



Title	HsMCM6 : a new member of the human MCM/P1 family encodes a protein homologous to fission yeast Mis5
Author(s)	敦賀, 弘道
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40776
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	つるがひろみち 敦 賀 弘 道
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 6 9 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成10年3月25日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	<i>HsMCM6</i> : a new member of the human MCM/P1 family encodes a protein homologous to fission yeast Mis5 (ヒトの新規 MCM/P1 遺伝子ファミリーの一員, <i>HsMCM6</i> 遺伝子は分裂酵母 Mis5 のヒト相同蛋白質をコードする)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 野 島 博 (副査) 教 授 杉 野 明 雄 教 授 花 岡 丈 雄

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

真核細胞においては、一回の細胞周期につき一度だけ、S期において核DNAが複製される。このことを保証する機構として複製ライセンス因子仮説が提唱されていたが、最近、複製ライセンス因子の候補としてMcm蛋白質が同定された。MCM遺伝子はMCM2-7の6種類あることがわかっている。そのうち、MCM6遺伝子については分裂酵母、ごく最近ではカエルで*mis5⁺*遺伝子がクローニングされたのみで、他の生物種にも存在するか否かさえ不明であった。そこで本研究では、ヒトにおいて未同定であった*HsMCM6*遺伝子を新たに単離することでヒトMCM遺伝子を全て揃え、それらを用いてヒトMcmについて構造と機能の解析を包括的にを行い、Mcmの機能および細胞周期制御における役割を明らかにすることを目的とした。

【方法ならびに成績】

方法ならびに結果は以下にまとめて列挙する。

1) コロニー・ブランクハイブリダイゼーション法により、今まで断片的な塩基配列しか報告されていなかった5種類の*HsMcm* (*HsMcm2*, -3, -4, -5, -7) および未知であった*HsMcm6*の全長cDNAをクローニングして揃え、塩基配列を決定し、GST-Mcm's, FLAG-Mcm's, GFP-Mcm's, His6-Mcm's (Baculo virus) などを作製し、構造・機能解析した。

2) FISH方法により、*HsMCM* (*HsMCM2*, -4, -5, -6, -7) の染色体上の配座を決定した。

3) *HsMcm2*, -3, -5, -6, -7 に対するポリクローナル抗体を作製し、免疫沈降法によりヒトでは未確認だった*HsMcm6*, -7 と他の*HsMcm*'s との *in vivo* での結合を証明した。

4) これら抗体を用いた間接蛍光抗体法により、細胞周期 (GO期も含めて) における*HsMcm*'s の細胞内局在変化を比較しながら調べ、核内局在の変動を観察した。

5) これら抗体を用いたウェスタン解析、およびMcm'sを純化して量比較することにより、細胞周期における細胞内Mcm'sの存在量の変動を測定した。

6) ノーザン解析により、*HsMCM*'s の細胞周期 (G1/S) における転写誘導を見いだすとともに、*HsMCM5*, -6 遺伝子の5'上流をクローニングして、E2Fモチーフの存在を見だし、ルシフェラーゼ・アッセイにより、転写誘

導における E2F の役割を確認した。

【総括】 *HsMCM's* (*HsMcm's*) を比較した結果、以下の類似点と相違点を見いだした。

《類似点》

1. アミノ酸配列上の類似性は *Mcm domain* 内だけでなく幅広い領域で見い出された。
2. *HsMcm's* はいずれも G1 期では核に局在し、M 期ではクロマチンからはずれ、M 期終期 (M/G1 期) になると *HsMcm's* のクロマチンへの再結合が観察された。
3. 存在が否定的であった GO 期においても明確な *HsMcm's* の核内局在を認めた。
4. *HsMCM's* の細胞周期における転写誘導パターン (G1/S ピーク) は大筋で一致した。

《相違点》

1. *HsMcm3* は GO 期においては核のごく一部に少量局在するのみで、それ以外の場所では検出できなかったが、G1 期において核内局在が検出されるようになり、G1/S 期においては核内での存在量が急激に増大した。他の *HsMcm's* では核内の局在のみでなく細胞質内にも少量検出でき、それらの存在量は GO, G1 期におけるそれと大差なかった。
2. *HsMCM2* の細胞周期 (G1/S) における転写誘導パターンは他の *HsMCM's* に比べて早めに増加し、早めに減少していた。
3. *HsMcm2* は他の *HsMcm's* に比較して強力にクロマチンへ結合しており、0.5M の NaCl でもクロマチンからはずれなかった。
4. *HsMcm2*, *HsMcm5* においてのみ (*HsMcm4* は未確認)、リン酸化に由来する SDS-PAGE 上での 2 本のバンドが観察された。
5. 細胞周期中における細胞内の *HsMcm's* 間の存在量比は各々異なっていた。
6. *HsMCM* (*HsMCM2*, -4, -5, -6, -7) の染色体上の配座はクラスターを形成することなく、全て異なった染色体に分散していた。

論文審査の結果の要旨

真核生物細胞においては、一回の細胞周期につき一度だけしか DNA 複製が起きない。この現象を制御する複製ライセンス因子の候補として *Mcm* 蛋白質が同定されている。本研究は未同定であったヒトの *MCM6* 遺伝子を新たに単離したこと、および断片しか報告されていなかった他の 5 種類のヒト *MCM* 遺伝子を全て単離し、それらを手段としてヒト *Mcm* 蛋白質について包括的に構造と機能を解析したものである。その結果以下のような新たな知見を得た。

(1) アミノ酸配列上の類似性は *Mcm domain* 内だけでなく幅広い領域で見い出されたこと。(2) ノーザン法によりヒト *MCM* 遺伝子の細胞周期 (G1/S) における転写誘導を見いだすとともに、*HsMCM5*, -6 遺伝子の 5' 上流をクローニングして、E2F モチーフの存在を見だし、その転写誘導における役割を確認したこと。(3) 免疫沈降法により *Mcm* 蛋白質間の *in vivo* における結合を証明したこと。(4) 間接蛍光抗体法により、存在が不明であった GO 期においても明確な *Mcm* 蛋白質の核内局在を検出したこと。(5) バキュロウイルス発現系により純化した蛋白質を標準として細胞内の存在量を測定するとともに、ウェスタン法により細胞周期における細胞内 *Mcm* 蛋白質の存在量の変動を比較・検討したこと。(6) ヒト *MCM* 遺伝子 (*HsMCM2*, -4, -5, -6, -7) の染色体上の配座を決定したこと。

以上の研究結果はヒトにおける *Mcm* 蛋白質の機能の解明、ひいては細胞周期の制御機構の解明に新たな道を開くものであり、学位の授与に値すると認めるものである。