

Title	Novel Splicing Variant of Mouse Orc Is Deficient in Nuclear Translocation and Resistant for Proteasome-mediated Degradation
Author(s)	三宅, 康之
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46329
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"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	三宅 康之
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 20073 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 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	Novel Splicing Variant of Mouse Orc1 Is Deficient in Nuclear Translocation and Resistant for Proteasome-mediated Degradation (マウス Orc1 の新規スプライシングバリエントは核へ移行できず、プロテアソームを介した分解に耐性である)
論文審査委員	(主査) 教授 花岡 文雄 (副査) 教授 杉野 明雄 教授 田中亀代次

論文内容の要旨

〔目 的〕

遺伝情報の集積である DNA の複製はあらゆる生命現象の基本であり、種の存続を保証するために厳密に制御されている。しかも DNA 複製と細胞増殖の制御機構は密接に関わっており、DNA 複製の分子メカニズムを明らかにすることは細胞の癌化、分化、老化、再生などの高次の生命現象を理解する上で重要である。

真核生物における染色体 DNA 複製は複製装置複合体の形成に先立ち、複製前複合体の段階的形成により制御を受けていることがわかってきた。出芽酵母の複製前複合体は複製開始領域に特異的に結合した ORC (origin recognition complex) 複合体上へ Cdc6、Cdt1、Mcm2-7 が段階的に結合することで形成される。しかし、高等真核生物における複製開始点は未だ同定されておらず、複製開始因子の役割も十分に明らかとなっていない。従って高等真核生物の複製開始機構を解明する上で、これらの複製開始因子ホモログの機能解析は必要不可欠である。そこで本研究では、Orc サブユニットの cDNA をクローニングし、それらの解析を行った。

〔方法ならびに成績〕

ORC 複合体における個々のサブユニットのマウスホモログの cDNA をクローニングした結果、今まで報告されていない様々な alternative splicing によるバリエントが存在することが明らかとなった。mOrc1 は第 5 エクソン内部の 105 塩基がイントロンとして欠失し、35 アミノ酸短くなったバリエント (mOrc1B) がクローニングされた。mOrc2 に関しては第 2 エクソンをスキップする mOrc2B、mOrc3 については第 14 エクソンの 5' 側のスプライス部位が 3 塩基シフトした結果、1 アミノ酸を欠失する mOrc3B がクローニングされた。そこで各 Orc バリエントの mRNA の発現を RT-PCR 法により検出したところ、初期発生や組織及び細胞周期特異的に多彩な発現分布を示すことを見出した。mOrc1B は胸腺で特異的に発現しており、mOrc1B を認識できる抗体でそのタンパク質の胸腺内での発現が確認された。また一過性過剰発現系を用いてタンパク質の生化学的挙動を解析した。ヘテロクロマチン上に存在することが報告されている mOrc1A は 2M 塩抽出画分に溶出したが、mOrc1B は溶出されなかった。さらに免疫組織化学的手法により各タンパク質の細胞内局在を検討したところ、細胞質に局在した mOrc1B 以外は核内に検出された。点変異

体を用いた解析から、mOrc1Bに欠失している配列内に核移行シグナルが存在することを明らかにした。最近、Orc1タンパク質は細胞周期によって発現量が変動する不安定なタンパク質であり、ポリユビキチン化され、プロテアソームにより分解されるという報告がなされた。そこでmOrc1AおよびmOrc1Bがプロテアソームにより分解されるかどうかを検討した。その結果、mOrc1Aはプロテアソーム阻害剤の添加により安定化したのに対し、mOrc1Bの発現量は変化せず分解されなかった。しかもこのmOrc1Bに欠失する配列には脊椎動物以上に保存された核移行シグナルおよびリン酸化のコンセンサス配列が存在することを見出した。そこでこのリン酸化の基質となりうる276番目のセリン残基をアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸に置換した変異体のプロテアソームによる分解への影響を調べたところ、リン酸化されないアラニンの変異体は変化がみられなかったが、リン酸化状態を模倣したアスパラギン酸あるいはグルタミン酸置換変異体の分解は抑えられた。つまり、この276番目のセリン残基のリン酸化によってマウスOrc1サブユニットの分解が制御されていることが示唆された。以上の結果からOrc1サブユニットの制御機構は脊椎動物で保存されており、一方で節足動物であるショウジョウバエや単細胞真核生物である出芽酵母では異なるOrc1サブユニットの制御および再複製抑制の機構が存在すると考えられた。

[総括]

哺乳類細胞の複製前複合体の制御機構を解明するために、マウスのOrcサブユニットのcDNAをクローニングし、機能解析を試みた。その結果、マウスOrc1-3(mOrc1A, 2A, 3A)にalternative splicingによって生じるvariant(mOrc1B, 2B, 3B)が存在することを見出した。mRNAの発現をRT-PCR法により確認したところ、mOrc2B, 3Bは様々な組織で発現が検出され、それぞれmOrc2A, 3Aと類似の発現パターンを示した。また組織によってサブユニット間の発現量に差が見られた。一方、mOrc1Bは胸腺で顕著に発現が見られ、特異的抗体によるタンパク質の解析によりマウス胸腺由来の細胞抽出液中にmOrc1Bのシグナルが実際に検出された。さらにmOrc1Bを用いた解析から、mOrc1Aの中央領域には(1)核移行シグナル、(2)脊椎動物間で保存されたCDKによるリン酸化部位、(3)orc1サブユニットのプロテアソームによる分解に必要な領域、が存在することを明らかにした。すなわち、高等真核生物ではOrc1のスプライシングによる機能制御が細胞の増殖および発生、分化の調節に関与していることが考察された。

論文審査の結果の要旨

哺乳類細胞の複製前複合体の制御機構を解明するために、マウスのOrcサブユニット(mOrc)のcDNAをクローニングし、機能解析を試みた。その結果、mOrc1A, 2A, 3Aにalternative splicingによって生じるvariant(mOrc1B, 2B, 3B)が存在することを見出した。mRNAの発現をRT-PCR法により確認したところ、mOrc2B, 3Bは様々な組織で発現が検出され、それぞれmOrc2A, 3Aと類似の発現パターンを示した。また組織によってサブユニット間の発現量に差が見られた。一方、mOrc1Bは胸腺で顕著に発現が見られ、特異的抗体によるタンパク質の解析からも胸腺組織内で検出された。さらにmOrc1Bの解析を通じて、mOrc1Aの中央領域には、(1)核移行シグナル、(2)脊椎動物間で保存されたCDKによるリン酸化部位、(3)Orc1サブユニットのプロテアソームによる分解に必要な領域、が存在することを明らかにした。これらのことから高等真核生物では、Orc1のスプライシングによる機能制御が細胞の増殖および発生、分化の調節に関与していることを示唆している。

以上のように本研究は哺乳類細胞のDNA複製に関して重要な知見を得ており、癌研究その他の基礎となって医学に貢献するものであり、学位の授与に値すると考えられる。