

帝京平成大学大学院
論文審査結果の要旨

氏 名	中崎 祐太		
論文名	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		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	辻本 雅文
	副 査	教授	石田 功
	副 査	教授	西村 千秋
要 旨			
<p>中崎祐太氏の学位論文、「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」の審査結果の概要を以下に記載する。</p> <p>Cdt1 は、DNA 複製の開始に必須な Mcm2-7 複合体を、DNA 複製開始点に導入する働き（ライセンス化活性）を持つタンパク質である。この Cdt1 の機能は DNA 合成期（S 期）にはタンパク質分解や阻害タンパク質の発現亢進により抑制されるため、Mcm2-7 複合体のクロマチンへの導入は、細胞分裂期後期から S 期開始前までに限定される。これにより、1 回の細胞周期で DNA 複製が 1 回だけ開始するよう制御されている。一方、がん細胞のように DNA 複製の制御に破綻をきたした細胞では、Cdt1 や Mcm2-7 複合体などの発現が著しく亢進している例が報告されている。そこで、中崎氏の研究の先行研究として、Cdt1 が大量に存在する場合に DNA 複製がどのような影響を受けるかについて生化学的検討がおこなわれ、DNA 複製開始が繰り返されるにもかかわらず、DNA 合成量は著しく低下することが観察された。この結果を受け、Cdt1 により DNA 合成が抑制される機序を解明することを目的として、中崎氏の研究が実施された。</p> <p>先行研究では GST 融合型組換え Cdt1 タンパク質が用いられていたため、中崎氏はまず、GST を除去した Cdt1 を効率的に取得する条件を構築し、アフリカツメガエル（<i>Xenopus</i>）卵抽出液無細胞 DNA 複製系に精製 Cdt1 を添加して解析をおこなった。その結果、上記の DNA 合成量低下が GST の影響ではなく、過剰な Cdt1 が DNA 複製の新生鎖伸長反応を抑制したためであることを明らかにした。さらに、過剰な Cdt1 による DNA の再複製開始を p27 により抑制した条件下においても、新生短鎖 DNA の蓄積が観察されたことから、新生鎖伸長反応の抑制は再複製開始には依存しないことが示唆された。</p> <p>次に、DNA 複製開始 Mcm2-7 複合体と一本鎖 DNA 結合タンパク質複合体（RPA）のクロマチン結合の解析から、過剰な Cdt1 存在下では DNA 複製反応が途中で停止するものの、顕著な一本鎖 DNA の露出が起きていないことを示す結果を得た。すなわち Cdt1 は、DNA 合成に先んじて DNA 二本鎖を一本鎖に巻き戻す反応（複製フォークの進行）の段階を阻害するために新生鎖伸長が止まり、結果的に DNA 合成を抑制しているものと推察された。</p> <p>Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用の機能領域を明らかにするために、Cdt1 の様々な変異体を作製して検討をおこなった。欠失変異体の解析から、N 末側 255 アミノ酸から C 末端までの</p>			

領域で野生型 Cdt1 と同等の新生鎖伸長抑制作用を示すこと、さらに 255 アミノ酸から 289 アミノ酸の間にその活性に必須な構造が存在することが示唆された。

Cdt1 の新生鎖伸長抑制に必要な領域は、ライセンス化活性に必要な領域とオーバーラップしている。そこで、255～289 アミノ酸の領域内でライセンス化活性に重要な役割を持つと推測されるアルギニン残基 (R285) に点変異を導入した変異体型 Cdt1 を作出し、検討をおこなった。この変異体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 と同様の新生鎖伸長抑制作用を示した。したがって、R289 は新生鎖伸長抑制作用に必須な構造には含まれていないと推測された。また、これにより Cdt1 のライセンス化活性と新生鎖伸長抑制活性を区別できる変異体を獲得した。

以上の結果をふまえ、中崎氏はがん細胞で見られる Cdt1 の過剰発現が、S 期において複製フォークの進行を阻害することにより新生鎖伸長反応を抑制する可能性を提示した。細胞のがん化の過程で Cdt1 が過剰に存在すれば DNA 複製の阻害による抗がん作用が期待できるかもしれない。その一方で、過剰な Cdt1 はがん細胞で頻繁に見られる遺伝子重複に関与することも考えられる。本研究は、がん細胞における Cdt1 過剰発現の意義や影響を明示化する端緒となることが期待される。

本学位論文の結果の一部は、一報の学術論文として報告されている。これに加え、もう一報の学術論文をリバイス中である。中崎氏の研究は様々な変異体タンパク質を作出して地道な実験を積み重ね、明確な答えを得ていこうとするものであり、研究に対する真摯な取り組みを感じさせる。創出する変異タンパク質やその解析手段なども明確なビジョンのもとで選択されている。遺伝情報安定性維持機構はごくわずかな不具合であっても重篤な遺伝的影響をもたらすことになる。本研究はこのような現象を取り上げて生化学的に詳細な解析を試みたもので、得られた知見は、その生理的な意義について明確に提示するには至っていないものの、次におこなわれる細胞レベルでの解析に大いに寄与するものであり、十分に評価できる。以上の観点より、本論文は博士（薬学）の学位論文としてふさわしいものであると結論する。