

## 7-Chloro-4-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazole 1-oxide의 CDK4 활성저해

전용진 · 고종희 · 연승우<sup>#</sup> · 김태용

일동제약(주) 중앙연구소

(Received January 6, 2006; Revised February 8, 2006)

### Inhibition of CDK4 activity by 7-chloro-4-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazole 1-oxide

Yong-Jin Jeon, Jong Hee Ko, Seung Woo Yeon<sup>#</sup> and Tae-Yong Kim

Ildong Research Laboratories, Ildong Pharmaceutical Co. Ltd., Yongin 449-910, Korea

**Abstract** — The activation of cyclin dependent kinase 4 (CDK4) is found in more than half of all human cancers. Therefore, CDK4 is an attractive target for the development of a novel anticancer agent. For mass screening of CDK4 inhibitor, we set up *in vitro* kinase assay for CDK4 activity using a cyclin D1-CDK4 fusion protein, which is constitutively active and exhibits enhanced stability. From the screening of representative compound library of Korea Chemical Bank, we found that 7-chloro-4-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazole 1-oxide (FBP-1248) selectively inhibited CDK4 activity *in vitro* by ATP competitive manner. This compound prevented the phosphorylation of retinoblastoma tumor suppressor protein, Rb, and inhibited cell growth through cell cycle arrest. In summary, we developed an efficient assay system for CDK4 activity *in vitro* and identified the CDK4 inhibitory compound, FBP-1248.

**Keywords** □ CDK4, CDK2, cell cycle, benzoxadiazole

진행 세포는 G1, S, G2 및 M기의 순서로 세포주기를 진행하여 세포분열을 완성한다. 이때 각 주기의 이행은 활성화된 cyclin dependent kinase(CDK)에 의해 조절된다. CDK는 각 세포 주기에서 발현된 cyclin과 결합에 의해 활성화 되어 다음 주기로의 이행을 완성하게 된다. 세포 분열 초기 단계인 G1기에서는 외부 신호에 의해 발현이 유도된 cyclin D가 CDK4를 활성화 시키고 세포분열을 시작하게 한다. 이후 cyclin E가 발현되어 CDK2를 활성화 시켜 G1기의 완성 및 S기로의 이행을 돕는다. 활성화된 CDK4와 CDK2는 Retinoblastoma tumor suppressor protein (Rb)을 인산화 시켜 이와 결합하고 있는 전사인자 E2F1의 유리를 유도하여 S기로의 이행에 필요한 DNA 복제 관련 유전자가 발현되도록 한다.<sup>1,2)</sup> 이와 같은 세포분열 과정에서 CDK4는 가장 먼저 활성화되어 세포 분열의 진행을 결정하는 중심적인 기능을 담당하고 있다.<sup>1)</sup> 따라서 CDK4의 작용기전에 대한 많은 연구가 이루어졌고 또한 암세포에서 그 활성이 상대적으로 높다는 것이 밝혀져<sup>3)</sup> 암 치료제 개발의 중요한 표적으로 인정되고 있다.<sup>4)</sup>

본 연구에서도 CDK4 활성을 조절하는 물질을 탐색하고자 대량 검색에 효율적으로 적용할 수 있는 *in vitro* CDK4 assay system을 개발하였고 이를 통해 CDK4 저해 활성을 보이는 화합물을 발견하여 그 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 실험 재료

Rb antibody, pRb(ser780) antibody, CDK4 antibody, Rb-C fusion protein은 Cell Signaling Technology Inc.(Danver, MA)에서 구입하였고, Cyclin D antibody는 Santa Cruz(Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. 이외 언급하지 않은 모든 시약은 Sigma (St. Louis, MI)에서 구입하였다.

#### 세포 배양

A549 세포와 HCT116 세포는 한국 세포주 은행에서 분양 받아 시험에 사용하였다. 각 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, UT)을 함유한 DMEM(Hyclone, UT) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 분압조건으로 배양하였고 계대 배양은 trypsin 용액(0.25% trypsin, 0.02% EDTA)을 처리하여 수행하였다. 곤충

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 031-287-1700 (팩스) 031-287-1800  
(E-mail) swyeon@ildong.com

세포인 SF21 세포주(Invitrogen, CA)는 10% FBS를 포함하는 Grace's insect media(Invitrogen, CA)를 사용하여 27°C 항온기에서 정지 배양하였다.

#### Cyclin D1-CDK4 fusion 유전자 제작

Rao 등의 방법을 참조하여 Cyclin D1-CDK4 fusion 유전자를 제작하였다.<sup>7)</sup> 우선, HeLa 세포주에서 추출한 RNA에서 cyclin D1과 CDK4의 cDNA를 합성하였다. 실험에 사용한 primer는 Integrated DNA Technologies Inc.(IA)에서 제작하여 사용하였다. Cyclin D1의 cDNA는 forward primer CD1-Hind F(5'-GGGAAGCTTAGGAACACCA-GCTCCTGTG-3')와 reverse primer CD1-T286A NS-EcoRI R(5'-GGGAATTCCTGGATGTCCACGTCCC-GCACGTCGGTGGGGCGCAAG-3')를 사용하여 확보하였다. Cyclin D1의 286번째 threonine을 alanine으로 치환하기 위해 primer CD1-T286A NS-EcoRI R는 원래 cyclin D1 유전자의 해당 염기서열인 ACA를 GCC로 돌연변이시켰으며 stop codon이 제거되도록 설계하였다. CDK4의 cDNA는 forward primer로 CDK4-linker-EcoRI F(5'-GGGAATTCGGGCGGAGGTGGATCTGGCGGAGGTGGATCGGGCGGAGGTGATCAATGGCTACCTCTCTCGATATGA-3')과 reverse primer로 CDK4-NS-XbaI R(5'-GGGTCTAGACCCTCCGGATTACCTTCATCC-3')을 사용하였다. Forward primer CDK4-linker-EcoRI F에는 cyclin D1 유전자와 fusion하기 위해 [(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>]로 발현되는 linker가 포함되어있다. Reverse primer CDK4-NS-XbaI R은 CDK4 유전자의 stop codon이 포함되지 않도록 설계하였다. Cyclin D1 유전자를 먼저 곤충 세포 발현 vector인 pIB/V5-His(Invitrogen, CA)의 multicloning site인 HindIII/EcoRI에 cloning한 후 linker가 결합되어 있는 CDK4 유전자를 EcoRI/XbaI에 cloning하여 vector 내에 있는 His tag과 fusion될 수 있도록 삽입해 fusion 유전자를 완성하였다. DNA 염기서열 분석을 통해 fusion 유전자의 염기서열을 확인한 후 시험에 사용하였다.

#### Transfection

곤충 세포에 유전자를 도입하기 위해  $1 \times 10^6$ 의 세포를 6-well plate에 분주한 뒤 16시간 동안 27°C 항온기에 방치하였다. 배양 배지를 제거한 뒤, Grace's insect media 2 ml로 washing한 뒤, 800  $\mu$ l의 Grace's insect media로 교환하였다. 1  $\mu$ g의 DNA를 100  $\mu$ l의 Grace's insect media에 희석하고, 4  $\mu$ l의 Cellfectin<sup>®</sup> reagent(Invitrogen, CA)를 100  $\mu$ l의 Grace's insect media에 희석하였다. DNA 희석액과 Cellfectin 희석액을 혼합한 뒤, 곤충 세포 배양액에 넣고 4시간 동안 27°C 항온기에 방치하였다. 20% fetal bovine serum을 함유한 Grace's insect media 1 ml를 첨가한 뒤, 16시간 동안 27°C 항온기에 방치한 뒤, 최종 농도가 1 mg/ml이 되도록 blasticidin을 처리하여 유전자 도입 세포를 선별하

였다.

#### Cyclin D1-CDK4 fusion 단백질의 분리

Rao 등의 방법을 참조하여 Cyclin D1-CDK4 fusion 단백질을 분리하였다.<sup>7)</sup> SF21/Cyclin D1-CDK4 세포를 원심 분리하여 회수한 뒤 homogenization buffer(50 mM Hepes, pH 7.5, 320 mM sucrose, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA)로 현탁시켜 3분간 sonication하였다. 세포 추출물을 원심분리 (14000 rpm, 10 min, 4°C)하여 얻은 상층액에 동일 부피의 loading buffer (50 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl)를 섞어 binding buffer (5 mM imidazole, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0)로 saturation된 nickel column(Peptron, Taejon, Korea)에 흘려 단백질을 결합시켰다. 10 ml의 binding buffer로 2회 washing 후 10 ml의 elution buffer(50 mM imidazole, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0)로 결합되어 있는 단백질을 분리 시켰다. 단백질 분획을 분자량 5,000 Da cut-off ultra-filtration membrane (Vivascience GmbH, Hanover, Germany)으로 농축하고 buffer A(50 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM DTT)를 첨가하여 부피를 조정한 후 여기에 glycerol을 25%(w/v) 섞어 사용 시까지 deep freezer에 보관하였다.

#### Western blot

CDK4 및 cyclin D의 발현을 확인하기 위해서는 protease inhibitor cocktail이 첨가된 lysis buffer(50 mM Tris-Cl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% triton X-100)로 단백질을 추출하여 70  $\mu$ g의 단백질을 8% SDS PAGE gel에서 분리하였다. PVDF membrane에 transfer 후 각 단백질을 특이적으로 인식하는 antibody를 이용하여 Western blot을 수행하였다.

세포 내 Rb 단백질의 인산화를 확인하기 위해서 protease inhibitor cocktail과 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20 mM NaF가 첨가된 high salt lysis buffer(50 mM Tris-Cl, pH 7.6, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100)로 추출한 단백질 40  $\mu$ g을 6% SDS PAGE gel에서 분리하였다. PVDF membrane에 transfer 후 Rb antibody를 이용한 Western blot을 수행하여 이들의 세포 내 변화를 관찰 하였다.

#### In vitro CDK4 assay

Alexandros 등의 방법을 참고하여 in vitro CDK4 assay법을 확립하였다.<sup>6)</sup> In vitro CDK4 assay를 수행하기 위한 반응액으로 cyclin D1-CDK4 fusion 단백질 4  $\mu$ l와  $1 \times$  kinase buffer(14.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM HEPES, pH 7.0, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 0.02% Triton X-100), 전체 반응액 부피의 1/20의 화합물을 혼합한 뒤, 30°C에서 10분간 전처리 하였다. 전체 반응액 1/10 부피의 2 mM ATP와 0.1  $\mu$ g의 Rb-C fusion protein을 첨가

하고 30°C에서 30분간 방치한 뒤, 반응액을 10% SDS PAGE gel에서 분리하였다. PVDF membrane에 transfer 후 Rb 단백질의 780번 serine의 인산화를 인지하는 pRb(ser780) antibody를 이용한 Western blot을 수행하였다.

### In vitro CDK2 assay

In vitro CDK2 assay를 수행하기 위한 반응액으로 CDK2/cyclin A 효소 5 unit과 1× kinase buffer, 전체 반응액 1/10 부피의 추출물을 혼합한 뒤 30°C에서 10분간 전처리 하였다. 전체 반응액 1/10 부피의 2 mM ATP와 0.1 µg의 Rb-C fusion protein을 첨가하고 30°C에서 30분간 방치한 뒤, 반응액을 10% SDS PAGE gel에서 분리하였다. PVDF membrane에 transfer 후 pRb(ser780) antibody를 이용한 Western blot을 수행하였다.

### MTT assay

MTT assay에 사용된 세포주는 A549와 HCT116으로써 한국 세포주 은행에서 분양 받아 실험에 사용하였다. 96-well plate에  $1 \times 10^4/90 \mu\text{l/well}$ 의 농도로 A549 세포와 HCT116 세포를 분주하여 1 일 동안 배양 후 DMSO에 용해한 각 물질을 배양액으로 희석하고 A549와 HCT116에 처리하여 3일 동안 배양하였다. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, 5 mg/ml in PBS] 용액을 각 well당 15 µl씩 첨가하여 4 시간 동안 37°C에서 반응시키고 well당 100 µl의 lysis buffer (0.01 N HCl, 10% SDS)를 처리하여 형성된 formazan이 완전히 용해되도록 37°C에서 24시간 동안 방치한 후 570/652 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### FACS analysis

세포 주기 분석을 위한 FACS analysis를 위해 A549 세포주에 적정 농도의 화합물을 처리한 뒤 20시간 방치하였다. Trypsin 용액(0.25% trypsin, 0.02% EDTA)을 처리하여 세포를 배양 접시에서 분리하여 5 ml의 PBS로 2회 washing 한 뒤 300 µl의 PBS에 현탁하였다. 700 µl의 70% cold EtOH을 처리하고 얼음에 1 시간 동안 방치하여 세포를 고정하였다. 5 ml의 PBS로 washing 한 뒤, 250 µl의 PBS로 현탁하였다. 10 mg/ml 농도의 RNase A를 5 µl 처리하여 37°C에서 1시간 동안 방치 시켰다. Propidium iodide solution(1 mg/ml in distilled water)을 10 µl 처리하여 DNA를 염색한 다음 FACS(BD FACScalibur™, BD Bioscience, CA) 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### In vitro CDK4 assay system의 확립

CDK4는 cyclin D1과 결합하여 효소 활성을 지니게 되는데 세

포에서 이들의 결합체인 활성형 CDK4를 분리 시 활성이 약할 뿐 아니라 보존 과정에서 급격한 활성의 손실이 있어 CDK4 저해제 대량 검색에 어려움을 주었다.<sup>6,7)</sup> 따라서 효소 활성이 안정적으로 유지되는 활성형 CDK4의 확보가 요구되었으며 개선 방법의 하나로 cyclin D1과 CDK4를 유전자 단계에서 결합시켜 이들이 fusion 단백질로 발현하도록 하는 연구가 곤충세포에서 시

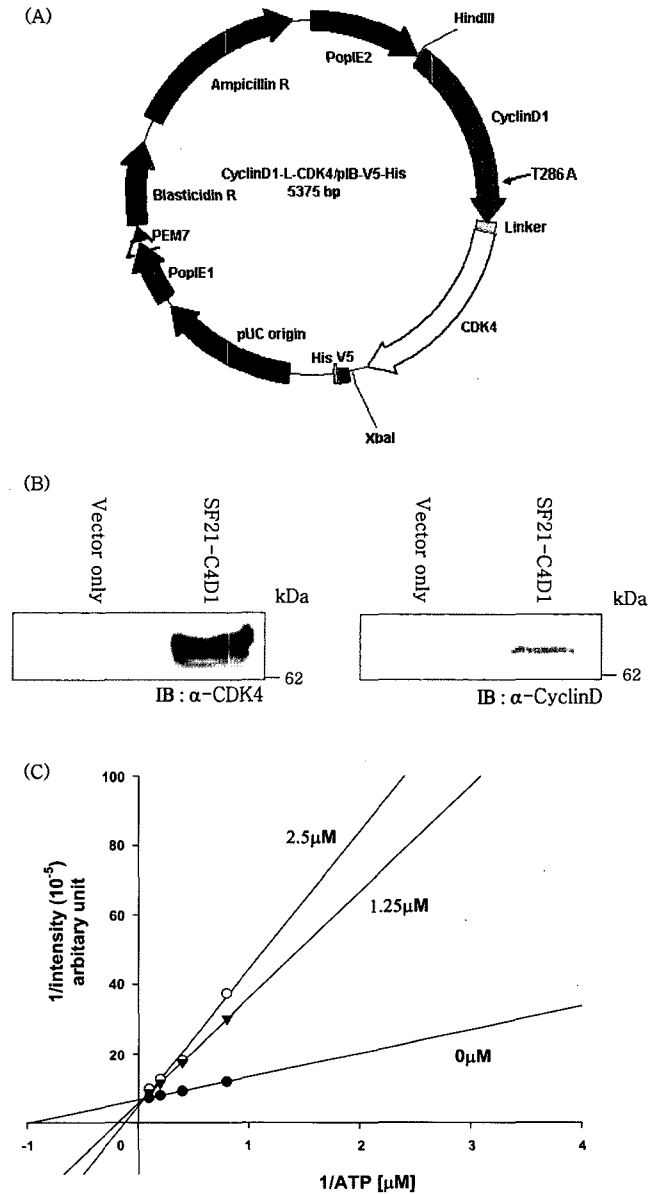
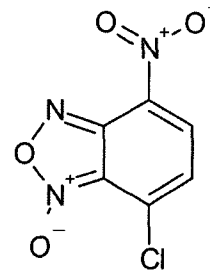


Fig. 1 – Development of CDK4 assay system *in vitro*. (A) cyclinD1-CDK4 fusion cDNA was inserted into pIB/V6-His, insect expression vector. (B) Western blot analysis of SF21-C4D1 lysate by α-CDK4 and α-cyclinD antibody. (C) Double reciprocal plots of CDK4 activities in the presence of varying concentration of ATP and flavopiridol. These data indicated that flavopiridol inhibits CyclinD1-CDK4 fusion protein by ATP competitive manner. SF21-C4D1; SF21 cells stably expressed CyclinD1-CDK4 fusion cDNA.

도되었다.<sup>6,7)</sup> Fusion 단백질 형태의 CDK4는 각각이 서로 결합한 복합체 형태보다 효소 활성, 안정성 및 효소의 분리 등에 많은 개선을 보였다. 본 연구에서도 cyclin D1의 안정성을 위해 일부 개선한 fusion 단백질을 CDK4 대량검색에 적용하고자 하였다. Cyclin D1은 286번 threonine이 인산화 되면 ubiquitin-proteasome 경로를 통해 분해가 일어나며 다른 아미노산으로 대체하면 cyclin D1의 안정성이 증가 된다고 밝혀졌다.<sup>5)</sup> 이러한 연구 결과를 도입하여 cyclin D1의 286 번 threonine을 alanine으로 치환하도록 cyclin D1 유전자를 변형시키고 linker를 사이에 두고 CDK4 유전자와 결합시켜(Fig. 1A) 곤충세포에서 도입하였다. Cyclin D1 및 CDK4를 특이적으로 인지하는 항체를 사용하여 곤충세포에서 fusion 단백질이 안정적으로 발현(Fig. 1B)되는 것을 확인하였다. Nickel column으로 부분 정제하여 확보한 fusion 단백질은 기질인 Rb 단백질을 효율적으로 인산화 시켰으며 4주 이상 효소 활성을 안정적으로 유지하였다(data not shown). Cyclin D1에서 변형된 fusion 단백질의 효소 활성이 실제 세포 내에 존재하는 CDK4와 다르지 않음을 간접적으로 확인하기 위하여 CDK들의 활성을 ATP 경쟁적으로 저해하는 flavopiridol을 처리하여 저해 형태를 조사하였다. Flavopiridol에 의해 fusion 단백질의 활성도 ATP 경쟁적으로 저해(Fig. 1C)됨을 확인할 수 있어 실제 세포에 존재하는 cyclin D1과 CDK4의 복합체와 유사한 활성을 보이는 것으로 예상할 수 있었다. 이처럼 발현이 높고 활성이 안정적으로 유지되는 fusion 단백질의 확보가 가능하였고 이를 이용하여 CDK4 저해제의 대량검색을 수행하였다.

**7-Chloro-4-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazole 1-oxide benzo-oxadiazole(FBP-1248)에 의한 CDK4 활성저해**

*In vitro* CDK4 assay system을 이용하여 화합물은행 대표시료 7,000여종을 대상으로 CDK4 활성 저해 효과를 보이는 19종의 물질을 확보하였다. 이들이 CDK4 활성을 선택적으로 저해하는지 조사하고자 CDK2 저해활성을 비교하였다(data not shown). Benzo-oxadiazole 유도체인 7-Chloro-4-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazole 1-oxide benzo-oxadiazole(FBP-1248)가 CDK2 활성에는 영향을 미치지 않으면서 CDK4 활성을 선택적으로 저해하였다(Fig. 2, Fig. 3A). 이 화합물은 5.2 μM에서 CDK4 활성을 50% 저해하였으며 ATP와 경쟁하여 효소활성을 저해하는 것으로 확인되었다(Fig. 3B). FBP-1248의 CDK4 저해 효과는 flavopiridol에 비해 상대적으로 약한 것으로 확인되었지만, CDK2 활성에는 영향을 미치지 않는 것(IC<sub>50</sub>>100 μM)으로 볼 때 FBP-1248은 CDK4 활성을 선택적으로 저해하는 화합물임을 알 수 있었다. 하지만 FBP-1248이 다른 kinase의 활성에도 영향을 미치는지에 대한 추가적인 조사가 필요하며, 향후 연구를 통해 증명하고자 한다.



C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
M.W. 215.552

Fig. 2 – Chemical structure of 7-chloro-4-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazole 1-oxide benzo-oxadiazole (FBP-1248).

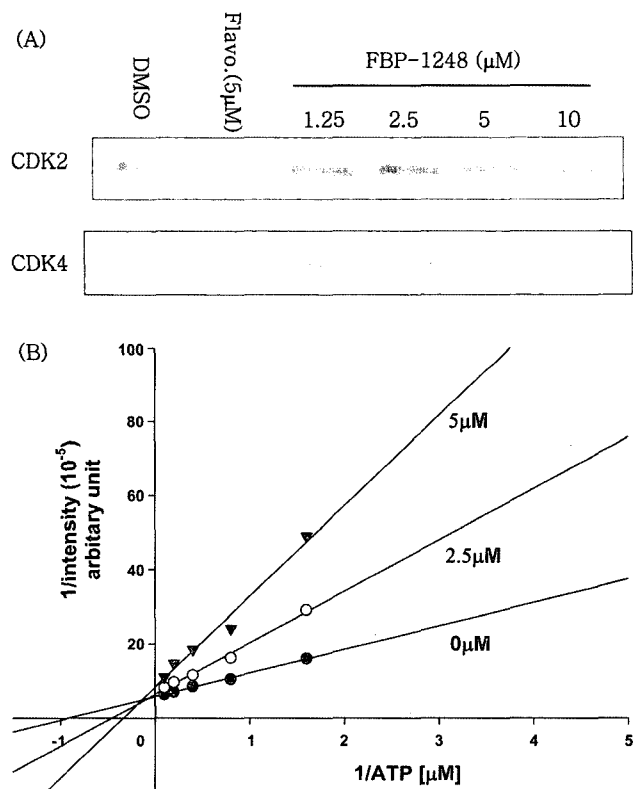


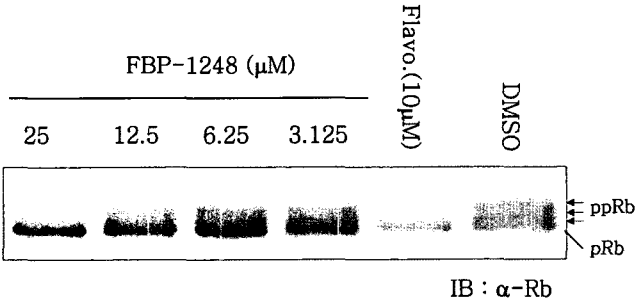
Fig. 3 – Inhibition of *in vitro* CDK4 activities by FBP-1248. (A) Inhibitory effect of FBP-1248 on CDK4 activities *in vitro*. (B) Double reciprocal plot of CDK4 activities in the presence of varying concentration of ATP and FBP-1248.

**FBP-1248의 세포증식 억제효과**

*In vitro* CDK4 활성을 선택적으로 저해하는 FBP-1248이 암 세포의 세포 증식을 저해하는지 A549 및 HCT116 세포주를 대상으로 조사하였다. 각 세포주에 처리 시 A549는 3.5 μM, HCT116는 1.4 μM에서 50%의 세포 증식을 억제하였다(Table I). FBP-1248의 세포증식 억제효과가 세포 내 CDK4 기질인 Rb 단

**Table I** – Anti-proliferative effects of FBP-1248

	MTT assay (IC <sub>50</sub> , μM)	
	Flavopiridol	FBP-1248
A549	0.8	3.5
HCT116	0.25	1.4



**Fig. 4** – Rb hypophosphorylation by treatment of FBP-1248 in A549 cells. FBP-1248 exposed A549 cells were induced Rb hypophosphorylation. ppRb; hyperphosphorylated form of Rb, pRb; non-phosphorylated form of Rb.

백질의 인산화 억제에 의한 것인지 확인하고자 A549 세포주를 대상으로 조사하였다. FBP-1248를 20시간 처리하여 얻은 세포 추출액을 Western blot으로 분석결과 처리 최저 농도인 3.125 μM에서도 Rb 인산화가 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 다른 작용기전도 배제할 수 없지만 현재의 결과는 FBP-1248이 Rb 인산화 억제를 통하여 세포증식억제 효과를 보인다는 것을 제시한다. 이외에 FBP-1248이 CDK4의 활성을 억제한다고 알려진 p16<sup>ink4a</sup>의 활성 증가를 유도하여 세포 내 CDK4의 활성을 저해하고 이로 인하여 Rb 인산화가 억제되었을 가능성도 배제할 수 없다. 그러나 *in vitro* CDK4 assay 결과로 미루어 볼 때, FBP-1248은 CDK4의 활성을 직접적으로 저해하고 이에 의해 Rb의 인산화를 억제함으로써 세포 분열에 관련된 단백질의 발현을 조절하는 것으로 생각된다.

**FBP-1248의 세포주기에 미치는 영향**

Rb 단백질의 인산화 억제는 세포 주기 진행과 밀접한 관련을 갖고 있으므로 FBP-1248의 세포주기에 미치는 영향을 조사하였다. FBP-1248을 A549 세포주에 20시간 처리한 뒤 propidium iodide로 DNA를 염색하여 FACS analysis를 수행하였다(Table II). 50 μM 처리군에서는 apoptosis가 관찰되었고 이하의 농도에서는 무처리군과 비교하여 G1기에 있는 세포의 비율이 최대 8% 증가되는 것을 확인하였다. G2기에 있는 세포 또한 최대 5%의 증가를 보인 반면 S기에 있는 세포의 비율은 무처리군 대비 최대 13% 이상 농도 의존적으로 줄어드는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 FBP-1248가 G1 및 G2기에서 세포주기를 억제한다는 것을 의미한다. G1기 이외에 G2기에서 세포주기의 억제는 FBP-

**Table II** – Cell cycle analysis of FBP-1248 treated A549 cells

	FBP-1248 (μM)				
	DMSO	6.25	12.5	25	50
G1 (%)	72.16	77.05	79.24	80.15	56.92
G2 (%)	5.26	7.11	7.26	10.55	12.76
S (%)	22.59	15.84	13.5	9.3	30.32
Sub-G1 (Apoptosis, %)	1.81	1.14	1.28	2.22	14.74

1248이 G2기와 관련된 cell cycle dependent kinase의 활성화도 조절할 가능성을 시사한다. 향후 다른 세포주에서도 유사한 결과가 나타나는지 더욱 조사가 요구 되어진다.

이상의 *in vitro* CDK4 저해활성과 세포주에서 효과는 FBP-1248이 CDK4의 활성의 선택적인 저해를 통해 Rb 단백질의 인산화를 억제함으로써 세포주기에 변화를 주어 세포 증식억제 효과를 보이는 물질이라는 것을 제시한다. Flavopiridol에 비해 그 효과가 상대적으로 약하지만 CDK4에 선택적인 저해활성을 갖는 이 화합물의 발견은 부작용이 적은 항암물질의 연구 개발에 새로운 모형을 제공할 것으로 기대된다.

**결론**

효율적으로 CDK4 활성 저해물질의 대량 검색이 가능하도록 *in vitro* CDK4 assay system을 개발하였고 이를 이용하여 CDK4 활성을 선택적으로 저해하는 benzooxadiazole 유도체인 FBP-1248을 확보하였다. 또한 이 화합물이 Rb 단백질의 인산화를 억제하고 세포주기를 조절하여 세포증식억제효과를 보이는 물질임을 확인하였다.

**감사의 말씀**

본 연구는 한국화학물은행의 화합물들을 대상으로 수행하였기에 한국화학물은행에 감사를 드립니다.

**참고문헌**

- 1) Sherr, C. J. and Roberts, J. M. : CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501 (1999).
- 2) Adams, P. D. : Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim. Biophys. Acta* **1471**, M123 (2001).
- 3) Al-Aynati, M. M., Radulovich, N., Ho, J. and Tsao, M. S. : Overexpression of G1-S cyclins and cyclin-dependent kinases during multistage human pancreatic duct cell carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* **10**, 6598 (2004).
- 4) Fry, D. W., Bedford, D. C., Harvey, P. H., Fritsch, A., Keller, P.

- R., Wu, Z., Dobrusin, E., Leopold, W. R., Fattaey, A. and Garrett, M. D. : Cell cycle and biochemical effects of PD 0183812. A potent inhibitor of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *J. Biol. Chem.* **276**, 16617 (2001).
- 5) Diel, J. A., Zindy, F. and Sherr, C. J. : Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **11**, 957 (1997).
- 6) Alexandros, K. K., Fei Gu, R. R., Rao, R. N. and Yeh, W. K. : Purification, characterization, and kinetic mechanism of Cyclin D1 · CDK4, a major target for cell cycle regulation. *J. Biol. Chem.* **273**, 26506 (1998).
- 7) Rao, R. N., Stamm, N. B., Otto, K., Kovacevic, S., Watkins, S. A., Rutherford, P., Lemke, S., Cocke, K., Beckmann, R. P., Houck, K., Johnson, D. and Skidmore, B. J. : Conditional transformation of rat embryo fibroblast cells by a cyclin D1-cdk4 fusion gene. *Oncogene* **18**, 6343 (1999).