

# 帝京平成大学 大学院

## 学位論文の要旨

氏 名 中崎 祐太

博士論文題目

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

### 要 旨

高等真核生物の DNA は、一度の細胞周期において、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 および Cdt1 がクロマチン上に動員される。これらのタンパク質が介在することで、DNA 複製において DNA ヘリカーゼとしてはたらく Mcm 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。この反応は DNA 複製ライセンス化反応と呼ばれ、DNA 複製の開始に不可欠な反応である。Cdt1 は、MCM 複合体を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。

pre-RC が形成された後、Cdt1 は、DNA 複製抑制タンパク質 geminin による阻害やユビキチン化を介した分解を受ける。これらの制御機構により Cdt1 の活性が厳密にコントロールされることで、ゲノム上の特定の領域における DNA 複製が単一の細胞周期のなかで繰り返される現象 (再複製) が抑制されている。

DNA の再複製はゲノム情報不安定化の要因となることから、がんの進行、悪性化に深く関わると考えられている。実際に、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、Cdt1 および Cdc6 ががんの進行を促進することを示唆する結果が報告されている。

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が、その一方で、*Xenopus* 卵抽出液への過剰な Cdt1 の添加により、DNA 複製における新生鎖伸長反応が抑制されることが見出されている。また、この抑制作用は、Cdt1 と結合でき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。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、*Xenopus* 卵抽出液無細胞実験系を用いて Cdt1 による DNA 複製抑制の機序をより詳細に解析するとともに、ここにかかわる Cdt1 の機能領域の同定を試みた。

Cdt1 を添加した卵抽出液では、時間経過に伴い長さの短い新生 DNA 鎖（新生短鎖 DNA）が蓄積すること、また、この蓄積は p27（DNA 複製開始反応に必要な CDK 活性を阻害するタンパク質）存在下で著しく減少することを示す結果を得た。このことから、Cdt1 を添加した卵抽出液では、Cdt1 によって過剰な DNA 複製が誘発されていると考えられた。そこで、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対する過剰な DNA 複製の影響を明らかにするため、複製フォーク形成後に伸長反応を停止させたクロマチンを単離し、Cdt1 および p27 を添加した卵抽出液に加えて DNA 複製を再開させた。これにより、過剰な DNA 複製を抑制した状態を作り出し、この条件下における Cdt1 の抑制作用を検討した。その結果、このような実験条件下でも、Cdt1 の添加により DNA 合成量が減少し、新生短鎖 DNA が蓄積した。

次に、Cdt1 添加時における MCM 複合体および一本鎖 DNA 結合タンパク質複合体（replication protein A; RPA）のクロマチン結合について検討をおこなった。MCM 複合体はライセンス化反応に伴ってクロマチンに結合し、DNA 複製の終結に伴いクロマチンから解離する。また、RPA は、DNA ヘリカーゼによる DNA 二本鎖の解離から DNA ポリメラーゼによる新生鎖合成までの間に露出する一本鎖に結合する。このため、複製フォークの進行が止まることなく DNA 合成のみが阻害されると、RPA は過剰にクロマチン上に蓄積する。Cdt1 により DNA 複製が抑制された際の、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 複合体はクロマチンに結合していたが、RPA の顕著な結合の増加はみられなかった。これらのことから、Cdt1 により DNA 複製が抑制されるときには DNA 合成反応ではなく複製フォークの進行が抑制されており、このため一本鎖 DNA の露出は増加していないと推測された。

続いて、新生鎖伸長抑制作用に関わる Cdt1 の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、それらを卵抽出液に添加して DNA 複製への影響を観察した。その結果、N 末端側 254 アミノ酸を欠失させた変異体で、野生型 Cdt1 と同様の抑制作用が観察されたが、N 末端側 289 アミノ酸を欠失させた変異体では抑制作用はみられなかった。一方、C 末端側 606 アミノ酸以降の領域を欠失させた変異体では、DNA 合成量の減少がみられたが、野生型 Cdt1 を添加した際にみられるような新生短鎖 DNA の蓄積は観察されなかった。

上の結果より、Cdt1 による新生鎖伸長抑制作用に重要な構造が Cdt1 の 255-289 アミノ酸領域に存在することが示唆された。この領域に存在するアルギニン残基をアラニンに置換した点変異体は、ライセンス化活性を失うことが報告されている。そこで、Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用に対するライセンス化活性の影響を明らかにするため、上記の点変異型 Cdt1 を作製し、これを卵抽出液に添加した際の、DNA 複製に対する影響を検討した。その結果、野生型 Cdt1 と同等の新生鎖伸長抑制作用を示すことが見出された。

以上の結果から、Cdt1 による DNA 複製の抑制が DNA 再複製に起因しないこと、この作用が複製フォークの進行の抑制によるものであること、この抑制作用に重要な役割を果たす構造が Cdt1 の 255-289 アミノ酸領域に存在することが示唆された。また、この抑制作用には、Cdt1 自身のライセンス化活性は必須ではないこと、すなわち、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有すると推測された。本研究は、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加えるものであり、この成果を端緒として腫瘍の悪性化の過程などでゲノム安定性に影響を及ぼす要因の一端が明確に提示されるようになるものと期待する。