



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Identification of a DNA replication licensing factor of Xenopus eggs                                                                                                                                                                                                 |
| Author(s)    | 久保田, 弓子                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Citation     | 大阪大学, 1995, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/39055">https://hdl.handle.net/11094/39055</a>                                                                                                                                                                                  |
| rights       |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|               |                                                                                                                      |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 久保田 弓 子                                                                                                              |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (理 学)                                                                                                            |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 1 7 4 8 号                                                                                                        |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 7 年 3 月 23 日                                                                                                      |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>理学研究科生理学専攻                                                                                       |
| 学 位 論 文 名     | Identification of a DNA replication licensing factor of <i>Xenopus</i> eggs<br>(アフリカツメガエル卵無細胞系を用いた DNA 複製ライセンス因子の同定) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 小 倉 明 彦<br><br>(副査)<br>教 授 森 田 敏 照    教 授 小 川 英 行                                                        |

### 論 文 内 容 の 要 旨

真核細胞は、分裂前に遺伝情報を正確に倍加するために、1回の細胞周期内で2回以上のDNA複製が開始しないようにする機構を有している。DNA複製ライセンス因子は、この機構を担う因子として想定された因子である。この因子は、DNA複製開始に必要であり、複製開始後すぐに不活性化されるが、核輸送シグナルを持たないのでM期に核膜が崩壊するまで活性な因子がDNAに近づくことができない、といった特徴を備えた因子であると考えられている。その実態はまだ明らかではないが、出芽酵母のMCM関連タンパク質が候補の一つとして挙げられている。これらのタンパク質はDNA複製開始に必要とされるが、S期の初期に核より失われ、M期の終わりに再び核内に現れるという、特異な挙動を示すからである。

一方、アフリカツメガエル卵からは、S期あるいはM期の活性を保持する2種類の卵抽出液を得ることができることが知られている。この無細胞抽出系は、細胞周期を進行させる様々な因子を同定するために近年利用されてきた。私はこの系を用いて、S期の開始に必要な因子の探索を行い、アフリカツメガエル卵に於てライセンス因子として働くと思われるタンパク質を同定した。

アフリカツメガエルM期卵抽出液は高いヒストンH1キナーゼ活性を保持しているが、キナーゼ阻害剤であるスタウロスポリンを加えると、H1キナーゼ活性が阻害されるに従いM期の活性は失われる。キナーゼ活性がS期卵抽出液以下まで低下したときに、この抽出液中ではS期卵抽出液と同様に、精子核DNAを加えるとその周囲に核膜が形成された。しかし、S期卵抽出液の場合と異なり、この核でDNA複製は開始されなかった。S期卵抽出液にこの核を加えてもDNA複製は開始されないため、このスタウロスポリンを加えたM期卵抽出液をG2期様卵抽出液と称することにした。G2期様卵抽出液とS期卵抽出液を比較すると、DNAポリメラーゼ活性や核膜輸送活性は両者で相違はなかったが、DNA複製開始はS期卵抽出液のみで生じた。しかし、精子核DNAを予めS期卵抽出液で処理するとG2期様卵抽出液中で形成した核でもDNA複製は開始された。このDNA複製開始誘導活性は核形成後には働くことができないのでS期卵抽出液中にはいわゆるライセンス活性が存在することが明らかとなった。このライセンス活性の実体を明らかにするために、S期卵抽出液とG2期様卵抽出液でDNAに結合するタンパク質を比較した。その結果、110kDa (p110)、100kDa (p100)、92kDa (p92)の3つのタンパク質がS期卵抽出液特異的にDNAと結合していた。これらのタンパク質に対する抗体を作製すると、これらのタンパク質はS期、G2期様卵抽出液の両者に存在したが、S期のみでDNAと結合していた。さらに、p100に対する抗体で処理すると、p100と共にp110の大部

分とp92の半量以上が抽出液から除去された。このときS期卵抽出液のライセンス活性も失われたが、抗体カラムから溶出したタンパク質を加えるとこの活性は回復した。以上の結果より、この3つのタンパク質は複合体を形成してライセンス因子として働くと考えられる。この3つのタンパク質のクローニングを行うと、p110, p100, p92はそれぞれ、酵母のMCM2, MCM3, CDC46/MCM5と相同であった。

### 論文審査の結果の要旨

真核細胞においてDNAの複製は1回の細胞分裂あたり正確に1回行なわれる必要があるが、その制御機構は不明である。この機能を担う分子としてDNA複製ライセンス因子が想定されているが、その実体は明らかではなかった。

久保田君はアフリカツメガエル卵より調製した無細胞系を用いた優れたアッセイ系を確立したのち、卵抽出液よりDNA複製ライセンス因子の満たすべき性質を備えた分子の分離に成功し、かつこの分子の構造を決定した。

これらの業績は細胞生物学上きわめて重要な功績といえ、これを記載した本論文は、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。