The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Mouse Geminin Inhibits Not Only Cdt1-MCM6 Interactions but Also a Novel Intrinsic Cdt1 DNA Binding Activity
Author(s)	柳, 憲一郎
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43889
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

【25】

氏　　名	柳（やなぎ）　憲一郎（けんいちろう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　17595　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学　位　論　文　名	Mouse Geminin Inhibits Not Only Cdt1-MCM6 Interactions but Also a Novel Intrinsic Cdt1 DNA Binding Activity （マウス geminin は Cdt1 と MCM6 との相互作用だけでなく Cdt1 の DNA 結合活性も阻害する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　花岡　文雄 （副査） 教　授　杉野　明雄　　教　授　野島　博

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

染色体DNAの複製は細胞周期により厳密に制御されており、一度のS期にただ一度のみ行われる。酵母及びツメガエルを用いた分子遺伝学的、生化学的解析から、複製開始制御機構とはDNA複製開始点（origin）における複製前複合体（pre-RC）の形成とその活性化機構であることが明らかになってきた。酵母においては、pre-RCはORC、Cdc6、Mcm2-7がorigin上にロードされることにより形成される。しかし、酵母以外の真核生物ではoriginは定かではなく、染色体上のどこに、どのようにpre-RCが形成され、いかにして活性化されるのか未解明のままである。

最近、pre-RCを構成する新規の因子としてCdt1が同定された。分裂酵母、ツメガエルにおいてCdt1は染色体複製に必須であり、Cdt1のORC依存的なクロマチンへの結合がMcm2-7のクロマチンへの結合に必要であることが示された。また、Cdt1の阻害因子としてgemininも同定された。gemininはCdt1と強固に結合し、Mcmのクロマチンへの結合を阻害することでpre-RC形成を負に制御する因子である。Gemininは多細胞生物においてのみ単離されており、Cdt1-gemininによるpre-RC形成の制御機構の解明は、多細胞生物に特化した複製調節機構を明らかにしうるものとして注目されている。そこで我々は、哺乳類細胞におけるCdt1-gemininシステムの分子機構を明らかにするためにマウスCdt1（mCdt1）のcDNAクローニングと機能解析を行った。

【方法ならびに成績】

ホモロジー検索によるcDNAクローニングの結果、mCdt1は557個のアミノ酸からなり、ヒトCdt1と72%、ツメガエルCdt1と46%、ショウジョウバエCdt1と25%の相同性を有した。特徴的なアミノ酸モチーフを検索したところ、mCdt1に顕著なアミノ酸モチーフは見出されなかった。アミノ酸配列のアライメントと2次構造予測により、mCdt1は異種間で相同性の低いN末端領域と、ヒト、ツメガエル、ショウジョウバエを含む多細胞生物においてのみ相同性の高い中央部分、さらに酵母からヒトに至るまで相同性の高いC末端領域との大きく3つのドメインから構成されることが示唆された。

各ドメインの機能を明らかにするために、酵母two-hybrid法および精製組換えタンパク質を用いた解析を行った。

酵母 two-hybrid 法を用いた解析から、mCdt1 が geminin 及び Mcm6 と強く相互作用することを見出した。また、弱いながらも Orc2 との相互作用も検出するに至った。そこで、組換えタンパク質を用いた *in vitro* における機能解析をさらに進めた。抗 mCdt1 抗体を用いた共免疫沈降実験による機能解析の結果、mCdt1 と geminin、MCM6 との相互作用が検出された。mCdt1 の欠失変異体による解析から、中央領域（177-380 アミノ酸）が geminin と、C 末端領域（407-477 アミノ酸）が MCM6 と相互作用することが示された。これは、酵母 two-hybrid 法による結果とよく一致していた。加えて、Cdt1 と Mcm6 の相互作用は geminin 存在下で阻害されることも明らかとなった。

一方、DNA セルロースおよび electrophoretic mobility shift assay（EMSA 法）を用いた解析から、mCdt1 の N 末端領域（1-293 アミノ酸）が一本鎖および二本鎖 DNA の両者に配列、構造非特異的に結合することが示された。また、mCdt1 の DNA への結合は geminin 存在下において阻害されることも見出した。

【総括】

本研究において、mCdt1 と geminin、MCM6、Orc2 との相互作用を検出するに至った。また、興味深い生化学的活性として Cdt1 が DNA 結合能を有することを見出した。これらの結果は、Cdt1 が pre-RC の構築に深く関与することを示すものである。さらに、geminin が Cdt1 の２つの特性、すなわち MCM6 および DNA との結合、を中央ドメインへの強固な相互作用を通して阻害する、という pre-RC 形成制御の分子メカニズムを初めて示すに至った。今後、Cdt1-geminin 系を中心としたさらなる解析が進むことで、未だ明らかになっていない高等真核生物における origin 認識および活性化機構の解明につながると考えられる。

論文審査の結果の要旨

Cdt1 は複製前複合体形成に必須の因子であり、Cdt1 のクロマチンへの結合が Mcm2-7 のクロマチンへの結合に必要であることが酵母、ツメガエルにおいて示されている。また、geminin は Cdt1 と強固に結合し、Mcm のクロマチンへの結合を阻害することで複製開始を負に制御する因子である。そこで、哺乳類細胞における Cdt1-geminin 系の分子機構を明らかにするために、マウス Cdt1（mCdt1）の機能解析を行った。

酵母 two-hybrid 法や共沈降実験による機能解析の結果、mCdt1 の中央領域で geminin と、C 末端領域で Mcm6 と相互作用することが示された。また、Orc2 との相互作用も弱いながら検出された。一方、DNA セルロース及びゲルシフト法を用いた解析から、mCdt1 が配列、構造非特異的な DNA 結合能を有することが示された。さらに geminin の存在下により mCdt1 と Mcm6 との相互作用及び mCdt1 の DNA 結合活性が阻害されることが明らかになった。以上の結果から、geminin による再複製阻害の分子機構が示されると共に、Cdt1 が複製前複合体の中核を担うことが示唆された。

本研究は、未だ明らかになっていない高等真核生物における origin 認識および活性化機構の解明への分子基盤となるものであり、学位の授与に値すると考えられる。