数化した

SR-3Y1細胞の形態

(A): 二倍体SR-3Y1細胞

(B): スタウロスポリン処理により

倍数化したSR-3Y1細胞

核（オレンジ）と微小管（緑）の二重染色

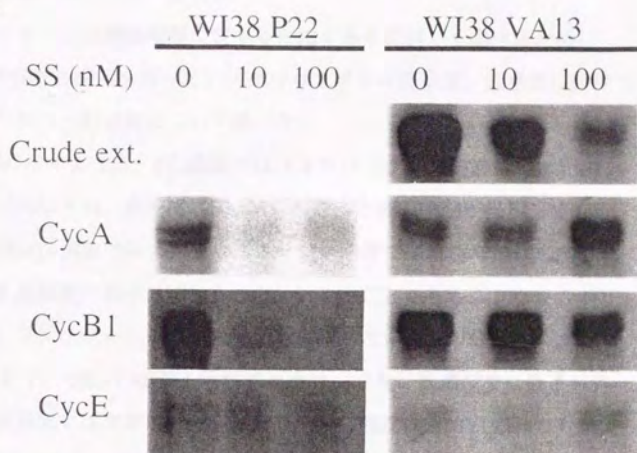
(3) Cdkキナーゼ活性の変動

細胞周期の進行にはCdc2キナーゼ以外にも多くのCyclin依存性キナーゼ、Cdkキナーゼが関与している。スタウロスポリンは強力なプロテインキナーゼ阻害剤であり、細胞内では多くのプロテインキナーゼの活性が阻害されている。おそらく細胞周期進行に必須のCdkキナーゼも同様に阻害を受けると考えられるが、トランスフォーム細胞で見られた倍数化進行にはDNA複製が行われること、すなわちS期の進行に必要なCdk2/cyclinAの活性が必要である。そこで次に倍数化過程におけるCdkキナーゼ活性をヒト正常繊維芽細胞WI-38 P22株（以下P22と略す）とそのSV40トランスフォーム細胞であるWI-38 VA13株（以下VA13と略す）を用いて検討した。

Fig. 2-2-16 Aに示すように正常細胞P22ではスタウロスポリン低濃度、高濃度ともに15時間の処理でcyclinA、cyclinB1依存性のキナーゼ活性（それぞれCdk2/cyclinA、Cdc2/cyclinB1複合体の活性に相当）は消失していた。それに対しトランスフォーム細胞VA13では低濃度スタウロスポリン存在下ではどのcyclin依存性キナーゼの活性もそれほど変化がなく、高濃度スタウロスポリン存在下では薬剤を処理していないときに比べcyclinA依存性キナーゼ活性は逆上昇していた。

Cdk2/cyclinA複合体は細胞内でさらにp21、PCNA等と複合体を形成していることが知られている。P22とVA13の間で見られたcyclinA依存性キナーゼ活性の差は、この複合体の違いによりスタウロスポリンに対する感受性が変化したためである可能性がある。そこで対数増殖期にあるP22とVA13からcyclinA依存性キナーゼ複合体を精製し、スタウロスポリンに対する感受性を*in vitro*で観察したところ（Fig. 2-2-16 B）、その阻害率には差が見られなかった。このことは複合体の差によって活性化が起こるのではなく、複合体の活性をさらに上流で制御している機構にスタウロスポリンに感受性の違うキナーゼが関与していることを示唆している。

A.



B.

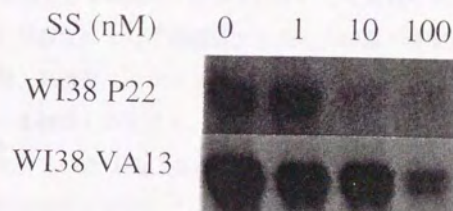


Fig. 2-2-16 倍数化過程におけるCdkキナーゼ活性の変動

A スタウロスポリン処理15時間後の細胞内

Cdkキナーゼ活性

B cyclinA依存性キナーゼに対するスタウロスポリン

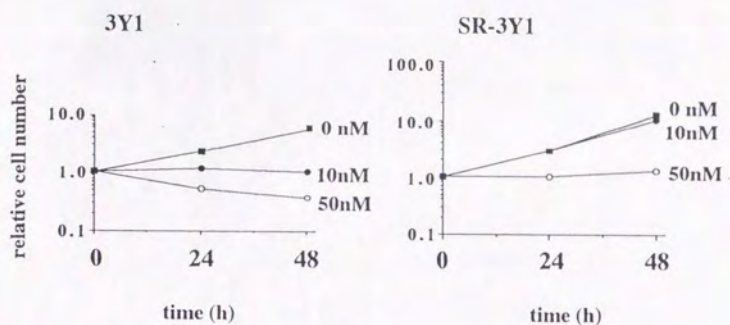
のin vitro阻害活性

(4) 倍数化細胞のコロニー形成能

スタウロスポリンの細胞増殖に対する作用をさらに詳しく調べるために3Y1細胞およびSR-3Y1細胞を用いて、スタウロスポリン高濃度、低濃度における増殖およびコロニー形成能について調べた。

Fig. 2-2-17に示すように、3Y1細胞ではスタウロスポリン低濃度 (10 nM) で完全に増殖が抑制され、高濃度 (50 nM) になると死ぬ細胞が出現してくる。しかしながらSR-3Y1細胞ではスタウロスポリン低濃度では細胞増殖は抑制されず、高濃度でも細胞数の減少は認められない。このことからスタウロスポリンは低濃度でトランスフォーム細胞の増殖を抑制しないことが分かる。またコロニー形成能は3Y1、SR-3Y1細胞ともにスタウロスポリン低濃度では低下が見られないが、高濃度では次第に低下しており、その程度はSR-3Y1細胞の方が大きい。3Y1細胞でコロニー形成能が低下しているのは増殖曲線からこの濃度のスタウロスポリンが細胞にダメージを与えているためだと考えられる。それに対してSR-3Y1細胞では明らかな細胞死は観察されないにも関わらずコロニー形成能が減少しており、倍数化によって増殖能力を失った細胞が増加していることを示している。実際、高濃度スタウロスポリン処理をした一つの高倍数体細胞から生じたコロニーを観察したところ、細胞の大きさの異なるヘテロの細胞からなるコロニーが生じていた (Fig. 2-2-18)。これは高倍数体細胞がM期には入ったときに多くの染色体が存在しているために正しい均等な二分裂が起こらず、不等分裂が生じた結果染色体の数のバランスが崩れ、大きさの異なる細胞が生じたと考えられる。

A



B

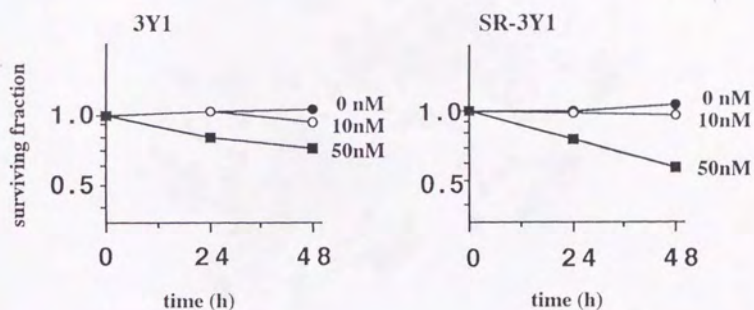


Fig. 2-2-17 細胞増殖、及びコロニー形成能に対する
スタウロスポリンの効果

A 細胞増殖に対する効果

B コロニー形成能に対する効果



Fig. 2-2-18 倍数化SR-3Y1細胞から生じたコロニー形態

A 二倍体から生じたコロニー

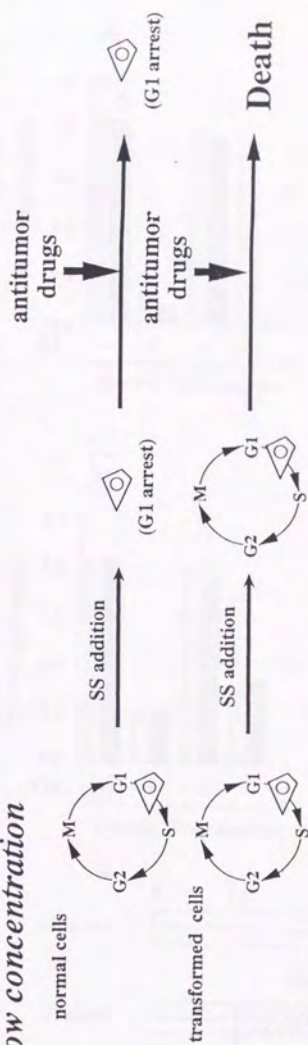
B 多倍体細胞から生じたコロニー

(5) スタウロスポリンを用いた新しいタイプの化学療法の検討

現在までにがんの治療においてよく用いられている薬剤はアドレマイシンといったDNA topoisomeraseの阻害（S期の阻害）や、ビンブラスチンのようなチューブリンの脱重合剤（M期の阻害）といったS期やM期の現象を標的としたものである。がん細胞では細胞増殖が正常組織の細胞と比較して一般により昂進しているが、免疫系などの一部の正常な組織においてもがん細胞同様、細胞は盛んに増殖している。そのためこれらの薬剤は正常細胞の増殖をも阻害し、時として重篤な副作用の原因となっている。逆に正常細胞に対するこれらの薬剤の作用を防ぐことによって、より安全でより副作用の少ない治療法が開発できる可能性がある。第3項で述べたようにスタウロスポリンは正常細胞の細胞周期進行をG1、G2期で阻害し、多くのトランスフォーム細胞の細胞周期進行を阻害しない。このスタウロスポリンの様に選択性のある薬剤を利用することで、正常細胞にはダメージを与えず、トランスフォーム細胞のみを選択的に殺す新しいタイプの化学療法が考えられる。ここではスタウロスポリンを用い、そのような化学療法の可能性を検討した。

Fig. 2-2-19に示すように2つの方法が考えられた。1つは高濃度のスタウロスポリンを用いる方法で、正常細胞はG1、G2期で細胞周期進行が停止するが、がん細胞は倍数化が進行することを利用し、第3項で述べたような倍数化による生残率の低下を引き起こす方法である。この方法はFig. 2-2-17で示したように正常細胞に対してもスタウロスポリンがダメージを与えることから、少なくともスタウロスポリンはあまり効果があるとはいえない。もう一つの方法はスタウロスポリンを前処理することにより正常細胞をG1期に止め、その間にS期あるいはM期に作用する既存の抗がん剤を添加することにより、細胞周期進行が停止している正常細胞は抗がん剤の攻撃を受けないが、細胞周期の進行しているがん細胞は抗がん剤の攻撃を受けて死滅するという方法である。この方法について検討した。

at low concentration



at high concentration

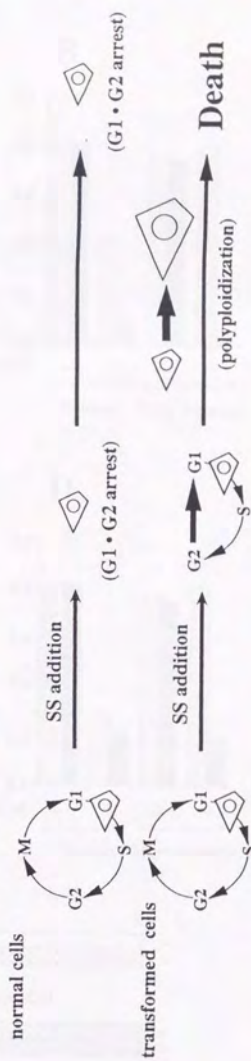


Fig. 2-2-19 スタウロスポリンを用いた新しい化学療法のモデル

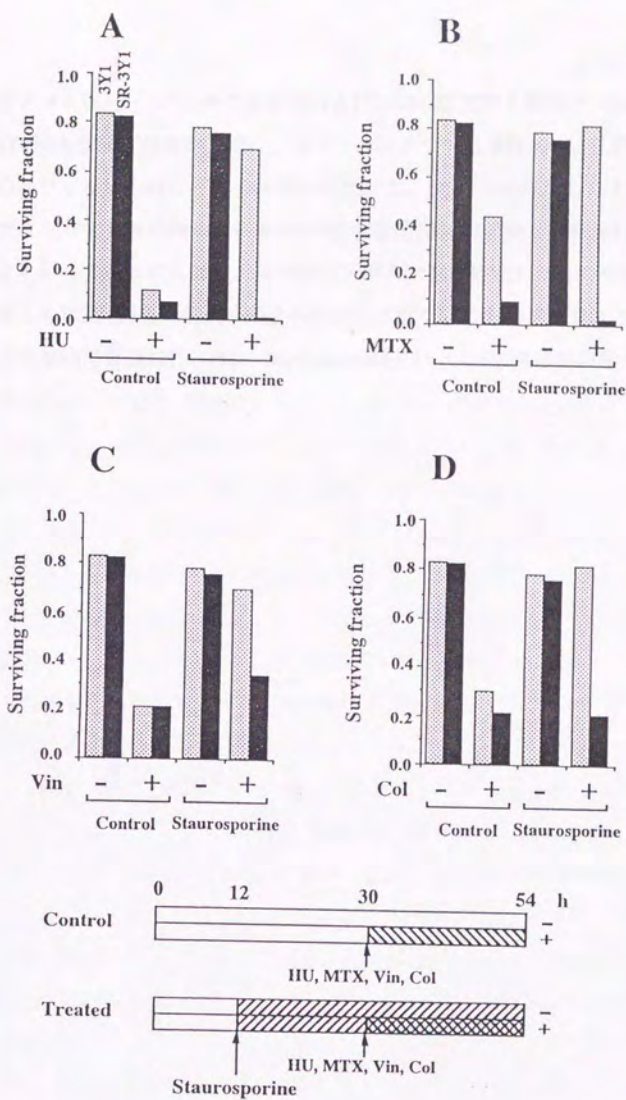


Fig. 2-2-20 スタウロスポリン低濃度存在下での
各種細胞周期阻害剤の効果

共存させる薬剤としてS期の阻害剤およびM期の阻害剤2種類ずつ用いた。細胞は3Y1細胞とSR-3Y1細胞を用い、スタウロスポリン低濃度10 nMを前処理したもの及びしないものに4種の薬剤を添加した。Fig. 2-2-20に示したように、スタウロスポリンを前処理しないものは3Y1細胞もSR-3Y1細胞と同程度に生残率の低下を示しているのに対し、スタウロスポリンを前処理したものでは4種類の薬剤とともに3Y1細胞の生残率の上昇が観察された。このスタウロスポリンによる正常細胞の保護は特にHU、MethotrexateといったS期阻害剤の場合に顕著に見られた。

第3節 まとめと考察

一般に細胞にはその倍数性を維持するためにDNA合成はS期において一回だけ行なわれ、分裂を経なければ次のS期に入らない機構(DNA再複製ブロック; DNA re-replication block)が存在する。この機構の存在はRaoとJohnsonの細胞融合実験、即ちG1期の細胞とS期の細胞を融合させた場合にG1期の核は速やかにDNA合成を開始するのに対し、G2期の細胞とS期の細胞を融合させた場合ではG2期の核はDNA合成を行なわないことから明かにされたものである(20)。また実際のS期においてもDNAの複製は一つの染色体においてもいくつかの部位から違った時期に順次開始され、一度複製が終了した領域は再び複製が起これないように制御されていると考えられる。この機構の詳細は未だ明かにされていないが、一つの示唆を与える実験としてBlowとLaskeyによる実験がある。彼らは*Xenopus*の卵を用いた*in vitro*の実験からG2期の卵においても核壁に界面活性剤を用いて障害を与えるとDNAの再複製が起こることを示し、このことからDNAの複製開始に必要であり、核壁を通過することのできないlicensing factorの存在を予想している(25)。S期の間にlicensing factorの活性によりDNA複製が開始され、licensing factor自身は不活化される。不活化されたlicensing factorはM期において核壁が消失したときに取り除かれ、細胞質から活性型のものが供給されることが考えられる。このlicensing factorの概念はDNA再複製ブロックのメカニズムをうまく説明でき、またColcemidなどの紡錘体形成阻害剤によるendoreduplicationによる倍数化はうまく説明できるが、物質的にはつかめていない。

本研究に用いたK-252aは細胞の種類に関係なくDNAの再複製を促し、多倍体細胞を蓄積させた。この過程においてM期細胞は観察されないことからColcemidなどによるendoreduplicationとは明かに違っており、licensing factorの概念からも説明できないものである。また3Y1細胞のチミジンの取り込みの

結果から分かるように一回目のDNA複製から二回目のDNA再複製まで一定の時間があること、S期に対応する時期にH1キナーゼの弱い活性が観察されることからDNA複製の周期性はK-252aによってM期を失った細胞周期においても維持されていることが示唆された。

一方、スタウロスポリンは*ras*や*c-erbB-2*以外でトランスフォームした細胞においてG1停止作用を示さず、3Y1細胞に対してはG2停止作用を示す濃度で倍数化を誘導した。トランスフォーム細胞は正常細胞とは違った性質をいくつか示すがそのうちの一つにG1期における制御の異常が挙げられる。正常細胞では血清刺激が不十分な培地におかれた場合や、細胞密度が上昇した場合にG1期でその増殖を停止し、いわゆるG0期へと導入される。しかしながらトランスフォーム細胞では血清への依存性が減少し、細胞密度が上昇しても増殖と停止させることはない。トランスフォーム細胞がスタウロスポリンによるG1停止作用に非感受性になっていることはG1期における制御の異常によると考えられる。このことはCdkキナーゼ複合体の活性化がCdkキナーゼそのものの感受性の差によるものではなく、さらに上流の制御機構の差によることから示唆される。またスタウロスポリン高濃度において倍数化を引き起こすことから、トランスフォーメーションによりDNA再複製ブロックの機構も同時に異常になることが分かる。G1期における制御とDNA再複製ブロックの機構との関連は不明であるが、スタウロスポリンは正常細胞とトランスフォーム細胞を識別しうる薬剤であると考えられる。

この識別能を利用し新しいタイプの化学療法が考えられた。実際にS期阻害剤との共存実験では効果があることを示すことができた。今後スタウロスポリンに限らず直接抗がん剤として利用できなくとも正常細胞とトランスフォーム細胞を識別できる薬剤を開発することががん治療の一つの方法として有効であると考えられる。

K-252aとスタウロスポリンはともに強力なプロテインキナーゼ阻害剤であるので、DNA再複製ブロックの機構にはこの二つの薬剤に対して感受性の高い

キナーゼが関与していると考えられる。しかしながらK-252aはスタウロsporin同様多くのキナーゼを阻害するため、動物細胞でDNA複製ブロック機構に関与するキナーゼを生化学的に取得するのはかなり困難であると考えられる。そこで遺伝学的な解析が行える下等真核生物である酵母に解析系が移せるかどうかを次の章で解析した。

第3章 K-252aの酵母に対する作用

第1節 材料と方法

第1項 使用菌株

本実験に使用した菌株をTable 3-1-1に示す。

第2項 培地

大腸菌*Escherichia coli*の培地をTable 3-1-2、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*の培地をTable 3-1-3、分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*の培地をTable 3-1-4に示す。組成はすべて、培地1000 ml中に含まれる量を示した。また特に明記しない限り試薬は特級を使用した。また製薬会社の名称のないものは国産化学の試薬を用いた。

第3項 プラスミド

本研究において使用したプラスミドをTable 3-1-5に示す。

第4項 培養法

通常の株は液体培養、固体培養ともに通常30 °Cで培養した。また用いたcdc変異株はすべて温度感受性のため26.5 °Cで培養した。取得した変異株の低温感受性の検討は固体培養、20 °Cで、また温度感受性の検討は37 °Cで行った。

第5項 薬剤のMIC (Minimum Inhibitory Concentration; 生育最小阻止濃度) および細胞周期への作用検定

*S. cerevisiae*に対するMICの検討にはYPD固体培地を、また*S. pombe*にはYE固体培地を用いた。薬剤は培地をオートクレーブ後、50 °C以下に冷やして

添加した。それぞれのプレートに菌体を塗布した後、30 °Cで2-3日培養後、検討をおこなった。

細胞周期への作用検定は液体培地を用いて行った。対数増殖期においた 10^6 個の細胞を、薬剤を添加した新しい液体培地に移し、30 °Cで一定時間培養した後、細胞を集菌、固定し、Flow Cytometerを用いてDNA含量を測定することにより薬剤の細胞周期への効果を検討した。酵母のFlow Cytometer用の固定、染色方法はFig. 3-1-1に示す。

第6項 形態観察

細胞の形態は蛍光顕微鏡 OLYMPUS BH2を用いた。

細胞は(1) エタノール固定あるいは(2)ホルムアルデヒド固定を行い観察した。核の染色にはDAPI (4,6-Diamidino-4-phenylindole; Sigma D 9542) を用いた。またチューブリン染色にはホルムアルデヒド固定した細胞を用い、抗チューブリン抗体TAT1、FITC結合抗マウス抗体を使用した間接蛍光抗体法により染色した。TAT1抗体はDr. Iain Haganより分与していただいた。抗体染色法は文献(61)に従い、レーザー共焦点顕微鏡MRC6000 (BioRad) で観察した。

第7項 増殖及びCFU (Colony forming unit) の算定

増殖の定量は計数板を用いて、またviabilityの検討は細胞液を希釈後、YPD、あるいはYE固体培地上にスプレッドし、30 °Cで2～3日培養した後、生育してきたコロニー数と希釈液中の細胞数から計算して求めた。倍数化酵母の分離は赤色色素 Phloxine B (和光純薬 166-02072) に対する染まり方を指標に行った。Phloxine B (5 mg/l) を含むプレート上で形成されたコロニーは二倍体の方が一倍体よりも Phloxine Bにより赤く染まる。これはPhloxine Bは生きている細胞は染めず、死んだ細胞を染めるが、二倍体からなるコロニーは一倍体からなるコロニーよりも死細胞の割合が高いためである。

Table 3-1-1

strain	relaevant genotype	source or reference
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169(ϕ80 <i>lacZ</i>ΔM15) <i>hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i></i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
AH22	<i>MATa leu2 his4 can1</i>	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
972	<i>h⁻</i>	
JY266	<i>h⁺ leu1</i>	
JY741	<i>h⁻ leu1 ade6-M216 ura4</i>	
JY746	<i>h⁺ leu1 ade6-M210 ura4</i>	
JY182	<i>h⁹⁰ mei1 ura1 arg1</i>	
JY183	<i>h⁹⁰ mei1 lys3 arg1</i>	
JZ1005	<i>h⁻ leu1 ura4 wee1::ura4⁺</i>	
KN4	<i>h⁻ leu1 ade6-M210 ura4 pmd1::ura4⁺</i>	(70)
KEN1	<i>h⁺ leu1 ade6-M216 ura4 bfr1::ura4⁺</i>	(74)
HK1-12	<i>h⁻ leu1 ade6-M216 ura4 ucm1-K12</i>	This Study
HK1-14	<i>h⁻ leu1 ade6-M216 ura4 ucm1-K14</i>	This Study
HK2-4	<i>h⁻ leu1 ade6-M216 ura4 ucm2-K4</i>	This Study
HK3-7	<i>h⁻ leu1 ade6-M216 ura4 ucm3-K7</i>	This Study
CDC mutants of <i>S. cerevisiae</i> ;		
cdc28-13, cdc7, cdc14, cdc26		
were gifted from Prof. Toh-e		
cdc mutants of <i>S. pombe</i> ;		
cdc1, cdc3, cdc4, cdc6, cdc7, cdc8, cdc10, cdc11, cdc12, cdc13, cdc14,		
cdc15, cdc17, cdc20, cdc21, cdc22, cdc23, cdc25-22, wee1-50		
were gifted from Prof. Shimoda		
cdc2-566, cdc2-567, cdc2-568, cdc2-569, cdc2-575, cdc2-661		
were gifted from Prof. Beach		

Table 3-1-2

LB (Luria-Bertani)

Tryptone (Difco, 0123-01-1)	10 g
Yeast Extract (Difco, 0127-17-9)	5 g
NaCl	10 g

Supplement

Agar (国産化学、一級)	20 g
Ampicillin sodium salt (Sigma A-9518)	50 mg
IPTG (Isopropyl β -D(-)-thiogalactopyranoside; 和光純薬 095-02531)	
X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside; 和光純薬 027-07854)	

Table 3-1-3

YPD

Yeast Extract	10 g
Polypeptone (日本製薬 394-00115)	20 g
Glucose	10 g

Supplement

Agar (国産化学、一級)	20 g
----------------	------

Table 3-1-4

YE

Yeast Extract	5 g
Glucose	30 g

MM

Potassium Biphthalate (和光純薬 167-03825)	3 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	5.54 g
NH_4Cl	5 g
Glucose	20 g
Salt Stock. ¹⁾	10 ml
Vitamine Stock. ²⁾	1 ml
Mineral Stock ³⁾	0.1 ml

SPA

KH_2PO_4	1 g
Glucose	10 g
Vitamine Stock. ²⁾	1 ml

SSL

Glucose	10 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g
KH_2PO_4	2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500 mg
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	250 mg
Aspartic acid	200 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg
Vitamine Stock. ²⁾	1 ml
Trace Element ⁴⁾	1 ml

Supplement

Agar (国産化学、一級)	20 g
	SPAの場合は 30 g
Leucine(1000 x)	75 mg
Adenine (1000 x)	75 mg
Uracil (1000 x)	75 mg
Arginine (1000 x)	75 mg
Lysine (1000 x)	75 mg

1) Salt Stock (100 x)

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	106.6 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.47 g
KCl	100 g
Na_2SO_4	2 g

2) Vitamine Stock (1000 x)

Nicotinic acid	1 g
Inositol	1 g
Biotin	1 mg
Pantothenic acid	100 mg

3) Mineral Stock (10,000 x)

H_3BO_3	0.5 g
MnSO_4	0.4 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.16 g
KI	0.1 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.04 g
Citric acid	1 g

4) Trace Element (10,000 x)

H_3BO_3	0.5 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.53 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
KI	0.1 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.04 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1 g

Table 3-1-5

Plasmid	relevant genetic marker and purpose	reference
pDB248'	<i>LEU2</i> (<i>S. cerevisiae</i>), 2 μ ori (<i>S. cerevisiae</i>), <i>amp</i> for gene cloning and subcloning	(62)
pAL19	<i>leu1</i> (<i>S. pombe</i>) <i>ars1</i> (<i>S. pombe</i>) <i>amp</i> for subcloning	(63)
pUC19	<i>amp</i> for DNA sequence	(64)

Table 3-1-6

STES buffer			
NaCl	0.5	M	
Tris-HCl (pH 7.6)	0.2	M	
EDTA	0.01	M	
SDS	1	%	

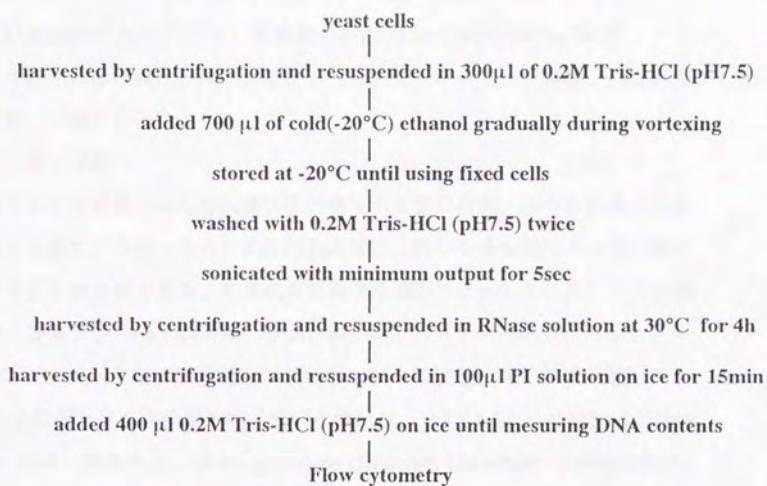


Fig. 3-1-1 酵母のフローサイトメーター用サンプル調整法

第8項 変異処理

*S. pombe*の親株972をホストとして変異処理を行なった。方法をFig. 3-1-2に示す。変異剤としてEthylmethanesulfonate (EMS; ナカライテスク社 155-195G)を用いた。

第9項 遺伝解析

得られた変異株の遺伝解析を(1)戻し交配(Back Cross)、(2)優劣判定(Dominant Test)、(3)相補群の決定(Complementation Test)、(4)半数化による染色体マッピング、(5)ランダムスポア解析、(6)四分子解析、の順に行った。

(1) 戻し交配

得られた変異株にはK-252a感受性に関与する変異の他、様々な変異が存在している可能性があり、そのためK-252a感受性に関与する変異のみを持つ株に純化することが必要である。変異株及び親株をYESプレート上、26.5°C 2日間培養後、等量ずつ1.1% KCl溶液に懸濁、混合し、SPAプレート上にスポットする。SPAプレート上では栄養増殖ができず、すぐに接合、胞子形成が進行する。26.5°C 2日間おき、顕微鏡で胞子形成を確認後、0.5% β -Glucuronidase (Sigma G 0876) 溶液に懸濁する。 β -Glucuronidase (Helicase, Glusulase) は細胞壁成分中の β -glucanを分解するため、低浸透圧条件下で細胞壁が壊された細胞は致死に至る。一方、 β -Glucuronidaseは胞子の壁を分解できないため、胞子は生き残る。生き残った胞子を適当な希釈で水に懸濁し、YEプレートにスプレットする。26.5°C で培養後、現れたコロニーからK-252a感受性を持っている株を取得した。得られたK-252a感受性株に対し3回づつ戻し交配を行い、K-252a感受性変異のみを持つ株に純化した。

(2) 優劣判定

K-252a感受性変異が優勢であるか、劣性であるかの検討には*meiI*変異を持

つJY182株を用いた。*mei1*変異株はホモタリック株であり、*h*'株と接合した場合には通常の孢子形成を行うものの、*h*株とは接合した場合にできた二倍体は減数分裂を行うことができず、安定な二倍体を形成する。戻し交配により*h*、*leu1*マーカーを持った株を取得し、戻し交配の時と同様の方法により接合させた。接合した安定な二倍体はMMプレートにストリークし、栄養要求性が相補されることを利用して分離した。優劣決定は得られた二倍体の株をそれぞれ、K-252a 0、5、10、20 μ M含むプレートにスプレットし、26.5 °C 4日間培養して判定した。

(3) 相補群の決定

分裂酵母*S. pombe*は二倍体が安定でなく、N源の減少により速やかに減数分裂へ進行する。このため一般に変異株同士の二倍体を形成しての相補群 (Complementation Group) 決定は難しい。今回、変異株同士の二倍体のみを分離し、継代する方法として*ade6*変異株のアリルを用いたintracomplementation系を用いた。これは*ade6*-M210と*ade6*-M216の変異を持つそれぞれの株を用いて二倍体を形成すると*ade*'の形質を獲得するという性質を利用したものである。戻し交配によりK-252a感受性変異を持つ (*h'* *ade6*-M210) (*h'* *ade6*-M216) (*h'* *ade6*-M210) または (*h'* *ade6*-M216) の各株をそれぞれ作製し、接合を行った。得られた二倍体はMMプレートあるいはYEプレート上で継代し、相補群の決定はK-252a 0、5、10、20 μ MをふくむYESプレートにストリークして26.5 °C 4日間培養後、MICの決定を行うことにより判定した。

(4) 半数化による染色体マッピング

*mei1*変異株と*h*株との接合でできた二倍体は、通常の貧栄養条件下においても減数分裂、孢子形成には進行しない。しかしMBC (methyl-2 benzindazolecarbamate; 和光純薬 135-06841) 存在下では細胞のMitoticな半数化が起こり一倍体細胞が高頻度で出現する。このようにして得られる一倍体細胞は通常の減数分裂によって生じる一倍体細胞とは異なり、減数分裂を経由していないため、染色体の組み換え頻度はかなり低い。その結果同一染色体上の遺

伝子は連鎖し、別の染色体の遺伝子とはランダムな染色体分配に従って分離する。この形質を用い、変異遺伝子のある染色体を同定した。方法は文献(65)に従った。

(5) ランダムスポア解析

求める遺伝子が存在する染色体が明らかになると、次に染色体上のどの遺伝子と近い距離にあるのが問題となる。そこで染色体上の位置が明かな利用しやすい遺伝子を用いて、それらが求める遺伝子と連鎖しているかについてランダムスポア解析によって調べた。方法は戻し交配と同様に行った。

(6) 四分子解析

求める遺伝子とその近くの遺伝子が分かると、次にその遺伝子の遺伝学的な距離を四分子解析により求めることができる。方法は文献(65)に従った。

第10項 酵母の形質転換及びプラスミド回収

分裂酵母の形質転換は文献(66)Lithium Acetate法に従った。

形質転換の結果陽性となったクローンは(1)プラスミド欠失テストを行い、求める形質がプラスミドに依存していることを確認した後で(2)プラスミド回収をおこなった。

(1) プラスミド欠失テスト

今回クローン化にプラスミドはpDB248'由来のものをを用いた。このプラスミドは*S. cerevisiae*の2 μ DNAの自律複製配列を持っており、細胞内で多コピーで保持される。しかし2 μ DNAの自律複製配列を持ったプラスミドは非選択条件下では分裂に従って容易に失われる。このことを利用し、得られたトランスフォーマントをYESプレート上で継代を続けることによりプラスミドを保持していない株が出現してくる。このプラスミドを失った株がクローン化に用いた形質を維持していれば、最初に分離した株はspontaneousな変異によりクローン化に用いた形質を獲得した変異株であると言える。逆にプラスミドを失った株がクローン化に用いた形質を失い、親株と同じ形質を示せば形質はプラスミ

ドに依存していることを示している。また継代数を増やしてもプラスミドを失った株が出現してこない場合にはそのプラスミドは染色体上に挿入されたと考えられる。

(2) プラスミド回収

プラスミドの回収はFig. 3-1-3に示すグラスビーズ (Sigma G-8772) を用いる方法で行った。用いた溶液の組成はTable 3-1-6に示した。

第11項 遺伝子操作

各種遺伝子操作法は文献(67)に従った。また用いた制限酵素など遺伝子操作に用いた試薬は特に明記しない限り宝酒造から購入した。

遺伝子配列の決定にはDideoxy法を用い、宝酒造のBcaBEST Dideoxy Sequencing Kit (6017A) 及び α -CTP (Amersham PB) を用いた方法と、Pharmacia AutoCycle Sequencing Kit (27-1693-03) とPCR Perkin-Elmer 9600を用いてサイクルシーケンスを行った後、Shimadzu DSQ-1を用いてシーケンスを行った。

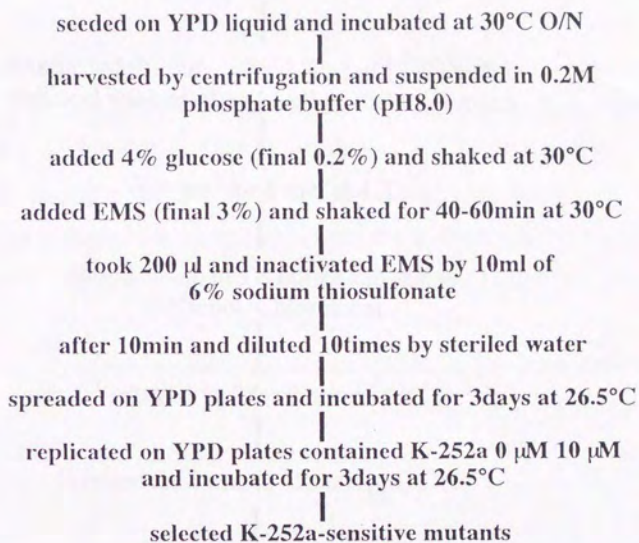


Fig. 3-1-2 酵母の変異処理

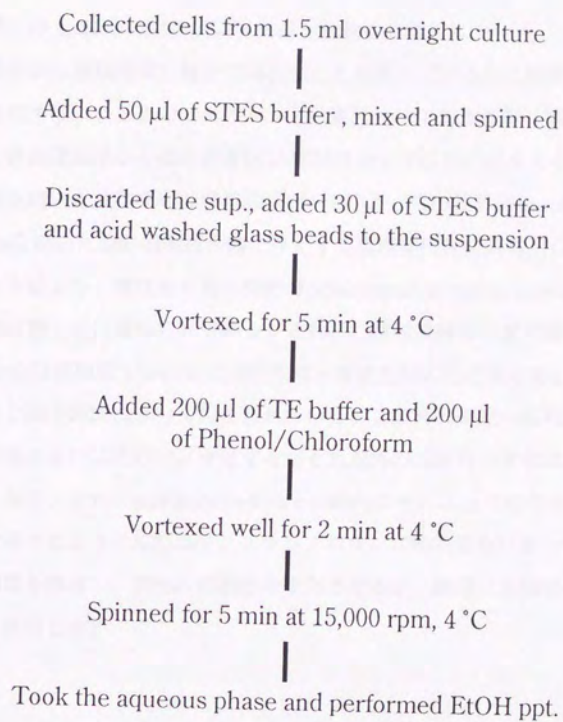


Fig. 3-1-3 酵母からのプラスミド回収法

第2節 結果

第1項 序 -酵母の細胞周期変異株と倍数性の維持について-

真核生物の細胞周期の解析で現在もっとも進んでいるのは酵母を用いた分子遺伝学的手法によるものであろう。下等真核生物である酵母は減数分裂を行ない、古典的遺伝学から組み替えDNA実験技術まで容易に行なえる実験系である。酵母を用いた細胞周期の解析はHartwellによって出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*を用いた細胞周期特異的に停止する温度感受性変異株 (CDC 変異株) の分離から始まり、現在もお分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*とともにその解析は精力的に進められている。これら二種類の酵母、出芽酵母*S. cerevisiae*と分裂酵母*S. pombe*は有性生殖と無性生殖の生活環を有し、相互の変換は接合と孢子形成によって行なわれている。この時に細胞の倍数性は一倍体から二倍体あるいはその逆に変化するがそれ以外の倍数性の変化は減多に起こることはなく、まれにendomitosisやrare matingなどによって起きるのみである。第二節で述べたようにK-252aやスタウロスポリンは動物細胞においてM期のな細胞周期を誘導し、細胞の倍数性を変化させるが、酵母にも同様の作用を及ぼすかを検討した。

第2項 多倍体酵母の誘導

スタウロスポリンは対数増殖期の出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に対してはG2期でその増殖を停止させることが知られている(68)。また分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* に対しては細胞質分裂直後、即ちS期の前で停止させることが報告されている(69)。しかしながらスタウロスポリンの構造類縁体であるK-252aの酵母に対する作用はこれまで解析されていない。そこで *S. cerevisiae* 親株AH22及び *S. pombe* 親株972を用いてK-252aの酵母の細胞周期への作用を検討した。それぞれの株を30℃で前培養して対数増殖期におき、細胞数が 2×10^6 cells/mlになったところでK-252a 20 μ M添加後2、4、8時間目にサンプルを調整し、フローサイトメトリーによりDNA含量を測定した。

S. cerevisiae AH22株では対数増殖期でG1期よりもG2期の細胞の割合が多い (Fig. 3-2-1 A)。K-252a 添加後2時間目には2C DNA含量をもつ細胞の割合が増加し始め、4C DNA含量をもつ細胞が出現してきている。さらに8時間目には大部分の細胞が4C DNA含量を持つようになった。このときDNA含量を示すフローサイトグラムが鋭いピークを示さず、次第にブロードなピークになっていくのはミトコンドリアDNAの影響であると考えられる。K-252a 10 μ Mを処理した細胞および核の形態を観察したのがFig. 3-2-1 Bである。4時間目にはshmoo (接合管) に似た異常な芽 (bud) や大きくなった核が観察され、8時間目には明らかに核が大きくなった細胞が蓄積していた。

一方、*S. pombe* は対数増殖期においてG2期が細胞周期の90%以上を占めているため、ほとんどの細胞が2CのDNA含量をもっている (Fig. 3-2-2)。K-252a添加後2時間目には4C DNA含量をもつ細胞が現われ始め、8時間目には8CのDNA含量をもつ細胞が蓄積している。このときにM期阻害剤であるMBCを添加してもDNA含量の増加はMBCの共存しない場合と同じ時間経過で進行していた。また核と微小管の2重染色を試みたところ (Fig. 3-2-3)、薬剤処理をしていない細胞ではM期に特有の核を貫く、太く短い微小管が観察され

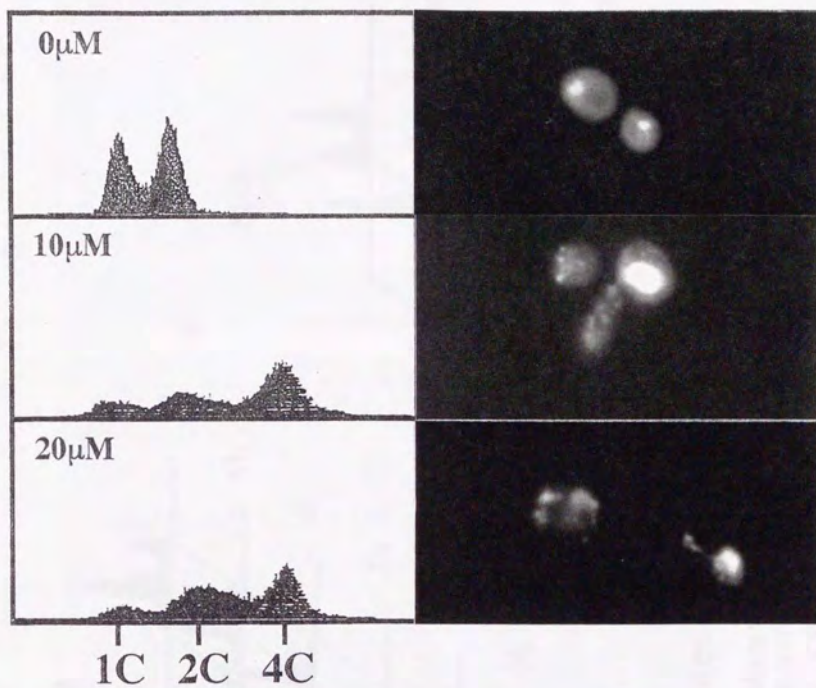


Fig. 3-2-1 K-252aによる *S. cerevisiae* の倍数化

Left. K-252a 20 μ Mによる細胞の倍数化

right K-252a 10 μ Mによって倍数化した細胞の核形態

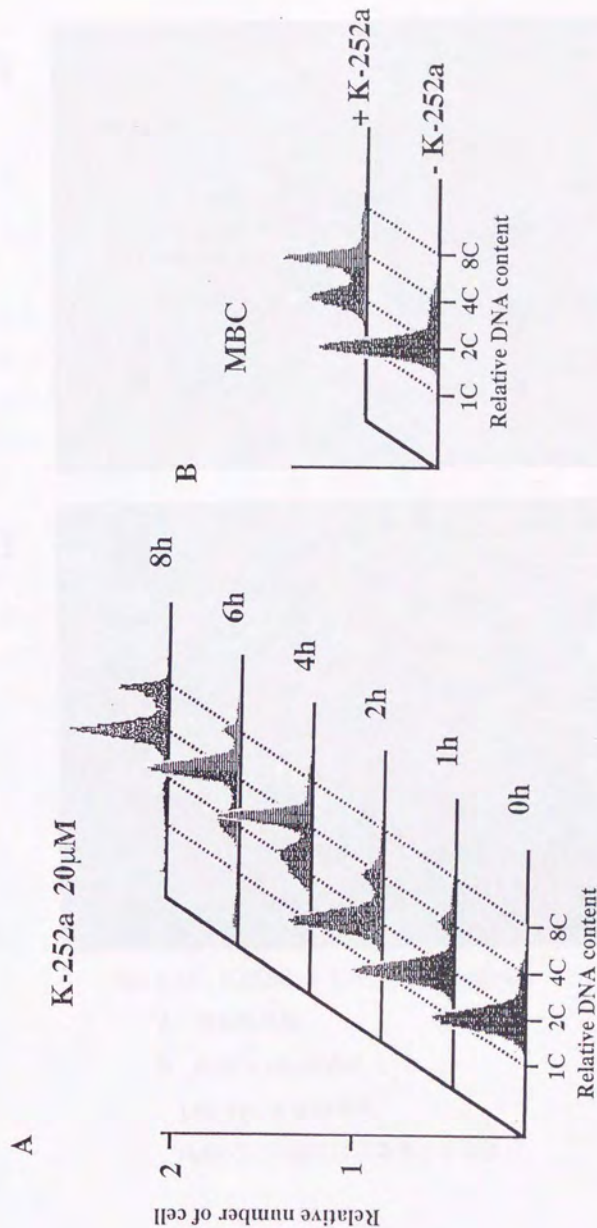
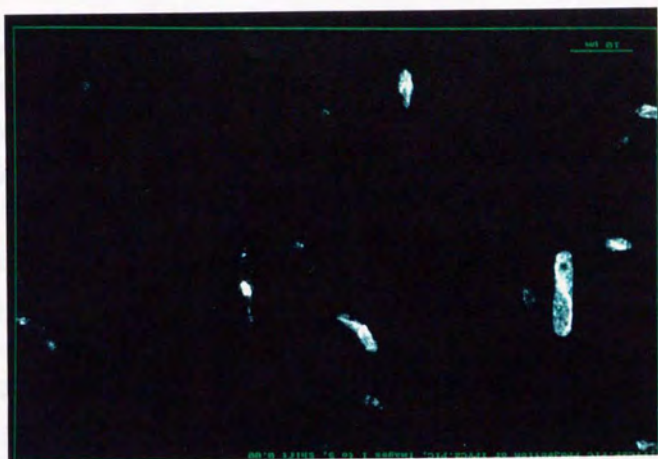


Fig. 3-2-2 分裂酵母*S. pombe*の細胞周期に対するK-252aの効果

- A 野生株972に対するK-252aの効果
 B M期阻害剤MBCとの共存4時間目のDNA含量
 K-252aによる倍數化はM期を經ていない。

A



B

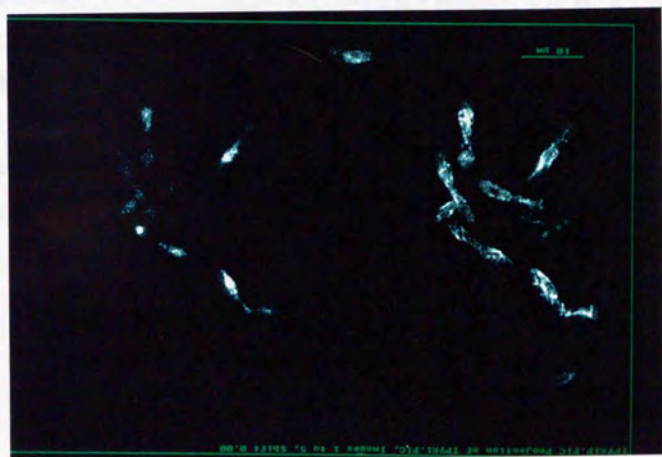


Fig. 3-2-3 K-252aによる*S. pombe*の倍数化

A 薬剤無処理

B K-252a 10 μ M処理

Left: PIによる核染色

right: TAT1抗体による微小管染色

たが、K-252aを処理した細胞ではそのような微小管を持つ細胞は全く観察されず、間期に見られるようなネットワークを持つ細胞のみ観察された。このことからK-252aは*S. pombe*に対しても動物細胞の場合と同様にM期のない細胞周期が誘導したと考えられる。さらに一端が引き延ばされたような異常な形態の核を持つ細胞が増えていた。

次に対数増殖期にある*S. pombe*親株972 (2×10^6 cells/ml) にK-252a 10 μ -M処理して細胞の増殖、CFUを検討すると同時に倍数化した細胞の分離をPhloxine Bを用いて試みた。Fig. 3-2-4に示すように、K-252a処理により細胞増殖が完全に停止するとともに、2時間目から倍数化した細胞によると考えられるPhloxine Bに染まるコロニーの割合の増加及びCFUの低下が観察された。Phloxine Bに染まるコロニーの割合はK-252a処理後8時間目には70%にまで達した。これらの細胞を合計64株分離し、そのDNA含量をフローサイトメトリーにより検討したところ、64株中、63株が2倍体のDNA含量を持っていた。この結果は*S. pombe*ではK-252a処理により2倍体までは安定に分離できることを示している。しかしながら、さらに倍数化の進んだ4倍体や8倍体は増殖速度が遅くなるためか、今回の実験では得ることができなかった。

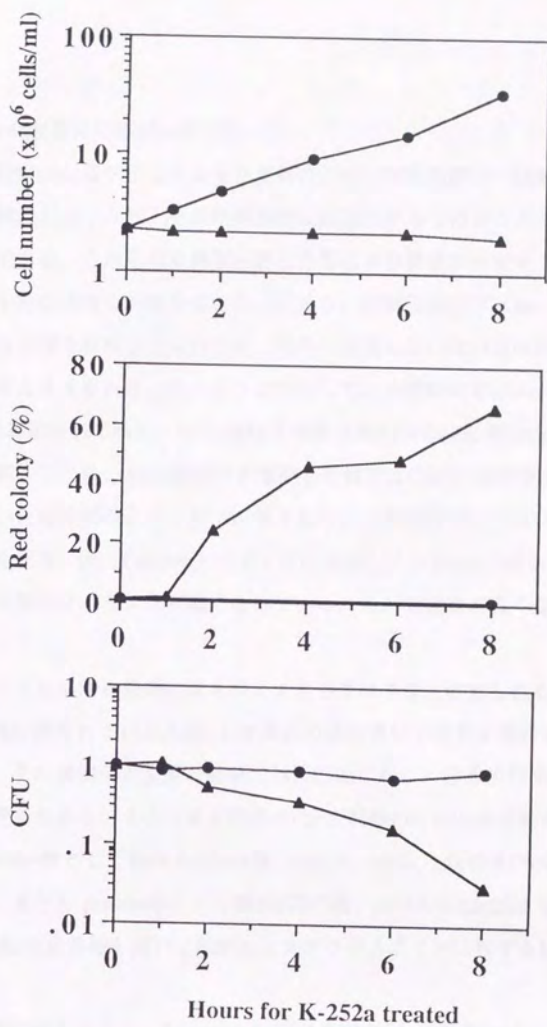


Fig. 3-2-4 倍数化酵母の分離

Upper Graph; 細胞増殖

Middle Graph; 倍数化酵母の割合

Lower Graph; CFU

close circle; 薬剤無処理

close triangle; K-252a 20 μ M処理

第3項 cdc変異株のK-252a感受性

cdc変異株はcdc遺伝子上におきた変異のために制限温度下では遺伝子産物が失活して機能なくなり、その結果細胞周期進行がある特定のところで停止する変異である。これらの変異蛋白質は変異により構造が不安定であるか、あるいは不十分な活性しか持たなくなっており、非制限温度下においても増殖できるだけの活性を維持してはいるが、活性が変異していない蛋白質と比べ弱くなっていると考えられる。そのような例として、分裂酵母ではwee1変異株や、cdc25変異株が知られている。wee1遺伝子産物は細胞分裂に必要なCdc2キナーゼを負に制御しており、wee1遺伝子が変異した株ではCdc2の負の制御が充分に行われなため分裂のタイミングが早くなり、非制限温度下においても細胞の長さが短くなる。逆にCdc2キナーゼを正に制御しているcdc25遺伝子が変異した株では分裂のタイミングが遅くなっているために細胞長が長くなっている(10)。

同様なことは温度を薬剤に置き換えても当てはまると考えられる。すなわちK-252aが既に得られている各種cdc変異株の原因遺伝子産物を標的としているとすれば、その遺伝子が変異した株ではK-252aに対し、超感受性あるいは耐性を示すと考えられる。そこでまず既存のcdc変異株のK-252a感受性を検討した。*S. cerevisiae*株として親株AH22の他、cdc28、cdc7、cdc16及びcdc26変異を持つ株を、また*S. pombe*株として親株972の他、cdc1からcdc25までのcdc24を除いた各種cdc変異株を用いてK-252aとスタウロスポリンに対するMICを検討した。

Fig. 3-2-5に示すように、*S. cerevisiae*では各種のcdc変異株に対してそれぞれのMICの差は観察されず、一般に*S. pombe*と比べK-252aに耐性であった。一方*S. pombe*では親株や、各種cdc変異株の間にMICの差が見られ、とくにcdc2のアリルのなかで感受性株と耐性株がはっきり分かれた。しかしながらK-252aがCdc2キナーゼそのものを標的としている可能性は低いと考えられる。これは

感受性になった株と耐性となった株において、そのK-252aに対するMICの差が高々4倍しかないことや、スタウロスポリンに対する感受性の変化がK-252aに対する感受性の変化と似ていること、また動物培養細胞を用いた結果から、K-252aは直接にCdc2キナーゼ活性を阻害していると言うよりも、その活性化過程を阻害しているように見えるためである。しかしながらCdc2キナーゼの活性を制御している遺伝子の変異株であるcdc25がK-252aに対し感受性であったことから、K-252aはCdc2の制御系に何らかの関わりがある分子を標的にしていると考えられる。

今回用いたcdc変異株のアリル以外にK-252aに対し超感受性あるいは超耐性となるアリルが存在しないと断言する事はできないが、この実験では親株と比較して高々4倍感受性となったcdc変異株しか見いだすことができなかったことから、K-252aがこれらcdc遺伝子産物を直接阻害しているという積極的な証拠を得ることはできなかった。

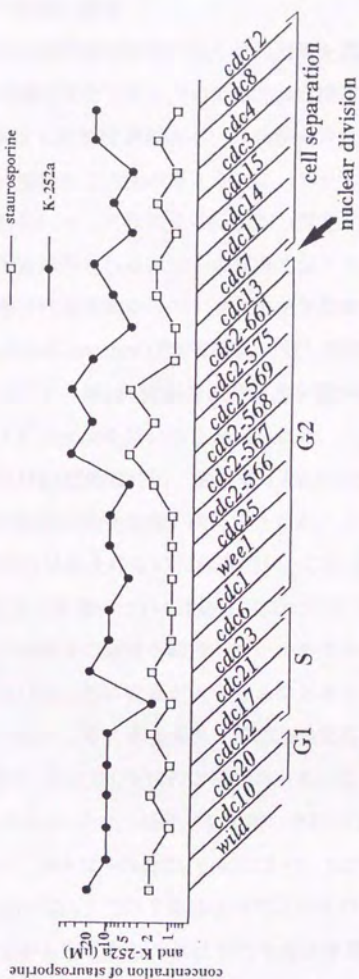
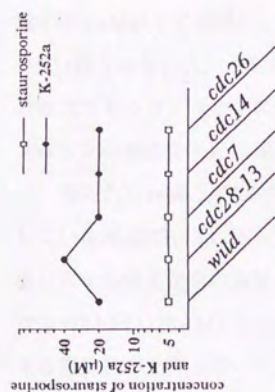


Fig. 3-2-5 各種cdc変異株のK-252a及びスタウロスポリンに対するMIC

第4項 K-252a超感受性変異株の取得と解析

前節の結果から、K-252aはcdc2の活性制御機構の何らかの因子を標的としている可能性が示唆された。酵母の遺伝学的手法を用いてK-252aの標的分子を明かにする方法として、K-252aに対する耐性変異株あるいは超感受性変異株を取得してその遺伝子をクローン化、解析する方法が考えられる。しかしながら耐性変異株からのアプローチでは酵母に対して作用するK-252aの濃度が、かなりの高濃度必要とされること、また直接得られる遺伝子が変異遺伝子であるなど解析上不利な点があるため、超感受性変異株からのアプローチを採用することにした。*S. cerevisiae*と*S. pombe*では*S. pombe*の方がK-252aに対し感受性が高かったこと、また得られた変異遺伝子と各種cdc変異株との関連を調べることが可能であることから、親株として*S. pombe*を用いることにした。

変異をかけたときの開始菌数及びEMS処理時間、生存率はTable 3-2-1に示す。計四回の変異処理の結果74株のK-252a感受性株が取得できたが、このうちMICが5 μ M以下を指標にして再度絞り込みを行ない14株選択し、これらをK1～K14株と命名した。これらのMIC及び特徴についてTable 3-2-2に示す。これらの株はスタウロスポリンに対しては親株並の耐性を維持していたのでスタウロスポリンの標的分子とは関わりのないところに変異が入ったものと考えられた。

得られた14株の戻し交配を行ったところ、単独変異でK-252a感受性を維持している株はK3、K4、K7、K9、K11、K12及びK14の7株であった。これらの株に対する優劣決定の結果をTable 3-2-3に示す。親株として用いたJY741（感受性は972と同じ20 μ M）とJY182との二倍体は一倍体のJY741に比べ、K-252aに対する感受性が上昇していた。またK3～K14までの7株はすべてコントロールのJY741 x JY182株と同じであったことから、これらの株はすべて劣性変異であると結論した。

	No.1	No.2	No.3	No.4
cell number of EMS treatment (cells/ml)	2×10^7	5×10^7	1×10^7	1.5×10^7
time of EMS treatment (min)	45	60	60	50
survivality (%)	5	2	2	3
isolated colonies at first selection	42	40	16	26
isolated colonies at second selection	10	40	13	1

Table 3-2-1 変異処理条件

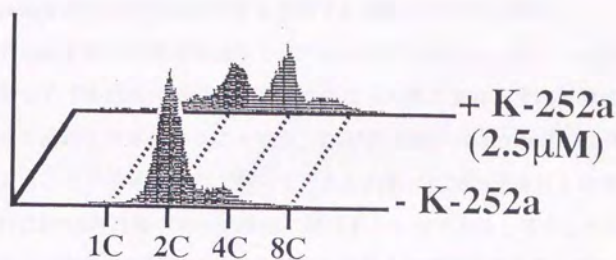
isolated strain	MIC to K-252a (μ M)	temperature sensitivity	isolated strain	MIC to K-252a (μ M)	temperature sensitivity
K-1	5	-	K-8	5	-
K-2	5	ts	K-9	4	-
K-3	4	-	K-10	10	cs
K-4	5	-	K-11	4	-
K-5	5	-	K-12	4	-
K-6	5	-	K-13	4	-
K-7	5	-	K-14	5	-

Table 3-2-2 K-252a感受性株の特性

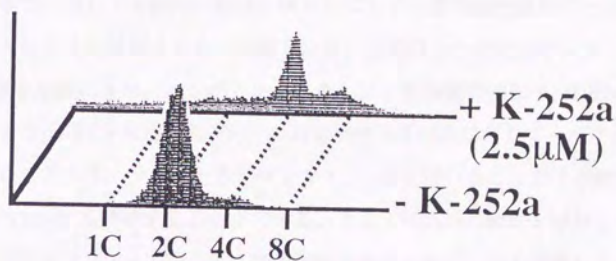
次に相補群決定の結果をTable 3-2-4に示す。K4とその他の株、及びK7とその他の株との二倍体は親株のJY741 x JY746 二倍体と同程度のK-252a感受性を獲得していた。このことはK4およびK7は独立した相補群を形成することを示している。またK3とK9、K11、K12、K14とのそれぞれの二倍体は一倍体と同じMICを示していた。同様にK9 x K11、K9 x K12、K9 x K14、K11 x K12、K11 x K14、K12 x K14の各二倍体もMICの上昇が観察されなかった。このことからK3、K9、K11、K12、K14の5株はすべて一つの相補群に含まれることが明らかとなった。以上の結果から得られた変異株はすべて劣性の3つの相補群からなることが示された。

次に、得られたK-252a感受性株がK-252aにより細胞周期非特異的に増殖が停止するために感受性となった株か、あるいは親株よりも低いK-252a存在下でもDNA含量が増加するために増殖ができなくなった株であるかを判定するためにフローサイトメトリーによる解析を行った。各相補群の中からK3、K4、K7株を用いた場合のDNA含量の変化をFig. 3-2-6に示す。すべての株において親株と同様に倍数化が観察されたがその時の濃度は、液体培地で親株が倍数化を誘導される10 μ Mよりも低い濃度であった（K3に対して2.5 μ M、K4、K7に対して5 μ M）。一方、スタウロスボリンに対するMICは親株の場合と変化がなかったことから、得られた変異株はK-252a特異的に感受性となった株であり、DNA再複製ブロック機構に関与する遺伝子に変異の入った株であると考えられた。そこでM期が脱共約した細胞周期を示す変異株という意味でこれらの変異株を *ucm* (Uncoupled Cell cycle without Mitosis) と命名した。

A



B



C

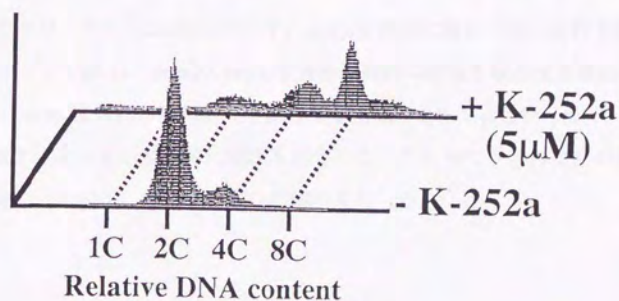


Fig. 3-2-6 K-252aによるucm変異株の倍数化

ucm変異株は野生株が倍数化する濃度 ($10\mu\text{M}$) よりも低い濃度で倍数化が進行する。各濃度で8時間処理したときのDNA含量を示す。A ucm1-K3; B ucm2-K4; C ucm3-K7

第5項 *ucm*変異株のK-252a感受性を相補する遺伝子の取得と解析

分離した*ucm*変異株は構造類縁体であるスタウロスポリンに対しては感受性が親株と変わらずK-252aに特異的に感受性になった株であり、また低濃度のK-252aによって倍数化が進行することから、DNA再複製ブロック機構に変異の入った株であることが示唆された。従ってこれらの株のK-252a感受性を相補する遺伝子断片はDNA再複製ブロック機構に関与するものであると考えられる。

そこで各*ucm*変異株に対しK-252a感受性を相補する遺伝子の取得を試みた。K-252aの様な薬剤に対する耐性を指標に遺伝子をクローニングする場合にK-252a以外の薬剤に対しても同時に耐性を賦与してしまう多剤耐性遺伝子と求める遺伝子をどのように区別するかが問題となる。以前我々の研究室でレプトマイシンB耐性を指標にクローニングしたところ、ヒト多剤耐性遺伝子MDR1のホモログである*pmdI'*を取得した(70)。この遺伝子はK-252aに対しても交差耐性を賦与したことから、少なくともレプトマイシンBを用いることで多剤耐性遺伝子の一つ*pmdI'*を排除することができる。そこでK-252aに耐性を賦与した遺伝子でレプトマイシンBに対しては交差耐性を賦与しないことを指標にクローニングを行った。

取得したクローンをTable3-2-5に示す。*ucmI*変異株に極めて弱い耐性を賦与する遺伝子としてpK11、*ucm2*と*ucm3*変異株に同時に耐性を賦与する遺伝子としてpK21、*ucm3*変異株のみに耐性を賦与する遺伝子としてpK31～pK34を取得した。*pmdI'*はすべての変異株に耐性を賦与した。これらのうち再現性が安定しているクローンpK21、pK32、pK11の解析を行った。

<i>ucm1-I</i>	<i>ucm2-I</i>	<i>ucm3-I</i>
pK11 (<i>sk2</i> ⁺)	pK21 (<i>sk1</i> ⁺)	pK21 (<i>sk1</i> ⁺)
		pK31
		pK32 (<i>hmt1</i> ⁺)
		pK33
		pK34
<i>pmd1</i> ⁺	<i>pmd1</i> ⁺	<i>pmd1</i> ⁺

pmd1⁺ = multidrug resistance gene
(mammalian MDR homologue)

sk1⁺ = F37A4.5 and *Mov34* homologue

sk2⁺ = hsp70 protein

hmt1⁺ = heavy metal tolerance gene

Table 3-2-5 *ucm*変異株のK-252a感受性を相補するクローン

(1) pK21の解析

pK21には約12 kbの挿入断片が見られた。サブクローニングの結果3.4 kbの *SacI*-*BglII*断片に活性が見られたためこの部分の塩基配列決定を行った。決定された塩基配列及びその配列から予測される読み枠 (ORF; Open Reading Frame) をFig. 3-2-7に示す。308アミノ酸からなる蛋白質をコードし、その予想分子量は34.6 kDaであった。最初のATGコドンから230 bp上流に*S. pombe*のプロモーターでよく見られるTATAGAAAというTATA Boxが存在した。ホモロジー検索の結果、*Caenorhabditis elegans*のF37A4.5遺伝子産物や、マウスやハエのMov34遺伝子産物(71)と相同性が見られた (Fig. 3-2-8)。

本遺伝子はジェノミックスアザンの結果、*S. pombe*のゲノム中に1コピーしか存在していないと考えられた (Fig. 3-2-9)。またインテグレーションマッピングの結果この遺伝子はucm2、ucm3遺伝子とは異なることが分かったため、本遺伝子をsksI⁺ (Suppressor of K-252a sensitivity) と命名した。

sksI⁺の遺伝子破壊を行った(72)。Fig. 3-2-10に示すように本遺伝子のプロモーター領域から読み枠のN末側約3分の2を*S. pombe ura4*⁺遺伝子約1.7 kbと入れ替え、*SacI*-*EcoRI*断片切り出した後、*ura4*マーカーを持つ二倍体 (JY741 x JY746) にトランスフォームした。生育してきたura非要求性株12株をsksI⁺をブロープとしてジェノミックスアザンを行い、sksI⁺遺伝子が破壊された株を選択した (12株中10株が破壊されていた)。次にこれらの株をSPA培地に植え、胞子形成をさせた後、四分子解析を行った。合計52組の四分子を解析したところ、すべてviable : nonviable = 2 : 2 (28組) あるいは1 : 3 (24組) の分離を示した。生育してきた株はすべてura要求性であったことからsksI⁺遺伝子は生育に必須の機能を持つと考えられた。sksI⁺遺伝子産物と相同性のあるMov34遺伝子産物はマウスの胚発生に必須の遺伝子であることが報告されており、現在まだ不明のままであるF37A4.5遺伝子産物やMov34遺伝子産物の機能の解析を*S. pombe*のホモログであるsksI⁺遺伝子の機能を解析することにより可能であると考えられる。

1 GAGCTCGCACTTTCGCGTATGCGGACAATCATCGGCATCAAATGATAAGGCATTATTGA
 61 CTGTATCTAAATCGGCAAGCTCAAGAACTGGTCACAAAAACAGGGTTTAGTAAGACAAA
 121 TAAAAAGTAAAAATATATTACCTTCATAGTAATTGTAATGTAATCAATTCAA'TGTTTCC
 181 TTTTCATTA AAAAGAGGTTTGCTGTGGTTAGGTATCAGCGTCGCGTCCAACGTCAATGTCA
 241 CTTCTATTAAGGGTACGTTAATCTTAAATAACAGACTATAAGCTAATAGTAAGCGTAAGG
 301 AGTTTGTAGATGTCGGTTC AACATTTTACCGAAGCTTAATATATTTGAGAAACCATCCC
 361 GATGCATTGCCATTTATTTTTTATGCTGTTTTAAGGTACTTAACCGTATAATGTGTAA
 421 AGTCCAAGTCGAAATGCATTTATTTATTCATAAAAAATAATATTTTAAGTAATTA AAAAGG
 481 AGTCTAATAAAAAACAAATCAGTTTAAAAATATCGATTATAAGTTTTTCCGTATTTTCTG
 541 ATGAGCATTGAGTA ACTCAATTTTCAATATTC AATTTTCTACAATTCCTAAAAGAAA
 601 CGGTTCAGTATCATTATTAACCAAAAAAAGTAATAATATTTATTTAATGAATAATC
 661 GTCGCTTC TAGAGTATACCTTTACATGAAATTTACATATATATATCATATTTTTTTTAAAT
 721 TAGCCCATTAATAAACTTCACAACATACATCATCTTTTATGTATTACTTATTACACTT
 781 TTA CTATTAATAATATATTTATTTATTTATTTTAAATTC AATTCCTAGTGTAAATGT
 841 ATTAAACTGTTTCACCTCTTATCGTACAGTTC AAACATTTTGCTTACACCAACTTACCTT
 901 TACCAAGA ACTATGGACTACGTTGGTGGTCTCTAAAAC TGAAAAATGTA AAAAAA AAC
 961 CTTTGA AAAAGAAAAG AAGGATTCTAAAAA ACTTGCTGAAAAAGTTCAAGAGCATCTTT
 1021 CCCGAGATAAATCACCTTTAGAAGAAAATGGCGTATCTACGTACCA AATGCTTCGCTCAA
 1081 AGGATACAGACTCGGCTGGCTATGCTGACGGAAGCACAGAAACATTTTGAGTCTGTTT CAG
 1141 GAACAAAGATTACTTCAGAAAGCAAAGAATTGAGCGATTGAAAACACATAAAGACAGGAT
 1201 TGATGAGTATAATAGACTACTGGAAGTCAGTCGGAGCATTTTGACATGCCTAAAAATTGG
 1261 ACCCGGCTAGTTTTTCAA AACACGTCCTTTTTTCTCTCAATAGCTATACTTAAATAGCAAT
 1321 GGATGCCTCCTCTATTCTGCATAGTTTTTCTCCATCCACCTACCATATCTTTTATGAAT
 1381 TACGCACTCTAATGAAATCACTATTTTATTTTAA CAATACGCATTATACCTCATTATTGT
 1441 TATAGCTATTCA TTGTCTCTAGAAAAACCTGTTTATAGCCA ACTACCACGTAAACGTA
 1501 TACTAGCTGCCTAAGTGAGACCAAAGACATAGAATCTTGTATATTCGTTTTGTATAGTGG
 1561 TTGAACATATAGAAAGA ACTTCCTTTGAAGAACAAGCACATTATAGTGACCTTTGATTG
 1621 TTTTGTGCTCTTACTAAATATCAGTGAACAGCATTAACGTTTTGGTAACTTTATTTAAA
 1681 TACTTTACTGAGTTTCTCATTTAATCTCCAATTACACTTTTATTTGCGGTTATTGTGAGA

Fig. 3-2-7 pK21の塩基配列およびORF

1741 GGAACCCCACTGATACTGATAAACTCTCATATTTCAATACATACATACGAGTCATATTTT
 1801 TCGCGATGGAATCTTTACAAAGATTGTTACAAGGTGCCCGCATGGGTACTGGTATGATGG
 M E S L Q R L L Q G A R M G T G M M G
 1861 GAGATCAGCCTCTTGTGTGATAATCCGAGTGTGTATACATTTTCATCTCTAGCTTTGTAA
 D Q P L V D N S E C V Y I S S L A L L K
 1921 AAATGCTTCGTCATGGCGACATGGTACACCAATGGAAGTTATGGGTTTGATGTTAGGAG
 M L R H G R H G T P M E V M G L M L G E
 1981 AATTCGTTGATGACTTTACAGTACGTGTTGTTGATGTTTTTGCAATGCCTCAATCTGGTA
 F V D D F T V R V V D V F A M P Q S G T
 2041 CAGGTGTCAGTGTAGAAGCAGTCGATCCAGTTTTTCCAAAAAATATGATGGATATGCTTA
 G V S V E A V D P V F Q K N M M D M L K
 2101 AGCAAAACAGGACGGCCAGAAATGGTTGTAGGTTGGTATCATTCTACCCGGGTTTTGGTT
 Q T G R P E M V V G W Y H S H P G F G C
 2161 GTTGCGTTTCTAGTGTGATATCAACACCCAACAATCATTGAGCAATTAACACCAAGAG
 W L S S V D I N T Q Q S F E Q L T P R A
 2221 CGGTGGCAGTTGTTGTGACCCCTATTCAATCTGTCAAAGGAAAGGTGGTAATTGACGCCT
 V A V V V D P I Q S V K G K V V I D A F
 2281 TTCGATTGATTAATCCGTCTACCCTAATGATGGGTCAGGAACCCAGACAAACAACTTCCA
 R L I N P S T L M M G Q E P R Q T T S N
 2341 ATTTGGGTCACATCAACAAACCTAGCATTCAAGCTTTAATTCACGGTTTAGGAAGACATT
 L G H I N K P S I Q A L I H G L G R H Y
 2401 ACTACTCCCTTCGCATCAATTACAAAAAACTGAGCTTGAAGAGATCATGCTTTTGAATT
 Y S L R I N Y K K T E L E E I M L L N L
 2461 TACACAAAACAGCCTTGGGCACATGGTCTTTTACTTGAAAACCTTAATTCTGCTGCGAAA
 H K Q P W A H G L L L E N F N S A A E K
 2521 AAAATCATGCTTCTATTGATAAGATGAAATCCTTGTCAGAACAGTACACTGAACGTGTTTC
 N H A S I D K M K S L S E Q Y T E R V Q
 2581 AAAATGAAGTGACTTTAAGTCCGGAGCAACTTCGTATTCAATACGTTGGTAAACAAGATC
 N E V T L S P E Q L R I Q Y V G K Q D P
 2641 CCAAGAAGCATCTTGACGCTGAGGTTTCAGAAATGTATAGACAACAAATATTTCTTCCATGT
 K K H L D A E V Q K C I D N N I S S M L
 2701 TAGCTTGATGCTTGATTCCGTTGCCTTCTAGTACATCTATTTTGGTAATACCTCTTTTC
 A C M L D S V A F *
 2761 CATCATCCGTTTTTTATGAGCTACTTTCTTTCTTACTCAAAGCATTTATGAACGTGTTTG
 2821 AATAATCCTGTTGGTCGAATCTGATACTACTTTTTTACGATTTTCATATTCGTGACTAGGA
 2881 GTACATTTTTTTTTAAACTTTTTTACATGATCGTGGAGTATGATTGATGATATTTTTGGTAA

Fig. 3-2-7 (2)

2941 GCTCTTGAGATTGCGAGCGTTTGCTTTGATGGATTCTTATATATTTTTTTCATAGATCC
 3001 TTAAGATATACCTGCACACCAGTCTTTCAAGCTTCTTCCCAATAAGAAAAATTTGTTTCA
 3061 ATTATTGAATTTGTAAACATCTTCTACCAACATGTTAAAAATTTGTTTCCTTGATTGTT
 3121 TGTAATGTACCTGTAAGGATCGTCGATCAGCGTCAAACCATTGAAGTTGAATACATAAAG
 3181 GTATAACTGAGGCTACTTAAATTTATTATATGACATTTTAGCGTGATATGATTTTTTGATG
 3241 TAGCATGATATTGTACTTGTCAAGTATTCCTATCTATCTTTCAACCTTTGCCAACCACTA
 3301 ACGTATGTTGGTTTACGGAATCAACAAACAATTGTTTATTAAGAAGTTTAAACAAGGTTTC
 3361 TTTTTTATTTTCAACGTTTAAAGACTTGCTCCAATATTTAACTGGTTTTTTGAATTCAAA
 3421 TGAATAGATCT

Fig. 3-2-7 (3)

Sks1 MESLQRLQGARMGTGMMGDQPLVDNSEGVYISSLALLKMLRHERHGPPPEVMGLMLGPF 60
 F37 MDRLIRSLLMNQNKQATDKLDHPDTSETVNISSLALLKMLRHRSCPPPEVMGLMLGPF 59
 VDDITIRVVVDVFAMPQSGTSVSEVENVDPVSCNNMMDLKKQTGRPEMVVWGWHSHPGFGCW 120
 VDDITIRVVVDVFAMPQSGTSVSEVENVDPVSCNNMMDLKKVGRPEMVVWGWHSHPGFGCW 119
 LSSVDINTQOSFEALIPRAVAVVVDPIQSVKGKVVIDAFRLINPSTLMMGQ...EPRO 175
 LSSVDINTQOSFEALIPRAVAVVVDPIQSVKGKVVIDAFRLINPSTLMMGQ...EPRO 179
 TTSNLGHINKPSIDALIHGLGRHYYSLEINNYIKTELEIMLNLKCEWAHGLLEENFNS 235
 TTSNLGHINKPSIDVHGLGTYYSLEINNYIKTELEIMLNLKCEWAHGLLEENFNS 239
 AAEKNHASIDKMKSLSEQYTERVQNEVTLSPQQLRIQYVGKQDPKKHDAEVQKCIDNNI 295
 LEKKQEEKFKSINKLIAVFNKDIDEVKEKPIADKIGKTQEEVKKFGKINAKQQLQMITSS 299
 SSMLNMLDSVAF 308
 LLNDSLCHQLTAMINAKSMT 319

Fig. 3-2-8 F37A4.5 (*Caenorhabditis elegans*)とSks1との比較
 完全一致のアミノ酸は黒塗りで、類似アミノ酸は
 白抜きの枠で示した

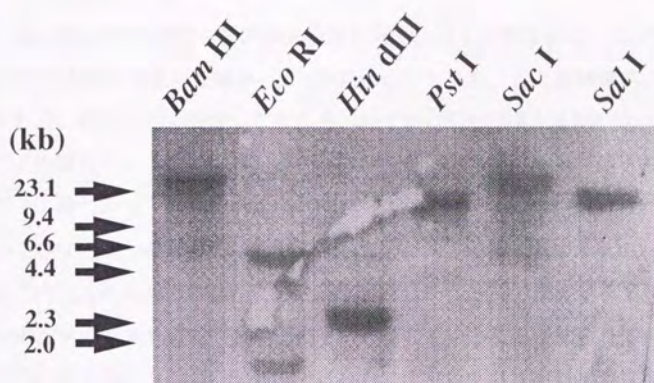


Fig. 3-2-9 *sktI* 遺伝子をプローブとして用いた
ジェノミックスザン

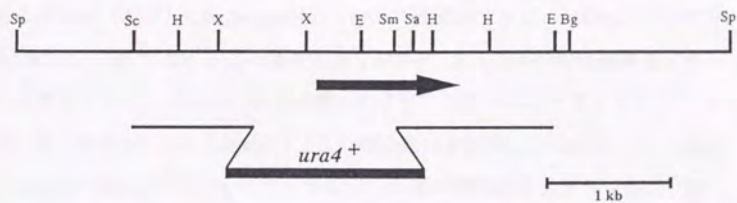


Fig. 3-2-10 *sktI* 遺伝子の破壊

(2) pK32の解析

pK32はucm3変異株のK-252a感受性を弱く相補する遺伝子として分離した。pK32の挿入断片は極めて短かった(500 bp以下)ため、その相補機構に興味を持たれた。塩基配列を決定したところ、わずか115 bpの挿入断片が見いだされた。この断片中にはATGコドンが一つ存在したが、このATGから始まるORFは11アミノ酸しかコードしていない(Fig. 3-2-11)。しかしながらATGコドンは持っていないが一続きの読み枠が存在していた。この挿入断片はpDB248'の*tet*遺伝子内に入れられており、この*te*遺伝子には*S. pombe*で機能するプロモーターが*te*遺伝子の読まれる方向とは逆向きに存在していることが知られている。そこでこの挿入断片の両側の配列を決定した。決定した塩基配列と予想されるアミノ酸配列をFig. 3-2-12に示す。*te*遺伝子内に存在し、*S. pombe*で読み始められると考えられるATGから、挿入断片を含む部分まで120アミノ酸からなる一つの読み枠が見いだされた。この読み枠の挿入断片部分のホモロジー検索を行ったところ、1992年に重金属耐性を指標にしてクローン化された*hmtI'*遺伝子のnucleotide binding siteを含む部分であることが分かった(Fig. 3-2-13)。*hmtI'*遺伝子はABC(ATP binding-cassette)-typeの膜蛋白であり、MDRとホモロジーが高い(73)。しかしながらこの部分のみでMDRのような薬剤耐性機構を付与するとは考えにくい。K-252aの作用機構はATPとの拮抗であると考えられていることから、おそらくは*S. pombe*内でこの融合蛋白が発現し、nucleotide binding siteの部分でK-252aを結合することでK-252aの真の標的の阻害活性を弱め、耐性を賦与するものと考えられる。

10 20 30 40 50 60
 GATCGTATATTACAATTCAGATGGTTATAATTCTCGTGTCCGAGAAAGAGGCTTAAAG
 D R I L Q F P D G Y N S R V G E R G L K

70 80 90 100 110
 TTAAGCGGTGGTGAACCAACGTGTAGCAGTTGCCAGAGCTATCTTAAAGATC
 L S G G E K Q R V A V A R A I L K D

Fig.3-2-11 pK32は115 bpの挿入断片を持つ

GGCCGTTGAGCACC GCCGCCGAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTC
 M V H A R R W R P T V

CCCCGGCCACGGGCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTG
 P R P R A C H H T H A E T S A H E P E V

GCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCCGCGATATAGGCCGAGCAACCGCACCTGT
 A S P I F P I G D V G D I G A S N R T C

GGCGCCGGTGATGCCGCCACGATGCGTCCGCGTAGAGGATCGTATATTACAATTCCTCA
 G A G D A G H D A S G V E D R I L Q F P

GATGGTTATAATTCTCGTGTCCGAGAAAGAGGCTTAAAGTTAAGCGGTGGTGAACCAAC
 D G Y N S R V G E R G L K L S G G E K Q

CGTGTAGCAGTTGCCAGAGCTATCTTAAAGATCCACAGACGGGTGTGGTCCGATGAT
 R V A V A R A I L K D P Q D G C G R H D

CGCGTAGTCGATAGTGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAG
 R V V D S G S K *

Fig. 3-2-12 pK32の挿入断片はtet遺伝子の一部との融合で発現する

hmt1 560 LYRSLQNSIIDTERLLEIFEKFP-TVVEKPNAPDLKVTQGVIFSHVSFAYDPRK--PVL
 STE6 316 VLQKGVAMEKIMTLKDGSKRNPLNKTVAHQFPLDYATSDLTANVSFSYPSRPSEAVL
 pmd1 382 SFVSCASAAKKIPDTIDRVSPINAPPTPT-GDV-V-KDIKGEIELKNIRFVVPTRPEVLV

Nucleotide
 binding site

617 SDINFVAQPGKIALVSGSGGKS FIMRILLRFFDVNSGSITIDQDIRNVTLSLRSSI
 376 KNSLNFSAQQTFLVSGSGGKS TSLNLLRFYDYGNSISINGHNIQTIDQKLLIENI
 439 DNFSLVCPSPGKIALVSGSGGKS FIIGLVERGYDPIGGQVFLDGKDLRLTNVASLRNQI

677 GVVPQDSTLFNDTILYNIKYAKPSA-----TNEEY--AAAKA---QIHDR-ILQFP
 436 TVVEQRQTLFNDTLRKNILLGSTDSVRNADCSTNENRHLI---KDACQMALDRFILDLP
 499 SLVQQEPVLFATTVFENITYGLPDTIKGTLKKEELERRVYDAAKLA---NAYD-FIMTLP

Nucleotide
 binding site

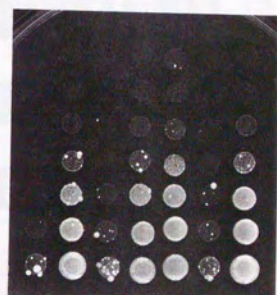
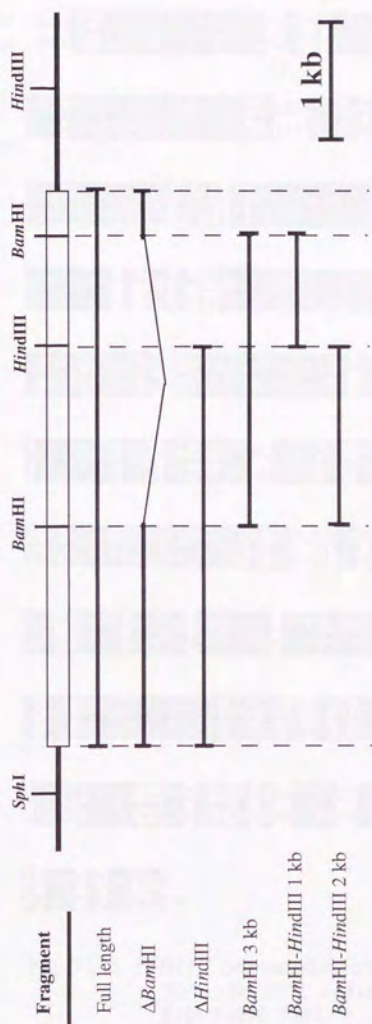
Prokaryotic
 membrane ATPase

725 DGYSRVGERGLKSGGQQRVAIARAALKDPSIILLDEATSALIINTERQIQALNRLA
 493 DGLLETIGTGGVTLSGGQQRVAIARAIFRDTPIFLDEAVSALIIVHRNLMKAIHWR
 555 EQPSTNVGQRGLMSGGQQRVAIARAIVSDPKILLDEATSALISKSEVLVQKALDNAS

Fig. 3-2-13 pK32の挿入断片はhmt1遺伝子のnucleotide binding site領域を持つ

(3) pK11の解析

pK11は*ucmI*変異株に極めて弱い耐性を賦与する遺伝子として分離してきたクローンである。約6 kbの挿入断片のサブクローニングを行ったところ、約2 kbの*Bam*HI-*Hind*III断片に相補活性が見いだされた (Fig. 3-2-14)。この断片の塩基配列を決定し、予想されるアミノ酸配列のホモロジー検索を行ったところ、熱ショック蛋白質の一つであるHSP70グループと高い相同性が見いだされた。Fig. 3-2-15に*S. cerevisiae*のhsp70蛋白のうち最もホモロジーの高かったSSB1との相同性を示す。この蛋白がどのようにしてK-252aに対する耐性を賦与するのかは不明であるが、おそらくはストレス応答の一つであると考えられる。すなわち熱と同様薬剤もストレスの一つであり、薬剤による阻害の結果引き起こされる蛋白の不活性化をこの蛋白質が防いでいるのであろう。本遺伝子も次項の解析により*ucmI*遺伝子ではないことが分かったため*sks2'*と命名した。



vector

Full length

Δ BamHI

Δ HindIII

BamHI 3 kb

BamHI-HindIII 1 kb

BamHI-HindIII 2 kb

Fig. 3-2-14 pK11のサブクローニング

SSB1	MAEGVFCGAIGIDLGTYSVATYESSVEIINQGNRVTPSFVAFTEERLIGDAAKN	59
sks2	MSEVYHGAIGIDLGTYSVAVWEFAWVEIINQGNRVTPSFVAFTEERLIGDAAKN	59
	QAAINPRNTVFDKRLIGRRFDESVOKDVKWPFKVIDVQGNVIEVYVLEEKTFEE	119
	QAAINPRNTVFDKRLIGRRFDEPETOKDKWPFKVIDVGLPTIEVNYLSERKQFEA	119
	EISAMVLTKMKEISEAKISKVEKAVITVPAYFNDQRQATKDAGAIIGLNLVRIINEPT	179
	EISAMVLTKMKEISEAKISKVEKAVITVPAYFNDQRQATKDAGAIIGLNLVRIINEPT	179
	AAAIAYGLGACKSEKERHVLIFDLGGGTFDVSLLEIAGGVYIVKSTSSNTHLGGDFDTN	239
	AAAIAYGLGACKSEKERHVLIFDLGGGTFDVSLLEIAGGVYIVKSTSSNTHLGGDFDTN	238
	LLEHFNFEFKIKTGIDISDDRALRRLRRAERAKRLSSVTQTTVEVDSLSEDFESS	299
	LLEHFNFEFKIKTGIDISDDRALRRLRRAERAKRLSSVTQTTVEVDSLSEDFESS	297
	ITRARFEDNAAIFKRTIEPVQVLKDKIKSKQIDEVVLGGSTRIKVOILSDFFDG	359
	ITRARFEDNAAIFKRTIEPVQVLKDKIKSKQIDEVVLGGSTRIKVOILSDFFDG	357
	QQLKSINPDEAVAYGAAVQAALTGQSSSDSTKDLLLLDVAPLSLGVMEGDMFGIVVP	419
	QQLKSINPDEAVAYGAAVQAALTNKASDSTKDLLLLDVAPLSLGVMEGDMFGIVVP	417
	RNTIIPPTIKRTFTTADNQTTVTFPVYQGERVNCENTLLGEFILKNIPMPPAGEFMLE	479
	RNTIIPPTIKRTFTTADNQTTVTFPVYQGERVNCENTLLGEFILKNIPMPPAGEFMLE	477
	AIFEIDANGILKVTAVERITGSSNITINNVGRLLSSSEIEMVNCADDFKAADFAFAK	539
	AIFEIDANGILKVTAVERITGSSNITINNVGRLLSSSEIEMVNCADDFKAADFAFAK	537
	HEAIDLESYVASIECTVTDVLSKLKRGSKSKIEAALSDAALDIEDFSADELKAE	599
	LEAIDLESYLSNIETIIEEPNMMKLKRFKSKIEAALAEIEMLEIEDINTCALKAE	597
	MSLKRIVTKAMSSR	613
	RLKRIVQKAFSLR	612

Fig. 3-2-15 SSB1 (*S. cerevisiae*) と Sks2 との比較

完全一致のアミノ酸は黒塗りで、類似アミノ酸は白抜きの枠で示した

第5項 *ucm1*遺伝子の解析

*ucm1*変異株は他の2株よりもK-252a感受性が高く、親株に対しても約10倍の感受性を示す株である。このことから*ucm1*遺伝子はK-252aの標的である可能性が高い。しかしながら前項で述べたように、トランスフォーメーションによっては本遺伝子を取得することができなかった。そこで遺伝学的に本遺伝子を同定することを試みた。本遺伝子の同定は(1)半数化による染色体マッピング、(2)ランダムスポア解析による近在の遺伝子の同定、(3)四分子解析による遺伝子の同定の順に行った。

(1) 半数化による染色体マッピング

優劣判定をするときに用いたJY182との二倍体を利用し、染色体マッピングを行った。Table 3-2-6に示した結果から、*ucm1*遺伝子は3番染色体のマーカーと強く連鎖していることが分かった。このことから*ucm1*遺伝子は3番染色体上に存在していると考えられた。

(2) ランダムスポア解析による近在の遺伝子の同定

3番染色体上の利用しやすいマーカーを用いて近くに存在する遺伝子を同定した。用いたマーカーとしては*wee1*⁺、*cdc11*⁺、*ura4*⁺、*ade6*を用いた。このうち*ura4*⁺、*ade6*マーカーは以前のマーカー導入の時に余り連鎖していないことが分かったため、*wee1*⁺、*cdc11*⁺を用いた。結果をTable 3-2-7に示す。*wee1*⁺遺伝子は必須遺伝子でないため、*ura4*⁺遺伝子で破壊した株を利用し、*ura*要求性で確認した。

*wee1*破壊株との掛け合わせ、合計308の胞子を解析したところ、親株の形質を持つものの割合が高かった。この結果は*wee1*遺伝子と*ucm1*遺伝子が連鎖していることを示している。一方*cdc11*変異株との掛け合わせではこの用の分離は見られず、2つの変異が独立に分離していることが示された。以上の結果から*ucm1*遺伝子は*wee1*遺伝子の近くに存在することが示された。

	<i>lys3</i> ⁺	<i>lys3</i> ⁻	<i>leu1</i> ⁺	<i>leu1</i> ⁻	<i>arg1</i> ⁺	<i>arg1</i> ⁻
<i>ucm1</i> ⁺	32	9*	31*	10	0	41*
<i>ucm1</i> -K3	35*	6	35	6*	39*	2

Table 3-2-6 半数化による染色体マッピング

lys3, *leu1*, *arg1* マーカーはそれぞれ1, 2, 3番染色体にある親株は*で示す。親株の形質とマーカーが一致しているのは *arg1* マーカーであるので *ucm1* 遺伝子は3番染色体に存在する。

	I. x JZ1005'		II. x <i>cdc11</i>	
	<i>wee1</i> ⁺	<i>wee1</i> ⁻	<i>cdc11</i> ⁺	<i>cdc11</i> ^{ts}
<i>ucm1</i> ⁺	25	137	87	67
<i>ucm1</i> -K3	135	12	65	47

Table 3-2-7 ランダムスポア解析によるマッピング

wee1 遺伝子座の近傍に *ucm1* 遺伝子は存在する。

(3) 四分子解析による遺伝子間距離の決定

wee1 遺伝子と *ucm1* 遺伝子の距離を四分子解析により算出した。合計43組の四分子を解析したところ、両親型二型が39組、非両親型二型が0組、テトラ型が4組出現した。この結果をPerkinsの式に当てはめたとところその遺伝子間の距離は約4.65 cMと算出された。これは *S. pombe* のDNA上で約25 kbの距離を意味している。

(4) *ucm1* 遺伝子の同定

以上の結果から *ucm1* 遺伝子は3番染色体の *wee1* 遺伝子座の近くに存在する遺伝子であることが明らかになった。しかし、残念ながら *wee1* 遺伝子座の近傍には余り遺伝子が知られておらず、遺伝子そのものを同定することはできなかった。

一方、東京大学農学部農芸化学科微生物学研究室でBrefeldin Aに耐性を賦与する遺伝子として分離されていた *bfr1* 遺伝子(74)を破壊した株、 $\Delta bfr1$ 株がK-252aに対して *ucm1* 変異株と同じ程度の感受性を示すことが偶然に分かった。そこで *bfr1* 遺伝子が *ucm1* 遺伝子と同一である可能性を考え、四分子解析を行った。*ucm1* 変異株、*bfr1* 破壊株ともにK-252aに感受性であることからこの二つの変異が独立の変異である場合、親株並の耐性を示すと考えられる。そこでそれぞれ4胞子中、一つでも耐性を示したものを組み替えが起こったものとして検討した。合計73組のK-252a感受性を検討したところ、耐性の胞子を形成したものは1組しか存在しなかった。これは恐らくテトラ型であると考え、Perkinsの式(65)に当てはめたとところその遺伝子間の距離は約0.69 cMと算出された。この結果は *ucm1* 遺伝子が *bfr1* 遺伝子と同一であることを示している。

(5) *ucm1*変異株と*bfr1*破壊株の解析

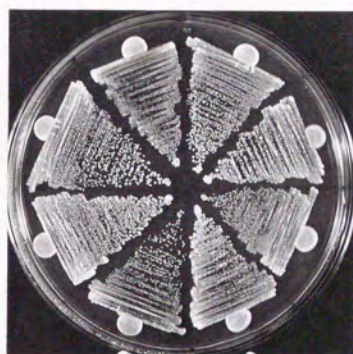
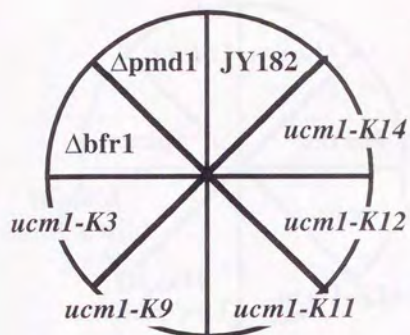
遺伝学的解析は統計学的なものであり、2つの遺伝子のごく近傍に存在することは証明できるがその遺伝子が実際に同一の遺伝子であるのかどうかについては断定することはできない。実際に*ucm1*遺伝子が*bfr1*遺伝子と同一ならばその形質も同一でなければならない。そこで*ucm1*変異株のBrefeldin Aに対する感受性及び*bfr1*破壊株のK-252a感受性を詳細に検討した。

brefeldin Aに対する感受性の検討は微生物学研究室で行われている方法(0.004 % SDSと共存させる)で行った。Fig. 3-2-16に示すように各*ucm1*変異株は*bfr1*破壊株と同程度のbrefeldin A感受性を示した。また逆に*bfr1*破壊株は*ucm1*変異株と同程度のK-252a感受性を示した(data not shown)。以上の結果から*ucm1*遺伝子は*bfr1*遺伝子と同一であると考えられる。

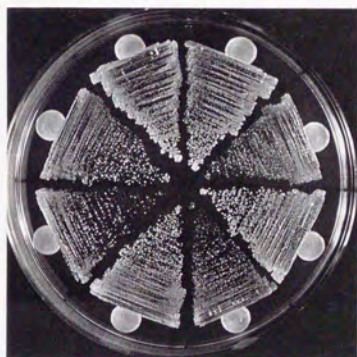
(6) *pmd1/bfr1*二重破壊株の作成と薬剤感受性

*bfr1*遺伝子産物はABC-transporterの一つであり、多コピーで細胞に保持されたとき多剤耐性を賦与することがNagaokaらの研究によって明らかにされている。我々の研究室ではNishiらの研究により別のABC-transporterタイプの多剤耐性遺伝子*pmd1*を分離している。この二つの遺伝子ともに非必須遺伝子であり破壊株が存在する。*pmd1*破壊株ではいくつかの薬剤に対し超感受性となることが知られており、また*bfr1*破壊株はK-252aとBrefeldin Aに対して超感受性となる。そこでこの二つの遺伝子を破壊した二重破壊株はさらに多くの薬剤に対して感受性になると考え、作成した。

それぞれの破壊株を用いて二倍体を作成し、胞子形成させ、四分子解析した。Fig. 3-2-17に一組の四分子に由来する4株を用いた結果を示す。予想通り、二重破壊株はK-252a及びBrefeldin Aに対し超感受性を示した。とくにK-252aに対する感受性は*bfr1*破壊株の10倍にもなり、両遺伝子の破壊されていない親株と比較すると100倍にも感受性になっていた。しかしながらK-252aと



brefeldin A 0 $\mu\text{g/ml}$
(+ SDS 0.004%)

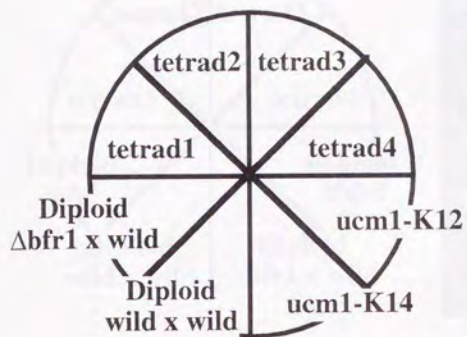


brefeldin A 1 $\mu\text{g/ml}$
(+ SDS 0.004%)

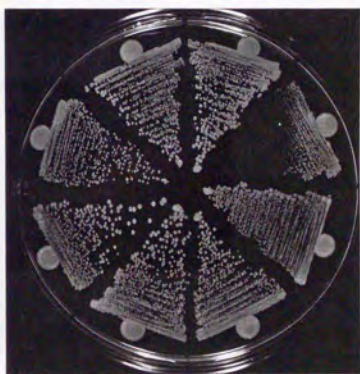


brefeldin A 2 $\mu\text{g/ml}$
(+ SDS 0.004%)

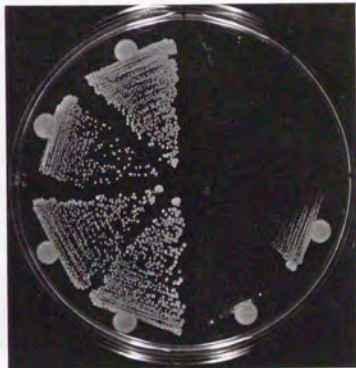
Fig. 3-2-16 *ucm1*変異株のBrefeldin A感受性



K-252a 0 μM



K-252a 0.1 μM



K-252a 1.0 μM

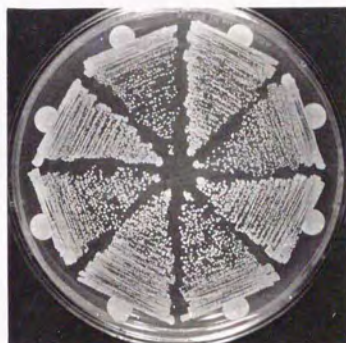
Fig. 3-2-17 二重破壊株のK-252a感受性

Tetrad 1 親株

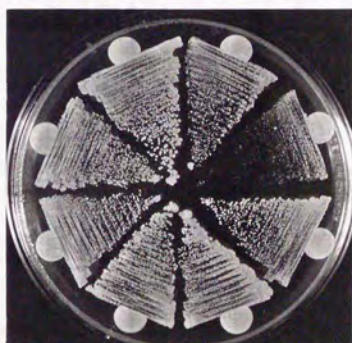
Tetrad 2 *pmd1*破壊株

Tetrad 3 *bfr1*破壊株

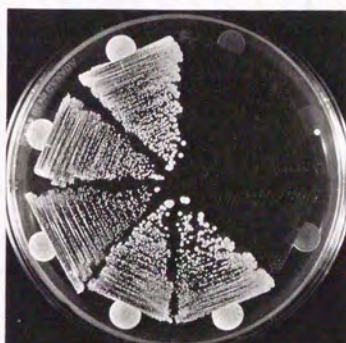
Tetrad 4 *pmd1/bfr1*二重破壊株



brefeldin A 0 $\mu\text{g/ml}$
(+ 0.004% SDS)



brefeldin A 1 $\mu\text{g/ml}$
(+ 0.004% SDS)



brefeldin A 2 $\mu\text{g/ml}$
(+ 0.004% SDS)

Fig. 3-2-17 二重破壊株のBrefeldin A感受性

- Tetrad 1 親株
- Tetrad 2 *pmd1*破壊株
- Tetrad 3 *bfr1*破壊株
- Tetrad 4 *pmd1/bfr1*二重破壊株

Sensitivities for several metabolic inhibitors or ions

	wild	Δ pmd1	Δ bfr1	Δ pmd1/ Δ bfr1	
cation					
CaCl ₂	500	500	500	500	(mM)
MgCl ₂	> 200	> 200	> 200	> 200	(mM)
LiCl	5	5	5	5	(mM)
anion					
Na ₃ VO ₄	> 2	> 2	> 2	> 2	(mM)
actinomycin D	10	10	10	10	(μ g/ml)
cycloheximide	20	10	20	2	(μ g/ml)
thiabendazole	≥ 20	20	20	20	(μ g/ml)
hydroxyurea	20	20	20	20	(mM)
trichostatin A	> 5	> 5	> 5	> 5	(μ g/ml)
staurosporine	> 3	> 3	> 3	3	(μ M)
K-252a	20	10	1	0.1	(μ M)
brefeldin A	> 5	> 5	2	1	(μ g/ml)

Table 3-28 pmd1/bfr1二重破壊株の各種イオン、薬剤感受性

Brefeldin A以外の薬剤に対してはそれほど感受性の上昇は見られず、*pmd1*単独破壊株と同程度であった (Table 3-2-8)。

第7項 K-252a耐性株の取得

*pmd1/bfr1*二重破壊株がK-252aに対して超感受性を示したことから、この株を利用してK-252a耐性株の取得が可能になった。両遺伝子破壊ともにORFの一部を*ura4⁺*遺伝子と入れ替えているためにそれぞれの遺伝子が復帰することはない。そこでEMS終濃度2%、反応30℃、30分～1時間、生残率5～10%の条件で変異処理した。得られたK-252a耐性株は温度感受性 (ts) 及び低温感受性 (cs) を調べ、そのどちらかを保持しているものを取得した。

合計4回の変異処理でts、csをもつK-252a耐性株が19株取得できた。現在そのts、csの優劣決定、およびK-252a耐性との連鎖を調べている。

第3節 まとめと考察

K-252aの酵母に対する作用を調べたところ、動物細胞の場合と同様に倍数化が観察された。このことはDNA再複製ブロックに関与するプロテインキナーゼが真核生物全体で共通していることを示唆している。現在までに酵母の変異株で倍数性を変化させるものはいくつか知られているが、それらの大部分はチューブリンの変異やSPB (spindle pole body) の複製ができないことにより紡錘体形成が異常になったもの(75, 76)、Kinesin類似のMotor蛋白質の変異により染色体の分離ができなくなったもの(77)、あるいは染色体の凝縮が不完全になったために正常な染色体分離ができなくなったものなど、M期の現象が正常に起こらなくなった変異株である。この点でK-252aにより倍数性が変化する場合とは明らかに異なっている。今回取得し、解析を行った*ucm*変異株はK-252a特異的に感受性となった株であり、K-252aの標的キナーゼの遺伝子に変異が入ったものと期待された。現在までのところ*ucm2*および*ucm3*遺伝子は不明であり、これらが目的のキナーゼをコードしている可能性は依然残っている。これらの遺伝子をクローニングする過程で2つの新規遺伝子と1つの興味深い融合遺伝子を取得することができた。

sks1 遺伝子は線虫 *C. elegans* の F37A4.5 遺伝子産物や、マウスやハエの *Mov34* 遺伝子産物(71)と相同性のある蛋白質をコードしていた。これらの遺伝子の機能は不明であり、遺伝解析の容易な *S. pombe* で相同遺伝子が取られたことは今後この遺伝子群の解析に大きな利点になると考えられる。

sks2 遺伝子は原核生物から高等真核生物まで広く保存されているストレス蛋白質 hsp70 蛋白質群の一つをコードしていた。この遺伝子がどのようにして K-252a に対する耐性を賦与するのかその機構については不明である。本遺伝子の感受性相補能は極めて弱いこと、また K-252a 存在下での増殖もまた極めて遅いことから、本遺伝子は K-252a に対する感受性に直接関与する遺伝子ではなく、

K-252aによって引き起こされたストレス、おそらくは不活性になった蛋白を正常に戻すことによって細胞の生存を維持していると考えられる。

また野生型遺伝子ではないが、ベクターの一部との融合によって生じた遺伝子がK-252a感受性を相補した。この融合遺伝子は*hmtI*遺伝子(73)の nucleotide binding siteを完全に含む形で融合しており、おそらくはこの部分にK-252aが結合し、本来の標的にK-252aが結合することを量的に阻害しているのではないかと考えられる。本遺伝子産物が他の核酸アナログ型の阻害剤に対しても耐性を賦与できるかどうか興味深い。

*ucmI*遺伝子は遺伝解析の結果、Brefeldin A耐性に関与する*bfrI*遺伝子と同一であることが明らかとなった。*ucmI*変異株の相補で本遺伝子を取得することができなかったが、これはトランスフォーメーションの段階でレプトマイシンBを用いて多剤耐性遺伝子を排除したためと考えられる。*bfrI*遺伝子破壊株は*ucmI*変異株と同じ形質を保持しており、実際にK-252aとBrefeldin Aに対してのみ感受性を示し、スタウロスボリンには感受性にならなかった。多剤耐性遺伝子が構造類縁体に対しこのように親和性の違いを示すことは興味深い。また同じ多剤耐性遺伝子である*pmdI*の破壊を組み合わせることにより、K-252aとBrefeldin Aに対して親株の100倍もの感受性になった株ができた。この株を用いてK-252a耐性株を取得でき、今後この変異を相補する遺伝子を分離することによりK-252aの標的キナーゼを同定できると考えられる。

第4章 未成熟染色体凝縮 (PCC) の誘導

第1節 材料と方法

第1項 使用動物培養細胞株

本実験に使用した動物細胞株をTable 2-1-1に示す。

第2項 培地

本研究に用いた動物細胞用の培地、及びPBSの組成をTable 2-1-2に示す。

特に明記しない限り試薬はすべて国産化学の特級を用いた。

第3項 培養条件および細胞継代法

動物細胞の培養は5% CO₂ 37℃で培養を行った。接着系の細胞の用いるトリプシン溶液はトリプシン (DIFCO TRYPSIN 1:250 #0152-13-1) をPBSで2%になるように溶解し、ろ過滅菌したものをを用いた。

第4項 薬剤の細胞周期への効果検定

薬剤の動物細胞に対する作用の検定にはCHO細胞は非同調系 (Random Culture)、3Y1細胞はEarly S期同調培養系の2種の細胞系を用いた。

CHO細胞ではHU 2 mM 12時間処理、3Y1細胞ではHU 2.5 mM処理によりEarly S期に導入後、細胞ヘスタウロスボリン及びcaffeine 5 mMを添加し、PCC誘導能を検討した。DNA含量の検討にフローサイトメトリーを用いた解析を用い、形態観察には倒立型顕微鏡DIAPHOTO (Nikon社)、および蛍光顕微鏡BH2 (Olympus社)を使用した。

第5項 フローサイトメトリー用サンプル調製

フローサイトメトリー用のサンプルは(1)裸核染色あるいは(2)エタノール固定染色により調製した。裸核染色に用いた試薬の組成はTable 2-1-3に示す。測定はすべてEPICS C (Coulter社)を用い、488 nmの励起波長で行った。

(1) 裸核染色

接着系の細胞はトリプシン処理により細胞浮遊液をつくり、 $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞を遠心で集めた後、浮遊系の細胞は $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞を直接遠心で集めて50 μ l PBS-NP40溶液に懸濁し、500 μ l NP-PI溶液を加えることで染色した。

(2) エタノール固定染色

裸核染色の場合と同様の方法で細胞を集め、300 μ l PBSに懸濁後、 -20°C にしたエタノールを700 μ lをゆっくりと加えに固定し、 -20°C に保存した。染色は固定した細胞をPBSで二度洗い、抗MPM-2抗体反応をした後PBS-PI溶液を加えることで調製した。

第6項 蛍光抗体染色

細胞のM期特異的抗原MPM-2の染色には抗MPM-2抗体、FITC結合抗マウス抗体を用いた。細胞はカバーガラス上で培養し、固定は -20°C メタノールを用いた。核との2重染色にはPBS-PIを用いた。

第7項 染色体染色法

細胞の染色体の染色にはカルノア固定法を用いた。

Colcemidを1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加して集積したM期の細胞を1.5 mlサンプリングチューブを用いて集め、0.55 % KCl溶液で室温で20分膨潤させた。次に3倍量のカルノア液(メタノール75 %、酢酸25 %溶液)を加え、30分以上固定した。一度カルノア液で洗った後水を薄く乗せたスライドガラスにたらし、細胞をはじかせ、染色体を広げる。乾燥した後にギムザ染色(Merck, Art. 9204)あるいはDAPIやHoechst 33258で染色し、顕微鏡で観察した。

第8項 透過型電子顕微鏡のサンプル調製

電子顕微鏡用のサンプル調製はFig. 4-1-1に示す。サンプルは酢酸ウラニウムを用いたネガティブ染色し、ミクロトームMT-2 (Surval社) で超薄切片を作製した。観察はJEM 200CX (日本電子)、100 kVで行った。

第9項 Cdkキナーゼの免疫沈降と活性測定

各cyclinに対する特異的抗体を用い免疫沈降することでCdkキナーゼ複合体の分離を行った。各種抗cyclin抗体はSantaCruz社より購入した。免疫沈降に用いた溶液及び方法は文献(52)に従った。細胞抽出液の蛋白量はLowry法により定量し、精製に用いるサンプルの蛋白量をそろえた。基質にはヒストンH1 type S-III (Sigma, H 5505) 及び γ -ATP (Amersham, PB 10218) を用いた。

第10項 使用薬剤

スタウロスポリン、K-252aは協和発酵より分与していただいた。

代謝阻害剤としてHydroxyurea (Sigma, H 8627) Colcemid (Demecolcine; Sigma, D 7385) Caffeine (和光純薬 034-06782) を用いた。

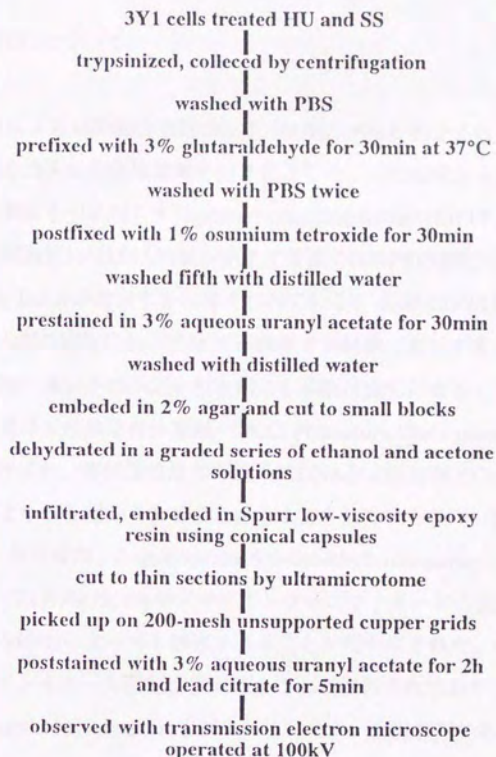


Fig. 4-1-1 電子顕微鏡サンプル調整法

第2節 結果

第1項 序 -PCCについて-

RaoとJohnsonによる細胞融合実験(20)で、M期の細胞と融合された間期の核は速やかに核膜を消失し染色体凝縮を引き起こした。この結果からM期の細胞質には染色体の凝縮を引き起こすM-phase promoting factor (MPF) が存在しており、間期の細胞質にはDNA複製が完了するまではMPFの産生を阻害するM-phase delaying factorが存在すると考えられている。実際にDNA複製が終了していないG1、S期の細胞においてMPFが産生されM期に進行することはその結果生じた娘細胞の遺伝子の不足を引き起こし細胞は致死になると考えられる。このような現象は未成熟染色体凝縮 (PCC; Premature Chromosome Condensation) と呼ばれ、齧歯類の培養細胞系にDNA合成阻害剤とCaffeineを共存させることにより引き起こされることがよく知られている(78)。また最近になってCaffeine以外の薬剤、2-aminopurineや6-dimethylaminopurineといったプロテインキナーゼ阻害剤(79, 80)やプロテインフォスファターゼの強力な阻害剤であるokadaic acid(81)によっても誘導されることが明かにされた。Caffeineは*in vitro*でプロテインキナーゼ阻害活性があることが報告されており、2-aminopurine、6-dimethylaminopurineもプロテインキナーゼ阻害剤である。このことからプロテインキナーゼ阻害剤の少なくとも一部にはPCC誘導活性がある可能性がある。

一方、細胞のチェックポイント機構の一つとして、自殺機構 (アポトーシス; Apoptosis) がある(82)。これは修復不能のDNA損傷が入った場合などに細胞の増殖を阻止する機構であり、正常な免疫系の細胞においても自己抗原に反応性のあるものがこの機構によって個体から除かれる。この過程で染色体凝縮及びヌクレオソームレベルまで分解 (Fragmentation) が観察される。アポトー

シスは最近の研究から (1) 複数の増殖因子からの矛盾したシグナルが送られてきた場合 (2) Rb欠損細胞や免疫系の細胞でp53蛋白の急激な上昇がおきた場合 (3) 不完全なDNA virusが感染した場合におきることが知られている。また逆に正常な組織でおきるアポトーシスをDNA virusが阻止すること (83, 84)、またがん遺伝子であるbcl-2がアポトーシスを防ぐこと (85)が知られている。アポトーシスの過程に起こる染色体凝縮は形態的にはPCCと極めてよく似ており、その違いはPCCでは一度染色体凝縮が起こり核分裂が進行した後に再び喚起の状態に戻るのに対し、アポトーシスでは染色体凝縮の後はそのまま細胞は死に向かうところである。

スタウロsporinはプロテインキナーゼ阻害剤であり、Caffeine同様PCCを誘導する可能性があると考え、検討した。

第2項 スタウロスポリンのPCC誘導活性

(1) 3Y1細胞に対するPCC誘導

スタウロスポリンにPCCを誘導する活性があるかを検討するために3Y1細胞を用いて解析した。3Y1細胞をEarly S期に同調し、HUを洗わずにスタウロスポリンを0.2、0.4、1.0、2.0、4.0、10.0、20.0 nM添加し24時間後の形態を観察した (Fig. 4-2-1)。スタウロスポリンを加えない場合にはM期細胞はほとんど観察されなかったが、スタウロスポリンを加えた場合には0.2 nMの添加でもM期の細胞が観察され、その割合はスタウロスポリンの濃度に依存していた。スタウロスポリンによって引き起こされたPCCは今までによく研究されてきたCHO細胞がCaffeineによって引き起こされるPCCと同じ形質を示しているのかについて次に検討した。

CaffeineによるCHO細胞に対するPCCでは周期的な核分裂が繰り返され多くの微小核を持った細胞が形成される。しかしながらスタウロスポリンの3Y1細胞に対するPCCではこのように周期的に間期の状態になることはなく、M期の形態のままであった。このような細胞において染色体の状態がどのようなになっているかをカルノア固定により調べた (Fig. 4-2-2)。Early S期においた3Y1細胞にスタウロスポリンを0、20、40、100 nM加え12時間後の細胞を集めてカルノア固定した。スタウロスポリンを加えない場合は12時間後でもほとんどが間期の形態を示し、M期の形態を示したものは6.2%に過ぎなかった。しかしながらスタウロスポリンを20 nM加えた場合にはM期の形態を示した細胞は70.3%になり、染色体は凝縮して小さな粒子状になり、いくつかが集まって塊になっていた。一般にカルノア固定したM期の細胞は染色体が一本一本ばらばらに離れて観察されるが、スタウロスポリンを処理した細胞では凝縮した染色体が一つの固まりとして観察されることから、核膜の崩壊が起こっていないことが予想された。スタウロスポリンの濃度をさらに濃くした場合M期の形態をした細胞

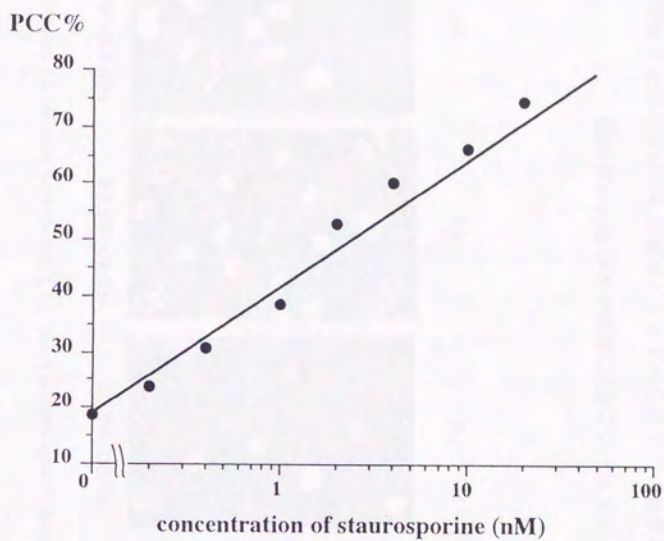


Fig. 4-2-1 スタウロスポリンによる未成熟染色体凝縮の誘導

Premature chromosome condensation in rat 3Y1 fibroblasts induced by staurosporine

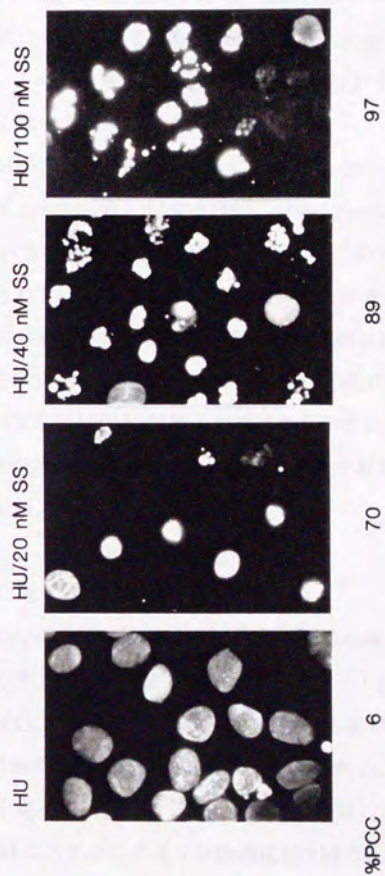


Fig. 4-2-2 スタウロスポリンによる3Y1細胞の未成熟染色体凝縮

カルノア固定を行い、スタウロスポリン各濃度でのPCCの割合を算出

の比率が上昇し、さらに凝縮した染色体の粒子がばらばらになっていた。このことからスタウロスポリンの濃度が薄い場合に染色体凝縮は起こるが核膜崩壊は起こらない可能性がある。このことを電子顕微鏡を用いて確認した (Fig. 4-2-3)。黒く丸い塊が凝縮した染色体であり、周囲に所々が崩壊した核膜が存在している。核膜のほとんど確認できない細胞も存在したがそのような細胞の割合は30 %程であり、スタウロスポリンによる3Y1細胞に対するPCCでは核膜は不十分にしか崩壊しないことが示された。

また一般に、M期の細胞には他の間期には見られない抗原 (MPM-2抗原) の発現が観察されており、これに対する抗体 (MPM-2 antibody) が得られている。CHO細胞を用いたCaffeineによるPCCの場合にはこのMPM-2抗原が出現していることが報告されているのでこの抗体を用いてスタウロスポリンの3Y1細胞に対するPCCの時のM期特異的抗原の出現を共焦点顕微鏡を用いて観察した。Fig. 4-2-4に示すようにM期の細胞ではMPM-2抗原の出現が見られたが、スタウロスポリンによるPCCではMPM-2抗原の出現は見られなかった。このことは3Y1細胞とCHO細胞の違いを示している可能性が考えられる。次に細胞をCHO細胞に移して解析した。

(2) CHO細胞に対するPCC誘導

現在までにPCCの研究は主にCHO細胞やBHK細胞の様なハムスター由来の細胞で行なわれてきている。前節で用いた細胞はラット由来の3Y1細胞であり、CaffeineによるPCCにおいてもM期特異的抗原の出現が見られないことからハムスター由来の細胞とは反応性が異なると考えられる。このことを確認するためにCHO細胞を用いて検討した (Fig. 4-2-5)。予想した通りCHO細胞ではCaffeineの場合と同様にスタウロスポリン低濃度10 nMで周期的なPCCが起り細胞は凝縮した核や微小核化した核をもっていた。またスタウロスポリンの濃度を100 nMの高濃度にすると逆にPCCが抑制されることが分かった。このときの核を単離し、DNA含量を測定したのがFig. 4-2-6のフローサイトグラムである。

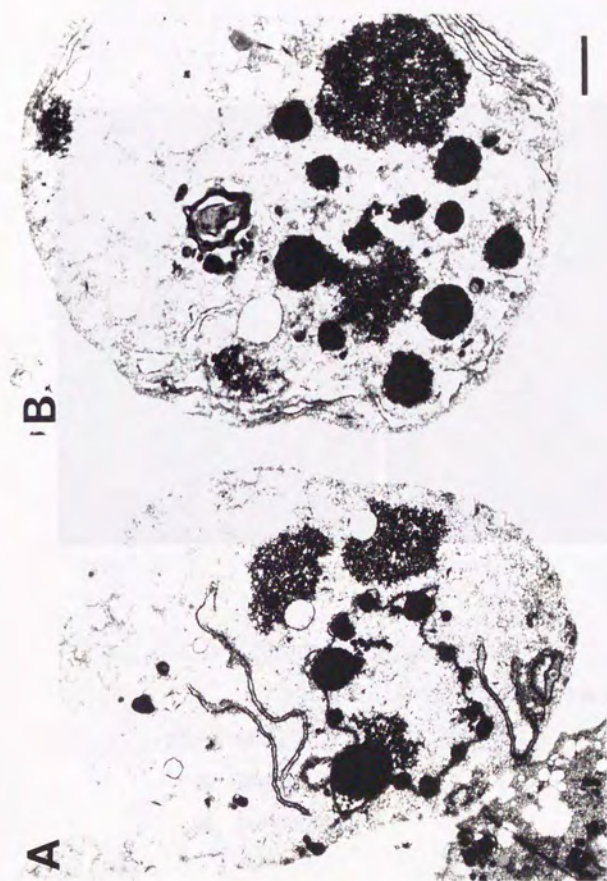


Fig. 4-23 スタウロスポリンによる3Y1細胞の未成熟染色体凝縮 (電顕像)

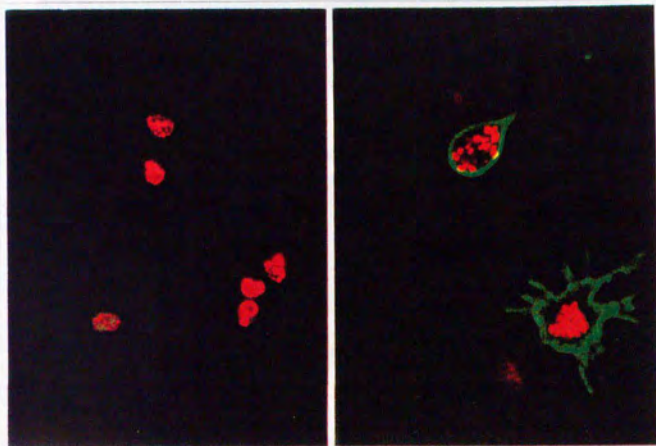


Fig. 4-2-4 3Y1細胞でのMPM-2抗原の出現

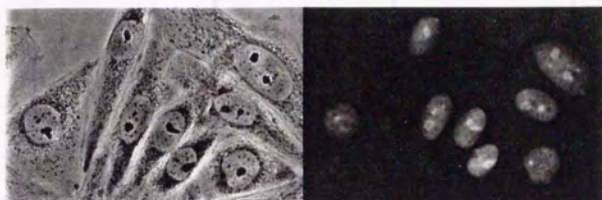
Left. スタウロスポリンによる未成熟染色体凝縮

Right. M期における染色体凝縮

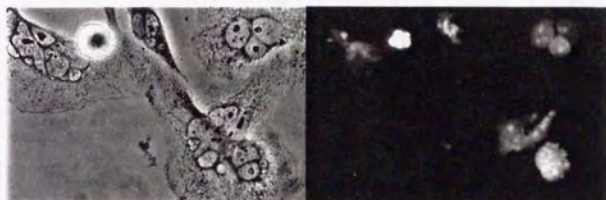
赤、染色体 (PI染色)

緑、MPM-2抗原

+ HU



+ HU + Staurosporine



+ HU + Staurosporine + Colcemid

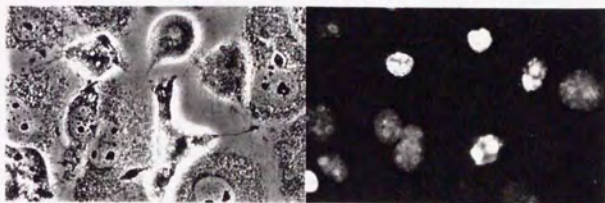


Fig. 4-2-5 スタウロスポリンによるCHO細胞のPCC

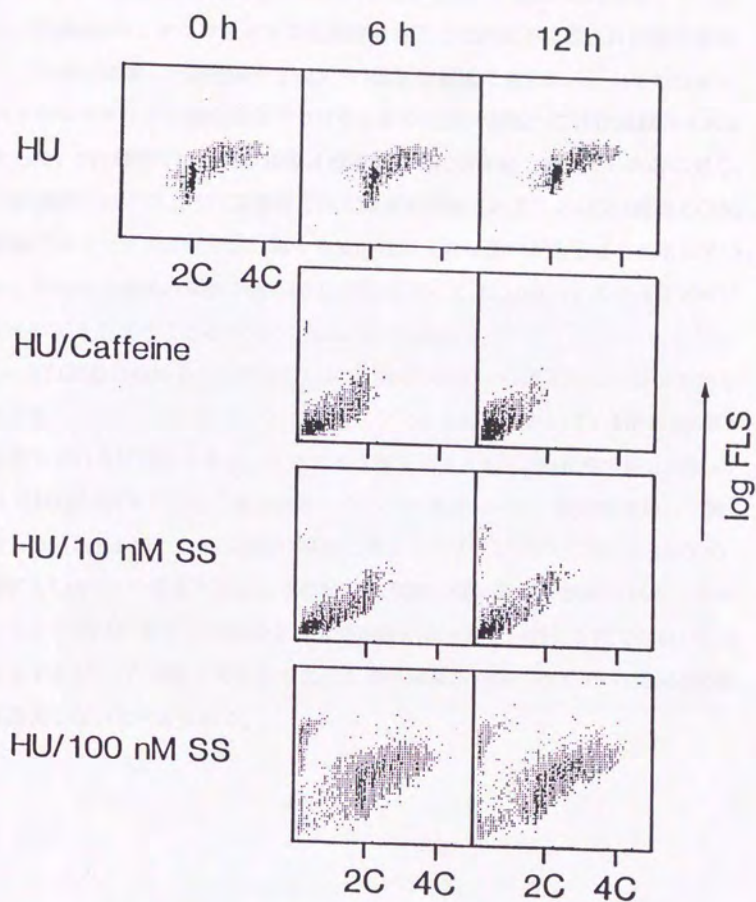


Fig. 4-2-6 CHO細胞でのスタウロスポリンによるPCC

低濃度のスタウロスポリンでPCCの誘導がおこり、微小核が出現するが高濃度スタウロスポリン存在下ではPCCの誘導がかからない

HUによってS期に止めた細胞ではDNA含量が2Cから4Cの間に存在しているが、Caffeineやスタウロスポリン低濃度共存下ではPCCが誘導され核膜が崩壊したために凝縮した染色体が2C以下の低蛍光領域に見られる。しかしながらスタウロスポリン高濃度共存下では明らかな低蛍光領域への移行は観察されなかった。3Y1細胞ではPCCの誘導は濃度依存的に引き起こされていたのに対し、CHO細胞ではこのように高濃度でPCC誘導が抑制されることは3Y1細胞とCHO細胞ではスタウロスポリンに対する反応性に大きな違いがあることを示している。またヒト由来の細胞であるHeLa細胞に対してはCaffeineもスタウロスポリンもPCCを引き起こさなかった (data not shown)。

3Y1細胞との場合とは異なりCHO細胞でのPCCでは周期的な核分裂が繰り返されていることから、スタウロスポリンによるPCCにおいてもMPM-2抗原が出現している可能性がある。このことを確かめるために3Y1細胞の時と同様にPIとMPM-2抗体による二重染色を行ない、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した (Fig. 4-2-7)。3Y1細胞の場合と異なりスタウロスポリンによるPCCの時にもCaffeineの場合と同じようにMPM-2抗原の強い発現が観察された。このことからMPM-2抗原は周期的な核分裂が繰り返される一般的なPCCにおいては出現するが、3Y1細胞で見られたような染色体凝縮が続くPCCではMPM-2抗原は出現しないと考えられる。

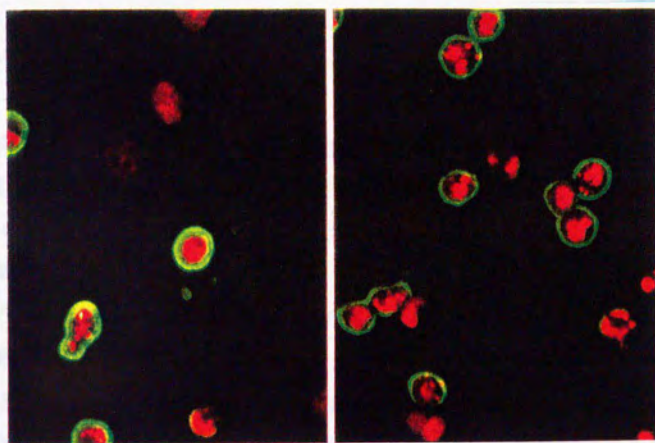


Fig. 4-2-7 CHO細胞でのMPM-2抗原の出現

Left. スタウロスポリンによる未成熟染色体凝縮

Right. Caffeineによる未成熟染色体凝縮

赤、染色体 (PI染色)

緑、MPM-2抗原

(3) PCC条件下でのCdc2キナーゼ活性活性の変動

3Y1細胞とCHO細胞の間でスタウロスポリン及びCaffeineによって誘導されるPCCでMPM-2抗原の出現に大きな差が見られた。MPM-2抗原はM特異的に出現する抗原であり、いくつかの蛋白質のSer/Thr残基がリン酸化されたものであることが明らかになっている。このリン酸化を引き起こすキナーゼは複数存在すると考えられており、その内一番MPM-2抗原を誘導するキナーゼはCdc2キナーゼであることが分かっている。そこでCHO細胞で観察されたMPM-2抗原がCdc2キナーゼによるものであるかを検討する目的でPCC条件下でのCdc2キナーゼ活性を*in vitro*で測定した。

薬剤の共存を始めてから6時間目と12時間目に細胞を回収し、抗cyclinA抗体及び抗cyclinB1抗体を用いてCdk複合体を回収し、ヒストンH1を基質としてキナーゼ活性を検討した。CHO細胞ではスタウロスポリン、Caffeine添加後、PCCが観察され始める頃からcyclinB1キナーゼの強力な活性化が観察された。またこのときcyclinAキナーゼも弱いながら活性化していた (Fig. 4-2-8)。しかし3Y1細胞ではこの二つのキナーゼは全く活性化していなかった。

以上の結果からCHO細胞でMPM-2抗原の出現が見られるのに、3Y1細胞では観察されないのはCdkキナーゼの活性化がCHO細胞ではスタウロスポリン、Caffeineで誘導されるのに対し、3Y1細胞では誘導されないためだと考えられる。

CHO

α -cyclinA

HU

+Col +Col +Col
+SS +Caf



α -cyclinB1

HU

+Col +Col +Col
+SS +Caf



3Y1

α -cyclinA

HU

+Col +Col +Col
+SS +Caf



α -cyclinB1

HU

+Col +Col +Col
+SS +Caf

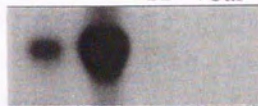


Fig. 4-2-8 Cdkキナーゼ活性

CHO細胞、3Y1細胞での未成熟染色体凝縮時
Cdkキナーゼ活性

HU処理12時間処理後、他の薬剤を添加し、
12時間後の活性を調べた。

第3節 まとめと考察

細胞にとってPCCと言われる現象は致死的なものであり、このようなことが起こらないように様々な制御機構が存在していると考えられる。今までによくPCCの研究されていたものとしてはハムスターのCHO細胞があるが今回ラットの3Y1細胞を用いて行なった結果、現在までに知られていたPCCとは違うPCCが誘導された。CHO細胞に対してCaffeineはPCCを誘導するがこのときには周期的な核分裂を繰り返し、微小核を持った細胞が蓄積する。しかしながら3Y1細胞では部分的なPCCの誘導しか起こらず、染色体は凝縮するが核膜崩壊は不十分の状態で停止している。このことは細胞によってPCCの誘導のかかりかたに差があることを示している。このようなPCCの誘導はスタウロスポリンにおいても同様であり、3Y1細胞に対しては不十分なPCCしか誘導できず、また一般的なPCCと異なり、周期的な核分裂は観察されない。

細胞にとってPCCは致死的な状態であるのでこれを防ぐ機構がいくつか存在すると考えられ、細胞によってはこのうちのいくつかが不完全になっているものがあると思われる。細胞によってPCCの進行の度合いが異なるのはこのことが原因になっている可能性がある。恐らくCHO細胞はプロテインキナーゼによる制御以外が不完全なためにこれを阻害してやればPCCが引き起こされるのであろう。それに対し3Y1細胞ではプロテインキナーゼによらない機構が存在し、PCCが核膜崩壊までしか進行しないと考えられる。このような制御の一つにcyclin Bの合成が含まれているという報告がある(81)。人の細胞でPCCが起きにくいのはS期においてはCdc2キナーゼの活性に必要な制御サブユニットであるcyclin Bが存在しないためであると考えられる。しかしスタウロスポリンをCHO細胞に対して作用させたときに何度か核分裂を繰り返すにも関わらずCaffeineの場合には観察されるM期特異的抗原は出現しておらず、このことはスタウロスポリンによるPCCはcaffeineによる場合とは違う側面を持っているこ

とを示している。

3Y1細胞で観察された染色体凝縮は、PCCと言うよりもむしろアポトーシスに近いと考えられる。アポトーシスでは周期的な核分裂は見られず、そのまま染色体のヌクレオソームレベルまでの断片化が引き起こされ、細胞は死に至る。3Y1細胞で見られた染色体凝縮がアポトーシスであることを証明するにはさらに染色体の断片化を観察する必要がある。

現在までのところ、M期への進行にはCdc2キナーゼの活性化が必要であると考えられており、実際CHO細胞のPCCではCdc2キナーゼの活性化が観察された。しかし3Y1細胞で見られたようにCdc2キナーゼの活性化なしに染色体凝縮が観察された例は少ない。またShiらはアポトーシスにもCdc2キナーゼの活性化が必要だと報告している(86)。しかし逆にCdc2キナーゼの活性は必要ないという報告もある(87, 88)。今回の結果はCdc2キナーゼ活性もCdk2キナーゼ活性も見られないまま染色体の凝縮が観察されており、その機構に興味を持たれる。

第五章 総括

細胞周期のG₁、G₂期に特異的な阻害剤のスクリーニングからいくつかの
プロテインキナーゼ阻害剤が見いだされた。特にプロテインキナーゼCを始め
とする各種キナーゼに対する強力な阻害剤であるスタウロスポリンが、可逆的
にG₁、G₂期停止作用を有することが発見された(34)。本研究はプロテインキナー
ゼ阻害剤であるK-252aがスタウロスポリンと構造が極めてよく似ているにも関
わらずG₂期停止作用のみが見いだされ、そのG₂期停止の間にDNA再複製を誘導
することにより、定量的に四倍体細胞を蓄積させることを見いだしたことから
出発し、プロテインキナーゼ阻害剤による細胞周期の脱制御について行なった
ものである。

プロテインキナーゼ阻害剤として知られている薬剤を種々調べたところ細
胞周期のG₁、G₂期を停止させるものがいくつか見いだされた。このことはG₁、
G₂期の制御にプロテインキナーゼが深く関わっていることを示唆している。プ
ロテインキナーゼ阻害剤のうちでインドロカルバゾール骨格をもちスタウロス
ポリンと構造的に良く似ているK-252aとRK-286Cはスタウロスポリンとは異な
り、G₂期停止作用のみを示しさらにそのG₂期停止の間にDNA再複製を行なう
ことにより4倍体細胞を形成した。このような作用は他の調べたかぎりのイン
ドロカルバゾール骨格をもつプロテインキナーゼ阻害剤では見られなかったこ
とからK-252aとRK-286Cに特有の作用だと考えられる。K-252aによる細胞の倍
数化過程について詳しく調べた結果、この過程でM期の形態をもつ細胞が出現
しないこと、及びG₁期の進行を阻害するような条件おいた場合には倍数化が見
られないことが明らかとなった。このことはK-252aによる倍数化の過程には、
M期は存在していないが機能的なG₁期の存在することが示唆された。この過程
において、G₂/M期の進行に必要なCdc2活性化は全く認められ無いにも関わら

ず、キナーゼとしての活性発現に必要なチロシンの脱リン酸化は起こっていた。このことはキナーゼとして活性化しないまま、Cdc2のG2型からG1型への変換が誘導されていることを示唆している。これにより細胞はG2記憶（G2期にあるという記憶）を失い、細胞周期はリセット状態となってG1期から再開される。またDNA再複製に対応する時期にCdkキナーゼの弱い活性（おそらくはCdk2キナーゼの活性）が認められたことから、G1期に必要なCdkキナーゼの活性化はK-252aによって阻害されないと考えられ、これによりDNA再複製が起こると考えられる。しかしながら一度複製を終了したDNAがM期を経ずに再び複製を開始するのを防ぐ機構であるDNA再複製ブロックがどのようにしてK-252aにより解除されるのかについては不明である。このK-252aの倍数化誘導活性は他の細胞についても同様に認められ、特に細胞周期の制御が厳密に行なわれているヒトの細胞でも認められるのは注目に値すると思われる。

スタウロスポリンはラットの正常繊維芽細胞3Y1に対しては高濃度ではG2期停止、低濃度ではG1期停止作用を示す。この作用が他の細胞に対しても普遍的に認められるか調べたところ、正常細胞であるBalb/c-3T3細胞に対しては3Y1細胞と同様にG1、G2期停止作用を示したがDNA virusやv-srcでトランスフォームした細胞に対してはG1期停止作用を示さなかっただけでなく、G2期停止の間にK-252aの場合と同様の倍数化が観察された。v-rasによってトランスフォームした細胞などは正常細胞と同様にG1、G2期停止作用を示したため一般化することはできないが、このことはG1期の制御とDNA再複製ブロックの制御機構がともにトランスフォーメーションにより異常になったことを示している。また同時にスタウロスポリンが正常細胞とv-ras以外でトランスフォームした細胞との違いを認識しうる薬剤であるということが出来る。

下等真核生物の酵母は減数分裂を行ない、古典的遺伝学から組み替えDNA実験まで容易に行なえる実験系であり、真核生物全般のモデル系として使われている。酵母においても倍数性的変化は、接合と胞子形成以外では例外的にしか

起こらない。このことはDNA再複製ブロックの機構が酵母にも存在することを示唆している。K-252aを*S. cerevisiae*、*S. pombe*に処理すると多倍数化が観察され、酵母にもK-252aが作用することが分かった。*S. pombe*を用いて得られた感受性変異株は3つの相補群に分類され、感受性をサプレスする野生型のクローンを取得することで多剤耐性に関わる遺伝子*sks1*、及びストレス耐性に関与する遺伝子*sks2*を得た。これらの遺伝子産物は直接K-252aの標的分子と関わるものではないと考えられるが薬剤耐性の機構を知るうえで興味ある遺伝子である。特に*sks1*遺伝子は他の多剤耐性と異なり、生育に必須であるためその耐性賦与機構には興味が持たれる。またK-252a超感受性株である*ucm1*変異株の変異点を遺伝学的手法を用いて決定したところ、多コピーで多剤耐性を賦与する遺伝子の一つである*bfr1*と同一であった。おもしろいことに*bfr1*遺伝子破壊株はBrefeldin AとK-252a特異的に感受性となっており、*ucm1*変異株も同じ形質を示した。多コピーで多剤耐性を賦与する遺伝子産物がなくなることで特定の薬剤にたいする感受性が上昇することは興味深い。同じく多剤耐性遺伝子として分離された*pmd1*の場合、遺伝子破壊を行うと多剤感受性となる。この点で*bfr1*は*pmd1*と異なり、おそらくは1コピーで機能する場合*bfr1*の方が基質特異性が高いため、このような形質が現れるのであろう。また*bfr1*と*pmd1*の二重破壊株はK-252aに対して親株の100倍もの感受性を示した。この株を利用し、K-252aに対する耐性株を分離することが可能になった。プロテインキナーゼ阻害剤のように、その薬剤の標的が複数存在する場合、標的分子を同定するには耐性株からのアプローチの方が感受性株からのアプローチよりも有効であると考えられる。今後、分離したK-252a耐性株を用いて、K-252aの標的分子、さらにDNA再複製ブロック機構に関わる蛋白群の同定が可能であると考えられる。

DNA再複製ブロックがM期に対するS期の依存機構と考えると、PCCを防ぐ機構はその逆にS期に対するM期の依存機構ということができる。この正反対の現象が同じプロテインキナーゼ阻害剤によって引き起こされることは興味

深いことである。また同じ条件でスタウロスポリンを処理しているにも関わらずPCCの進行の度合い（全く起こらないか、核膜崩壊までか、核分裂まで進行するか）が細胞によって異なることはDNA再複製ブロックが酵母から保存されていることから考えると不自然に感じられる。この理由としては細胞内にはPCCを防ぐ機構としてプロテインキナーゼに依らない機構（rad9など）が複数存在しているが、細胞によりこの内のいくつかの機構が充分に働かなくなっている場合があり、その程度にPCCの進行の度合いが依存している可能性がある。さらにCHO細胞ではスタウロスポリンの濃度によりPCCの誘導活性が異なることは感受性の異なる二種のプロテインキナーゼが分裂の抑制と促進のそれぞれに関与していることを示唆していると考えられる。

S期のM期に対する依存機構であるDNA再複製ブロック、逆にM期のS期に対する依存機構であるPCCを防ぐ機構がともにプロテインキナーゼによって脱制御を受けることから次のモデルが考えられる（Fig. 5-1）。細胞周期はS期を中心とした周期とM期を中心とした周期の二つの周期から成り立っており、この二つの周期はプロテインキナーゼが関与する機構によって共役している。この共役に関与するプロテインキナーゼを阻害すると正常の細胞周期からM期の周期が切り離されるためにM期を欠いた細胞周期が誘導され、またS期の進行を阻害する条件とともに処理すると逆にS期の周期が切り離されるためにS期を欠いた細胞周期が誘導されると考えられる。今後このような細胞周期の共役に必要なプロテインキナーゼを同定することが細胞周期の制御を理解するうえで必要であり、スタウロスポリンやK-252aはそのための良い阻害剤であると期待される。

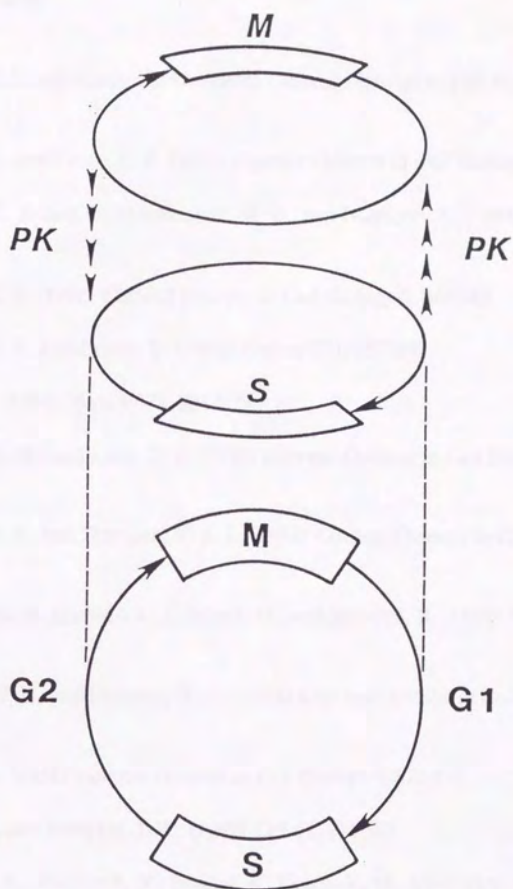


Fig. 5-1 Model of cell cycle regulation by protein kinases

References

1. Elledge, S. J., and Harper, J. W. (1994) *Current Opinion in Cell Biology* 6, 847-852
2. Oehlen, B., and Cross, F. R. (1994) *Current Opinion in Cell Biology* 6, 836-841
3. Schwob, E., Bohm, T., Mendenhall, M. D., and Nasmyth, K. (1994) *Cell* 79, 233-244
4. Draetta, G. F. (1994) *Current Opinion in Cell Biology* 6, 842-846
5. Hannon, G. J., and Beach, D. (1994) *Nature* 371, 257-260
6. Peters, G. (1994) *Nature* 371, 204-205
7. Picksley, S. M., and Lane, D. P. (1994) *Current Opinion in Cell Biology* 6, 853-858
8. Lam, E. W.-F., and Thangue, N. B. L. (1994) *Current Opinion in Cell Biology* 6, 859-866
9. Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. (1994) *Nature* 371, 534-537
10. Coleman, T. R., and Dunphy, W. G. (1994) *Current Opinion in Cell Biology* 6, 877-882
11. Murray, A. (1994) *Current Opinion in Cell Biology* 6, 872-876
12. Dasso, M., and Newport, J. W. (1990) *Cell* 61, 811-823
13. Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M., and Beach, D. (1991) *Cell* 64, 1111-1122
14. Enoch, T., Carr, A. M., and Nurse, P. (1992) *Genes & Development* 6, 2035-2046
15. Saka, Y., and Yanagida, M. (1993) *Cell* 74, 383-393
16. Weinert, T. A., Kiser, G. L., and Hartwell, L. H. (1994) *Genes & Development* 8, 652-665

17. Minshull, J., Sun, H., Tonks, N. K., and Murray, A. W. (1994) *Cell* 79, 475-486
18. Hoyt, M. A., Totis, L., and Roberts, B. T. (1991) *Cell* 66, 507-517
19. Li, R., and Murray, A. (1991) *Cell* 66, 519-531
20. Rao, P. N., and Johnson, R. T. (1970) *Nature* 225, 159-164
21. Broek, D., Bartlett, R., Crawford, K., and Nurse, P. (1991) *Nature* 349, 388-393
22. Hyles, J., Fisher, D., Woollard, A., and Nurse, P. (1994) *Cell* 78, 813-822
23. Blow, J. J., and Laskey, R. A. (1988) *Nature* 332, 546-548
24. Leno, G. H., Downes, C. S., and Laskey, R. A. (1992) *Cell* 69, 151-158
25. Blow, J. J. (1993) *J. Cell Biol.* 122, 993-1002
26. Yan, H., Gibson, S., and Tye, B. L. (1991) *Genes & Development* 5, 944-957
27. Tye, B.-K. (1994) *Trends in Cell Biology* 4, 160-166
28. Yoshida, M., Iwamoto, Y., Uozumi, T., and Beppu, T. (1985) *Agric. Biol. Chem.* 49, 563-565
29. Yoshida, M., Nomura, S., and Beppu, T. (1987) *Cancer Res.* 47, 3688-3691
30. Hamamoto, T., Gunji, S., Tsuji, H., and Beppu, T. (1983) *J. Antibiotics* 36, 639-645
31. Hamamoto, T., Seto, H., and Beppu, T. (1983) *J. Antibiotics* 36, 646-650
32. Yoshida, M., and Beppu, T. (1988) *Exp. Cell Res.* 177, 122-131
33. Yoshida, M., Nishikawa, M., Nishi, K., Abe, K., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1990) *Exp. Cell Res.* 187, 150-156
34. Abe, K., Yoshida, M., Usui, T., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1991) *Exp. Cell Res.* 192, 122-127
35. Kimura, G., Itagaki, A., and Summers, J. (1975) *Int. J. Cancer* 15, 694-706

36. Zaitzu, H., Tanaka, H., Mitsudomi, T., Mitsuzaki, A., Ohtsu, M., and Kimura, G. (1988) *Biomed. Res.* 9, 181-197
37. Pledger, W. J., Stiles, C. D., Antoniades, H. N., and Scher, C. D. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4481-
38. Gey, G. O., Coffman, W. D., and Kubicek, G. D. (1952) *Cancer Res.* 12, 264-265
39. Bubenik, J., Baresova, M., Viklicky, V., and al, e. (1973) *Int. J. Cancer* 11, 765-773
40. Friend, C., Scher, W., Holland, J. G., and Sato, T. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 378-
41. Nakano, N. (1966) *Tohoku J. Exp. Med.* 88, 69-84
42. Puck, T. T., Cieciura, S. J., and Robinson, A. (1958) *J. Exp. Med.* 108, 945-955
43. Macpherson, I., and Motagnier, L. (1964) *Virology* 23, 291-294
44. Fabricant, R. N., DeLarco, J. E., and Todaro, G. J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 565-569
45. Hayflick, L. (1965) *Exp. Cell Res.* 37, 614-
46. Girardi, A. J., Weinstein, D., and Moorhead, P. S. (1966) *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 4, 242-254
47. Nichols, W. W., Murphy, D. G., Gristofalo, V. J., Toji, L. J., Greene, A. E., and Dwight, S. A. (1977) *Science* 196, 60-63
48. Gluzman, Y. (1981) *Cell* 23, 175-182
49. Jainchill, J. L., Aaronson, S. A., and Todaro, G. J. (1969) *J. Virol.* 4, 549-553
50. Mitsunobu, F., Fukui, M., Oda, T., Yamamoto, T., and Yoyoshima, K. (1989) *Oncogene* 4, 437-442
51. Akiyama, T., Matsuda, S., Namba, Y., Saito, T., Toyoshima, K., and Yamamoto, T. (1991) *Molec. Cell. Biol.* 11, 833-842
52. Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J., and Kato, J.-y. (1994) *Molec. Cell. Biol.* 14, 2066-2076

53. Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., and Sasaki, Y. (1984) *Biochemistry* 23, 5036-5041
54. Loomis, C. R., and Bell, R. M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 1682-1692
55. Nishioka, H., Sawa, T., Hamada, M., Shimura, N., Imoto, M., and Umezawa. (1990) *J. Antibiot.* 43, 1586-1589
56. Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S.-i., Itoh, N., Shibuya, M., and Fukami, Y. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 5592-5595
57. Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y., and Masuma, R. (1977) *J. Antibiot.* 30, 275-281
58. Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., and Tomita, F. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 397-402
59. Nakanishi, S., Yamada, K., Kase, H., Nakamura, S., and Nonomura, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 6215-6219
60. Hedberg, K. K., Birrell, G. B., Habliston, D. L., and Griffith, O. H. (1990) *Exp. Cell Res.* 188, 199-208
61. Alfa, C. E., and Hyams, J. S. (1990) *J. Cell Sci.* 96, 71-77
62. Beach, D., and Nurse, P. (1981) *Nature* 290, 140-142
63. Barbet, N., Muriel, W. J., and Carr, A. M. (1992) *Gene* 114, 59-66
64. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) *Gene* 33, 103-119
65. Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M., and Warbrick, E. Experiments with Fission Yeast
A laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993
66. Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991) *Meth. Enzymol.* 194, 795-823
67. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. E. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
68. Yoshida, S., Ikeda, E., Uno, I., and Mitsuzawa, H. (1992) *Mol. Gen. Genet.* 231,

69. Toda, T., Shimanuki, M., and Yanagida, M. (1991) *Genes & Development* 5, 60-73
70. Nishi, K., Yoshida, M., Nishimura, M., Nishikawa, M., Nishiyama, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1992) *Molec. Microbiol.* 6, 761-769
71. Gridley, T., Gray, D. A., Orr-Weaver, T., Soriano, P., Barton, D. E., Francke, U., and Jaenisch, R. (1990) *Development* 109, 235-242
72. Grimm, C., Kholi, J., Murray, J., and Maundrell, K. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 215, 81-86
73. Ortiz, D. F., Kreppel, L., Speiser, D. M., Scheel, G., McDonald, G., and Ow, D. W. (1992) *EMBO J.* 11, 3491-3499
74. Nagao, K., Taguchi, Y., Arioka, M., Kadokura, H., Takatsuki, A., Yoda, K., and Yamasaki, M. (1995) *J. Bacteriol.* in press,
75. Baum, P., Yip, C., Goetsch, L., and Byers, B. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8, 5386-5397
76. Winey, M., Goetsch, L., Baum, P., and Byers, B. (1991) *J. Cell Biol.* 114, 745-754
77. Hagan, I., and Yanagida, M. (1992) *Nature* 356, 74-76
78. Schlegel, R., and Pardee, A. B. (1986) *Science* 232, 1264-1266
79. Schlegel, R., Belinsky, G. S., and Harris, M. O. (1990) *Cell Growth & Differentiation* 1, 171-178
80. Andreassen, P. R., and Margolis, R. L. (1991) *J. Cell Sci.* 100, 299-310
81. Steinmann, K. E., Belinsky, G. S., Lee, D., and Schlegel, R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6843-6847
82. White, E. (1993) *Genes & Dev.* 7, 2277-2284
83. Gregory, C. D., Dive, C., Henderson, S., Smith, C. A., Williams, G. T., Gordon, J., and Rickinson, A. B. (1991) *Nature* 349, 612-614

84. White, E., Cipriani, R., Sabbatini, P., and Denton, A. (1991) *J. Virol.* 65, 2968-2978

85. Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, T. M. (1988) *Nature* 335, 440-442

86. Shi, L., Nishioka, W. K., Th'ng, J., Bradbury, E. M., Litchfield, D. W., and Greenberg, A. H. (1994) *Science* 263, 1143-1145

87. Norbury, C., MacFarlane, M., Fearnhead, H., and Cohen, G. M. (1994) *Biochemical & Biophysical Research Communications* 202, 1400-6

88. Oberhammer, F. A., Hochegger, K., Froschl, G., Tiefenbacher, R., and Pavelka, M. (1994) *Journal of Cell Biology* 126, 827-37

謝辞

本研究を行うに当たり、終始懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学農学部教授堀之内末治先生、日本大学農獣医学部教授別府輝彦先生に謹んで感謝の意を表します。また、日々適切な指針を与えてくださり、ご助言いただきました東京大学農学部助教授吉田稔先生、西山真先生、サントリー株式会社阿部圭一氏に深く感謝いたします。また有形無形のご援助をいただきました、発酵学研究室の諸先輩方、ならびに現在研究室で働いている皆様にお礼申し上げます。*bfr1*遺伝子及び、*bfr1*破壊株を用いた研究は東京大学農学部微生物学研究室との共同で行いました。この場を借りて謹んでお礼申し上げます。

電子顕微鏡写真を撮るに当たり、快くご指導くださいました東京大学分子細胞生物学研究所電子顕微鏡室の平田愛子先生に深謝いたします。

今回実験を行うに当たりp13^{suc1}-Sephroseを分与くださいましたLaurent Meijer先生、Andre Picard先生、ならびにTAT1抗体を分与くださいましたIain Hagan先生に深く感謝いたします。

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成四年度博士課程進学

氏名 臼井 健郎

指導教官氏名 堀之内末治

論文題目 プロテインキナーゼ阻害剤による細胞周期の脱制御に関する研究

真核生物の細胞周期はDNA合成期であるS期と細胞分裂を行なうM期、およびそれぞれの準備期であるG₁, G₂期から成り立っており、増殖期の細胞はこの周期を回って遺伝的に等価な二つの娘細胞に分裂する。この細胞周期の中でDNA複製はS期で過不足なく一回だけ行なわれ、分裂を経なければ次のS期に入ることはない。また未複製DNAや損傷DNAが存在している場合、複製あるいは修復が完了するまでは次の細胞分裂へと進行しない。このようなDNA再複製ブロック制御や未複製分裂阻害機構はゲノムの倍数性を維持するために不可欠であり、もっとも基本的な細胞周期調節機構の一つである。我々は以前から細胞周期のG₁, G₂期に特異的な阻害剤のスクリーニングを行っており、強力なプロテインキナーゼ (PK) 阻害剤であるスタウロスポリン (STS) がラット正常繊維芽細胞3Y1の細胞周期の進行をG₁, G₂期で特異的に阻害することを見いだした。本研究はSTSに類縁のPK阻害剤であるK-252aが調べた限りすべての動物細胞に対し著しい多倍数体細胞を誘導する活性をもつという発見をもとに詳細な解析を行ない、K-252aによりM期を完全に欠いた細胞周期が誘導可能であること、また細胞のトランスフォーメーションによってその制御機構に変化が生じること、さらにPK阻害剤とS期阻害剤との共存により染色体の凝縮を誘導することから、DNA再複製ブロックと未複製染色体凝縮にある種のPKが関与することを明らかにしたものである。

1. K-252aによる細胞の倍数化

K-252aの細胞周期への影響を調べるために3Y1細胞をS期に同調し、細胞周期を再開させるとともにK-252aを培地に添加してDNA含量の変化をフローサイトメトリーを用いて解析した。K-252aで処理した細胞は一回目のDNA合成を終了しても分裂期に入らず、8時間のラグののち次のDNA合成が誘導され48時間後には8CのDNA含量をもつ細胞が蓄積した。この8時間のラグは代謝阻害剤との共存実験により機能的なG1期に相当することが示された。細胞周期進行に直接関与することが知られているPK (CDKs) の活性変動をヒストンH1を基質として調べたところ、M期で起こるはずの強力な活性化がK-252a存在下では認められず、S期に対応する時期にのみ弱い活性が観察された。以上のことからK-252aは細胞周期のG2期でその進行を阻害し、そのG2停止の間にG1期へ移行させることによりM期を完全に失った細胞周期を誘導し、細胞を倍数化させることが明らかになった。このような倍数化の誘導は調べたかぎりすべての細胞で認められ、特に3Y1細胞をv-srcによってトランスフォームしたSR-3Y1細胞では48時間後に最大32CのDNA含量をもつ細胞が蓄積するなど、一般にトランスフォーム細胞で著しい巨大核化が認められた。

2. K-252aの分裂酵母に対する作用と感受性変異株の分離

下等真核生物である分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*に対するK-252aの作用を調べたところ、動物細胞の場合と同様に倍数化が観察された。このことはDNA複製ブロックに関与するPKが真核生物全体で共通していることを示唆している。K-252aに対する超感受性変異株の分離したところ、すべて劣性の三つの相補群に分かれた。これらの変異株は野生株では倍数化が誘導されないような低濃度のK-252aにより倍数化が誘導され、STSに対する感受性は変化しなかった。従ってこれらの変異株はK-252a特異的に感受性になった株であり、DNA複製ブロック機構に変異が入った株であると考え、*ucm* (uncoupled cell cycle from mitosis) 変異株と命名した。

3. *ucm*変異株にK-252a耐性を賦与する遺伝子の解析

*ucm*変異株にK-252a耐性を賦与し、さらに多剤耐性遺伝子をさける意味でレプトマイシンBと交差耐性を示さない遺伝子を、野生株から作成したゲノムライブラリーを用いてクローン化したところ得られたクローンはすべてサブレッサー遺伝子であった。このうち2つの新規遺伝子 *sksl'*, *skss2* (*skss*: suppressor of K-252a-sensitive) が得られ、解析を行った。

3-1. *sks1* 遺伝子の解析

ucm2, *ucm3* 変異株に同時に耐性を賦与する遺伝子として得られた *sks1* 遺伝子を含むプラスミド pK21 をサブクローニングし、塩基配列の決定を行った。*sks1* 遺伝子は 308 アミノ酸からなる蛋白質をコードしており、ホモロジー検索の結果線虫 *Caenorhabditis elegans* の F37A4.5 遺伝子産物や、マウス・*Drosophila* の *Mov34* 遺伝子産物と相同性を示した。遺伝子破壊の結果、本遺伝子は生育に必須であった。本遺伝子をマルチコピーで導入された *S. pombe* 野生株は K-252a のほか、パナジン酸やシクロヘキシミド等に対しても耐性を示したことから本遺伝子は多剤耐性を賦与する遺伝子であることが明らかとなった。この耐性は *S. pombe* の多剤耐性遺伝子 *pmd1* を破壊した株においても観察されたことから *pmd1* 遺伝子産物を介さない耐性機構が *S. pombe* に存在することが示唆された。

3-2. *sks2* 遺伝子の解析

ucm1 変異株に極めて弱い耐性を賦与する遺伝子として得られた *sks2* 遺伝子を含むプラスミド pK11 をサブクローニングし、塩基配列の決定を行った。*sks2* 遺伝子は 612 アミノ酸からなる蛋白質をコードしており、ホモロジー検索の結果バクテリアから動物まで広く保存されている蛋白質である HSP70 family と高い相同性を示した。

4. *ucm1* 変異株の解析

ucm1 変異株は K-252a に対する感受性が野生株の十倍上昇した株である。*ucm1* 遺伝子は遺伝学的解析の結果、多コピーで brefeldin A (BFA) に対する耐性を賦与する遺伝子として東京大学農芸化学科微生物学研究室で分離された多剤耐性遺伝子 *bfr1* 遺伝子から 1 cM 以下の距離にマッピングされた。*bfr1* 遺伝子破壊株を用いて K-252a 感受性を検討したところ *ucm1* 変異株とほぼ同様の感受性が観察され、また *ucm1* 変異株は *bfr1* 遺伝子破壊株と同程度の BFA 感受性を示した。以上の結果から *ucm1* 遺伝子は *bfr1* 遺伝子と同一であると考えられる。*pmd1* の破壊株は、K-252a に対する感受性が野生株の二倍に上昇することが知られている。*pmd1*/*bfr1* 二重遺伝子破壊株を作成したところ K-252a に対する感受性が野生株の 100 倍以上上昇した超感受性株が得られた。現在この株を用いて K-252a 耐性変異とともに ts/cs が連鎖している変異株を分離・解析している。

5. STS による細胞の倍数化

我々は以前、STSが正常繊維芽細胞3Y1の細胞周期進行をG1, G2期で可逆的に阻害することを明らかにしてきた。このSTSの作用がすべての動物細胞に普遍的かどうかを検討したところ、いくつかのがん遺伝子やDNAウィルスによってトランスフォームされた細胞ではG1期停止が起らず、倍数化が観察された。3Y1細胞と3Y1をv-srcでトランスフォームしたSR-3Y1細胞を用いてCDKの活性を調べたところ、SR-3Y1細胞ではSTS添加によりG1/S期進行に必須なCyclin Aキナーゼの活性が上昇していることが明らかとなった。

6. STSによる未成熟分裂の誘導

一般にDNA複製を阻害された細胞はM期へと進行しないが、カフェイン等の薬剤により未成熟染色体凝縮(PCC)、あるいは未成熟分裂と呼ばれるM期へと進行することが知られている。STSがこのような活性を持つかを3Y1細胞を用いて検討を行った。S期に集めた細胞にSTSを添加したところ、高度な染色体凝縮が観察されたことからSTSにPCC誘導活性があることが示された。このときのCDKキナーゼ活性をヒストンH1を基質として検討したところ、Cyclin Aキナーゼ、Cyclin Bキナーゼとも活性が観察されなかった。

7. まとめと考察

本研究はPK阻害剤K-252aがM期を完全に欠いた細胞周期が誘導可能であること、DNA複製ブロック機構には酵母から動物細胞まで保存されているPKが関与していることを明らかにしてきた。残念ながら*ucm*変異株を用いた遺伝学的な解析からはこのPKを同定することはできなかったが、その過程でK-252aとBFAの感受性に関与する遺伝子*bfr1*を同定することができた。今後*pmd1/bfr1*二重遺伝子破壊株が超感受性株であることを利用した耐性変異株の解析からDNA複製ブロック機構に関わるPKを同定できると考えられる。また*ucm*変異株のK-252a感受性を相補する遺伝子を取得する過程で新規の多剤耐性遺伝子*sks1*を分離した。この遺伝子は今まで取得されているような多剤耐性遺伝子とは相同性がなくその耐性賦与機構には興味を持たれる。

STSはトランスフォーム細胞に対しG1期停止活性を示さず、倍数化を誘導した。このことはトランスフォーメーションによってG1期の制御機構およびDNA複製ブロック機構に変化が生じることを示している。トランスフォーム細胞ではSTS処理によりG1期進行に関わるCDKの活性が上昇していることから、この反応性の違いがトランスフォーム細胞で細胞周期の進行が阻害されない原因であることが示唆された。またSTSが正常細胞とトランスフ

オーム細胞の差異を検出できることを利用し、既存の抗がん剤との併用でより効率的にがんの化学療法ができると考えられる。さらにSTSとS期進行を阻害する薬剤との共存により染色体凝縮が観察されることから、DNA再複製ブロックと未複製染色体凝縮にある種のPKが関与することが示唆された。3Y1細胞で観察されたSTSのよる染色体凝縮ではCDKの活性化がみられず、染色体凝縮に必ずしもCDK活性が必要でないことが示された。

