

論文審査の結果の要旨

氏名 山崎 聡志

本論文は2章からなり、第1章は序論としてDNA複製の制御機構およびRif1(Rap 1 interacting factor 1)に関するこれまでの知見について述べ、第2章ではRif1がゲノムワイドにDNA複製プログラムを制御していることについて述べられている。

これまで、哺乳類細胞、特にヒトにおける染色体DNA複製は、ゲノム一次配列上での制御を受けるとともに、細胞周期の時間軸上および核内での染色体空間的配置などの制御下にもある。これらの機構は複雑で、遺伝子発現、ヒストンのメチル化やアセチル化修飾、クロマチン構造、核内構造などにも影響されると考えられる。さらに外部環境の変化にも影響を受け、それに順応する可塑性も有している。DNA複製を行うレプリソームには様々な因子が関与していることが明らかとなっている一方で、複製プログラムの制御機構、すなわちゲノム全体でいつ、どこで、どのように複製が開始されるのか、その選択性やタイミングの制御メカニズム、因子については未だ不明な点が多い。山崎君は本研究においてヒトRif1による複製起点の選択性やタイミングなどDNA複製プログラム制御の可能性について検討を行い、Rif1が哺乳類細胞におけるDNA複製開始の部位とタイミングをゲノムワイドで規定する重要な因子であることを明らかとした。

第2章1～2項では、Rif1タンパク質の細胞内局在、siRNAによるRif1発現抑制(以下Rif1 KD)解析について述べている。第2章3項では、Rif1 KD下でDNA複製に関与する因子に注目し解析を行い、DNA複製ヘリカーゼであるMCM複合体のMCM2 Ser53、MCM4 Ser6 Thr7部位(Cdc7キナーゼによりリン酸化される領域)のリン酸化が顕著に増加していることを確認している。また、このリン酸化の増強はS期(複製期)の初期にすでに起こっていることを同調実験から示し、更にMCM複合体の強いリン酸化が確認されるS期初期に、Cdc45やPCNAなど他の複製開始に重要な関連因子のクロマチンローディングが増強されることを明らかとした。第2章4～5項では、Rif1 KDが転写プロファイルに影響を与えると述べて、その一因であるp21のタンパク質発現の増加が細胞周期G2/M期の進行に影響を及ぼすとしている。第2章6項では、DNA複製とRif1との関連性について詳細に解析を行っている。BrdU免疫染色による解析から、Rif1 KDにより核内で複製される領域および、タイミングが顕著に変動することを見いだした。また、複製フォークの速度については1.7倍程度速くなり、隣接している複製起点間の距離は大きくなると述べている。更に、ゲノムワイドな複製タイミング解析で、DNA複製がメガベース単位で複製タイミングドメインを形成することを示している。またこの解析からRif1 KDにより、コントロールでS期後期に複製される領域が初期複製へと変動す

る複製ドメインの逆転や分割されていた複製ドメインが一つに統合されるドメイン融合など特徴的なタイミングの変化が多く観察された。第2章7項では、細胞分画解析より Rif1 がクロマチンのみならず核骨格にも強く結合していることを証明し、Halo アッセイから Rif1 がクロマチンループ構造の構築に重要な因子であることを発見した。最後の考察では、Rif1 の DNA 複製における役割として、核骨格にて染色体 DNA の束を繋ぎ止め、複製ドメイン構造およびそのタイミングを維持する働きを担っていると論じている。また Rif1 KD 時には、クロマチンループ構造の増大（染色体核内配置の転換）が生じ、それに起因して活性化複製起点の減少と複製フォーク速度の増加が生じたと考察している。

なお、本論文第2章の一部で、石井愛、西藤泰昌らとの共同研究があるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。