

( 続紙 1 )

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                             |    |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----|-------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 博士（生命科学）                                    | 氏名 | 中岡 秀憲 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | アフリカツメガエル卵抽出液を用いたCtc1-Stn1-Ten1 蛋白質複合体の機能解析 |    |       |
| <p>（論文内容の要旨）</p> <p>真核生物の染色体末端はテロメアと呼ばれ、5'-TTAGGG-3'を単位とする繰り返しDNA配列をもつ。末端複製問題により染色体複製を経るごとにテロメアは短小化するが、一部のがん細胞や生殖系細胞ではテロメラーゼと呼ばれる逆転写酵素がテロメア配列をもつ鋳型 RNA を用いて新規に 5'-TTAGGG-3'配列を付加することが知られている。テロメアの完全な複製にはテロメラーゼによって伸長された鎖の相補鎖をラギング合成する必要があると考えられるが、その合成機構の詳細については明らかでない。</p> <p>CTC1-STN1-TEN1 複合体（CST）はそれぞれのサブユニットに oligosaccharide/oligonucleotide binding fold (OB-fold)と呼ばれる構造モチーフをもつ一本鎖 DNA 結合蛋白質複合体である。CST はテロメアに局在し、末端保護機能を担うことが示されている一方、生化学的および遺伝学的解析から DNA ラギング合成を行う DNA ポリメラーゼ<math>\alpha</math>-プライマーゼに対する正の制御因子であることが知られている。</p> <p>本研究では CST による DNA ポリメラーゼ<math>\alpha</math>-プライマーゼ制御が染色体複製全体に必要なものであるのか、あるいはテロメアのような特殊な場所においてのみ必要とされるのかを明らかにするため、DNA 複製のモデル系であるアフリカツメガエル卵抽出液を用いた。まず、アフリカツメガエルの CST (xCST)を同定し、これが一本鎖 DNA 結合能をもつことと、テロメアに局在することを示した。xCST は卵抽出液中で再現される精子核の染色体複製において必須ではなかったが、一本鎖環状 DNA を鋳型とする新規 DNA 合成に関与することが明らかとなった。このモデル系では、xCST は DNA ポリメラーゼ<math>\alpha</math>-プライマーゼの鋳型 DNA への結合自体には影響しないこと、および DNA ポリメラーゼによるプライマーの伸長反応よりも、プライマーの合成もしくはその安定性に関与することを示唆する結果が得られた。</p> <p>本研究の結果から、xCSTは染色体複製全般に必要なではないものの、一本鎖DNAを鋳型とした新規DNA合成のような特殊なDNA合成反応において機能することが示唆された。テロメラーゼによるテロメア伸長を相補するラギング合成は、そのような例の一つとして考えられる。また、CSTがDNAポリメラーゼ<math>\alpha</math>-プライマーゼをDNA上にリクルートしてその活性を直接制御するという従来のモデルに加えて、プライマーの安定的維持を介した間接的な複製反応制御を行う可能性が提示された。</p> |                                             |    |       |

( 論文審査の結果の要旨 )

本論文は、「アフリカツメガエル卵抽出液を用いたCtc1-Stn1-Ten1蛋白質複合体の機能解析」と題され、第一章 序論、第二章 材料と方法、第三章 結果、および、第四章 考察からなる。第一章では、先ず、真核生物が線状染色体を持ち、その末端部分テロメアは染色体の安定な維持に必須であるが、細胞周期において、テロメアDNAがいかに複製されるのかは明らかではないことを指摘している。次に、申請者が在籍する研究室の先行研究によって同定された新規テロメアDNA結合蛋白質複合体Ctc1-Stn1-Ten1 (CST)複合体に注目し、その役割をアフリカツメガエル卵抽出液（以下、卵抽出液）を利用した試験管内複製系を用いて研究する意義を述べている。第二章において、研究手法を述べた後、第三章において研究成果を報告している。すなわち、先ず、アフリカツメガエルCST複合体の構成因子Ctc1, Stn1, Ten1をそれぞれコードする遺伝子を同定し、それらからリコンビナント蛋白質を調製後、これら3因子が複合体を形成し、哺乳類CST複合体同様、DNAに対する結合活性を有することを確認している。続けて、Stn1を特異的に認識するポリクローナル抗体を作成し、本抗体を用いて卵抽出液よりStn1を免疫除去できることを示し、Stn1免疫除去卵抽出液は、対照卵抽出液に比較して、カエル精子由来クロマチンの複製反応には欠損がない一方、環状1本鎖DNAであるM13ファージDNAを鋳型としたDNA合成反応が著しく低下していることを報告している。以上の結果より、第四章においては、CST複合体が一般的な複製因子として複製反応全般に機能するのではなく、テロメアDNAのように、複製フォーク形成を伴わない1本鎖DNAを鋳型としたDNA合成に必要な因子であることを議論している。以上の成果は、CST複合体がテロメアにおいて果たす役割を明らかにしたのみならず、CST複合体の一般的な機能を示唆するものであり、真核生物DNA複製機構のさらなる理解に大きく寄与するものである。従って、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

平成24年2月3日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：                      年                      月                      日