

DNA 複製開始関連タンパク質 Cdt1 による
新生鎖伸長抑制作用のメカニズムの解析

帝京平成大学大学院

薬学研究科 博士課程

313P11301

中崎 祐太

目次

序論	4
本論	7
第一章 Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対する過剰な DNA 複製の影響	7
第一節 実験材料・実験方法.....	7
1-1-1. 組換えタンパク質の精製	7
1-1-2. Xenopus 卵抽出液の調製	8
1-1-3. DNA 複製の解析	8
1-1-4. アルカリアガロースゲル電気泳動.....	9
1-1-5. aphidicolin-クロマチンの調製	9
第二節 結果	9
1-2-1. GST 切除型 Cdt1 による新生鎖伸長反応の抑制	9
1-2-2. Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対する p27 の影響.....	11
1-2-3. Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対する過剰な DNA 複製の影響.....	13
第三節 考察	14
第二章 Mcm2-7 複合体および RPA のクロマチン結合に対する Cdt1 の影響	15
第一節 実験材料・実験方法.....	15
2-1-1. クロマチンの単離.....	15
2-1-2. 免疫ブロット法	15
第二節 結果	15
2-2-1. Mcm2-7 複合体および RPA のクロマチン結合に対する Cdt1 の影響	15
2-2-2. Cdt1 添加時における MCM 複合体および RPA のクロマチン結合の経時変化	16
第三節 考察	18
第三章 Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に関与する機能領域の同定	19
第一節 実験材料・実験方法.....	19
3-1-1. 欠失変異体型 Cdt1 の作製	19
3-1-2. Cdt1 免疫除去 Xenopus 卵抽出液の調製と組換え Cdt1 のライセンシ化	

活性の測定	19
3-1-3. DNA 複製の解析	19
3-1-4. Mcm4 および Rpa70 のクロマチン結合の解析	20
3-1-5. 欠失変異体型 Cdt1 添加時における APH-クロマチンを用いた DNA 複製 の解析	20
第二節 結果	20
3-2-1. 欠失変異体型 Cdt1 の作製	20
3-2-2. DNA 複製に対する欠失変異体型 Cdt1 の影響	22
3-2-3. Mcm2-7 複合体および RPA のクロマチン結合に対する欠失変異体 Cdt1 の影響	24
3-2-4. 欠失変異体型 Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対するチェックポイント 機構の影響	25
3-2-5. 欠失変異体型 Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対する過剰な DNA 複製の影響	26
第三節 考察	27
第四章 Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用とライセンス化活性の関係	29
第一節 実験材料・実験方法	29
4-1-1. Cdt1 R285A の作製	29
4-1-2. Cdt1 R285A のライセンス化活性の測定	29
4-1-3. Cdt1 R285A を添加した卵抽出液における DNA 複製の解析	29
4-1-4. Cdt1 R285A を添加した卵抽出液における Mcm4 および Rpa70 のクロマ チン結合の解析	30
第二節 結果	30
第三節 考察	31
総括	33
謝辞	35
参考文献	36
関連論文目録	41
業績論文目録	42

序論

高等真核生物の DNA は、細胞周期の S 期において、一回のみ複製されるよう厳密に制御されている。DNA 複製の開始は、クロマチン上に存在する複製開始点 (origin) に複製開始点認識複合体 (origin recognition complex; ORC) が結合することで始まり、その結合に依存して、Cdc6 (cell division cycle 6) および Cdt1 (Cdc10-dependent transcript 1) がクロマチン上に動員される (Fig. 1)。これらのタンパク質を介在することで、DNA 複製反応時に DNA ヘリカーゼとしてはたらく Mcm (minichromosome maintenance) 2-7 複合体 (MCM 複合体) がクロマチンに導入され、DNA 複製前複合体 (pre-replication complex; pre-RC) が形成される (Fig. 1)。この反応は、M 期後期から G1 期初期に行われる DNA 複製の開始に不可欠な反応であり、DNA 複製ライセンス化反応と呼ばれている¹⁻³⁾。すなわち、DNA 複製ライセンス化因子 Cdt1 は、MCM 複合体をクロマチン上の複製開始点に導入させる活性 (ライセンス化活性) を有する DNA 複製に必須なタンパク質である^{4, 5)}。

pre-RC が形成された後、Cdt1 は、ライセンス化抑制タンパク質 geminin と結合することで、Cdt1 と MCM 複合体間の結合が立体障害的に阻害され、ライセンス化活性が抑制される (Fig. 1)⁶⁻⁹⁾。さらに Cdt1 は、S 期においてユビキチン化を介した分解を受けることが知られている。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵抽出液において、Cdt1 は Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) との結合により、Cul4-DDB1 E3 ligase に認識され、ユビキチン化を受けている (Fig. 1)^{10, 11)}。また、ヒト細胞では、Cdt1 は SCF-Skp2 および Cul4-DDB1 の 2 つの E3 ligase の標的となっている (Fig. 1)^{11, 13)}。

geminin による抑制やユビキチン化を介した分解により、Cdt1 のライセンス化活性が厳密にコントロールされることで、DNA 複製が一度の細胞周期において繰り返される現象 (再複製) が抑制されている¹⁴⁻¹⁶⁾。再複製は、一本鎖 DNA の蓄積や DNA の二本鎖切断を引き起こし、チェックポイント機構を活性化させることが知られている¹⁷⁻¹⁹⁾。このチェックポイント機構の活性化により、DNA 複製の開始反応が抑制され、DNA 複製がさらに繰り返し起こらないよう制御されていると考えられている。実際に、チェックポイント機構がはたらく細胞では、Cdt1 を過剰発現させても、限られた回数しか再複製を起こさないことが報告されている¹⁹⁻²¹⁾。

DNA の再複製は、ゲノム情報を不安定化させることから、がんの進行、悪性化に深く関わりと考えられている²²⁻²⁴⁾。実際に、ヒト培養細胞において、Cdt1 を含む DNA 複製ライセンス化関連タンパク質の過剰発現が再複製を誘発すること^{25, 26)}、Cdt1 および Cdc6 ががんの進行を促進することが知られている^{27, 28)}。

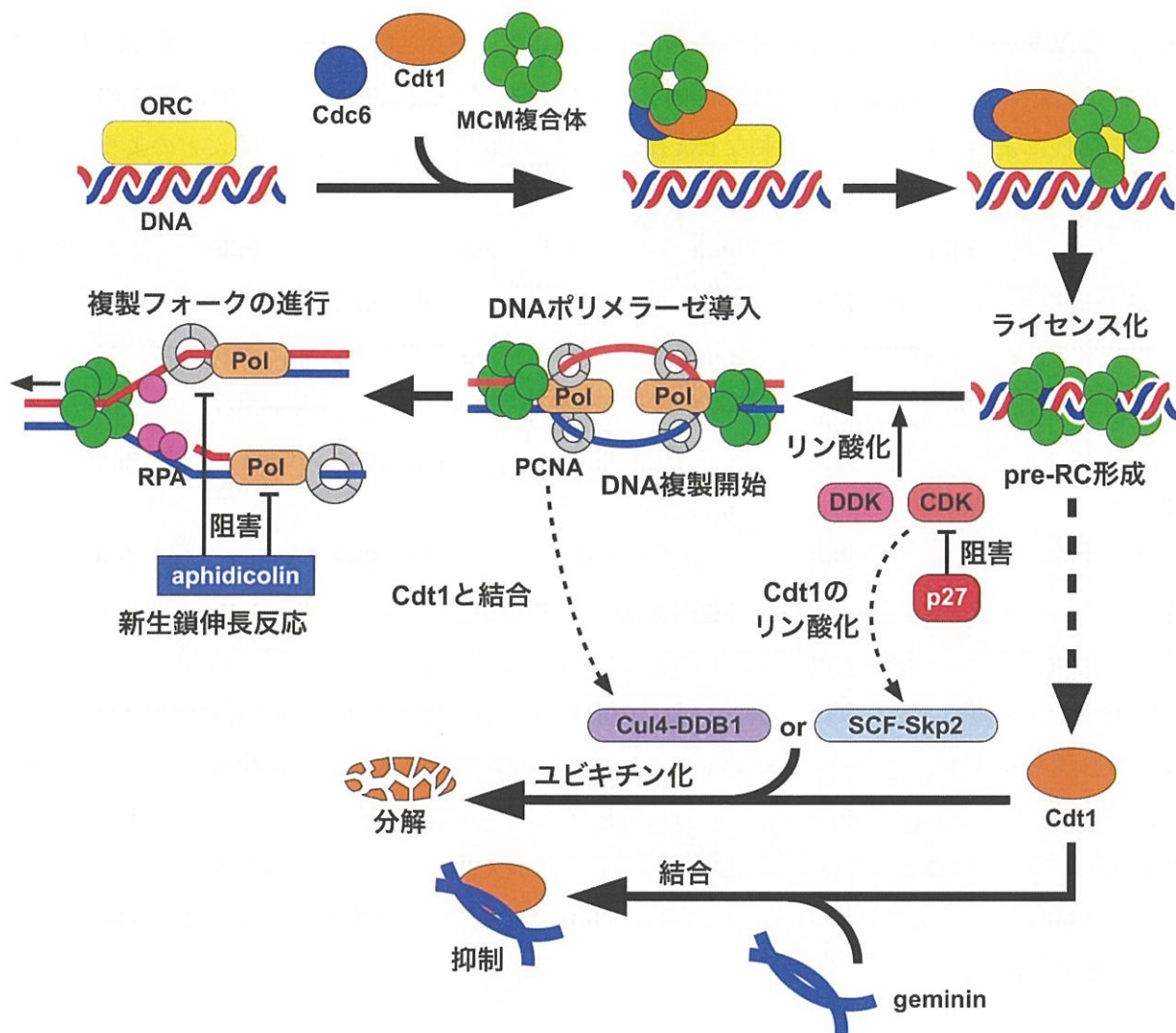


Figure 1. DNA 複製開始の機序と Cdt1 の抑制機構

これまでに知られている Cdt1 の主な生理活性は、ライセンス化活性である一方で、*Xenopus* 卵抽出液では、過剰なグルタチオン-S 転移酵素 (GST) 融合組換え Cdt1 (GST-Cdt1) を添加することにより、DNA 複製における新生鎖伸長反応を抑制するということが見出されている^{29, 30)}。また、この Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用は、Cdt1 との結合能を有するがライセンス化活性を抑制しないマウス geminin の 79-130 アミノ酸領域 (mGem 79-130) の添加によって解除される²⁹⁾。これらのことから、Cdt1 は、ライセンス化活性とは別に DNA 複製抑制作用を有し、ゲノム情報の安定性に何らかの影響を与えていることが推測された。

そこで本研究では、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用のメカニズムを解明することで、高等真核生物におけるゲノム情報安定性維持機構に新たな知見を見出すことを目的とし、*Xenopus* 卵抽出液無細胞実験系を用いた Cdt1 による DNA 複製の抑制の機序を解析するとともに、ここにかかわる機能領域の同定を試みた。

第一章では、卵抽出液に添加する Cdt1 を内在性 Cdt1 の形態により近づけるため、GST-tag を切除した組換え Cdt1 を作製し、それを卵抽出液に添加することで、DNA 複製に対する Cdt1 の影

響を、濃度依存性、経時的変化の 2 つの側面で検討した。また、CDK 阻害タンパク質 p27 および DNA ポリメラーゼ阻害剤 aphidicolin を用いて DNA 複製の開始を抑制することで、Cdt1 のライセンス化活性によって誘発される過剰な DNA 複製が、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用にどのような影響を与えるのかについて解析した。

第二章では、精製した GST 切除型 Cdt1 を卵抽出液に添加することで、DNA 複製反応中の卵抽出液における MCM 複合体および一本鎖結合タンパク質複合体 (replication protein A; RPA) のクロマチン結合などの動態がどのような影響を受けるのかを免疫ブロット法により解析した。

第三章では、N 末端側または C 末端側を欠失させた数種の変異体型 Cdt1 を作製し、それらを卵抽出液に添加することで、DNA 複製に対する各種変異体の影響を解析し、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に関与する機能領域の同定を試みた。

第四章では、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用とライセンス化活性の関係を明らかにするため、MCM 複合体をクロマチンに導入させる機能を持たない、すなわち、ライセンス化活性を持たない点変異型 Cdt1 を作製し、その DNA 複製に対する影響について検討した。

以上の解析を通じ、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用は、チェックポイント機構の活性化や過剰な DNA 複製の影響を受けず、複製フォークの進行を抑制することで生じることが示唆された。また、この抑制作用に重要な役割を果たす構造が 255-289 アミノ酸領域に存在すること、この抑制作用は MCM 複合体をクロマチンに導入するために必要な機能が欠損していても発現できることが示された。これらのことから、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用は、ライセンス化活性とは異なる生理活性であると推測された。

(なお、以後の章において単に Cdt1 と記載されている場合には、*Xenopus* Cdt1 を指すものとする。)

本論

第一章 Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対する過剰な DNA 複製の影響

これまでに、グルタチオン-S 転移酵素 (GST) 融合組換え Cdt1 (GST-Cdt1) が、*Xenopus* 卵抽出液中で DNA 複製における新生鎖伸長反応を抑制することが見出されている²⁹⁾。この抑制作用は、caffeine によりチェックポイント機構の活性化が抑制された状態においてもみられたことから、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用はチェックポイント活性化による DNA 複製の抑制とは別の反応であると考察されている²⁹⁾。一方で Cdt1 の過剰発現は、クロマチン上への Mcm2-7 複合体 (MCM 複合体) の過剰な導入を引き起こし、再複製の誘発や^{25, 26)}、チェックポイント機構の活性化をもたらすことが知られている¹⁹⁻²¹⁾。そのため、過剰な Cdt1 の添加により DNA 複製が抑制された卵抽出液においても過剰な DNA 複製の開始反応が誘発されていること、この過剰な DNA 複製開始の影響により新生鎖伸長反応が抑制されることが考えられた。

本章では、GST-Cdt1 から GST-tag を切除することで、内在性 Cdt1 の形態により近い組換え Cdt1 を作製し、それを卵抽出液に添加することで DNA 複製に対する抑制作用が Cdt1 自身が保持する活性によるものであることを確認した。また、DNA 複製の開始反応を CDK 阻害タンパク質 p27 で抑制することで、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対する DNA 再複製開始の影響について検討した。

第一節 実験材料・実験方法

1-1-1. 組換えタンパク質の精製

野生型 Cdt1 の cDNA を組込んだ pGEX-6P-3 (GE Healthcare) プラスミドベクターを作製し、これを導入した大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (STRATAGENE) に、0.1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranosids (IPTG) (Wako) を加え、16°C、2 時間反応させることでグルタチオン-S 転移酵素 (GST) 融合組換え Cdt1 (GST-Cdt1) を発現させた。その後、大腸菌を lysis buffer (10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.2、500 mM NaCl、4 mM dithiothreitol (DTT)、0.25% Triton-X100、1 mM EGTA、5 μ g/ml Pepstatin A、5 μ g/ml Leupeptin、5 μ g/ml Aprotinin) に懸濁し、超音波処理によって大腸菌を破碎したのち、タンパク質画分を抽出した。得られた画分を Glutathion Sepharose 4B (GE Healthcare) と共に 4°C、1 時間反応させることで、GST-Cdt1 を Sepharose レジンに結合させた。その後、レジンを lysis buffer で 3 回、PreScission Protease buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0、300 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM DTT、0.01% Triton-X100、1 μ g/ml Pepstatin A、1 μ g/ml Leupeptin、1 μ g/ml Aprotinin、10% sucrose) で 3 回洗った後に、12.5 unit の PreScission Protease (GE Healthcare) を加えて 4°C、5 時間反応させることで GST を切除し、Cdt1 のみを溶出した³⁰⁾。

Xenopus p27 の cDNA が組込まれた pGEX-KG は、Dr. Johannes C. Walter から寄与された。この発現プラスミドを BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Competent Cells (Agilent Technologies) に形質転換させ、組換えタンパク質を発現させた後、Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare) によって精製した³⁰⁾。

1-1-2. *Xenopus* 卵抽出液の調製

雌のアフリカツメガエルの産卵を誘発させるため、*Xenopus* 卵抽出液の調製日より 5 日前に 50 U/匹の動物用ピーエムエス A (日本全薬工業株式会社) を皮下投与し、調製前日の夜に 500 U/匹の動物用コリホルモン A (日本全薬工業株式会社) を皮下投与した。投与後は、modified high salt bath (110 mM NaCl、15 mM Tris、2 mM KCl、1 mM MgCl₂ を HCl で pH 7.6 に調整) 中 18°C 下で飼育し、卵を回収する 2 時間前に 22°C になるよう設定した。回収した卵を cystein buffer (2% cystein、1 mM EGTA を NaOH で pH 7.5 に調整) で洗い、寒天質を取り除いた。その後、室温の high salt bath (110 mM NaCl、15 mM Tris、2 mM KCl、1 mM MgSO₄、2 mM NaHCO₃、0.5 mM Na₂HPO₄、2 mM EGTA を HCl で pH 7.6 に調整)、さらに 4°C の unactivated extraction buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.6、5 mM MgCl₂、5 mM EGTA、2 mM 2-mercaptoethanol) で洗浄した。洗浄後の卵を 1.5 mL チューブに移して遠心分離 (890×g、4°C、1 min) し、上清および卵の層の表面に集まった質の悪い卵を除いた。その後、再び遠心分離 (14,170×g、4°C、10 min) し、中央部の黒褐色の層を回収した。そこに 10 µg/ml cytochalasin B および 15% extract dilution buffer (50 mM KCl、50 mM HEPES-KOH pH 7.6、2 mM DTT、0.4 mM MgCl₂、0.4 mM EGTA、10% sucrose、10 µg/ml Pepstatin A、10 µg/ml Leupeptin) を加えて遠心分離 (16,200×g、4°C、20 min) した。中央部の黄色い層のみを回収し、30 µm Nylon Net Filter (MILLIPORE) でろ過したのち、1% glycerol を加えて 20 µl ずつ分注し、液体窒素中で保存した。卵抽出液の使用時には、0.3 mM CaCl₂ を加えて 15 分間反応させることで活性化させ、各解析に使用した³¹⁾。

1-1-3. DNA 複製の解析

25 mM phosphocreatine、15 µg/ml creatin phosphokinase、250 µg/ml cycloheximide、0.8 nM biotin-14-dATP (invitrogen)、500 nuclei/µl 精子核 DNA を *Xenopus* 卵抽出液に加えることで DNA 複製を開始させた。反応完了後、0.4 µg RNAase A/T1 mix (Thermo Scientific) を加えた stop N (20 mM Tris-HCl pH 8.0、200 mM NaCl、5 mM EDTA、0.5% SDS) を卵抽出液に加えて 37°C で 10 分間反応させ、さらに 1.856 unit の Protease K (SIGMA) を加え 1 時間反応させた。その後、試料に 150 µl の 4 M 酢酸アンモニウム溶液 (nacalai tesque) および 375 µl のエタノールを加え、遠心分離 (16,200×g、4°C、20 min) により DNA 画分を沈降させた。DNA 画分を 0.4 N NaOH に溶かし、Biodyne B 0.45 µm メンブレン (Pall Corporation) に吸着させたのち、

Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Pierce) と Typhoon 9410 Variable Mode Imager (GE Healthcare) または LuminoGraph1 (ATTO) を用いて新生 DNA 鎖を検出した³⁰⁾。

1-1-4. アルカリアガロースゲル電気泳動

4 nM biotin-14-dATP (invitrogen) を加えた卵抽出液を DNA 複製の解析と同様の方法で反応させ、DNA 画分を沈降させた。回収した DNA 画分を 10 μ l の alkaline loading solution (50 mM NaOH, 8.3 mM EDTA, 3% ficoll 400, 0.42 mg/ml xylene cyanol) に溶かし、それらを 1% アルカリアガロースゲル (50 mM NaOH, 1 mM EDTA) 上で、4°C、13 時間、12 volts で泳動した。泳動終了後、アガロースゲルを 0.25 N HCl で 20 分間平衡化し、さらに、denaturation solution (1.25 M NaOH, 1.5 M NaCl) で 20 分間平衡化させた。泳動された DNA をアガロースゲルから Biodyne B 0.45 μ m メンブレン (Pall Corporation) に転写し、Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Pierce) と Typhoon 9410 Variable Mode Imager (GE Healthcare) または LuminoGraph1 (ATTO) を用いて新生 DNA 鎖を検出した³⁰⁾。

1-1-5. aphidicolin-クロマチンの調製

精子核 DNA (1000 nuclei/ μ l) を加えた *Xenopus* 卵抽出液に、75 μ g/ml aphidicolin および 5 mM caffeine を添加し、23°C で 40 分間反応させた。反応完了後、nuclear isolation buffer (NIB; 50 mM HEPES-KOH pH 7.6, 50 mM KCl, 2 mM DTT, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM spermidine, 0.15 mM spermine, 1 μ g/ml Aprotinin, 1 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml Pepstatin A) に 2.5 mM ATP と 0.01% Triton X-100 を添加した緩衝液 (T' NIBA) 1 ml に試料を懸濁し、さらに、15% sucrose を添加した T' NIBA を下層に重層した。スイングローターを用いた遠心分離 (6,300 \times g, 4°C, 5 min) によりクロマチン画分を沈殿させたのち、沈殿物を 1 mL の T' NIBA で洗浄した。その後、アングルローターを用いた遠心分離 (6,300 \times g, 4°C, 5 min) によって aphidicolin-クロマチン (APH-クロマチン) を単離した。APH-クロマチンを 100 nM p27 および 400 nM Cdt1 を添加した新しい卵抽出液に加え、DNA 複製の解析およびアルカリアガロースゲル電気泳動を行った³⁰⁾。

第二節 結果

1-2-1. GST 切除型 Cdt1 による新生鎖伸長反応の抑制

本研究では、グルタチオン-S 転移酵素 (GST) 融合組換え Cdt1 (GST-Cdt1) を内在性 Cdt1 の形態により近づけるため、PreScission Protease により GST-tag を切除し、Cdt1 を精製した (Fig. 2A)。得られた Cdt1 が、GST-Cdt1 と同様に、新生鎖伸長抑制作用を示すかを確認するため、*Xenopus*

卵抽出液無細胞実験系を用いて、DNA 複製に対する Cdt1 の影響を観察した。

精子核 DNA を加えた卵抽出液に、400、200、100、50、25、12.5 nM の Cdt1 を添加し、90 分間反応させた時の DNA 合成量を測定した結果、添加した Cdt1 濃度の増加に伴い、DNA 合成量が減少した (Fig. 2B)。また、同様の反応物をアルカリアガロースゲル電気泳動で分離し、新生 DNA 鎖の泳動像を観察したところ、Cdt1 を添加していない卵抽出液 (none) では、長鎖側に新生 DNA 鎖のバンドがみられたのに対し、Cdt1 の添加量を増やすにつれて新生 DNA 鎖のバンドが短鎖側に移動する様子が観察された (Fig. 2C)。これらのことから、GST を切除した組換え Cdt1 も、GST-Cdt1 と同様に、新生鎖伸長反応を抑制することが確認された。

続いて、400 nM Cdt1 を添加した卵抽出液において、DNA 合成量および新生 DNA 鎖の泳動像が、時間経過に伴いどのように変化するかを観察した。Cdt1 を添加しなかった卵抽出液 (none) では、反応開始後 60~120 分間の DNA 合成量にほとんど変化がみられなかったことから、反応開始後 60 分で DNA 複製がほぼ完了しているものと考えられた (Fig. 2D)。一方、Cdt1 を添加した卵抽出液 (+ Cdt1) では、Cdt1 を添加しなかったもの (none) と比べ DNA 合成量が著しく減少していたが、時間経過に伴い、次第に DNA 合成量が増加した (Fig. 2D)。さらに、この時の新生 DNA 鎖の泳動像をみると、Cdt1 を添加しなかった場合には長鎖側に新生 DNA 鎖のバンドが検出されるのに対し、Cdt1 添加時には、時間経過に伴い短い新生 DNA 鎖 (短鎖 DNA) が増加していた (Fig. 2E)。

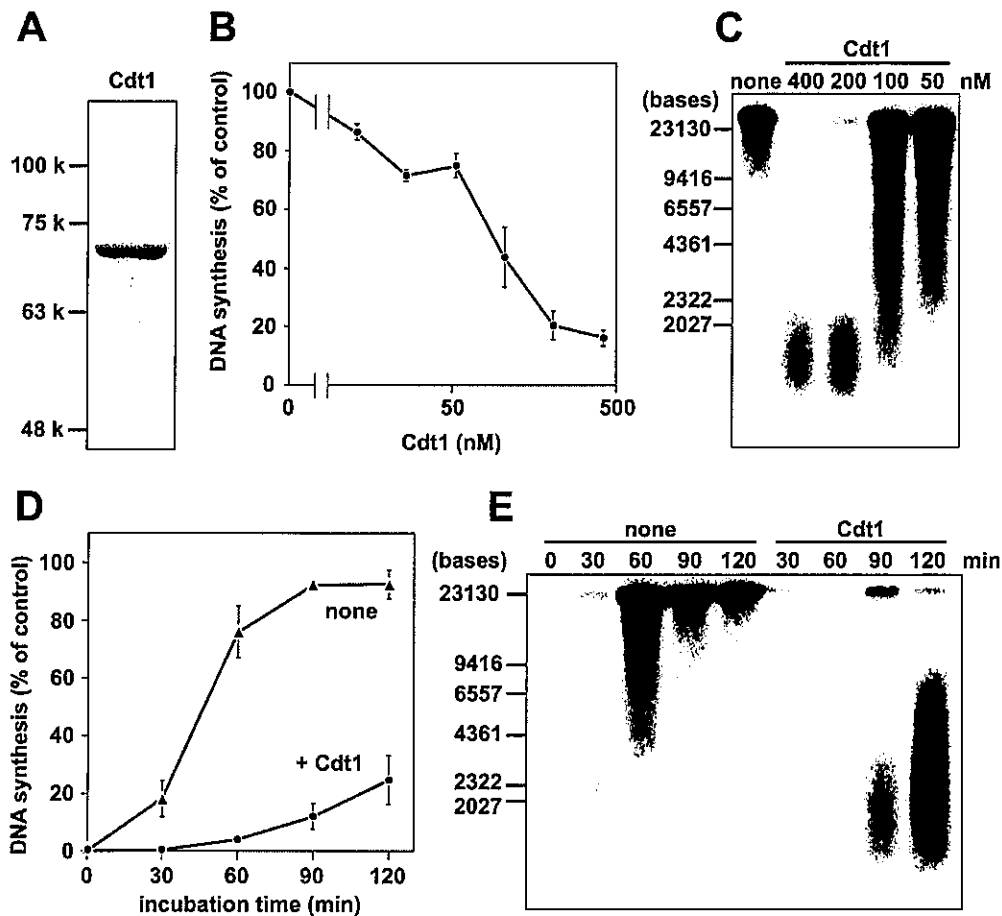


Figure 2. *Xenopus* 卵抽出液における DNA 複製に対する GST を切除した組換え Cdt1 の影響

(A) GST を切除して精製した組換え Cdt1 を SDS-PAGE で泳動し、Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (Bio Rad) により染色した。(B) 卵抽出液に、精子核 DNA および 400、200、100、50、25、12.5、6.25 nM の Cdt1 を添加し、90 分間反応をさせたときの DNA 合成量をそれぞれ測定した。グラフの縦軸は、Cdt1 を添加していない卵抽出液での DNA 合成量を 100% としたときの各試料における DNA 合成量 (%) の平均値±標準誤差 (n=3) を示し、横軸は Cdt1 濃度 (nM) を示した。(C) Cdt1 を 50、100、200、400 nM 添加したとき、または Cdt1 を添加しなかったとき (none) の新生 DNA 鎖をアルカリアガロースゲル電気泳動により観察した。(D and E) 400 nM Cdt1 および精子核 DNA を添加した卵抽出液を 30、60、90、120 分間反応させ、各試料の DNA 合成量 (D) と新生 DNA 鎖の長さ (E) を、Cdt1 を添加しなかった場合 (none) と比較した。D の縦軸は、Cdt1 を添加していない卵抽出液で 90 分間反応させたときの DNA 合成量を 100% としたときの各試料における DNA 合成量 (%) の平均値±標準誤差 (n=3) を示した。

1-2-2. Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対する p27 の影響

Cdt1 を添加した *Xenopus* 卵抽出液において、時間経過に伴い短い新生 DNA 鎖 (短鎖 DNA) が蓄積したことから、この卵抽出液では Cdt1 のライセンス化活性によって過剰な DNA 複製開始反応が

生じているものと推測された。そこで、DNA 複製開始反応に必須な cyclin-dependent kinase (CDK) 活性を阻害する p27 を用いて、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対する DNA 複製開始反応の影響を検討した。

DNA 複製の開始には、CDK および Dbp4-dependent kinase (DDK) の 2 つのリン酸化酵素により、数種の DNA 複製開始関連タンパク質がリン酸化される必要がある¹⁻³⁾。p27 は CDK と結合することで、CDK によるリン酸化反応を阻害し、DNA 複製の開始反応を抑制する。そこで、精子核 DNA および Cdt1 を添加してから 40 分間反応させた卵抽出液に p27 を加えることにより、40 分経過後以降に生じる新たな DNA 複製の開始反応を抑制した条件下で、DNA 合成量および新生 DNA 鎖の長さにどのような影響を及ぼすかを観察した。

Cdt1 を添加しなかった卵抽出液では、p27 の添加によって DNA 合成量はわずかに減少したが (Fig. 3B)、新生 DNA 鎖の泳動像に変化はみられなかった (Fig. 3A)。一方、Cdt1 を添加した卵抽出液では、p27 の添加により短鎖 DNA のバンドが著しく減少した (Fig. 3A)。この結果から、Cdt1 添加時にみられる短鎖 DNA の蓄積は、DNA 複製開始反応が繰り返されることにより著しく増加していることが示唆された。また、Cdt1 添加時にみられる DNA 複製の阻害には p27 の影響が見られなかったことから (Fig. 3B)、Cdt1 は過剰な DNA 複製開始反応の有無に関係なく DNA 複製を抑制すると考えられた。

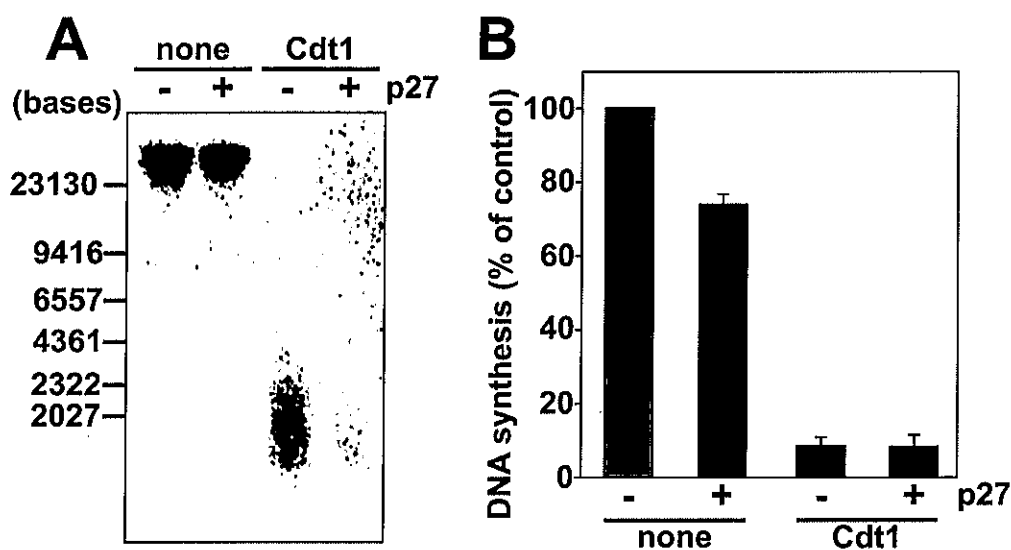


Figure 3. p27 および Cdt1 添加時における DNA 合成量および新生 DNA 鎖の解析

(A and B) 400 nM Cdt1 および精子核 DNA を添加して 40 分間反応させた卵抽出液に、100 nM p27 を加え、さらに 50 分間反応させた。反応完了後、新生 DNA 鎖 (A) および DNA 合成量 (B) を測定し、Cdt1 を添加しなかった場合 (none)、p27 を添加しなかった場合 (-) と比較した。B のグラフの縦軸は、Cdt1 および p27 を添加していない卵抽出液 (none, -) の DNA 合成量を 100%とした時の各試料における DNA 合成量 (%) の平均値±標準誤差 (n=3) を示した。

1-2-3. Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対する過剰な DNA 複製の影響

Cdt1 の添加により引き起こされる過剰な DNA 複製開始反応が Cdt1 の DNA 複製抑制作用に寄与しているかについてより明確な検討をおこなうため、aphidicolin (APH)-クロマチンを用いて Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対する過剰な DNA 複製の影響を解析した。

DNA ポリメラーゼ阻害剤 aphidicolin は、DNA ポリメラーゼを阻害することで複製フォークを停止させ、DNA 複製を抑制する。精子核 DNA および aphidicolin を添加し DNA 複製開始反応を完了させた卵抽出液からクロマチンを単離することで、新生鎖伸長反応が開始した段階で、複製フォークが停止したクロマチン (APH-クロマチン) を調製した。この APH-クロマチンを p27 および Cdt1 を添加した卵抽出液に戻して DNA 複製を再開させることにより、過剰な DNA 複製が生じない条件下で、APH-クロマチン上の複製フォークに対する Cdt1 の影響を観察した (Fig. 4A)。

Cdt1 を添加していない卵抽出液では、新生 DNA 鎖の泳動像および DNA 合成量に対する p27 の影響は確認されなかった (Fig. 4B and C, none)。また、Cdt1 を添加した卵抽出液においても、p27 の添加によってわずかに短鎖 DNA のバンドが減少したものの、DNA 合成量に明らかな変化はみられなかった (Fig. 4B and C, Cdt1)。このことから、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用には、添加した Cdt1 により誘起される過剰な DNA 複製は寄与していないことが示唆された。

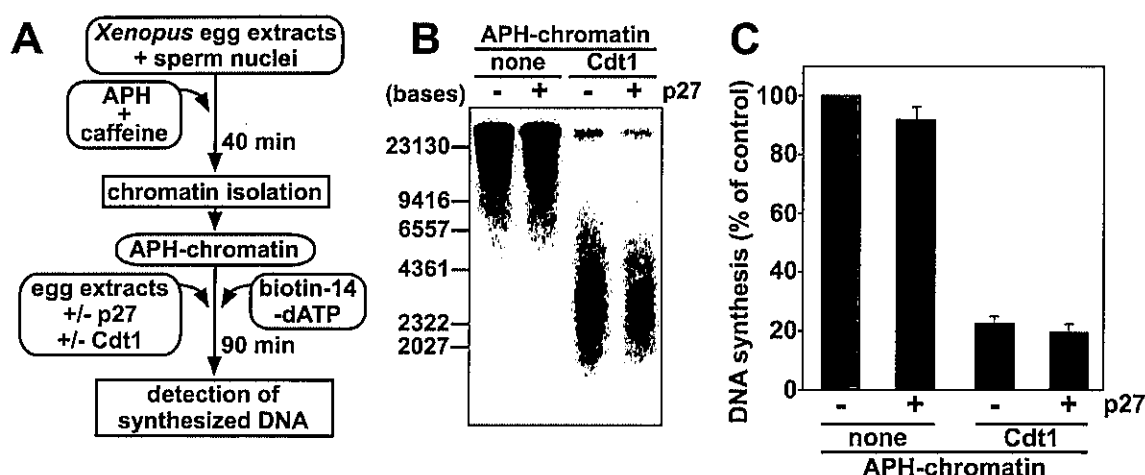


Figure 4. aphidicolin-クロマチンを用いた DNA 複製反応に対する Cdt1 添加の影響

(A) 以下の実験方法の図解。(B and C) *Xenopus* 卵抽出液に 75 μ g/ml aphidicolin および 5 mM caffeine を添加し、23°C で 40 分間反応させたのちに単離したクロマチン画分を aphidicolin (APH)-クロマチンとした。400 nM Cdt1 と 100 nM p27 を添加した卵抽出液に APH-クロマチンを加え、90 分間反応させた。反応終了後、新生 DNA 鎖の電気泳動像 (B) および DNA 合成量 (C) を観察し、Cdt1 を添加しなかった場合 (none)、p27 を添加しなかった場合 (-) と比較した。C におけるグラフの縦軸は、Cdt1 および p27 を添加していない卵抽出液 (none, -) における DNA 合成量を 100%としたときの各試料における DNA 合成量 (%) の平均値 \pm 標準誤差 (n=3) を示した。

第三節 考察

本章で GST 切除して精製した組換え Cdt1 を *Xenopus* 卵抽出液に添加した結果、DNA 複製による DNA 合成量が減少し、短鎖 DNA の蓄積がみられたことから、GST を切除した組換え Cdt1 であっても、既報の GST-Cdt1 組換えタンパク質と同様に新生鎖伸長反応を抑制することが確認された。また、この時に観察される短鎖 DNA の蓄積は、p27 を添加することによって、著しく減少することが明らかとなった (Fig. 2E and 3A)。そのため、Cdt1 によって新生鎖伸長反応が抑制された卵抽出液では、Cdt1 のライセンス化活性により、過剰な DNA 複製が生じているものと推測された。一方、APH-クロマチンを用いた DNA 複製の解析により、過剰な DNA 複製開始が抑制された条件下でも、Cdt1 は新生鎖伸長反応を抑制することが示唆された (Fig. 4B and C)。これらのことから、Cdt1 を添加した卵抽出液では、Cdt1 のライセンス化活性により過剰な DNA 複製が生じるが、この反応に関係なく Cdt1 が新生鎖伸長反応を抑制すること、また、新生鎖伸長反応が抑制された状態で過剰な DNA 複製開始が繰り返されることにより、短鎖 DNA が著しく蓄積するようになることが考えられた。

第二章 Mcm2-7 複合体および RPA のクロマチン結合に対する Cdt1 の影響

DNA 複製の開始に伴い、二本鎖 DNA は Mcm2-7 複合体 (MCM 複合体) の DNA ヘリカーゼ活性によって一本鎖 DNA へと巻き戻されていく。この反応により露出した一本鎖 DNA は、一本鎖結合タンパク質 (replication protein A; RPA) との結合によって一時的に保護される。しかし、直ちに DNA ポリメラーゼによる新生 DNA 鎖の合成が行われるため、一本鎖 DNA が二本鎖 DNA となり、RPA の結合は速やかに解消されていく^{32, 33)}。また、MCM 複合体は、DNA 複製完了に伴い DNA ヘリカーゼとしての役割を終え、クロマチン上から解離する³⁴⁾。

Xenopus 卵抽出液において、MCM 複合体および RPA のクロマチン上での動態が、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用によってどのような影響を受けるのかについて情報を得るため、Cdt1 の添加により DNA 複製を抑制した卵抽出液からクロマチンを単離し、MCM 複体のサブユニットである Mcm4、RPA のサブユニットである Rpa70 のクロマチン結合を免疫プロット法により解析した。

第一節 実験材料・実験方法

2-1-1. クロマチンの単離

精子核 DNA (1000 nuclei/ μ l) を加えた *Xenopus* 卵抽出液を 23°C で反応させた。反応完了後、試料を 1 ml の 2.5 mM ATP と 1% Triton X-100 を添加した NIB (TNIBA) に懸濁し、さらに、10% sucrose を添加した TNIBA を下層に重層した。スイングローターを用いた遠心分離 (14,000 \times g、4°C、5 min) によりクロマチンを沈殿させた後、1 mL の TNIBA を加え、アングルローターで遠心分離 (19,000 \times g、4°C、5 min) することで、沈殿画分を洗浄した³⁰⁾。

2-1-2. 免疫プロット法

試料中のタンパク質を SDS-PAGE により分離した後、Hybond-P PVDF Membrane (GE healthcare) に転写した。免疫プロット法では、一次抗体として anti-MCM4 antibody (BETHYL) または anti-RPA70 antibody、anti-histone H3 antibody (Abcam) を使用し、検出時には、Amersham ECL Select Western Blotting Reagents (GE Healthcare) を用いて発光させた³⁰⁾。

第二節 結果

2-2-1. Mcm2-7 複合体および RPA のクロマチン結合に対する Cdt1 の影響

精子核 DNA を加えたのちに 0、20、40、120 分間反応させた卵抽出液よりクロマチンを単離

し、Mcm4 および Rpa70 のクロマチン結合を観察した (Fig. 5A, B, lane 1-4)。その結果、Mcm4 のクロマチン結合は、反応開始後 20 分に最も強く観察され、120 分後には、ほとんどみられなくなった (Fig. 5B, lane 2, 4)。また、検討した全ての時間において、Rpa70 の顕著なクロマチン結合は確認されなかった (Fig. 5B, lane 1-4)。これらの結果から、卵抽出液中では、反応開始後 20 分までに MCM 複合体がクロマチン上に導入され、120 分後には DNA 複製が完了して MCM 複合体がクロマチン上から解離すると考えられた。また、DNA 複製の進行中にも、クロマチン上への顕著な RPA の蓄積は認められないものと考えられた。そこで本実験では、ライセンス化反応に対する各添加物の影響を排除するため、ライセンス化反応 (=MCM 複合体の導入) がほぼ完了した反応開始後 20 分の卵抽出液に、Cdt1 または aphidicolin を添加し、DNA 複製時の Mcm4 または Rpa70 のクロマチン結合について検討した (Fig. 5B, lane 5-7, D)。

aphidicolin を添加した卵抽出液では、反応開始後 120 分において、Mcm4 および Rpa70 の顕著なクロマチン結合が観察された (Fig. 5B, lane 5)。Mcm4 の結合については、DNA ポリメラーゼが阻害を受けることで DNA 合成が抑制され、DNA 複製が完了しなくなることにより、反応開始から 120 分を経過しても MCM 複合体がクロマチンから解離しないためであると考えられた。また Rpa70 の結合については、MCM 複合体のヘリカーゼ活性によって巻き戻された DNA を鋳型とした DNA 合成が阻害されることにより一本鎖 DNA の露出が増加したため、RPA がクロマチンに蓄積したと推測された。

これに対して Cdt1 を添加した卵抽出液では、反応開始後 120 分において Mcm4 のクロマチン結合が観察されたが、Rpa70 の顕著なクロマチン結合の増加はみられなかった (Fig. 5B, lane 6)。このことから、Cdt1 により新生鎖伸長反応が抑制された場合には、aphidicolin 処理により生じるような一本鎖 DNA の顕著な露出は起きないということが示唆された。一方、aphidicolin 添加から 40 分後に Cdt1 を添加した卵抽出液では、aphidicolin を単独で添加したときと同様に、Mcm4 および Rpa70 の顕著なクロマチン結合が観察された (Fig. 5B, lane 7)。この結果より、すでに露出している一本鎖 DNA に対して、Cdt1 の添加が影響を与えることはないと考えられた。

2-2-2. Cdt1 添加時における MCM 複合体および RPA のクロマチン結合の経時変化

卵抽出液と精子核 DNA を混合して DNA 複製をおこなわせている反応液に対し、反応開始後 20 分に Cdt1 または aphidicolin を単独で、もしくは両者を同時に添加し、さらに 40 分または 100 分の間反応を継続した。得られた反応液からクロマチン画分を単離し、Mcm4 および Rpa70 のクロマチン結合を観察した (Fig. 5C)。aphidicolin または Cdt1 を単独で添加した場合には、aphidicolin または Cdt1 添加後 40 分または 100 分において、Mcm4 および Rpa70 のクロマチン結合に顕著な変化は観察されなかった (Fig. 5D, lane 2, 3, 6 and 7)。これに対し、Cdt1 と aphidicolin を同時に添加した場合には、aphidicolin、Cdt1 添加後 100 分を経過したクロマチ

ンでは、40 分後に比べて、Mcm4 および Rpa70 の結合が顕著に増加していた (Fig. 5D, lane 4 and 8)。しかし、このときの Rpa70 のクロマチン結合の量は、aphidicolin を単独で添加した場合と比べ、明らかに減少していた (Fig. 5D, lane 6 and 8)。これより、Cdt1 と aphidicolin を同時に添加した卵抽出液では、時間経過に伴い RPA がクロマチン上に蓄積するが、その速度は aphidicolin 単独添加時よりも著しく遅延すると考えられた。

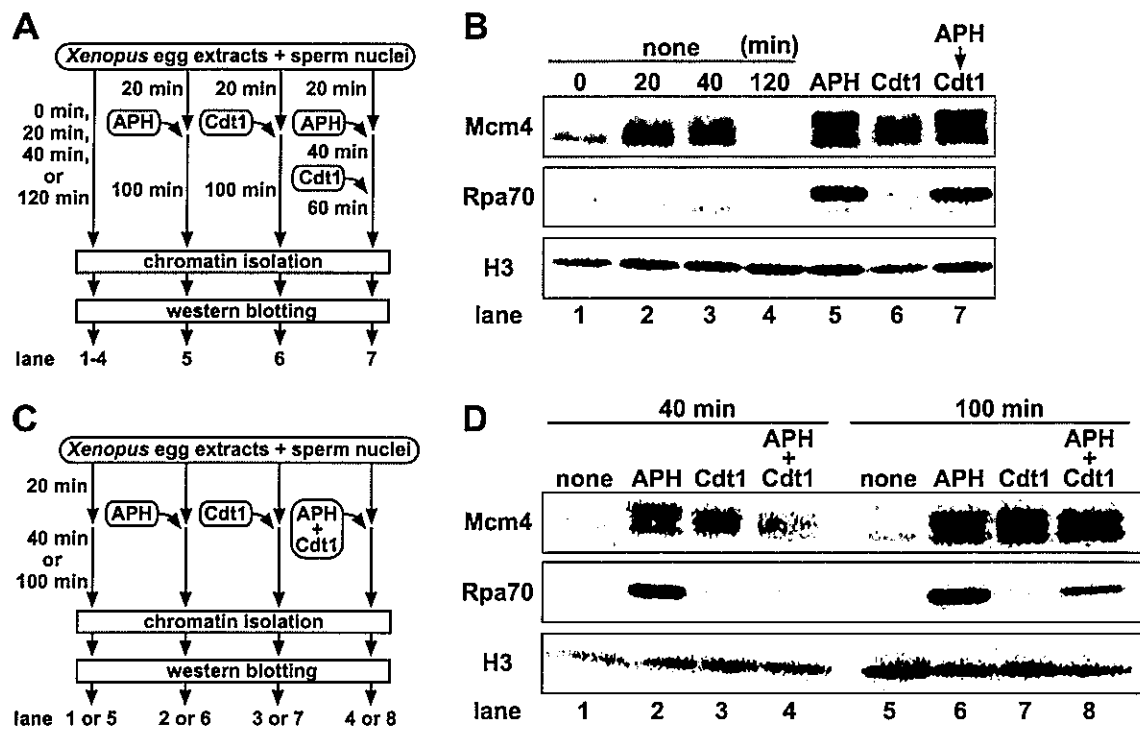


Figure 5. Cdt1 を添加した卵抽出液における MCM 複合体および RPA のクロマチン結合
精子核 DNA を加え、DNA 複製反応を開始させた卵抽出液よりクロマチンを単離し、免疫ブロット法を用いて Mcm4 および Rpa70 を検出した。また、Histone H3 (H3) を loading control として検出した。(A) Fig. 5B の実験方法を図に記した。(B) (lane 1-4) *Xenopus* 卵抽出液に精子核 DNA を加え、各時間における Mcm4 および Rpa70 のクロマチン結合を検出した。(B) (lane 5-7) 卵抽出液に精子核 DNA を加え 20 分間反応させた後、50 μ g/ml aphidicolin (lane 5 and 7) または 400 nM Cdt1 を添加した。lane 7 では、反応開始後 20 分に 50 μ g/ml aphidicolin、60 分に 400 nM Cdt1 を添加した。反応開始後 120 分で反応を停止し、免疫ブロット法によりクロマチン画分の Mcm4 および Rpa70 を検出した。(C) Fig. 5D の実験方法を図に記した。(D) 卵抽出液に精子核 DNA を加え 20 分間反応させた後、50 μ g/ml aphidicolin、400 nM Cdt1 またはその両方を添加した。その後、40 分間または 100 分間反応させ、免疫ブロット法によりクロマチン画分の Mcm4 および Rpa70 を検出した。

第三節 考察

Cdt1 を添加した卵抽出液では、反応開始後 120 分において、MCM 複合体のクロマチン結合が観察されたが RPA の蓄積はみられなかった。このため、Cdt1 による新生鎖伸長反応の抑制時には、一本鎖 DNA の露出が起きていないことが推測された。また、aphidicolin の添加によってみられる RPA のクロマチン上への蓄積が、Cdt1 を同時に添加することにより明らかに遅延したことから、Cdt1 添加時には、一本鎖 DNA の露出速度が低下していること、すなわち、複製フォークの進行が遅延していることが考えられた。これらのことから、Cdt1 は複製フォークの進行に対し抑制的にはたらくことで、新生鎖伸長反応を抑制していると推測された。

第三章 Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に關与する機能領域の同定

Xenopus Cdt1 は全長 620 アミノ酸からなるタンパク質である (Fig. 6A)。主な機能領域として、193-447 アミノ酸領域に geminin 結合領域、C 末端側 447-620 アミノ酸領域に Mcm2-7 複合体 (MCM 複合体) 結合領域が存在する (Fig. 6A)。また、これらを含む 243-620 アミノ酸領域がライセンス化活性に必須な領域であることが知られている³⁵⁾。

本章では、N 末端側および C 末端側の欠失変異体型 Cdt1 を作製し、それらの DNA 複製に対する影響を観察することで、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に關与する機能領域の同定を試みた。

第一節 実験材料・実験方法

3-1-1. 欠失変異体型 Cdt1 の作製

Cdt1 の N 末端側 1-134、1-198、1-239、1-254、1-289、1-444、1-522 アミノ酸領域または C 末端側 606-620、466-620、446-620、350-620、329-620、240-620 アミノ酸領域を欠失させた Cdt1 の cDNA を組込んだプラスミドベクターを作製し、1-1-1 と同様の方法で各種欠失変異体型 Cdt1 を精製した。

3-1-2. Cdt1 免疫除去 *Xenopus* 卵抽出液の調製と組換え Cdt1 のライセンス化活性の測定

rProtein A Sepharose Fast Flow (GE healthcare) に Sepharose レジンの 5 倍容量の anti-*Xenopus* Cdt1 antibody を加え、室温で 60 分間反応させた。その後、Sepharose レジンが全体量の 50% となるよう *Xenopus* 卵抽出液を加え、4°C で 60 分間反応させることで、卵抽出液中の Cdt1 をレジンに結合させた。Sepharose レジンを除去することにより、Cdt1 免疫除去卵抽出液を得た。また、非特異的抗体を用いて同様の操作を行ったものを mock 処理卵抽出液とした。

精子核 DNA (1,000 nuclei/ μ l) および 5 mM phosphocreatine、25 μ g/ml creatin phosphokinase、250 μ g/ml cycloheximide を mock 処理した卵抽出液または Cdt1 を免疫除去した卵抽出液に添加し、50 nM 野生型 Cdt1 または欠失変異体型 Cdt1 と共に 23°C で 30 分間反応させた。反応終了後、2-1-1 および 2-1-2 と同様の方法で Mcm4 のクロマチン結合を検出した。

3-1-3. DNA 複製の解析

反応開始から 20 分後の *Xenopus* 卵抽出液に 400 nM 野生型 Cdt1、各欠失変異体型 Cdt1、または caffeine 等の試薬を加え、さらに 70 分間反応させた。反応終了後、1-1-3 または 1-1-4 と同様の方法で DNA 合成量の測定および新生 DNA 鎖の泳動像の検出をおこなった。

3-1-4. Mcm4 および Rpa70 のクロマチン結合の解析

反応開始から 20 分後の *Xenopus* 卵抽出液に 400 nM の野生型 Cdt1 および各欠失変異体型 Cdt1 を添加し、さらに 100 分間反応させた。反応終了後、2-1-1 および 2-1-2 と同様の方法で Mcm4 および Rpa70 を検出した。

3-1-5. 欠失変異体型 Cdt1 添加時における APH-クロマチンを用いた DNA 複製の解析

1-1-5 と同様の方法で調製した aphidicolin (APH)-クロマチンを 100 nM p27 および 400 nM 野生型 Cdt1 または Cdt1 255-620、Cdt1 1-605 を添加した *Xenopus* 卵抽出液に加え、さらに 90 分間反応させた。反応終了後、1-1-3 および 1-1-4 と同様の方法で DNA 合成量の測定および新生 DNA 鎖の泳動像の検出をおこなった。

第二節 結果

3-2-1. 欠失変異体型 Cdt1 の作製

Cdt1 の機能領域の情報をもとに、N 末端側 134 アミノ酸、198 アミノ酸、239 アミノ酸、254 アミノ酸、289 アミノ酸、444 アミノ酸、522 アミノ酸を欠失させたグルタチオン-S 転移酵素 (GST) 融合組換え Cdt1 (それぞれ、Cdt1 の 135-620 アミノ酸、199-620 アミノ酸、240-620 アミノ酸、255-620 アミノ酸、290-620 アミノ酸、445-620 アミノ酸、523-620 アミノ酸の各領域を含む) を発現させた。その後、1-1-1 に示した方法と同様にして PreScission Protease 処理によって GST-tag を切除し、欠失変異体型 Cdt1 を精製した。SDS-PAGE を用いて各種組換えタンパク質の分子量を確認したところ、推定されたとおり、それぞれ 54 k、46 k、42 k、40 k、36 k、20 k、10 k 付近に泳動された (Fig. 6B 左図)。

また、C 末端側 15 アミノ酸、155 アミノ酸、175 アミノ酸、271 アミノ酸、302 アミノ酸、381 アミノ酸を欠失した変異体 (それぞれ、Cdt1 の 1-605 アミノ酸、1-465 アミノ酸、1-445 アミノ酸、1-349 アミノ酸、1-328 アミノ酸、1-239 アミノ酸の各領域を含む) も同様の方法で精製した。精製した組換えタンパク質の分子量を SDS-PAGE により確認したところ、推定されたとおり、それぞれ 67 k、51 k、49 k、40 k、37 k、27 k 付近に泳動された (Fig. 6B 右図)。

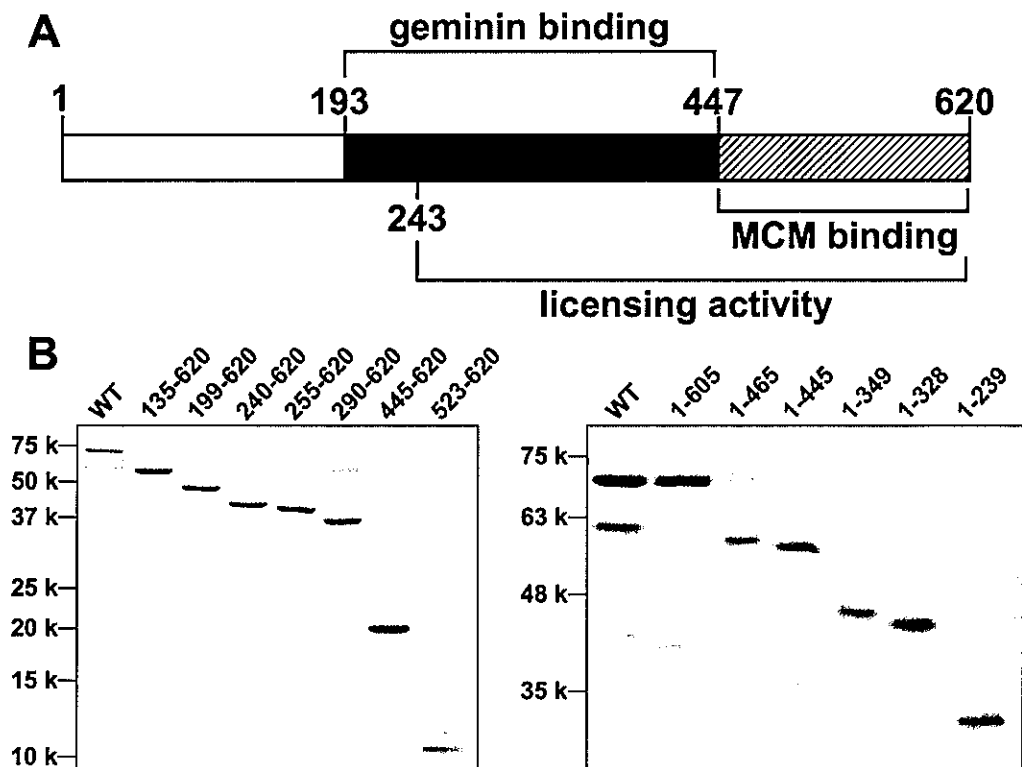


Figure 6. 欠失変異体型 Cdt1 の作製

(A) Cdt1 の geminin 結合領域 (geminin binding)、Mcm2-7 複合体結合領域 (MCM binding)、ライセンス化活性に必須な領域 (licensing activity) を図に示した。(B) 野生型 Cdt1 (WT) および N 末端側欠失変異体 (B 左図) または C 末端側欠失変異体 (B 右図) を SDS-PAGE により泳動した後、Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution により染色した。

続いて、内在性 Cdt1 を免疫除去した *Xenopus* 卵抽出液 (Fig. 7A) に欠失変異体型 Cdt1 を加えることにより、Mcm4 のクロマチンへの導入を指標として、欠失変異体型 Cdt1 のライセンス化活性を調べた。

その結果、野生型 Cdt1 および Cdt1 255-620 を添加した場合には、Mcm4 のクロマチン結合が観察されたが、Cdt1 290-620 および Cdt1 1-605 を添加した場合には、Mcm4 のクロマチン結合は検出されなかった (Fig. 7B)。これらのことから、Cdt1 の N 末端側 290 アミノ酸以降を欠失させた変異体および C 末端側欠失変異体は、ライセンス化活性を有さないと考えられた。

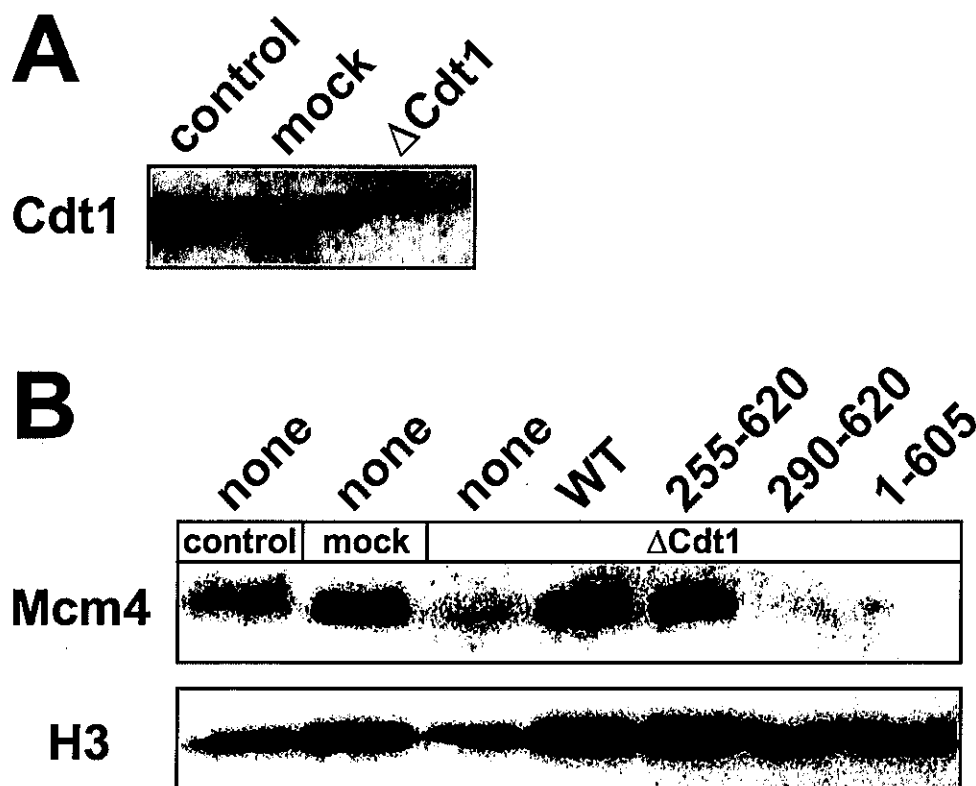


Figure 7. 欠失変異体型 Cdt1 のライセンス化活性

(A) 無処理の卵抽出液 (control)、mock 処理卵抽出液 (mock)、Cdt1 免疫除去卵抽出液 (Δ Cdt1) 各 4 \cdot l を、SDS-PAGE で分離したのち、Cdt1 を免疫ブロット法により検出した。(B) Δ Cdt1 に 50 nM の野生型 Cdt1 (WT) または Cdt1 255-620、Cdt1 290-620、Cdt1 1-605 を添加し、23°C で 30 分間反応させた。反応終了後、クロマチン画分を単離して SDS-PAGE で分離したのち、免疫ブロット法を用いて Mcm4 を検出した。Histone H3 (H3) は、loading control として検出した。

3-2-2. DNA 複製に対する欠失変異体型 Cdt1 の影響

各種欠失変異体型 Cdt1 を *Xenopus* 卵抽出液に添加し、DNA 複製に対する影響を観察した。精製した欠失変異体型 Cdt1 のライセンス化活性は一様ではないため、卵抽出液に精子核 DNA を加え、20 分間反応させてライセンス化反応が完了した後に各種欠失変異体を添加した。欠失変異体型 Cdt1 の添加後、さらに 70 分間反応させ、DNA 合成量の測定および新生 DNA 鎖の泳動像の観察をおこなった。

N 末端側欠失変異体である Cdt1 135-620、Cdt1 199-620、Cdt1 240-620、Cdt1 255-620 を添加した場合には、野生型 Cdt1 を添加した場合と同様に DNA 合成量の著しい減少がみられた (Fig. 8A 上図)。また、この時の新生 DNA 鎖の長さについてアルカリアガロース電気泳動により検討したところ、野生型 Cdt1 を添加したときと同様の短鎖 DNA が観察された (Fig. 8B 上図)。これに対して、Cdt1 290-620、もしくはそれ以上の N 末側領域を欠失させた Cdt1 欠失変異体を

添加した場合には、DNA 合成量にも新生 DNA 鎖の長さにも顕著な影響は認められなかった。一方、C 末端側欠失変異体を添加した場合には、Cdt1 1-606 の添加によって DNA 合成量が顕著に減少したが、欠失領域が大きくなるに伴い、DNA 合成量の抑制作用が減弱した (Fig. 8A 下図)。さらに新生 DNA 鎖の長さをアルカリアガロース電気泳動により検討したところ、C 末端側欠失変異体を添加した場合には、いずれにおいても野生型 Cdt1 添加時にみられるような短鎖 DNA は観察されず、長鎖側から短鎖側まで広がったスメア状のバンドが検出された (Fig. 8B 下図)。また、そのスメア状のバンドは、C 末端側の欠失領域が大きくなるに伴い、長鎖側に収束する傾向がみられた。

これらの結果から、Cdt1 による DNA 複製の抑制と新生短鎖 DNA の蓄積には、N 末端側 254 アミノ酸は寄与しないことが示唆された。一方、C 末端側領域の DNA 複製への影響については、機能領域の明確な境界は見出せなかったが、新生短鎖 DNA の蓄積には、C 末端側 15 アミノ酸が必須であることが示唆された。

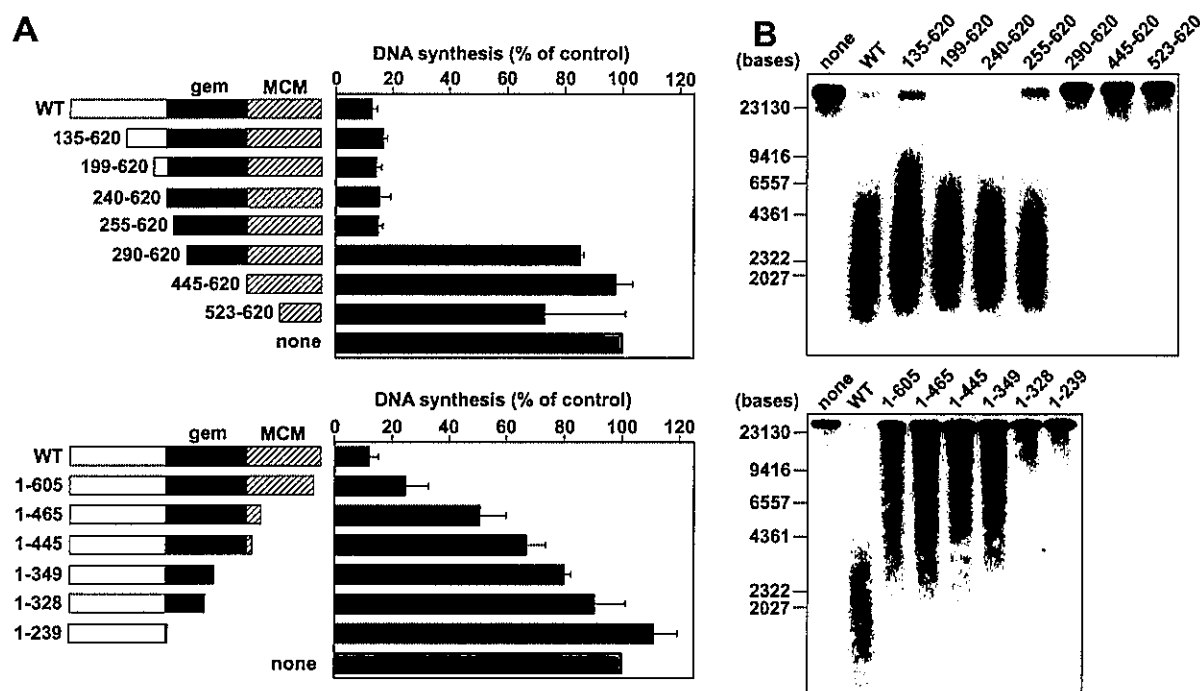


Figure 8. 欠失変異体 Cdt1 添加時における DNA 複製の解析

(A and B) 野生型 Cdt1 (WT) および各種欠失変異体 Cdt1 において、保存されている geminin 結合領域 (gem) および MCM 複合体結合領域 (MCM) を各グラフの左側に図示した。精子核 DNA を卵抽出液に添加して 20 分間反応させた後、各種欠失変異体を添加してさらに 70 分間反応させた。反応終了後、各試料の DNA 合成量の測定 (A) およびアルカリアガロースゲル電気泳動による新生 DNA 鎖の分離と検出 (B) をおこなった。A のグラフの横軸は、Cdt1 を添加していない卵抽出液での DNA 合成量 (none) を 100%とした時の各試料における DNA 合成量 (%) の平均値 ± 標準誤差 (n=3) を示した。

3-2-3. Mcm2-7 複合体および RPA のクロマチン結合に対する欠失変異体 Cdt1 の影響

第二章において、Cdt1 の添加によって DNA 複製が抑制された *Xenopus* 卵抽出液では、反応開始から 120 分経過した後でも MCM 複合体がクロマチン上に結合していること、また、aphidicolin により DNA 複製が抑制された場合とは異なり、クロマチン上に RPA が蓄積しないことが示された (Fig. 5B and D)。そこで、作製した各種欠失変異体型 Cdt1 が、MCM 複合体および RPA のクロマチン結合に対して、野生型 Cdt1 と同様の作用を示すのかについて検討した。

各種欠失変異体型 Cdt1 を反応開始後 20 分の卵抽出液に添加し、さらに 100 分間反応を継続したのちに、クロマチン画分における Mcm4 および Rpa70 を免疫ブロット法により検出した。その結果、DNA 複製の抑制および新生短鎖 DNA の蓄積を誘導することが認められた N 末端側欠失変異体、Cdt1 135-620、Cdt1 199-620、Cdt1 240-620、Cdt1 255-620 を添加した場合には、野生型 Cdt1 を添加した場合と同様に、顕著な Mcm4 のクロマチン結合が観察された (Fig. 9 上図)。また、すべての C 末端側欠失変異体を添加した場合でも、クロマチンへの Mcm4 の結合が観察された (Fig. 9 下図)。一方 Rpa70 は、いずれの欠失変異体型 Cdt1 を添加した場合においても、クロマチンへの明らかな結合は観察されなかった (Fig. 9)。これらのことから、欠失変異体型 Cdt1 の添加により DNA 複製が抑制されるときにも、野生型 Cdt1 を添加した場合と同様に、MCM 複合体がクロマチンに結合し、RPA はクロマチン上へ蓄積しないことが示唆された。

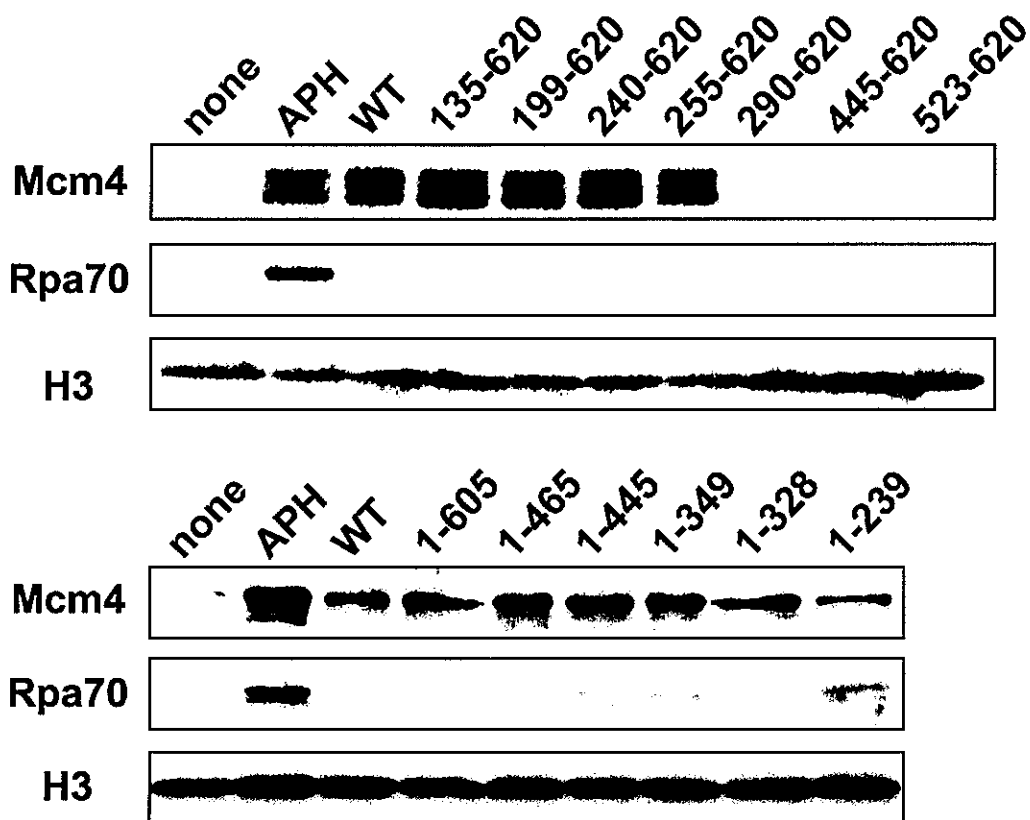


Figure 9. 欠失変異体型 Cdt1 添加時における Mcm4 および Rpa70 のクロマチン結合の解析
 反応開始後 20 分の卵抽出液に buffer (none)、aphidicolin (APH)、野生型 Cdt1 (WT)、および
 各種欠失変異体型 Cdt1 を添加し、さらに 100 分間反応を継続した。得られた反応液よりクロマ
 チンを単離し、クロマチン画分中の Mcm4 および Rpa70 を免疫ブロット法により検出した。
 Histone H3 (H3) は loading control として検出した。

3-2-4. 欠失変異体型 Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対するチェックポイント機構の影響

Xenopus 卵抽出液において、Cdt1 は、チェックポイント機構の活性化に関係なく、新生鎖伸長
 反応を抑制することが報告されている²⁹⁾。そこで、欠失変異体型 Cdt1 による DNA 複製の抑制
 が、野生型 Cdt1 の抑制作用と同様、チェックポイント機構に関係なく作用するのかを調べるた
 め、精子核 DNA の添加により DNA 複製を開始させた卵抽出液に、チェックポイント機構の活性化
 を抑制する caffeine を加え、Cdt1 255-620 または Cdt1 1-605 の DNA 複製抑制作用に対する影
 響を検討した。

Cdt1 1-605 を添加した卵抽出液において、caffeine は DNA 合成量を著しく増加させたが、野
 生型 Cdt1 または Cdt1 255-620 を添加した場合では、DNA 合成量の増加はわずかであった (Fig.
 10A)。新生 DNA 鎖をアルカリアガロース電気泳動により観察したところ、いずれの場合にも
 caffeine 添加により新生鎖の合成が増加していたが、短鎖 DNA を蓄積させる野生型 Cdt1 およ

び Cdt1 255-620 添加時には、caffeine 添加により同様の短鎖 DNA の合成が増加しており、また、長鎖 DNA を含むスメア状の新生 DNA 鎖を検出する Cdt1 1-605 添加時にも、同様の泳動パターンのまま合成量が増加することが明らかとなった (Fig. 10B)。

これらのことから、野生型 Cdt1、Cdt1 255-620、Cdt1 1-605 のいずれを卵抽出液に添加した場合にも、チェックポイント機構の活性化により、過剰な DNA 複製の開始が抑制されていると考えられた。しかし、このチェックポイント機構の活性化に関係なく、野生型あるいは欠失変異体型 Cdt1 の添加により新生鎖伸長反応が抑制されていることが示唆された。

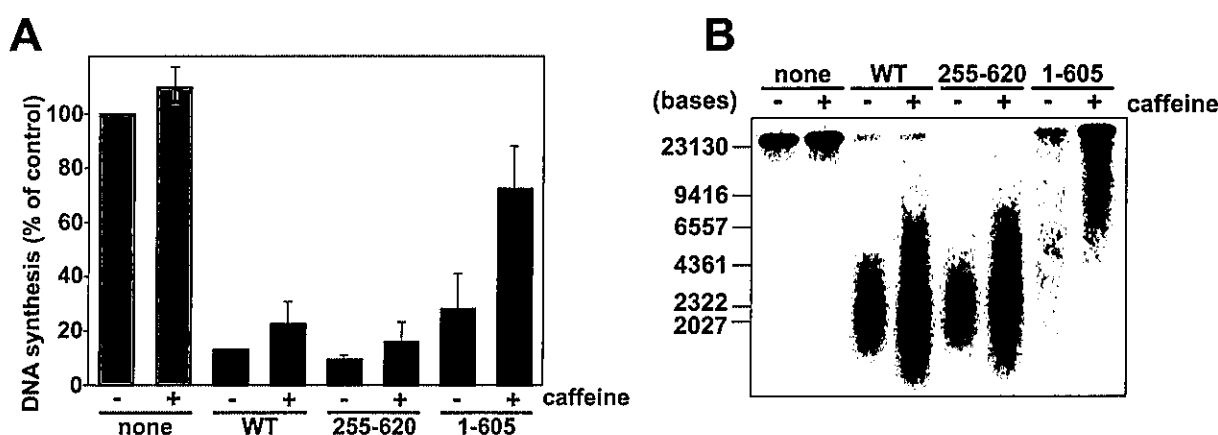


Figure 10. 野生型および欠失変異体型 Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対する caffeine の影響 (A and B) 卵抽出液に精子核 DNA を加え、20 分間反応させた後、5 mM caffeine および野生型 Cdt1 (WT)、Cdt1 255-620、Cdt1 1-605 のいずれかを 400 nM の濃度で添加し、さらに 70 分間反応させた。反応終了後、各試料の DNA 合成量の測定 (A) およびアルカリアガロース電気泳動による新生 DNA 鎖の観察 (B) をおこなった。A のグラフの縦軸は、Cdt1 および caffeine を添加していない卵抽出液 (none/-) の DNA 合成量を 100% としたときの各試料における DNA 合成量 (%) の平均値 ± 標準誤差 (n=3) を示した。

3-2-5. 欠失変異体型 Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対する過剰な DNA 複製の影響

Cdt1 255-620 および Cdt1 1-605 による DNA 複製の抑制が、野生型 Cdt1 による DNA 複製の抑制と同様に、過剰な DNA 複製に非依存的に生じるかを、1-2-3 (Fig. 4A) でおこなった実験方法と同様に aphidicolin クロマチンを用い、p27 により過剰な DNA 複製開始を抑制することにより検討した。

その結果、Cdt1 255-620 を添加した *Xenopus* 卵抽出液では、野生型 Cdt1 を添加した場合と同様に、p27 の共存によりわずかに DNA 合成量が減少したものの、新生 DNA 鎖は短鎖 DNA にとどまったまま明らかな変化はみられなかった (Fig. 11A and B)。また、Cdt1 1-605 添加時にも、p27 によってわずかに DNA 合成量が減少したが、新生 DNA 鎖の泳動パターンに明らかな変化はみ

られなかった (Fig. 11A and B)。これらのことから、Cdt1 255-620 および Cdt1 1-605 による DNA 複製の抑制は、野生型 Cdt1 による DNA 複製抑制作用と同様、過剰な DNA 複製の影響を受けないことが示唆された。

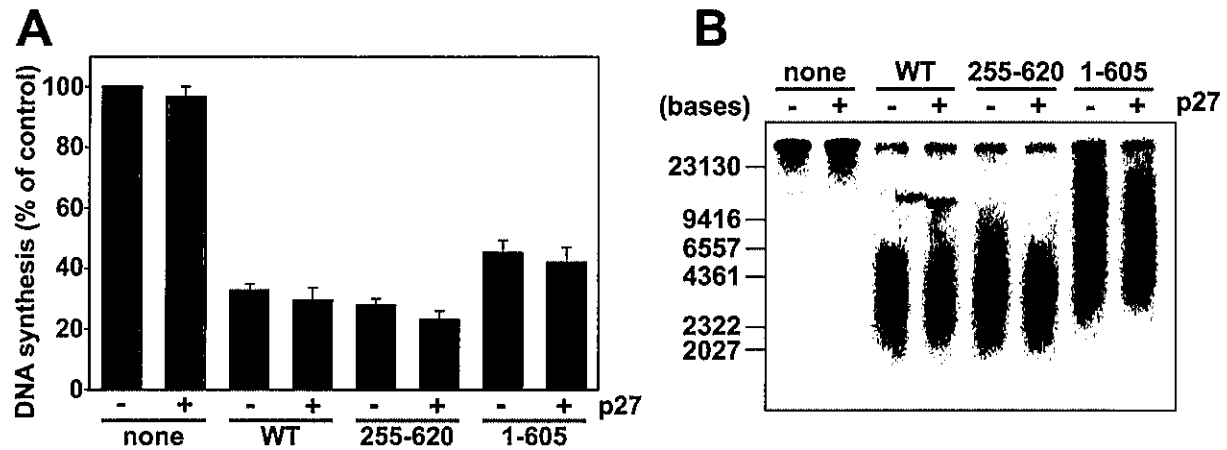


Figure 11. 欠失変異体型 Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対する過剰な DNA 複製の影響

(A and B) aphidicolin (APH) -クロマチンを 100 nM の p27 および 400 nM の野生型 Cdt1 (WT) または Cdt1 255-620、Cdt1 1-605 を添加した卵抽出液に加え、90 分間反応させた。反応終了後、DNA 合成量の測定 (A) およびアルカリアガロースによる新生 DNA 鎖の観察 (B) をおこなった。グラフの縦軸は、Cdt1 および p27 を添加していない卵抽出液 (none/-) の DNA 合成量を 100%としたときの各試料における DNA 合成量 (%) の平均値±標準誤差 (n=3) を示した。

第三節 考察

N 末端側欠失変異体の Cdt1 255-620 を添加した卵抽出液で、野生型 Cdt1 と同等の新生鎖伸長抑制作用がみられたが、Cdt1 290-620 の添加では抑制作用がみられなかったことから、N 末端側 1-254 アミノ酸領域は、Cdt1 による DNA 複製抑制作用に関与しないこと、また、255-289 アミノ酸領域に抑制作用に極めて重要な構造が存在することが推測された。また、C 末端側欠失変異体の添加時では、Cdt1 1-605 の添加により DNA 複製が抑制されたことや、今回検討したすべての C 末端側欠失変異体を添加した場合において、DNA 複製開始から 120 分後のクロマチン上に MCM 複合体の結合がみられたことから、C 末端側欠失変異体にも DNA 複製を抑制する作用があると考えられた。しかし、アルカリアガロース電気泳動による新生 DNA 鎖の泳動像が、長鎖側から短鎖に至るまでに広い範囲に分布するスメア状の泳動パターンであることや、caffeine の添加により、Cdt1 1-605 の DNA 複製抑制作用が著しく減弱したことから、C 末端側欠失変異体による DNA 複製の抑制は、主にチェックポイントの活性化によるものであり、野生型 Cdt1 や Cdt1 255-620 による新生鎖伸長抑制作用と比べ、伸長反応を抑制する作用が減弱しているものと推測された。

これまでに Cdt1 には、2 つの winged-helix motifs (2 つの翼状構造と 3 つの α -ヘリックスからなる構造)³⁶⁾ が中央部と C 末端側領域に存在し、それぞれが Cdt1 のライセンス化活性に重要な役割を果たすことが知られている^{9, 37, 38)}。中央部の winged-helix motif は、243-311 アミノ酸領域に位置しており、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に重要だと思われる 255-289 アミノ酸領域と重なっていることから、この中央部に存在する winged-helix motif が、タンパク質-DNA またはタンパク質-タンパク質間の相互作用を引き起こすことで、新生鎖伸長反応を抑制する可能性が考えられる。

第四章 Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用とライセンス化活性の関係

第三章より、Cdt1 の 255-289 アミノ酸領域に、新生鎖伸長抑制作用に重要な役割を果たす構造が存在することが推測された。Cdt1 の 255-289 アミノ酸領域は、ライセンス化活性に必須な 255-311 アミノ酸領域と重なることから、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用が、ライセンス化にかかわる生化学的活性の副次的な作用である可能性が考えられた。そこで、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用とライセンス化活性の関係を明らかとするため、ライセンス化活性を有さない点変異体型 Cdt1 を作製し、DNA 複製に対する影響を観察した。

ヒト Cdt1 の 210 番目のアルギニンをアラニン置換した変異体 (hCdt1 R210A) は、ライセンス化活性が著しく低下することが知られている³⁹⁾。ヒト Cdt1 と *Xenopus* Cdt1 の相同性を確認したところ、*Xenopus* Cdt1 の 255-289 アミノ酸領域内に位置する 285 番目のアルギニンが、ヒト Cdt1 の 210 番目アルギニンに相当すると考えられた。そこで、285 番目のアルギニンをアラニンに置換した点変異体型 Cdt1 (Cdt1 R285A) を作製し、*Xenopus* 卵抽出液における DNA 複製に対する Cdt1 R285A の影響を検討した。

第一節 実験材料・実験方法

4-1-1. Cdt1 R285A の作製

Xenopus Cdt1 の cDNA を組込んだ pGEX-6P-3 をもとに、Forward primer (GCTCTTTAACGCGTCAGAGACTATC) と Reverse primer (GATAGTCTCTGACGCGTTAAAGAGC) を用いて site directed mutagenesis をおこない、285 番目のアルギニンをコードするコドン (CGG) がアラニンをコードするコドン (GCG; 下線部に相当) に置換された点変異体型 Cdt1 (Cdt1 R285A) cDNA を含む発現プラスミドを作製した。その後、1-1-1 と同様の方法を用いて Cdt1 R285A を精製した。

4-1-2. Cdt1 R285A のライセンス化活性の測定

Cdt1 を免疫除去した卵抽出液に 50 nM の Cdt1 R285A を加え、3-1-2 と同様の方法を用いて Mcm4 のクロマチン結合を検出した。

4-1-3. Cdt1 R285A を添加した卵抽出液における DNA 複製の解析

精子核 DNA を加え、20 分間反応させた卵抽出液に、400 nM Cdt1 R285A を添加し、さらに 70 分間反応させた。反応終了後、1-1-3 または 1-1-4 と同様の方法を用いて DNA 合成量の測定、ま

たはアルカリアガロースによる新生 DNA 鎖の観察をおこなった。

4-1-4. Cdt1 R285A を添加した卵抽出液における Mcm4 および Rpa70 のクロマチン結合の解析

精子核 DNA を加え、20 分間反応させた卵抽出液に、400 nM Cdt1 R285A を添加し、さらに 100 分間反応させた。反応終了後、2-1-1 および 2-1-2 と同様の方法を用いて Mcm4 および Rpa70 を検出した。

第二節 結果

精製した Cdt1 R285A のライセンス化活性を調べるため、内在性 Cdt1 を免疫除去した卵抽出液に 50 nM の Cdt1 R285A を加え、Mcm2-7 複合体 (MCM 複合体) のクロマチンへの導入を、Mcm4 の結合を指標として検討した。その結果、Cdt1 R285A を添加した卵抽出液では、Mcm4 の明らかなクロマチン結合はみられなかった (Fig. 12A)。このことから、Cdt1 R285A はライセンス化活性を有さないか、活性が著しく損なわれていると考えられた。

Cdt1 R285A を卵抽出液に添加し、DNA 複製反応による DNA 合成量を測定した結果、野生型 Cdt1 を添加した場合と同様に、DNA 複製活性が著しく減弱していた (Fig. 12B)。また、Cdt1 R285A 共存時の DNA 複製により合成された新生 DNA 鎖をアルカリアガロース電気泳動により検討したところ、野生型 Cdt1 を添加した場合と同様に、短鎖 DNA の顕著な蓄積が観察された (Fig. 12C)。さらに、Cdt1 R285A を添加した卵抽出液を用いたときの Mcm4 および Rpa70 のクロマチン結合を検討したところ、反応開始から 120 分後においても Mcm4 のクロマチン結合が観察されること、Rpa70 のクロマチン結合の明らかな増加がみられないことが確認された (Fig. 12D)。これらのことから、Cdt1 R285A は、顕著な DNA 複製ライセンス化活性を持たないにもかかわらず、野生型 Cdt1 と同等の新生鎖伸長抑制作用を有することが示唆された。

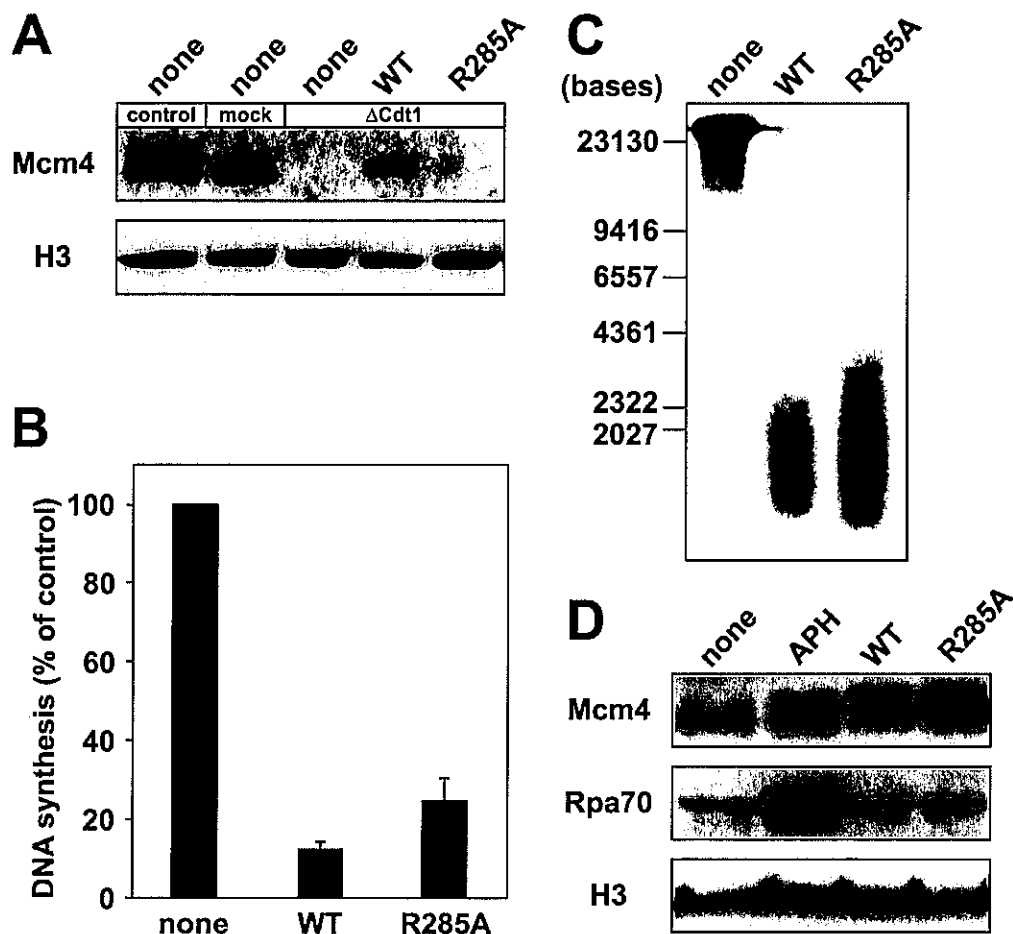


Figure 12. Cdt1 R285A を添加した *Xenopus* 卵抽出液における DNA 複製の解析

(A) 内在性 Cdt1 を免疫除去した卵抽出液に 50 nM の野生型 Cdt1 (WT) または Cdt1 R285A を添加し、精子核 DNA を加えて 30 分間反応させた。反応終了後、卵抽出液からクロマチンを単離し、Mcm4 のクロマチン結合を検出した。(B and C) 精子核 DNA を加え、20 分間反応させた卵抽出液に、400 nM Cdt1 R285A を添加し、さらに 70 分間反応させたのち、DNA 合成量の測定 (B) およびアルカリアガロースゲル電気泳動による新生 DNA 鎖の観察 (C) をおこなった。B のグラフの縦軸は、Cdt1 を添加していない卵抽出液 (none) の DNA 合成量を 100% とした時の各試料における DNA 合成量 (%) の平均値 ± 標準誤差 (n=3) を示した。(D) DNA 複製反応開始から 20 分後の卵抽出液に 400 nM Cdt1 R285A を添加し、さらに 100 分間反応させた。反応後、卵抽出液よりクロマチンを単離し、クロマチン画分中の Mcm4 および Rpa70 を免疫プロット法により検出した。Histone H3 (H3) は、loading control として検出した。

第三節 考察

Cdt1 R285A は、ヒト Cdt1 R210A と同様に、ライセンス化活性が著しく低下した変異体であることが示された。一方で、Cdt1 R285A を *Xenopus* 卵抽出液に添加すると、DNA 合成量が顕著に減

少し、新生 DNA 鎖の大部分が短いままであったことから、Cdt1 R285A は、野生型 Cdt1 と同様に、新生鎖伸長反応を抑制する変異体であることが示唆された。さらに、Cdt1 R285A の添加によって DNA 複製が抑制された卵抽出液では、野生型 Cdt1 を添加した場合と同様に、クロマチン上に MCM 複合体の結合がみられることと、RPA が蓄積しないことが確認された。したがって、Cdt1 R285A は野生型 Cdt1 と同様に、複製フォークの進行を抑制しているものと推測された。これらのことから、Cdt1 R285A では、ライセンス化活性が著しく損なわれているにもかかわらず、野生型 Cdt1 と同等の新生鎖伸長抑制作用を有することが示唆された。

これまでに、Cdt1 による新生鎖伸長抑制作用は、Cdt1 と結合するがライセンス化活性を抑制しない変異体型マウス geminin (mGem 79-130) の添加によって解除されることが報告されている²⁹⁾。これに加えて、本研究でライセンス化活性が著しく減弱していながら野生型と同等の新生鎖伸長抑制作用を有する Cdt1 変異体を見出したことにより、MCM 複合体をクロマチンに導入させるために必要な Cdt1 の機能の少なくとも一部は、新生鎖伸長反応の抑制に必須ではないことが示唆された。また、マウス geminin の 79-130 アミノ酸領域を用いた実験から、新生鎖伸長反応の抑制に必須な機能の少なくとも一部はライセンス化活性に必要ではないことが示唆されている。これらのことから、Cdt1 は、ライセンス化活性とは異なる生理活性として、新生鎖伸長抑制作用を保持するものと推測された。

総括

これまでに *Xenopus* 卵抽出液において、過剰なグルタチオン-S 転移酵素 (GST) 融合組換え Cdt1 (GST-Cdt1) が、DNA 複製における新生鎖伸長反応を抑制することが見出されている。しかし、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用の詳細なメカニズムについては明らかではなかった。そこで本研究では、精製した野生型 Cdt1 および欠失変異体型 Cdt1 を卵抽出液に添加し、様々な条件下で DNA 複製に対する影響を検討することで、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用のメカニズムの解明を試みた。

第一章では、組換え Cdt1 の形態を内在性 Cdt1 により近づけるため、GST-Cdt1 から GST-tag を切除した Cdt1 を作製し、DNA 複製に対する影響を観察した。その結果、過剰な Cdt1 を添加した卵抽出液では、反応時間の増加に伴い、短鎖 DNA が蓄積していくこと、また、DNA 複製開始反応に必須な CDK 活性を阻害する p27 の添加により、この短鎖 DNA が著しく減少することが明らかとなった。一方、aphidicolin (APH) -クロマチンおよび p27 を用いた DNA 複製の解析により、過剰な DNA 複製が抑制された状態においても、Cdt1 は新生鎖伸長反応を抑制した。この結果より、Cdt1 を添加した卵抽出液では Cdt1 のライセンス化活性による過剰な DNA 複製が誘発されるが、この過剰な DNA 複製に関係なく、Cdt1 は新生鎖伸長反応を抑制すると考えられた。すなわち、Cdt1 を添加した卵抽出液では、新生鎖伸長反応が抑制された状態で過剰な DNA 複製開始が繰り返されることにより、新生 DNA 鎖が短いまま蓄積すると推察される。

第二章では、Mcm2-7 複合体 (MCM 複合体) および RPA の動態 (クロマチンへの結合) に対する Cdt1 の影響を解析した。卵抽出液における MCM 複合体および RPA のクロマチン結合を観察したところ、MCM 複合体は DNA 複製反応開始から 20 分後にクロマチンに結合し、120 分後にはクロマチンから解離することが確認された。一方、RPA は DNA 複製開始から 120 分後まで、明らかなクロマチン結合が確認されなかった。これに対し、aphidicolin により DNA 複製が抑制された場合には、反応開始から 120 分後においても MCM 複合体はクロマチン上に結合していることが確認され、さらに RPA はクロマチン上に蓄積した。一方で、Cdt1 により DNA 複製を抑制した場合には、反応開始から 120 分後に、MCM 複合体のクロマチン結合がみられたが、aphidicolin を添加した場合のような RPA の顕著なクロマチン結合は認められなかった。これらのことから、Cdt1 により新生鎖伸長反応が抑制されている場合には、DNA 合成が直接的に抑制されているのではなく、複製フォークの進行が抑制されることで新生鎖伸長反応が滞っていることが推測された。

第三章では、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に関与する機能領域を同定するため、数種の欠失変異体型 Cdt1 を作製し、DNA 複製に対する影響について検討した。N 末端側 1-254 アミノ酸領域を欠失した Cdt1 は、野生型 Cdt1 と同等の新生鎖伸長抑制作用を示したのに対し、1-289 アミノ酸領域を欠失した Cdt1 は新生鎖伸長抑制作用を示さなかった。このことから、N 末端側 1-254 アミノ酸領域は Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に必須ではないこと、また、255-289 アミノ酸領域に新生鎖伸長抑制作用に重要な構造が存在することが考えられた。一方で C 末端側欠失変異体に

も、DNA 複製の抑制がみられたが、新生 DNA 鎖の泳動像が長鎖側から短鎖側の幅広い範囲にわたるスメア状であったこと、C 末端側 15 アミノ酸を欠失した Cdt1 1-605 による DNA 複製抑制作用が、チェックポイント機構を阻害する caffeine の添加により著しく減弱することから、野生型 Cdt1 の DNA 複製抑制作用とは必ずしも同等のものではないと考えられた。おそらく、C 末端側欠失変異体による DNA 複製抑制作用は、主にチェックポイント機構の活性化による作用であり、野生型 Cdt1 と比べ、新生鎖伸長抑制作用が顕著に減弱しているものと推測された。

第四章では、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用とライセンス化活性の関係を調べるため、ライセンス化活性を有さないか、有していたとしても著しく損なわれていると考えられる点変異体 Cdt1 (Cdt1 R285A) を作製し、この変異体の DNA 複製に対する影響を解析した。Cdt1 R285A を卵抽出液に添加したところ、野生型 Cdt1 を添加したときと同様に、DNA 合成量が著しく減少し、新生短鎖 DNA の蓄積が認められた。また、MCM 複合体および RPA のクロマチン結合も野生型 Cdt1 添加時と同様の結果になった。これらのことから、Cdt1 R285A は野生型 Cdt1 と同等の新生鎖伸長抑制作用を持つことが示唆された。

本論文において、Cdt1 がチェックポイント機構の活性化や過剰な DNA 複製の影響を受けずに、複製フォークの進行を抑制すること、そして、この抑制作用に重要な役割を果たす構造が、255-289 アミノ酸領域に存在することが示唆された。また、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に Cdt1 自身のライセンス化活性に必須な機能の少なくとも一部が、新生鎖伸長反応の抑制には必要とされないことが示唆された。これらのことから、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用は、ライセンス活性の副次的な作用ではないと推測された。

DNA 複製のストレスは、ゲノム情報の不安定化を引き起こす原因となっており、がんの進行と深く関わっている⁴⁰⁻⁴²⁾。特に DNA の再複製は、異常な複製フォークを形成させ、DNA に重大な損傷を与える^{28, 43)}。おそらく過剰な Cdt1 は、過剰な DNA 複製を誘発することで DNA 複製にストレスを与え、ゲノム情報を不安定化させていると推測される。一方、本論文において、Cdt1 はこれまでに知れていた主な機能である、ライセンス化活性とは別に、複製フォークの進行を抑制し、DNA 複製を抑制する活性を持つことを見出した。本論文による知見は、Cdt1 がゲノム情報の安定性維持に極めて重要なタンパク質であることを強く示唆し、そして、過剰な Cdt1 による細胞のがん化のメカニズムに新たな可能性を提示した。

この Cdt1 による新生鎖伸長反応の抑制が、さらに DNA 複製ストレスを高める原因となり、細胞のがん化を促進させる可能性が考えられる。一方で、過剰な DNA 複製を抑制することで細胞死を誘発し、異常な細胞増殖を抑制するという可能性も考えられる。ここで見いだされた Cdt1 の生化学的作用が、Cdt1 の過剰発現を特徴とする多くの形質転換細胞におけるがん化の進展や、アポトーシスなどに対しどのような影響を与えているのか、今後の研究の展開が期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました帝京平成大学薬学部分子細胞制御研究ユニット 高橋 美樹子教授に心よりお礼申し上げます。また本研究の遂行をはじめとして、多岐にわたりご指導、ご助力を頂きました東邦大学薬学部分子生物学教室の多田 周右教授、東 祐太郎准教授および津山 崇助教に深く感謝致します。

参考文献

1. Fujita M. Cdt1 revisited: complex and tight regulation during the cell cycle and consequences of deregulation in mammalian cells. *Cell Div.* 2006;1:22.
2. Sclafani RA, Holzen TM. Cell cycle regulation of DNA replication. *Annual review of genetics.* 2007;41:237-80.
3. Masai H, Matsumoto S, You Z, Yoshizawa-Sugata N, Oda M. Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu Rev Biochem.* 2010;79:89-130.
4. Yanagi K, Mizuno T, You Z, Hanaoka F. Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity. *J Biol Chem.* 2002;277:40871-80.
5. Cook JG, Chasse DA, Nevins JR. The regulated association of Cdt1 with minichromosome maintenance proteins and Cdc6 in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2004;279:9625-33.
6. McGarry, Kirschner. Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell.* 1998;93:1043-53.
7. Tada S, Li A, Maiorano D, Méchali M, Blow J. J. Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin. *Nat Cell Biol.* 2001;3:107-113.
8. Wohlschlegel JA, Dwyer BT, Dhar SK, Cvetic C, Walter JC, Dutta A. Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science.* 2000;290:2309-2312.
9. Lee C, Hong B, Choi J, Kim Y, Watanabe S, Ishimi Y, Enomoto T, Tada S, Kim Y, Cho Y. Structural basis for inhibition of the replication licensing factor Cdt1 by geminin. *Nature.* 2004;430:913-917.
10. Arias EE, Walter JC. Replication-dependent destruction of Cdt1 limits DNA replication to a single round per cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Gene Dev.*

2005;19:114-126.

11. Arias EE, Walter JC. PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication. *Nat Cell Biol.* 2006;8:84-90.

12. Nishitani H, Sugimoto N, Roukos V, Nakanishi Y, Saijo M, Obuse C, Tsurimoto T, Nakayama KI, Nakayama K, Fujita M, et al. Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis. *EMBO J.* 2006;25:1126-36.

13. Kim Y, Kipreos ET. Cdt1 degradation to prevent DNA re-replication: conserved and non-conserved pathways. *Cell Div.* 2007;2:18.

14. Li A, Blow JJ. Cdt1 downregulation by proteolysis and geminin inhibition prevents DNA re-replication in *Xenopus*. *EMBO J.* 2005;24:395-404.

15. Blow JJ, Dutta A. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 2005;6:476-486.

16. Arias EE, Walter JC. Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev.* 2007;21:497-518.

17. Melixetian M, Ballabeni A, Masiero L, Gasparini P, Zamponi R, Bartek J, Lukas J, Helin K. Loss of Geminin induces rereplication in the presence of functional p53. *J Cell Biol.* 2004;165:473-82.

18. Davidson IF, Li A, Blow JJ. Deregulated replication licensing causes DNA fragmentation consistent with head-to-tail fork collision. *Mol Cell.* 2006;24:433-43.

19. Liu E, Lee AY, Chiba T, Olson E, Sun P, Wu X. The ATR-mediated S phase checkpoint prevents rereplication in mammalian cells when licensing control is disrupted. *J Cell Biol.* 2007;179:643-57.

20. Vaziri C, Saxena S, Jeon Y, Lee C, Murata K, Machida Y, Wagle N, Hwang DS, Dutta A. A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication. *Mol Cell.* 2003;11:997-1008.

21. Truong LN, Li Y, Sun E, Ang K, Hwang PY, Wu X. Homologous recombination is a primary pathway to repair DNA double-strand breaks generated during DNA rereplication. *J Biol Chem.* 2014;289:28910-23.
22. Green BM, Finn KJ, Li JJ. Loss of DNA replication control is a potent inducer of gene amplification. *Science.* 2010;329:943-6.
23. Black JC, Manning AL, Van Rechem C, Kim J, Ladd B, Cho J, Pineda CM, Murphy N, Daniels DL, Montagna C, et al. KDM4A lysine demethylase induces site-specific copy gain and rereplication of regions amplified in tumors. *Cell.* 2013;154:541-55.
24. Hills SA, Diffley JF. DNA replication and oncogene-induced replicative stress. *Curr Biol.* 2014;24:R435-44.
25. Xouri G, Lygerou Z, Nishitani H, Pachnis V, Nurse P, Taraviras S. Cdt1 and geminin are down-regulated upon cell cycle exit and are over-expressed in cancer-derived cell lines. *Eur J Biochem.* 2004;271:3368-3378.
26. Karakaidos P, Taraviras S, Vassiliou LV, Zacharatos P, Kastrinakis NG, Kougiou D, Kouloukoussa M, Nishitani H, Papavassiliou AG, Lygerou Z, et al. Overexpression of the replication licensing regulators hCdt1 and hCdc6 characterizes a subset of non-small-cell lung carcinomas: synergistic effect with mutant p53 on tumor growth and chromosomal instability--evidence of E2F-1 transcriptional control over hCdt1. *Am J Pathol.* 2004;165:1351-65.
27. Liontos M, Koutsami M, Sideridou M, Evangelou K, Kletsas D, Levy B, Kotsinas A, Nahum O, Zoumpourlis V, Kouloukoussa M, et al. Deregulated Overexpression of hCdt1 and hCdc6 Promotes Malignant Behavior. *Cancer Res.* 2007;67:10899-10909.
28. Arentson E, Faloon P, Seo J, Moon E, Studts JM, Fremont DH, Choi K. Oncogenic potential of the DNA replication licensing protein CDT1. *Oncogene.* 2002;21:1150-8.
29. Tsuyama T, Watanabe S, Aoki A, Cho Y, Seki M, Enomoto T, Tada S. Repression of nascent strand elongation by deregulated Cdt1 during DNA replication in *Xenopus* egg

extracts. *Mol Biol Cell*. 2009;20:937-47.

30. Nakazaki Y, Tsuyama T, Seki M, Takahashi M, Enomoto T, Tada S. Excess Cdt1 inhibits nascent strand elongation by repressing the progression of replication forks in *Xenopus* egg extracts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;470:405-10.

31. Chong JP, Thömmes P, Rowles A, Mahbubani HM, Blow JJ. Characterization of the *Xenopus* replication licensing system. *Meth Enzymol*. 1997;283:549-64.

32. Byun TS, Pacek M, Yee MC, Walter JC, Cimprich KA. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev*. 2005;19:1040-52.

33. Pacek M, Tutter A, Kubota Y, Takisawa H, Walter J. Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the Site of DNA Unwinding during Eukaryotic DNA Replication. *Mol Cell*. 2006;21:581-587.

34. Masuda T, Mimura S, Takisawa H. CDK- and Cdc45-dependent priming of the MCM complex on chromatin during S-phase in *Xenopus* egg extracts: possible activation of MCM helicase by association with Cdc45. *Genes Cells*. 2003;8:145-61.

35. Ferenbach A, Li A, Brito-Martins M, Blow JJ. Functional domains of the *Xenopus* replication licensing factor Cdt1. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:316-324.

36. Gajiwala KS, Burley SK. Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 2000;10:110-6.

37. Jee J, Mizuno T, Kamada K, Tochio H, Chiba Y, Yanagi K, Yasuda G, Hiroaki H, Hanaoka F, Shirakawa M. Structure and Mutagenesis Studies of the C-terminal Region of Licensing Factor Cdt1 Enable the Identification of Key Residues for Binding to Replicative Helicase Mcm Proteins. *J Biol Chem*. 2010;285:15931-15940.

38. Khayrutdinov B, Bae W, Yun Y, Lee J, Tsuyama T, Kim J, Hwang E, Ryu K, Cheong H, Cheong C, et al. Structure of the Cdt1 C-terminal domain: Conservation of the winged helix fold in replication licensing factors. *Protein Sci*. 2009;18:2252-2264.

39. Marco V De, Gillespie PJ, Li A, Karantzelis N, Christodoulou E, Klompaker R, Gerwen S van, Fish A, Petoukhov MV, Iliou MS, et al. Quaternary structure of the human Cdt1-Geminin complex regulates DNA replication licensing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:19807-12.
40. Bartkova J, Rezaei N, Lontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou L-VFV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 2006;444:633-7.
41. Micco R Di, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre' M, Nuciforo PG, Bensimon A, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. 2006;444:638-42.
42. Burrell RA, McClelland SE, Endesfelder D, Groth P, Weller MC, Shaikh N, Domingo E, Kanu N, Dewhurst SM, Gronroos E, et al. Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature*. 2013;494:492-6.
43. Gaillard H, García-Muse T, Aguilera A. Replication stress and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15:276-89.

関連論文目録

本論文は、次の 1. の原著論文の内容をもとに作成されている。

1. Nakazaki Y, Tsuyama T, Seki M, Takahashi M, Enomoto T, Tada S. Excess Cdt1 inhibits nascent strand elongation by repressing the progression of replication forks in *Xenopus* egg extracts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;470:405-10.

業績論文目録

1. Nakazaki Y, Tsuyama T, Seki M, Takahashi M, Enomoto T, Tada S. Excess Cdt1 inhibits nascent strand elongation by repressing the progression of replication forks in *Xenopus* egg extracts. Biochem Biophys Res Commun. 2016;470:405-10.