京都大学	博士（医学）	氏　名	Dejsuphong Donniphat
論文題目	An essential role for Cdk1 in S phase control is revealed via chemical genetics in vertebrate cells (ニワトリ B リンパ細胞株を利用したケミカルジェネティックスによる、Cyclin dependent kinase 依存的な細胞分裂周期制御機構の解析)		

（論文内容の要旨）

相同組み換えは、細胞分裂周期の S/G_2 期のみ活性化される分子機構を解明することを最終目標にして、Cyclin dependent kinase(CDK)の活性を自由に ON/OFF できる実験系（細胞）の樹立を試みた。

ケミカルジェネティックスは、化学物質と遺伝学的手法とを組み合わせた新しい研究手法である。ある特定のタンパク分子の機能解析する場合に、そのタンパクに対する阻害剤を使う手法と、そのタンパクをコードする遺伝子を破壊する手法とがある。遺伝子破壊は、そのミュータントが致死である場合には、表現型解析が困難である。一方、阻害剤は、それが標的分子以外にも働きかける、すなわちオフターゲット効果が問題になる。これらの、阻害剤を使う手法と遺伝子破壊実験との弱点を乗り越える新しい実験手法が、ケミカルジェネティックスである。この新しい手法を Cyclin dependent kinase (CDK1) の機能解析に応用した。具体的には、CDK1 が PPi と呼ばれる ATP アナログによって阻害されるように、カエル CDK1 に変異を入れた（Xenopus CDK1 antagonist sensitive mutation、以下、xCDK1^{as} と略す）トランスジーンを作製した。そして CDK1 遺伝子を破壊した細胞（*CDK1*$^{-/-}$）に、トランスジーンをを発現した（*CDK1*$^{-/-}$*xCDK1*^{as} 細胞）。この際、野生型カエル CDK1 トランスジーンを発現した *CDK1*$^{-/-}$*xCDK1*^{wt} 細胞が、PPi のオフターゲット効果をモニターする為の対照になる。

ヒトでは少なくとも 11 種類の CDK が存在し、CDK1 の遺伝子破壊は細胞レベルで致死であった。そこで、CDK1 の機能解析を目標に、CDK1 の条件変異ミュータント細胞を作った。*CDK1*$^{-/-}$*xCDK1*^{as} 細胞は、PPi 非存在下で培養すると、正常速度で分裂できた。*CDK1*$^{-/-}$*xCDK1*^{as} 細胞は、PPi 存在下で培養すると、CDK1 活性が 10 分以内に無くなり、G_2 から M 期に移行できなくなるが、*CDK1*$^{-/-}$*xCDK1*^{wt} 細胞には影響がないことがわかった。ゆえに、(i) CDK1 は M 期への移行に必須であることがわかった。G_2 期で停止した *CDK1*$^{-/-}$*xCDK1*^{as} 細胞の培養液から PPi を除去すると、10 分以内に CDK1 が活性化されることがわかった。よって(ii) 細胞の CDK1 を迅速かつ可逆的にオン・オフできる実験系が樹立できた。

次に、CDK1 と CDK2 の機能的重複を明らかにするために、*CDK2*$^{-/-}$細胞と *CDK1*$^{-/-}$*CDK2*$^{-/-}$*xCDK1*^{as} 細胞とを作った。そして、(iii)DNA 複製開始と中心体を複製とには、CDK1 と CDK2 との両方が完全にオーバーラップして機能し、どちらか一方の CDK だけで正常に反応が進むことが確認できた。

（論文審査の結果の要旨）

申請者は、Cyclin-dependent kinase 1(以下にCdk1と略す)の機能を解析する為、Cdk1の条件欠損株を、ニワトリDT40細胞株から作製した。Cdk1は、細胞分裂を制御し、細胞周期の各フェーズ毎に異なる多様な機能を有する。申請者は、Cdk1の機能を決定するために、以下に説明するケミカルジェネティックスの手法を、ニワトリ細胞株、DT40に応用した。

本実験では、特定の変異が入ったCdk1にのみに有効な阻害剤を使う。この変異ノックイン細胞と野生型 Cdk1を発現する対照細胞とに、この阻害剤を加えた。阻害剤の OFF target 効果は、野生型細胞でモニターできる。申請者は、このCdk1条件欠損株では、阻害剤を添加・除去することによって10分以内に’Cdk1を抑制と再活性化ができることを確認した。Cdk1を抑制された細胞が、M期に入れないことから、Cdk1はG2からM期への移行に必須であると結論した。さらにCdk1とCdk2の機能的重複を解明する目的で、申請者は、Cdk1条件欠損株において、さらにCdk2遺伝子を破壊した。そして、Cdk1とCdk2とが、DNA複製の開始と中心体サイクルとで、機能が完全に重複することを確認した。

以上の研究は、CDKの機能の解明に貢献し、細胞増殖の機構を解明することや、発がん機構を理解することに寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものとみとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成21年1月26日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降