

論文内容要旨

真核生物において、染色体 DNA は細胞周期の S 期で正確に倍化し、その後 M 期で娘細胞に分配される。S 期における DNA 複製は他の細胞周期の事象と厳密に連動することで、一回の細胞周期につき一度だけ起こることが知られており、この制御機構の破綻は、遺伝情報の変化、細胞の死、あるいは細胞の癌化を引き起こす。真核生物に普遍的に存在している DNA 複製制御機構の一つとして DNA 複製ライセンス化機構が存在し、DNA 複製の開始、再複製の阻止に関与していることが知られている。細胞周期の初期に、クロマチン上の複製起点において複製前複合体 (pre-replication complex; pre-RC) が形成されることにより DNA 複製開始のライセンス化が起こる。pre-RC の形成には少なくとも、複製起点認識複合体 (ORC)、Cdc6, Cdt1, MCM 複合体の 4 種類の因子が必須であり、これらのタンパク質が複製起点上に順次結合することで pre-RC の形成が起こることが知られている。まず複製起点への ORC の結合が起こり、次に ORC 依存的に Cdc6 と Cdt1 がクロマチン上へ結合する。このとき Cdc6 と Cdt1 の結合は ORC にのみ依存して起こり、相互依存性は見出されていない。最後に MCM 複合体が Cdc6 と Cdt1 依存的にクロマチン上へ結合しライセンス化が完了する。これまでに、Cdt1 が他のライセンス化関連タンパク質と同様にクロマチン上へ結合すること、DNA との結合活性を有していることが報告されていた。しかし、Cdt1 のクロマチン結合と機能の関連性および生理的意義や、Cdc6 との機能的連携については殆ど解析が行われていなかった。そこで本研究では、Cdt1 の詳細な機能解析を通じて pre-RC 形成機構の解明を目的とし、細胞周期の進行と連動した Cdt1 のクロマチン上における機能を生化学的に解析するため、アフリカツメガエル卵抽出液無細胞実験系を用いて解析を行った。

DNA 複製ライセンス化反応における Cdt1 のクロマチン結合の意義について解析するため、まず Cdt1 がクロマチンへ結合した状態でライセンス化反応において機能するかについて検討した。初めに Cdc6 を免疫除去した卵抽出液中に精子核 DNA を添加しインキュベートしたのち、クロマチン画分を単離した。このときクロマチン上には ORC と Cdt1 が結合しているが、Cdc6 は結合していなかった。その後、単離したクロマチンに Cdt1 を免疫除去した卵抽出液中を加えさらにインキュベートした。この 2 回目のインキュベーションにより Cdc6 が ORC 依存的にクロマチン上へ結合する。また、このときに反応系に存在する Cdt1 は一回目のインキュベーション時にクロマチン上へ結合した Cdt1 のみであり遊離状態の Cdt1 は存在していない。この 2 回目のインキュベーションにおいて反応液中には全てのライセンス化関連因子が存在しており、実際にクロマチン上へは Cdc6 と Cdt1 が結合していたにも関わらず、ライセンス化および MCM のクロマチン結合は観察されなかった。このとき、反応系に導入された Cdt1 の量について調べたところ、クロマチンのライセンス化を行うには十分な量の Cdt1 が一回目のインキュベーションでクロマチンに結合していたことが確認された。そこで、クロマチン結合状態の Cdt1 が不活性化を受けている可能性について調べるため、クロマチンに結合していた Cdt1 を塩処理により溶出し、得られた溶出画分のライセンス化活性について Cdt1 を免疫除去した卵抽出液中へ添加することにより検討した。その結果、Cdt1 免疫除去卵抽出液のライセンス化活性の十分な回復が観察された。以上の結果より、Cdc6

非存在下で結合している Cdt1 は量的、質的にライセンス化を行うことができるものであることが示された。

つぎに、Cdc6 と Cdt1 が一定の順序でクロマチン上に結合しなければライセンス化を起こす事が出来ないという可能性を考え、これらのタンパク質のクロマチン上への結合順序について検討した。この目的のため、精製したタンパク質を用いて卵抽出液を使わずにライセンス化反応を再構築した。このとき、クロマチンと Cdc6, Cdt1, あるいは MCM 複合体を含むタンパク質画分を順次反応させ、それぞれの反応のあとにクロマチンを単離することで遊離状態のタンパク質の持ち込みを排除した。これにより、Cdc6, Cdt1, MCM 複合体のそれぞれの結合段階を区別し、このときにクロマチン上に MCM 複合体が導入され得るかについて検討した。その結果、Cdt1 を免疫除去した卵抽出液中でインキュベートし Cdc6 を結合させたクロマチンを Cdt1, MCM 複合体と順にインキュベートした場合には十分なライセンス化を検出することが出来た。しかしながら、Cdc6 を免疫除去した卵抽出液中でインキュベートして Cdt1 を結合させたクロマチンに対し Cdc6, MCM 複合体を順に添加した場合には、Cdc6, Cdt1 の両者ともクロマチン上に結合しているにも関わらず MCM 複合体のクロマチン結合は確認されなかった。以上の結果より、MCM 複合体をクロマチン上に導入するためには Cdc6 と Cdt1 が一定の順序でクロマチンに結合しなければならないことが明らかとなった。さらに、Cdt1 が遊離状態で存在することがライセンス化反応に必須である可能性を考慮し、MCM 複合体とのインキュベーションにおいて Cdt1 がクロマチン結合状態を維持したまま機能しているのかについて検討したが、ほぼすべての Cdt1 がクロマチン上に結合したままの状態であったにもかかわらず MCM 複合体のクロマチン結合は進行していた。この結果はライセンス化反応において Cdt1 がクロマチンに結合した状態で MCM 複合体のクロマチンへの導入に機能することを強く示唆している。

さらに、Cdc6 と Cdt1 の結合の順序を入れ替えたときに Cdc6 と Cdt1 のどちらの機能が障害を受けているのかについて検討した。まず、Cdc6 を免疫除去した卵抽出液中でインキュベートすることにより ORC と Cdt1 をクロマチン上に結合させた。インキュベート後単離したクロマチンに対し Cdc6 を結合させ、その後再び単離することにより Cdc6 と Cdt1 の結合順序が逆転したクロマチンを調製した。このクロマチン画分に MCM 複合体と Cdt1 を同時に添加し反応させたところ、クロマチンの顕著なライセンス化、および MCM 複合体のクロマチン結合が観察された。この結果は、結合順序を入れ替えた場合においてもクロマチンに結合している Cdc6 にはライセンス化反応において機能する活性が存在することを示している。すなわち、Cdc6 非存在下でクロマチン上に結合した Cdt1 にはライセンス化活性が無いことを示唆している。

以上の結果を受けて、Cdc6 存在下、非存在下で Cdt1 のクロマチン結合の状態が変化する可能性を考え、それぞれの条件下での Cdt1 のクロマチンへの親和性について検討した。MCM 複合体を免疫除去した卵抽出液中で調製されたクロマチン上には Cdc6 存在下で Cdt1 が結合しており、Cdc6 免疫除去卵抽出液中で調製されたクロマチンには Cdc6 非存在下で Cdt1 が結合している。これらのクロマチンを高塩で処理することにより、それぞれの条件下での Cdt1 のクロマチンへの結合強度について検討したが、両者

に顕著な差は見出されなかった。この結果より、Cdc6 非存在下における Cdt1 のクロマチンへの結合は、少なくとも親和性においては、Cdc6 存在下でのものと大きな違いは無いと考えられた。また、この結果は Cdc6 非存在下の Cdt1 のクロマチン結合が非特異的なものではないことを示唆している。

現在までに、Cdc6 または Cdt1 のそれぞれ単独の機能に関しては世界中で精力的に研究が進められており、多くの知見がもたらされているが、ライセンス化反応における両タンパク質の連携については殆ど明らかとなっていなかった。これまでの知見からは、Cdc6 と Cdt1 のクロマチン結合には相互依存性が見出されておらず、そのため Cdc6 と Cdt1 は独立してクロマチン上へ結合し、それぞれが独立に何らかの機能を発揮することにより MCM 複合体がクロマチン上に導入されると考えられていた。本研究では、独自の実験系を用いて Cdc6 と Cdt1 のクロマチン結合をその機能と関連付けて解析することにより、Cdc6 と Cdt1 の結合順序の存在を見出した。この結果は、pre-RC 構造形成時における新たな中間段階の存在を示しており、クロマチン上において Cdc6 と Cdt1 が積極的に協調することで機能的連携を果たしていることを示唆している。

審査結果の要旨

遺伝子に書き込まれた情報が正確に子孫に伝達されるためには、染色体 DNA が細胞周期の S 期で正確に倍化し、その後 M 期で娘細胞に正確に分配される必要がある。S 期における DNA 複製は、一回の細胞周期につき一度だけ起こることが知られており、この制御機構の破綻は、遺伝情報の変化、細胞の死、あるいは細胞の癌化を引き起こす。この、一回の細胞周期につき一度だけ DNA 複製を開始させるのが DNA 複製ライセンス化機構で、DNA 複製の開始、再複製の阻止に関与していることが知られている。細胞周期の初期に、クロマチン上の複製起点において複製前複合体 (pre-replication complex; pre-RC) が形成されることにより DNA 複製開始のライセンス化が起こる。pre-RC の形成には少なくとも、複製起点認識複合体 (ORC)、Cdc6、Cdt1、MCM 複合体の 4 種類の因子が必須であり、これらのタンパク質が複製起点上に順次結合することで pre-RC の形成が起こることが知られている。本研究は、アフリカツメガエル卵抽出液無細胞実験系を用いて pre-RC の形成機構を詳細に解析したものである。

まずはじめに、Cdt1 がクロマチンへ結合した状態でライセンス化反応において機能するか検討した。ORC と Cdt1 の結合したクロマチンを調製し、このクロマチンを Cdt1 を免疫除去した卵抽出液中に加えインキュベートしたところ、Cdc6 のクロマチンへの結合は観察されたが、ライセンス化および MCM 複合体のクロマチンへの結合は観察されなかった。そこで、クロマチン結合状態の Cdt1 が不活性化を受けている可能性や、結合量が足りないためにライセンス化および MCM 複合体のクロマチンへの結合が起こらないという可能性を検討した。その結果、クロマチンに結合した Cdt1 の量はライセンス化を行うのに十分な量であること、また、クロマチンに結合した Cdt1 をクロマチンから抽出し、ライセンス化を行わせるとその活性があることを示し、ORC と Cdt1 の結合したクロマチンでライセンス化が起こらないのは、Cdt1 の量が足りないためや、失活しているためではないことを明らかにした。

次に、Cdc6 と Cdt1 が一定の順序でクロマチン上に結合しなければライセンス化を起こすことができないという可能性を考え、精製したタンパク質を用いてライセンス化反応を詳細に解析した。その結果、ライセンス化を起こさせるためには、ORC に依存してまず Cdc6 がクロマチンに結合し、次に Cdt1 が結合することにより MCM 複合体がクロマチンに結合し、ライセンス化が起こることを明らかにした。

以上のように、本研究は、真核生物における DNA 複製開始制御の分子機構の詳細を解明したものであり、DNA 複製開始制御に関する理解を大きく進展させるものである。

よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。