

Title	Replisome progression complex links DNA replication to sister chromatid cohesion in Xenopus egg extracts
Author(s)	田中, 博志
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/54440
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

姉妹染色体の接着はゲノムを均等に分配するために重要な機構だが、接着が複製中にどのように形成されるかについてはほとんど明らかになっていない。出芽酵母において同定された接着に関わる因子の中には DNA ポリメラーゼ α の結合タンパク質である Ctf4 や、複製チェックポイント因子である Tof1、Csm3、Mrc1 など DNA 複製に関わる因子が存在する事が示されている。そこでこれらのタンパク質の機能を、アフリカツメガエル卵無細胞系を用いて解析し、複製の進行と接着形成との関わりを明らかにしようとした。

Ctf4、Tof1、Csm3、Mrc1 の高等動物における相同遺伝子はそれぞれ AND-1、Tim1、Tipin、Claspin であり、Tim1 と Tipin は複合体を形成する。これらの因子は複製開始前に染色体へ結合し始め、複製の進行と共に染色体から解離するという挙動を示した。さらに詳細に調べると AND-1 と Tim1-Tipin、Claspin の染色体結合には相互依存性はないが Claspin の染色体結合には Tim1-Tipin が必要なこと、これらの因子が全て複製開始因子である Cdc45 に依存して染色体へ結合することがわかった。また複製中の染色体結合タンパク質を免疫沈降したところ AND-1 と Tim1-Tipin が複製装置を構成する Cdc45 と共沈降したことから、AND-1 と Tim1-Tipin が複製装置と結合している事がわかった。しかし卵抽出液からそれぞれの因子の免疫除去を行っても顕著な複製活性の阻害は見られなかった。さらに DNA ポリメラーゼを阻害した時の複製チェックポイント活性を調べたところ、AND-1 は複製チェックポイントにも関わらなかったが、Tim1-Tipin と Claspin はどちらも複製チェックポイントの活性化に関わることを確認した。

次に免疫除去卵抽出液を用いて複製後に凝集した姉妹染色体間の距離を測り接着形成を調べた。AND-1 免疫除去卵抽出液では、部分的に姉妹染色体が離れた異常な接着が生じていた。この接着異常は組換え AND-1 タンパク質を複製開始前に免疫除去卵抽出液へ加えることで回復したが、複製後に加えても回復しなかった。これらの結果は AND-1 が複製中に存在する事が接着形成のために必要であることを示している。一方 Claspin の免疫除去卵抽出液では顕著な接着異常は見られなかったが、Tim1-Tipin 免疫除去卵抽出液ではわずかに姉妹染色体間の距離が広がった部分が観察された。そこで AND-1 と Tim1-Tipin を同時に卵抽出液から除去したところ接着形成が完全に阻害され、ばらばらに解離した姉妹染色体が観察された。これはコヒーシンのサブユニットのひとつである Smc3 を免疫除去した場合と同等だったが、AND-1 と Tim1-Tipin を除去してもコヒーシンの染色体結合には影響はなかった。

以上の結果は、AND-1 や Tim1-Tipin は複製装置の一部を構成しており、DNA 複製には直接関わらないが、あらかじめ染色体に結合しているコヒーシスが接着を形成するために複製と連動して働いていることを示している。また、AND-1 と Tim1-Tipin の両方の機能が完全な接着形成に極めて重要であることが示唆された。近年、出芽酵母においてもこれらの因子が複製装置に含まれている事が明らかになり、複製フォーク上で接着形成に関わるこれらの因子が働く事は、真核生物に共通した機構であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

細胞は増殖する過程で完全なゲノム情報を娘細胞に受け継がせるため、さまざまな機構を備えている。姉妹染色体の接着は、DNA 複製によって生じた姉妹染色分体を染色体分配の直前までつなぎ止めておく、ゲノムを娘細胞に均等に分配するための中心となる機構である。この接着にはコヒーシンと呼ばれるリング状のタンパク質複合体が関与しており、複製装置とコヒーシンの何らかの相互作用が、接着形成と DNA 複製の共役に関わっていると考えられているが、その実体は明らかでなかった。田中博志君は、アフリカツメガエル卵無細胞系を用いて、複製の進行と接着の成立に関わる複製装置の因子の同定を試みた。その結果、酵母からヒトまで高度に保存されている AND-1 と Tim1-Tipin が複製装置の成分であり、DNA 複製に直接関わらないが、複製と連動してあらかじめ染色体に結合しているコヒーシスが接着を

【8】

氏名	田中博志
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 23337 号
学位授与年月日	平成 21 年 9 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	Replisome progression complex links DNA replication to sister chromatid cohesion in <i>Xenopus</i> egg extracts (姉妹染色体接着の形成における複製フォーク結合タンパク質の役割)
論文審査委員	(主査) 教授 滝澤 温彦 (副査) 教授 篠原 彰 招へい教授 原口 徳子 教授 升方 久夫

形成するために働いていることを発見した。また、AND-1 と Tim1-Tipin 両方の機能が完全な接着形成に極めて重要であることを初めて明らかにした。これらの成果は、出芽酵母などで得られた結果と合わせて考えると、複製装置の成分が姉妹染色体接着に普遍的に関与する事を示したものと言える。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。