



Title	Regulation of replication licensing by geminin and Cdt1 in Xenopus embryonic cell cycle
Author(s)	Ode, Koji
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/2247">https://hdl.handle.net/11094/2247</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	大出 晃士
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 24339 号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Regulation of replication licensing by geminin and Cdt1 in <i>Xenopus</i> embryonic cell cycle (アフリカツメガエル初期胚型細胞周期におけるgemininとCdt1による複製ライセンス化制御)
論文審査委員	(主査) 教授 滝澤 温彦 (副査) 教授 升方 久夫 教授 篠原 彰 教授 平岡 泰 招聘教授 上田 泰己

## 論文内容の要旨

真核生物の染色体は複数の複製開始点を有する。複製ライセンス化制御は次の2ステップの反応を介して、各複製開始点からの複製が一回の細胞周期に一度だけ起こるよう保証している。まずM期後期からG1期にかけて、ORC蛋白質複合体、Cdc6蛋白質、Cdt1蛋白質の三者依存的に複製開始点にMcm2-7蛋白質複合体が結合する(ライセンス化)。S期においては、Mcm2-7の結合した領域から染色体複製が開始する一方、新たなMcm2-7の結合は抑制される(ライセンス化反応の阻害)。これにより、複製された染色体領域が再度複製されること(再複製)が抑制されている。geminin蛋白質は多細胞動物において再複製の抑制に中心的役割を果たす因子である。gemininはCdt1と結合してライセンス化を阻害するが、その詳しいメカニズムは明らかでない。

これまでにライセンス化は、ある geminin 閾値濃度で all-or-none 型に阻害されることが知られている。gemininの作用機構を知るために、all-or-none型ではなく濃度に応じて連続的に抑制効果を発揮する変異 gemininを作成した。野生型と変異型の違いとして、野生型 geminin は染色体上の Cdt1 の局在化を引き起こすが、変異型 geminin はこの効果が顕著に減弱していることを見出した。そこで、染色体上での geminin と Cdt1 の作用機構に着目した。その結果、ORC-Cdc6-Cdt1 複合体が染色体上に形成され Mcm2-7 を呼び込むこと、こ

の複合体が *geminin* による阻害を受け、この阻害は *Cdt1* により回復することが明らかとなった。従って、染色体上では ORC-Cdc6-Cdt1 複合体の *geminin*、*Cdt1* による活性変換が起きていることが示された。これらの結果より、*geminin* による染色体上 *Cdt1* の foci 形成の誘発は、複数の ORC-Cdc6-Cdt1 複合体の集積から生じている可能性が考えられた。*Cdt1*、*geminin* によって活性変換される複数の ORC-Cdc6-Cdt1 複合体の集積が、all-or-none 型の阻害機構を説明しうるかを検討するため、本研究では数理モデルの導入を行った。まず、複合体間での相互作用を介して *geminin* による阻害が促進的に制御されると考えるフィードバックモデルを構築した。このモデルは、実験的に求めた *Cdt1* 濃度、*geminin* 濃度、*Mcm2-7* 染色体結合量の関係性を良く説明した。次に、複合体間での相互作用を空間的に表現するモデルを構築した。一次元上に ORC-Cdc6-Cdt1 複合体を配し、阻害型複合体は両隣の複合体の阻害を促進することを仮定したモデルの解析から、隣接した阻害型複合体間の干渉効果により all-or-none 型の阻害が誘起されること、さらに阻害型、もしくは活性型の同状態の複合体同士が隣接する確率が上昇することが示された。そこでライセンス化された複製開始点の分布を検証した結果、*geminin* を用いて部分的にライセンス化を阻害した際に、隣接する複製領域間の距離の分布に顕著な変化は認められなかつた。これは、*geminin* 存在下では活性型複製開始点が隣接する傾向にあるという予測と矛盾しない。これらの結果から、距離的に近接した複数の ORC-Cdc6-Cdt1 複合体間の相互作用が *geminin* によって誘導されているとするモデルを提唱した。

これまで、厳密な再複製の阻害には複数の機構によって多重にライセンス化を抑制することが必要であると考えられてきた。今回提唱する染色体上 ORC-Cdc6-Cdt1 複合体間の阻害的相互作用モデルは、多重なライセンス化抑制経路を用いる代わりに、阻害された染色体領域が相互に抑制効果を増強し合うことで厳密なライセンス化阻害を保証する、新たな戦略を提示するものである。

#### 論文審査の結果の要旨

複製ライセンス化制御は、複数の複製開始点からなる真核細胞染色体の複製において、それぞれの複製開始点からの複製が一回の細胞周期に一度だけ起こるよう保証している機構である。その分子機構は、生物種により多様であり、多細胞動物では、*geminin* 蛋白質が *Cdt1* 蛋白質に結合することでライセンス化を抑制している事がわかつっていたが、詳細な機構は不明であった。大出君は、アフリカツメガエル卵無細胞系を用いて、*geminin* によるライセンス化抑制が all-or-none 型となる機構について研究を行い、all-or-none 型ではなく濃度に応じて連続的に抑制効果を發揮する変異 *geminin* を作成し、染色体上での振る舞いが野生型蛋白質と異なる事を見いだした。また、*geminin* が染色体上に形成されたライセンス化複合体の活性変換を介してライセンス化阻害する事を明らかにした。さらに、all-or-none 型の阻害を説明しうる数理モデルとして、*geminin* による阻害が促進的に制御されるフィードバックモデルを新たに提案し、このモデルが実験結果を良く説明出来る事をしめた。また、ライセンス化複合体間での相互作用を空間的に表現するモデルに基づき、隣接した阻害型複合体間の干渉効果により all-or-none 型の阻害が誘起されること、このモデルでは、阻害型あるいは活性型の同状態の複合体同士が隣接する確率が上昇することを示した。さらにモデルの妥当性をライセンス化された複製開始点の分布から検証し、*geminin* 存在下では活性型複製開始点が隣接する傾向にあるという予測と矛盾しない結果を得た。これら一連の実験と数理モデル化を通して、距離的に近接した複数のライセンス化複合体間の相互作用が *geminin* によって誘導されているとする新たなライセンス化制御機構を提唱するに至った。これまで厳密な複製の制御には、複数の機構によって多重にライセンス化を抑制することが必要であると考えられてきたが、新たに提唱した阻害的相互作用機構は、阻害された染色体領域が相互に抑制効果を増強し合うことで厳密なライセンス化阻害を保証する、新たなライセンス化制御戦略を提示するものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。