

# 博士論文審査報告書

氏名	林 晃世 (ハヤシ アキヨ)
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	博理第 9 2 号
学位授与報告番号	甲第 2 6 2 号
学位授与年月日	平成 2 8 年 3 月 2 2 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
論文題目	DNA 複製時に機能する CRL4 <sup>Cdt2</sup> によるユビキチン化必須因子の解析
論文審査委員	(主査) 教授 阪口 雅郎 (副査) 教授 樋口 芳樹 (副査) 教授 西谷 秀男 (副査) 教授 菅澤 薫 (神戸大学バイオシグナル研究センター)

## 1. 論文内容の要旨

DNA 複製時に働く CRL4<sup>Cdt2</sup> ユビキチンリガーゼは、多数の細胞周期制御因子のユビキチン化・分解を通して、ゲノム安定性維持に重要な役割を担っている。CRL4<sup>Cdt2</sup> によるユビキチン化は PCNA 依存的であり、S 期のクロマチン上でのみおこる。この時、PCNA と基質上の PCNA 結合モチーフ (PIP box) を介した結合が必須であることが示されてきた一方で、S 期クロマチン特異的な活性化機構は不明なままである。本研究では、CRL4<sup>Cdt2</sup> によるユビキチン化の分子機構を明らかにする目的で、PCNA と DNA の要求性に焦点をおき、精製タンパク質を用いた *in vitro* 再構成系で解析を行った。

まず、ユビキチンリガーゼ CRL4<sup>Cdt2</sup> 複合体、ユビキチン活性化酵素 E1、ユビキチン結合酵素 E2 (UbcH5c)、基質として Cdt1、PCNA を精製した。これら精製タンパク質を用いてユビキチン化反応を行い、PCNA と DNA 両方の添加が基質 Cdt1 のポリユビキチン化を促進することを明らかにした。さらに、環状 DNA ビーズを用いて、基質ユビキチン化が DNA に結合した PCNA 上でおきていることを確かめた。これらの結果は、CRL4<sup>Cdt2</sup> による基質ユビキチン化に DNA に結合した PCNA が必要十分であることを示している。また、プルダウンアッセイにより、DNA に結合した PCNA 上に基質 Cdt1 及び CRL4<sup>Cdt2</sup> が集合することを確認し、新たに、CRL4<sup>Cdt2</sup> は基質なしでも単独で DNA 上の PCNA に結合することを見出した。

以上のように、本研究では、CRL4<sup>Cdt2</sup>によるユビキチン化機構の生化学的解析の基盤を確立し、そのユビキチン化に DNA と PCNA が要求されることを最小単位で初めて証明した。これは CRL4<sup>Cdt2</sup>が細胞周期の S 期のみ機能する制御のために重要な分子機構であると考えられる。

## 2. 論文審査結果

細胞周期において、遺伝情報の複製と分配を正確に遂行するために、ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質の特異的な分解系が重要な働きをしている。DNA 複製時に機能する CRL4<sup>Cdt2</sup> ユビキチンリガーゼは、PCNA 依存的に S 期のクロマチン上でのみ働き、Cdt1 をはじめとする基質の分解にあずかる。Cdt1 は、G1 期において DNA 複製開始前複合体の形成に必要な因子であるが、S 期開始後に分解されることにより DNA の再複製の抑制に関わっている。従って、CRL4<sup>Cdt2</sup> ユビキチンリガーゼは、S 期特異的に機能するように制御されなければならないが、どのような機構によるのかほとんど分かっていなかった。本論文では、ユビキチン化に必要な酵素および CRL4<sup>Cdt2</sup> 複合体、基質 Cdt1、そして PCNA を精製して *in vitro* 系を再構成し解析を行った。その結果、PCNA と DNA の両方の添加により、基質 Cdt1 のポリユビキチン化が促進されることを明らかにした。さらに、DNA 複製時の状態を模した PCNA が載った環状 DNA ビーズを用いて、基質のユビキチン化が DNA に結合した PCNA 上でおきていることを確かめた。また、新たに基質 Cdt1 及び CRL4<sup>Cdt2</sup> がそれぞれ単独で、DNA に結合した PCNA 上に集合することも見出した。以上のように、本研究では、CRL4<sup>Cdt2</sup>によるユビキチン化機構の生化学的解析の基盤を確立し、そのユビキチン化に最小単位として DNA と PCNA が要求されることを証明した。これらの成果は、CRL4<sup>Cdt2</sup>が S 期特異的に機能する機構を初めて生化学的に示した知見といえる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成 28 年 1 月 28 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判断した。