

論文内容の要旨

申請者氏名 太田 聡

真核生物の染色体複製に関与する多くの因子は、染色体の構築、維持、機能発現に深く関与し、細胞周期の制御下において複製、修復、遺伝子発現からのシグナルに対して細胞を正常に保つために重要な役割を担っていると考えられる。さらに、これらの因子間で形成されるより大きな機能的ネットワークによりそれぞれの機能が協調的に機能しゲノム情報の安定な維持伝達を行っていると考えられる。本研究ではヒト染色体複製の開始反応および合成反応において染色体上での他の複製因子の足場としての役割を持つ因子である ORC (Origin Recognition Complex) と PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) に着目し、ORC については複合体形成とその制御に関する解析を、また、PCNA については結合因子の網羅的な同定により新たな機能ネットワークの探索を行った。

＜PCNA を中心としたタンパク質のネットワークの解明＞

DNA ポリメラーゼ δ (pol δ) の補助因子 PCNA は、3 量体からなるリング構造を有し、中心部の穴に DNA が貫通して DNA 上をスライディングする機能を持ち、様々な因子を DNA 上につなぎ留めるクランプとして機能している。クランプローダーである RFC との複合体形成によりそのリング構造に一時的に切れ目が入り、DNA 上にロードされる。pol δ は DNA 上の PCNA と結合すると、鋳型から外れることなく長い DNA を合成できるようになる。近年、pol δ 、RFC の他にさまざまな方法を用いて細胞周期制御、DNA 修復、染色体情報の維持に関わるタンパク質が PCNA 結合因子として同定され、いくつかの因子について PCNA により活性が促進されることが示された。このことから PCNA は pol δ の補助因子として働くほかに、複製された染色体の機能維持の中心的役割を持つと考えられる。従って、PCNA の従来知られている機能にとらわれず、PCNA 結合因子を網羅的に明らかにすることは非常に意義深いと考えられる。そこで、ヒト 293 細胞の細胞質抽出液 (S100) と核抽出液 (NE) から PCNA をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー (PCNA カラム) により PCNA に特異的に結合する 20 種以上の因子を精製した。これらの因子をウエスタンブロットティング、アミノ酸配列分析法および質量分析装置を用いて同定を試みたところ、S100、NE からそれぞれ 19 個と 31 個の因子が同定され、このうちこれまでに報告のある PCNA 結合因子がそれぞれ 12 個と 16 個含まれていた。よって、PCNA 結合因子の網羅的な精製法として PCNA カラムが有効であることが示された。また、同定法として質量分析装置を導入することで微量な核内因子の解析も通常の培養、精製スケールで効率よく同定できることが示された。NE からの残りの因子のなかには、修復、転写に関わる因子である DNA-dependent protein kinase、Ku80、Ku70、NDHII、RPA1、RuvB-like protein 2、Myb binding protein が同定されたことから、様々なイベントにおいて PCNA が機能していることが予想された。さらに、S100 と NE の双方から、cDNA 配列 (AAH06278) 由来の出芽酵母の CHL12 と相同性のあるタンパク質が同定された。CHL12 は出芽酵母の解析からチェックポイント、姉妹染色体接着に関与し、RFC1 と一次構造が似ていることが知られている。実際に、昆虫細胞でのヒト CHL12 および RFC2-5 が新規の

クランプローダー型の複合体となり、精製した PCNA と特異的な結合をすることが確かめられた。よって、CHL12/RFC2-5 は PCNA をターゲットとする新規のクランプローダーとして機能することが示唆された。

<ヒト ORC 複合体形成の解析>

出芽酵母の ORC は細胞周期を通して 6 つのサブユニットから成る安定な複合体として複製開始点に結合し、複製開始前に他の複製因子が複製開始点と相互作用するための染色体上の足場として機能していると考えられている。ヒトにおいても 6 つのサブユニットに対応するタンパク質 (ORC1-6) の存在が示されているが、細胞内での機能はもちろん、他の複製因子、さらに ORC サブユニット間の相互作用も明らかにされてない。そこで、ヒト ORC の複製開始における機能を明らかにするために、ORC の複合体形成について解析を行った。HeLa 細胞抽出液からヒト ORC に特異的な抗体を用いて免疫精製を行ったところ、ORC1、2、3、4、5 から成る ORC1-5 複合体が細胞内に存在することが示された。また、全てのサブユニットはクロマチン結合画分に見いだされることを考え合わせると、ヒト ORC は出芽酵母の場合と同様に複合体として複製開始点に結合することが予想された。しかしながら、同調細胞を用いた実験から ORC2-5 は細胞周期を通して一定量存在するのに対し、ORC1 は G1 期に一過的に増加し、その後、S 期の進行に伴って減少することが明らかとなった。S 期における ORC1 の分解は 26S プロテアソームの阻害剤 MG132 で阻害されることから、ORC1 の分解はプロテアソームの分解経路に依存すると考えられる。さらに、抗 ORC1 抗体と抗 ORC2 抗体を用いた免疫沈降実験から、この ORC1 の増加に伴って G1/S 期に ORC1-5 複合体が形成されることが明らかとなった。ORC の全てのサブユニットが細胞周期を通して一定量存在し、安定な複合体を形成している出芽酵母とは異なり、ヒトでは ORC1 の量に依存して ORC 複合体の形成が制御されていることが明らかとなった。ところで、ORC1 は常に DNase I 不溶画分に存在し、単にクロマチンと結合しているのではなく、何らかの核構造と相互作用していると考えられる。一方、核構造と相互作用する ORC2 の割合が G1/S 期に増加すること、細胞内の ORC1 の量を siRNA を用いて減少させたとき、核構造と相互作用する ORC2 の割合が減少したことから、ORC2、おそらくは他の ORC のサブユニットは ORC1 と核構造との相互作用を利用して、G1/S 期に ORC1-5 複合体として核構造上に存在すると考えられる。また、ORC1 に対する siRNA 処理により ORC1-5 の複合体形成を阻害すると、クロマチン結合画分に存在する MCM は減少した。また、CDC6 に対する siRNA により細胞を処理しても同様の結果が得られた。従って、ORC1 を含む ORC 複合体は CDC6 とともに働くことによってクロマチン上に MCM をロードすることにより複製開始複合体 (pre-RC) の形成に深く関与することが明らかとなった。本研究により明らかとなった、複製開始複合体の形成活性をもつ ORC 複合体が ORC1 の量に依存して細胞周期特異的に形成されるシステムは、酵母と比較して非常に長い S 期をもつ動物細胞に再複製の防止機構として新たに加わったものと考えられる。また、複製開始点の核内配置はそれぞれの複製開始点の開始時期のみならず遺伝子の機能発現とも密接に関係があることが古くから知られており、今回見いだした ORC 複合体と核構造との相互作用は、複製開始制御のみならず動物細胞における高次機能発現制御のメカニズムを内包していると考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 太田 聡

ヒト染色体複製の開始反応及び合成反応において PCNA と ORC は染色体上での他の複製因子の足場としての役割を持つ因子である事が知られている。申請者は、PCNA については結合因子の網羅的な同定により新たな機能ネットワークを探索し、ORC については複合体形成とその制御に関する解析を行い、以下の実験結果を得た。

1) PCNA は、RFC により DNA 上にロードされ、DNA ポリメラーゼ δ の補助因子として働くが、近年、細胞周期制御、DNA 修復、染色体情報の維持に関わる様々な因子が PCNA 結合因子として同定され解析されている。これを踏まえ、従来知られている PCNA の機能にとらわれず、PCNA 結合因子を網羅的に明らかにすることは意義深いと考え、PCNA をリガンドとしたアフニティークロマトグラフィーにより特異的結合蛋白質を精製した。さらに、ウェスタンブロッティング、アミノ酸配列分析法、質量分析法により解析を進め、50 種の因子を同定した。この中には、28 種類の既知の PCNA 結合因子が含まれることから、本解析法の有効性が示された。新規の因子の中で、RFC1 と一次構造が似ている Chl12 に着目し、Chl1 が RFC2-5 の小サブユニットと複合体を形成し、PCNA をターゲットとする新規のクランプローダーであることが示された。

2) ヒト ORC 蛋白質の複製開始における機能を明らかにするために、ヒト HeLa 細胞を用いて ORC の複合体形成について解析を行った。非同調細胞抽出液から ORC 特異的抗体を用いた免疫精製により ORC1-5 複合体がクロマチン結合画分に存在することを確認した。同調細胞を用いた実験系では、ORC2-5 は細胞周期を通じて一定量存在するのに対し、ORC1 の発現は細胞周期依存的に G1 期に増加し S 期の進行に伴って減少した。S 期における ORC1 の分解はプロテアソーム依存的であった。siRNA を用いて ORC1 の発現量を減少させると核構造上の ORC1-5 複合体の形成が阻害され、CDC6 の siRNA 処理時と同様にクロマチン結合画分の MCM 量が減少した。

本研究は、ヒト染色体複製で重要な役割を果たす PCNA と ORC に着目し、PCNA 結合蛋白質を網羅的に解析することにより PCNA/Chl12-RFC が新規のクランプ・クランプローダー系であることを初めて明らかにするとともに、ヒト ORC1 の発現と ORC 複合体の形成が出芽酵母と異なって細胞周期で制御されており、CDC6 とともに働くことにより複製開始複合体の形成に深く関与することを初めて明らかにした。

以上のように、本論文は、哺乳類における PCNA の新たな機能ネットワークと ORC の複合体形成制御に関する新しいモデルを提唱するもので、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。