

学 位 論 文 題 名

Study on mouse MCM proteins—are they DNA replication licensing factor?—

(マウス MCM タンパク質に関する研究—MCM は、DNA 複製のライセンス因子か?)

学位論文内容の要旨

細胞が増殖するためには、DNAの複製と細胞分裂とを正確に繰り返さなければならない。その際、自らの遺伝子を正確に娘細胞に伝えるために、DNAは自己と同じものを複製する必要がある。つまり、一度の細胞周期でDNAは通常ただ一度だけしか複製せず、一部のDNAが過剰に複製したり、未複製のDNAが残るようなことはない。このDNA複製が細胞周期のS期にただ一度だけ起こる仕組みを説明するために、1988年にBlowとLaskeyは、DNAと結合して複製のライセンス化を行うライセンス因子を考案した。このライセンス因子は、DNA複製の開始に必要な因子であり、核膜を通過できないため、核膜の消失するM期にのみクロマチンと結合することができると考えられた。そして、DNA複製が始まると分解あるいは不活性化されてクロマチンと結合しなくなる。そのため、DNAが再び複製できるようになるにはM期を通過することが必要だというわけである。このライセンス因子は、全く仮想上のものであったが、1990年代に入って、出芽酵母Mcm (minichromosome maintenance)遺伝子のコードするMCMタンパク質がその候補として注目を集めた。それは、MCMタンパク質の細胞周期における細胞内局在の変化が、予想されたライセンス因子の挙動とよく似ていたからである。つまり、MCMタンパク質は、細胞周期のM期の後期からG1期を通じて核に局在するが、S期になると核から消失し細胞質に局在ようになる。また、mcm変異体では非許容温度下でDNA複製の開始が阻害されることから、MCMタンパク質は複製の開始に関わることが明らかになっている。しかしながら、MCMタンパク質が真にライセンス因子として機能するかどうかは不明であり、また、酵母以外の高等真核生物においては、MCMタンパク質の性質はほとんど明らかになっていなかった。

本研究では、マウスMCM関連遺伝子のクローニングを行い、そのcDNAや特異抗体を用いて解析し、以下の点について明らかにした。

1. マウスと酵母の対応するMCMタンパク質間では、アミノ酸配列のレベルで40%以上の相同性をもつ。また、マウスCdc21タンパク質のN末端には、分裂酵母Cdc21と同様にCdkによりリン酸化されうる部位が密集して存在し、P1MCM3タンパク質には、DNA依存性キナーゼでリン酸化されうる部位が密集して存在している。
2. 3つのマウスMCM遺伝子(P1MCM3、CDC46、Cdc21)は、いず

れも細胞周期のG 1 後期に発現が上昇し、静止期においてはその発現は見られない。この発現制御に関連すると思われる E 2 F の結合部位が P 1 MCM 3 遺伝子の 5' 上流域に存在する。

3. マウス P 1 MCM 3 のタンパク質の合成は、その転写と同様に G 1 後期であるが、リン酸化は S 期に高度におこる。
4. マウス MCM タンパク質は、間期の細胞の核に局在するが、Triton X-100 で溶出される、クロマチン非結合型のタンパク質と Triton X-100 で溶出されないクロマチン結合型のタンパク質がある。P 1 MCM 3 タンパク質は、クロマチン結合型に比べて、非結合型は高度にリン酸化されている。
5. G 1 期には存在するクロマチン結合型の MCM タンパク質は、S 期が進むにつれて減少し、クロマチン非結合型のタンパク質が増加する。特に、P 1 MCM 3 タンパク質は、DNA 複製の起こったクロマチンから順次遊離する。
6. P 1 MCM 3 タンパク質は、C 末端付近に核移行シグナルを持ち、間期の核に輸送される。また、P 1 MCM 3 は、核と細胞質を往復するシャトルタイプの核タンパク質である。
7. P 1 MCM 3 タンパク質と CDC 4 6 タンパク質は、それらのクロマチンとの結合状態や P 1 MCM 3 のリン酸化状態によらず、強固に結合している。そのため、CDC 4 6 タンパク質自身では核移行シグナルを持たないが、P 1 MCM 3 とともに核に運ばれる。
8. マウス培養細胞の核に抗 P 1 MCM 3 抗体をマイクロインジェクションすると、DNA 合成が阻害される。

これらの結果より、マウス MCM タンパク質は、酵母のタンパク質と同様に DNA 複製に必須であることが明らかになった。また、MCM は互いに結合し、タンパク質複合体を形成していることもわかった。最も重要な点は、細胞周期におけるクロマチンとの結合状態の変化であった。マウス MCM の細胞内局在は、酵母の MCM の細胞周期に依存した細胞内局在の変化と異なり、常に核であった。しかしながら、MCM タンパク質は、未複製のクロマチンにのみ結合しており、細胞周期におけるその核内局在の変化は、MCM タンパク質が、DNA 複製が S 期に一度だけ起こるための制御機構に関与していることを強く示唆した。つまり、MCM が結合したクロマチンは複製できるが、いったん複製するとそのクロマチンは MCM と結合しなくなることで、全てのクロマチンがただ一度だけ複製するような機構が考えられる。このような MCM タンパク質の挙動は、まさしく DNA に複製の許可を与えるようなライセンス因子の性質そのものである。しかしながら、仮説として考えられていたライセンス因子とマウス MCM とは、それらの核への輸送という点では、大きく性質を異にする。ライセンス因子が核膜を通過できないと考えられていたのに対して、MCM タンパク質は明らかに核膜を通過でき、クロマチンと結合していなくとも核内に存在するからである。むしろ、その細胞内局在は重要ではなく、クロマチンと結合するかどうかの方が重要なのである。その結合の調節にはどうやらリン酸化が関与しているらしく、DNA 複製のライセンス化は、MCM とそのクロマチンとの結合を調節するような因子等により行われている可能性が高い。実際、Chong らは、アフリカツメガエル卵抽出液より、ライセンス活性を持つ因子を MCM タンパク質の複合体とその他の因子の二つの画分に分離している。この結果からも、MCM 単独では、ライセンス化を行えないことが明らかである。これらのことから DNA 複製のライセンス化という現象をもう一度考えてみると、その現象は、結局は C d c 2 キナーゼを中心とした、リン酸化、脱リン酸化による細胞周期の制御の中に組み込まれているのかもしれない。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 盛 田 フ ミ

副 査 教 授 菊 池 九 二 三

副 査 教 授 矢 澤 道 生

学 位 論 文 題 名

Study on mouse MCM proteins—are they DNA replication licensing factor?—

(マウス MCM タンパク質に関する研究—MCM は、DNA 複製のライセンス因子か?)

生命の最も基本的な特性として、自己複製能をあげることができる。真核細胞では、そのコピーを作るための指令となる DNA は、二重構造膜に覆われた細胞核内に保持されている。真核細胞が二つの娘細胞に分裂する 1 回の細胞周期で、DNA は正確に 1 回だけ複製され、娘細胞に分配される。1988年に、この厳密な DNA 複製は、ライセンス因子によって制御されているという提案がなされた。1990年代初頭に、発芽酵母の MCM (Minichromosome maintenance) 遺伝子産物が、提案されたライセンス因子としての挙動を示すこと、また、MCM ファミリーが、真核生物全般にわたって、広く保存されていることが明かとなった。しかし、MCM タンパク質が、真にライセンス因子として作用しているかどうかも含め、高等真核生物の MCM タンパク質の性質は、ほとんど明らかにされていなかった。

申請者は、マウス MCM 関連遺伝子のクローニングを行い、P1(MCM3), mCDC46, mCdc21の構造を決定した。その結果、マウスと酵母の対応するタンパク質間で、アミノ酸配列は40%以上の相同性をもっていることを明らかにした。mCdc21タンパク質のN末端には、サイクリン依存性キナーゼの磷酸化部位、又、P1MCM3タンパク質は、DNA 依存性キナーゼによる磷酸化部位を持ち、これらのタンパク質が磷酸化—脱磷酸化の制御と関連することが示唆された。発現タンパク質に対する特異抗体や、cDNAを用いた研究から、P1MCM, CDC46, Cdc21タンパク質の発現は、細胞周期のG1後期に上昇したが、静止期においては停止することが見いだされた。マウス MCM タンパク質は間期の間、細胞核に局在するが、Triton X-100で溶出されないクロマチン結合型と、溶出される非結合型の存在が示された。クロマチン非結合型の P1MCM3タンパク質は、結合型に比べ、高度に磷酸化されていた。クロマチン結合型の MCM タンパク質は、G1期に存在するが、S期が進むにつれて、減少し、代わって、非結合型が増加した。特に、P1MCM3タンパク質は、DNA 複製が終わったクロマチンから順次、遊離するこ

とが示された。即ち、MCMタンパク質は、未複製のクロマチンにのみ結合しており、DNA複製が、S期に一度だけ起こるための制御機構に関与していることを強く示唆している。また、マウス培養細胞の核内に、抗P1MCM3抗体をマイクロインジェクションすると、DNA合成が阻害された。これらの結果は、マウスMCMタンパク質は、DNA複製に必須で、且つ、ライセンス因子としての作用を持つことを示している。ただし、核膜を通過して核内へ移行できない酵母のMCMタンパク質と異なり、マウスMCMは核膜を通過でき、クロマチンと結合していなくとも核内に存在している。P1MCM3タンパク質は、C末端付近に核移行シグナルを持ち、間期の核に輸送され得ることを示している。ライセンス因子としては、細胞内での局在よりはむしろ、クロマチンと結合するかどうかで重要で、その結合の調節にMCMタンパク質の磷酸化の関与が示唆された。

以上、申請者は、マウスMCMタンパク質がDNA複製のライセンス因子として作用している可能性を明確に示しており、また、MCMタンパク質がクロマチンと結合していない時にも核内にとどまっていることを新たに見いだした。これらの結果は、DNA複製に関わる制御機構解明に大きく寄与するものと高く評価される。審査員一同は、申請者が、博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を持つと判断した。