

論文内容の要旨

申請者氏名 塩見 泰史

ゲノム情報の安定な維持伝達は、DNA の複製と修復、染色体の再構築と分配、といった細胞周期の進行に特有な反応を担った数多くのタンパク質の巧妙なクロストークの上に成り立っている。最近のゲノム生物学の進展によって、ゲノム情報の安定な維持伝達に関与する因子の反応機構には、機能的な類縁性だけでなく幾つか共有の基本原理の存在が明らかになってきた。たとえば真核生物では相互に高い類似性を持つ複数のクランプ・クランプローダー系が存在し、複製反応を軸としたゲノムの情報維持機構の分子集合の中核として機能していると考えられている。本研究では、それらの反応機構の特異性と機能的連携を明らかにすることを目的として、ヒト由来のクランプ・クランプローダー系の再構築と機能解析を行った。

まず、複製フォークで DNA ポリメラーゼ δ/ϵ の補助因子として機能し、クランプ・クランプローダー系の代表である PCNA (増殖細胞核抗原)、RFC (複製因子 C) について解析した。バキュロウイルス発現系を用いて再構築したヒト RFC による PCNA のローディング機構の解析では生化学的な解析に加えて、新たに電子顕微鏡観察による分子構造解析を導入した。その結果、RFC が U 字型の複合体であること、およびその構造が ATP 加水分解依存的に変化することを示した。この解析によりリング構造の PCNA が、結合した RFC の構造変化を駆動力として一時的に開環し DNA にローディングする機構が説明された。

当初、クランプ・クランプローダー系は DNA ポリメラーゼの補助因子に特有のしくみと考えられたが、チェックポイント応答、染色体接着等に関与する因子にクランプ・クランプローダーに相当すると予想されるものが見いだされてきた。そこで、PCNA-RFC の解析法をこれらに適用し、新規のクランプ・クランプローダー系の証明、機能解析を行った。

DNA 傷害、複製停止チェックポイント応答に必須な因子である分裂酵母、ヒトの RAD9、HUS1、RAD1 (出芽酵母 DDC1、MEC3、RAD17 に相当) は PCNA 類似タンパク質をコードしており、お互いに相互作用する。そこでこれらは Rad9/Hus1/Rad1 (Rad9-1-1) と呼ばれる複合体を形成し新規クランプとして機能すると考えられた。一方、同じチェックポイント経路に属する分裂酵母、ヒトの RAD17 (出芽酵母 RAD24) は RFC ファミリーに属し、RFC の 4 つの小サブユニットと Rad17-RFC と呼ばれる複合体を形成し、Rad9-1-1 に対応するクランプローダーと考えられた。RFC 同様、バキュロウイルス発現系を用いて再構築し精製された Rad17-RFC は、予想されたように Rad9-1-1 と特異的な結合を示した。さらにプライマー／鋳型 DNA との結合および ATPase 活性を有するがそれぞれの活性は RFC の 1/5 および 1/3 であり、しかも RFC と異なりその ATPase 活性は DNA やクランプの Rad9-1-1 を添加してもほとんど促進さ

れなかった。また実際に Rad17-RFC による Rad9-1-1 の DNA へのローディング活性を検出することはできなかった。これに対して電子顕微鏡観察による構造解析では Rad9-1-1、Rad17-RFC は PCNA、RFC とほとんど同一の分子構造をしていることを明らかにした。以上の結果から、Rad9-1-1 と Rad17-RFC は、第二のクランプ・クランプローダー系であることが強く示唆された。しかしそのローダー活性を発揮するためには、プライマー／鋳型 DNA 以外の特異的に結合する DNA 構造、あるいは未同定の必須因子の添加、あるいは関与する因子の翻訳後修飾が必要と考えられる。このことから、Rad9-1-1 と Rad17-RFC は、特定の DNA 基質、あるいは DNA 傷害応答による蛋白質修飾系によって機能制御を受けるクランプ・クランプローダー系であることが示唆され、チェックポイント応答機構を考える上で興味深い機能系である。

第三のクランプ・クランプローダー系としてやはり RFC ファミリーに属する CHL12/CTF18 (ヒト CHL12) が見いだされた。CHL12/CTF18 は DNA 複製後の姉妹染色体接着に必須な出芽酵母の遺伝子として同定されている。まず、ヒト Chl12 も Rad17 と同様 RFC の 4 つの小サブユニットと共発現して Chl12-RFC と呼ばれる複合体を形成することを明らかにした。一方、この複合体の標的クランプは明らかにされていなかったが、当研究室で行われた PCNA 結合タンパク質のプロテオミクス解析の結果から、新規 PCNA 結合タンパク質として Chl12 が発見された。そこで、再構築した Chl12-RFC 複合体と PCNA との結合を解析した結果、Chl12-RFC 複合体が PCNA と特異的に結合することを明らかにした。また再構築した Chl12-RFC のプライマー／鋳型 DNA との結合活性は RFC の 1/5 であったが、RFC と同様の比活性の ATPase 活性を有し、その活性は DNA、PCNA の添加により促進された。さらに、RFC の 1/6 の比活性ではあるが、Chl12-RFC は ATP 依存的な PCNA の DNA ローディング活性を示した。以上の結果から、Chl12-RFC は、機能する反応系は異なるが、第二の PCNA ローダーであることを初めてその活性から直接に証明した。今後、いかなる状況で PCNA ローダーが RFC と Chl12-RFC の間で使い分けられているのか、あるいは、ローダーが異なったとき、ロードされた PCNA の機能にどのような違いがあるのか、など複製フォークと姉妹染色体接着の間の機能連携について興味深いアプローチが可能である。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 塩見 泰史

ゲノム情報の安定な維持機構は、DNA の複製と修復、染色体の再構築と分配など細胞周期の制御に関わる蛋白質の巧妙なクロストークの上に成り立っている。最近のゲノム生物学の進展により、これらの蛋白質の反応機構には、機能的な類縁性だけでなく共有の基本原則が存在することが明らかになった。その一例として、真核生物では高い類似性を持つ複数のクランプ・クランプローダー系が存在し、複製反応を軸としたゲノムの情報維持機構の分子集合の中核として機能することがあげられる。申請者は、この反応機構の特異性と機能的連携を明らかにすることを目的とし、ヒト由来のクランプ・クランプローダー系の再構築と機能解析を行い以下の実験結果を得た。

1) クランプ・クランプローダー系の代表である PCNA/RFC 系をバキュウロウイルス発現系を用いて再構築し、生化学的解析に加えて電子顕微鏡を用いた分子構造解析を行った。その結果、RFC が U 字型の複合体であり、その構造が ATP 加水分解依存的に変化することを見いだした。これにより、リング構造の PCNA が、結合した RFC の構造変化を原動力として一時的に開環し DNA にローディングする機構が説明された。

2) バキュウロウイルス発現系により再構築した Rad17-RFC が、PCNA 類似の Rad9-1-1 複合体と特異的に結合し、プライマー/鋳型 DNA との結合活性や ATPase 活性を有することを見いだした。また、電子顕微鏡観察により Rad9-1-1/ Rad17-RFC が、PCNA/RFC と同一の構造をとることを明らかにした。これらの結果は、Rad9-1-1/ Rad17-RFC が第二のクランプ・クランプローダー系であることを強く示唆した。

3) RFC ファミリーに属し、DNA 複製後の姉妹染色体接着に必須な Chl12 が、RFC の 4 つの小サブユニットと Chl12-RFC 複合体を形成し、プライマー/鋳型 DNA との結合活性や ATPase 活性を有することを見いだした。また、Chl12-RFC が PCNA と特異的に結合し、弱いながらも ATP 依存的 DNA ローディング活性を示すことを明らかにし、第二の PCNA ローダーであることを直接証明した。

本研究は、哺乳類クランプ・クランプローダー系に着目し、その代表である PCNA/RFC に関し ATP 加水分解依存的分子構造の変化を見いだすとともに、第二、第三のクランプ・クランプローダー系である Rad9-1-1/Rad17-RFC と PCNA/Chl12-RFC についてもその存在や機能を初めて明らかにした。

以上のように、本論文は哺乳類クランプ・クランプローダー系の分子構造上、機能上の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。