

論文内容の要旨

申請者氏名 異 康 年

ORC (Origin Recognition Complex)は複製開始点に結合し、これを足場に CDC6、CDT1、MCM が集合し複製開始に必要な複製前複合体 (Pre-RC) が形成される。ORC は ORC1-6 のサブユニットからなる複合体で、出芽酵母では細胞周期を通じて安定に複製開始点に結合しているが、哺乳動物細胞では ORC1 の発現変動が ORC の機能制御に重要であることが提唱され始めている。本論文では、ヒト ORC1 の細胞内動態制御を解析し、ヒト細胞での ORC の機能制御と、染色体複製開始制御との関係について考察した。

ヒト ORC1 を特異的に認識する抗体を用いて細胞内局在を調べたところ、ORC1 は核内、特に核構造中に局在していた。系統的な欠失変異体をヒト細胞で一過的に発現させて調べたところ、ORC1 の核局在には N 末端から 324 アミノ酸が必要であり、ORC 複合体形成には、これに加えて、NTP 結合モチーフを含む C 末領域が必要であった。ヒト ORC1 の発現量は、細胞周期中、G1 後期から G1/S 期に蓄積し S 期以降は減少した。ORC1 を強制発現させた細胞での挙動を調べたところ、ORC1 蛋白質量の細胞周期制御は主に蛋白分解系によって制御されることが示唆された。また欠失変異 ORC1 発現細胞株を用いた解析から、ORC1 の分解には N 末側 324 アミノ酸および C 末側 351 アミノ酸の領域は関与しなかった。ORC1 の量的変動と細胞内挙動の関係を明らかにするため、非同調の細胞を抗 ORC1 抗体で染色した結果、ORC1 のシグナルは G1 後期の核では 500 個以上のドットとして、S 期初期では BrdU と共局在しない 100 個程度のドットとして観察され、S 期後期では検出されなかった。従って、G1 期にドット状に局在した ORC1 は DNA 複製開始時に分解されると考えた。

ORC1 の過剰発現は、細胞の増殖速度には影響しなかったが、G1 期が長くなり S 期が短くなった。ORC1 の過剰発現細胞をチミジン存在下で培養して S 期停止を誘導したところ、その発現量に応じて S 期停止が阻害された。これは、ORC1 を過剰発現する細胞では活性化される複製開始点の数が増加するため、複製フォークの停止に依存した S 期停止が阻害されたためであると考えた。実際、正常な 293 細胞では 20%程度の ORC2 が DNase I 不溶性であるのに対して、ORC1 を内在性の 12 倍発現する細胞株では大部分の ORC2 が DNase I 不溶画分に存在し、また DNase I 不溶画分に分画される MCM3 の量も約 3 倍に増加した。これらは、高レベルに存在する ORC1 によりそれと複合体を形成する ORC2 や MCM3 が DNase I 耐性の核構造中に移行したことを示唆する。以上のことから、ヒト細胞における ORC1 の発現変動は、ヒト細胞における再複製の防止機構の一つであると推測される。さらに、ヒト ORC1 は Pre-RC 形成を厳密に制御することによって DNA 複製開始のみならず正常な S 期チェックポイント応答を誘導する上でも重要であると考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 異 康 年

本論文は、ヒト ORC1 の細胞内動態制御を解析し、ORC1 の発現変動が ORC の機能制御と DNA 複製開始制御に重要であることを示した初めての例である。ORC は、ORC1-6 のサブユニットからなる複合体で、複製開始点に結合し、これを足場に CDC6、CDT1、MCM が集合し複製開始に必要な複製前複合体 (Pre-RC) が形成される。ORC は、出芽酵母では細胞周期を通じて安定に複製開始点に結合しているが、哺乳動物細胞ではサブユニットの発現が変化することが見つけられている。本論文では、ヒト培養細胞における ORC1 の発現変動を解析し、ヒト細胞での ORC の機能制御と染色体複製開始制御との関係について検討しており、これは高等動物での染色体 DNA 複製開始を制御する機構を理解する上で重要な知見であり、細胞周期研究において高く評価できる。

本論文では、まず、ヒト ORC1 を特異的に認識する抗体を作成し、これを用いてヒト培養細胞 293 細胞について染色を行っている。DNase I 処理に耐性であることから、ORC1 が核内、特に、特に核構造中に局在することを示している。次に、ヒト ORC1 の発現量をウエスタンブロッティングと細胞の抗 ORC1 抗体染色で検定しており、総発現量は細胞周期中 G1 後期から G1/S 期に増加、S 期以降は減少すること、核内では G1 後期では 500 個以上のドットとして、S 期初期では BrdU と共局在しない 100 個程度のドットとして存在し、S 期後期では観察されないこと、ORC1 を強制発現させた細胞での解析から、ORC1 蛋白質量の細胞周期制御は主に蛋白分解系によって制御されることを見出している。これらは、酵母で従来見出されていた ORC1 の挙動と異なり、哺乳類細胞の染色体複製開始制御を考える上で大きな意義を持つ発見である。

さらに、ORC1 の過剰発現の影響を検討しており、細胞の増殖速度に影響しないが、G1 期が長くなり S 期が短くなる表現型に加えて、S 期チェックポイント応答の阻害を見出している。これを、ORC1 を過剰発現する細胞では活性化される複製開始点の数が増加するため、複製フォークの停止に依存した S 期停止が阻害されたためであると考え、DNase I 不溶画分中に存在する ORC サブユニットや MCM の量を調べることでこの仮説を検討している。これらの結果から、ヒト細胞における ORC1 の発現変動は、ヒト細胞における再複製の防止機構の一つであると推測し、さらに、ヒト ORC1 は Pre-RC 形成を厳密に制御することによって DNA 複製開始のみならず正常な S 期チェックポイント応答を誘導する上でも重要であると考察している。

以上のように、本論文は染色体複製開始制御機構における哺乳類細胞特異的な ORC1 の機能を示唆するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。