



Title	Studies on the proteins involved in the initiation process of archaeal DNA replication
Author(s)	秋田, 眞季
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57741
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	あき た まさ き 秋 田 眞 季
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 9 4 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学 位 論 文 名	Studies on the proteins involved in the initiation process of archaeal DNA replication (アーキアのDNA複製開始に関与するタンパク質因子の研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 田中亀代次 (副査) 教 授 石野 良純 教 授 野島 博 教 授 升方 久夫

論 文 内 容 の 要 旨

細胞の遺伝情報である染色体 DNA を過不足なく正確に複製し、娘細胞に均等に分配する過程は、細胞が正常に増殖するために必要不可欠である。そのため DNA 複製は、生命にとって極めて重要なプロセスであり、特に厳密に制御される DNA 複製の開始は複雑な分子機構の基で進行する。

真正細菌および真核生物の DNA 複製研究により、DNA 複製開始に関与する様々な因子が同定され、両者は、進化的に異なる系統の DNA 複製装置および開始機構を持つ事が明らかとなっている。真正細菌では、ATP 結合型の DnaA が複製起点上で多量体形成し、複製開始起点に隣接する DUE (DNA unwinding element) 部位での融解を引き起こし、そこに DnaB ヘリカーゼが導かれる。一方、真核生物では、Cdt1, Cdc6, ORC (Orc1-6) 蛋白質が、ATP 依存的な MCM (Mcm2-7) ヘリカーゼタンパク質の複製起点への誘導に関与し、ORC および Cdc6 は複製起点の認識を、Cdt1 は MCM の複製起点への誘導を担っていると考えられている。Cdc6 や ORC のサブユニットタンパク質は、ATP 結合や加水分解を行う AAA+ドメインを有し、それらの ATPase 活性が複製開始制御にとって重要な役割を担うことを示す報告は出つつあるが、その詳細な分子機構については未だ解明されていない。

著者は、第3の生物であるアーキア (古細菌) の DNA 複製開始機構に注目し、超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* をモデル生物に用いて研究を行った。これまでの研究により、アーキアの DNA 複製因子の多くのものが真核生物は DNA 複製因子に類似していることが明らかとなっており、アーキアの DNA 複製開始機構は、複雑化した真核生物の DNA 複製開始反応をより単純化したものと予想されるので、アーキアは DNA 複製反応を理解する上で優れたモデル生物となり得ると考えた。*P. furiosus* は、環状の染色体上に DNA 複製起点(*oriC*)を一カ所もち、*oriC* 領域には ORB (Origin Recognition Box) と呼ばれる繰り返し配列が存在する。また、*P. furiosus* の DNA 複製開始因子は、真核生物の Cdc6 と Orc1 に配列上の類似性を有し、*oriC* に特異的に結合するタンパク質と、Mcm サブユニットに配列類似性を有し、DNA ヘリカーゼ活性を有するタンパク質が一種類ずつ存在し、それぞれ Cdc6/Orc1、Mcm と呼ばれている。

著者は本研究において、*oriC* 配列上で起こる DNA 複製開始反応を分子レベルで明らかにするため、Cdc6/Orc1 タンパク質の生化学的な性質解析、及び DNA 複製開始反応の *in vitro* 再構成系の構築を行った。Cdc6/Orc1 は AAA+ドメインと WH ドメインからなるが、WH ドメインのみからなる変異タンパク質でも特異的に ORB 配列を認識して結合することを見出した。さらに AAA+ドメインも DNA に接触し、ヌクレオチドの存在により AAA+ドメイン部分の結合様式が変化す

ることを発見した。また、Cdc6/Orc1 の ATP 加水分解活性が、ORB 配列結合時に著しく抑制されることを発見した。結合様式の変化や ATP 加水分解能の抑制という Cdc6/Orc1 の性質は、DNA 複製開始制御機構の中で重要な役割を担うと考えられる。著者は次に、DNA 複製開始反応の *in vitro* 再構成系を構築し、それを用いて複製ヘリカーゼである Mcm の *oriC* 上への誘導反応を解析した。その結果、Mcm は Cdc6/Orc1 依存的に ORB 配列を有する DNA に導かれることを明らかにした。さらにこのアッセイ系において、ORB 配列に結合した Cdc6/Orc1 とは別に、フリーの状態でも Mcm と結合できる Cdc6/Orc1 が存在する場合に、その誘導効率が上昇したことから、Cdc6/Orc1 には複製起点を認識して結合するものと、Mcm との相互作用により Mcm を複製起点に誘導するものがそれぞれ役割分担して存在するという分子機構を提唱した。しかし、このアッセイ系において、Mcm が機能的なコンフォーメーションをとって複製起点に誘導されるという証拠は得られておらず、またこの Mcm 誘導反応は ATP の有無に全く影響を受けなかったことから、Cdc6/Orc1 への ATP 結合や加水分解が、Mcm の機能的ローディングにどのように関係するのかについては、結論できておらず、より細胞内に近いアッセイ系を構築してさらなる解析を行うという課題を提唱した。

論文審査の結果の要旨

秋田眞季君の研究は、DNA 複製開始の初期反応である複製開始点の認識・結合

とそれに続く DNA ヘリカーゼの結合反応機構を普遍的に理解しようとするものである。

原核細胞と真核細胞の中間に位置する高熱性古細菌に属する *Pyrococcus furiosus* の

真核生物 ORC (Origin recognition complex) に相当する Orc1/Cdc6 タンパク質を大腸

菌で発現精製し、DNA 結合反応や ATP による構造変化を詳細に解析した。さらに DNA

ヘリカーゼである Mcm タンパク質を精製し、Orc1 存在下での Mcm タンパク質の DNA 結合

を検出することに成功した。また異なる DNA 基質を用いた条件では、Orc1 による二重

鎖 DNA 開裂を検出した。これらの結果は、古細菌では真核生物型の Orc1, Mcm を持つに

もかわかわらず、原核生物タイプの複製開始初期反応が行われる可能性を示唆しており、

興味深い。以上の結果は、Gene to Cells 誌に受理されている。

秋田眞季くんは、非常に実直で研究に真摯に取り組み、真核生物でも原核生物でも得

にくい貴重な反応を検出することに成功した。まだ Preliminary な部分もあるが、総合的

に学位を授与するに十分な研究であると認める。