

Title	Regulation of DNA replication origins by chromatin structures
Author(s)	Hayashi, Makoto
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/23451">http://hdl.handle.net/11094/23451</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名	林 眞 理
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 2 2 5 6 6 号
学位授与年月日	平成 20 年 12 月 18 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	Regulation of DNA replication origins by chromatin structures (クロマチン構造による複製開始点の制御機構の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 升方 久夫 (副査) 教授 滝澤 温彦 教授 篠原 彰 招へい准教授 近重 裕次

#### 論文内容の要旨

生物にとって自身の遺伝情報を担う DNA を一細胞周期につき一度だけ正確に複製することは必須の反応である。DNA 複製は複製開始点と呼ばれる染色体上の特定の部位から開始し、複数のタンパク因子の段階的な結合によりその活性を制御されている。真核生物の長大な染色体上には複数の複製開始点が存在し、それぞれの開始点活性化のタイミングは開始点ごとに制御されると考えられている。タンパク因子の開始点結合は周辺の染色体構造によって大きく影響・制御を受けることが予想されるが、その詳細は不明であった。その制御機構解明のためには様々な染色体構造をとる領域での複製開始点の分布や挙動に関する情報が必須であったが、研究開始当初は私がモデルとする分裂酵母を含むほとんどの生物で限られた複製開始点しか同定されていなかった。分裂酵母は高等真核生物から保存された複製因子群、ならびに高次クロマチン構造の形成に関わる因子群をもち、染色体構造による複製制御を研究する上で非常に有益なモデル生物である。そこでまず私は分裂酵母の全ゲノム領域を対象とした複製開始点の網羅的同定をおこなった。

複製開始点では G1 期に ORC, MCM からなる複製前複合体(pre-RC)が形成される。続く S 期に CDK, DDK という 2 つの細胞周期依存的キナーゼの働きでさらにいくつかの因子が結合し、pre-RC が活性化されることで複製が開始する。そこで分裂酵母全三本の染色体を網羅する DNA タイピングアレイを用いて、①pre-RC の構成因子である ORC, MCM の G1 期染色体上での局在を同定する、②BrdU による複製新生鎖標識により S 期初期に複製した領域を同定する、という 2 つの網羅的手法を用い複製開始点の局在と挙動を解析した。その結果興味深いことに、凝集した構造をとるヘテロクロマチン領域にはユークロマチンと比較して複製開始点が非常に密集して分布していることが明らかとなった。ヘテロクロマチンは真核生物に普遍的に見られる染色体構造で、複製や転写、組み換えに対して抑制的に作用すると考えられていたが、驚いたことに一部のヘテロクロマチン領域(CEN, MAT)では複製が S 期初期に活性化されていた。そこで定説と一見矛盾したこの反応の分子機構の解明を目指して研究を進展させたところ、ヘテロクロマチンの構成因子 Swi6/HP1 の破壊株では CEN, MAT 特異的に S 期初期に複製を開始できないことを発見した。これと一致して Swi6/HP1 破壊株では pre-RC 形成後、Sld3 という複製因子の開始点結合がこれらの領域で低下していた。Sld3 の開始点結合にはリン酸化酵素 DDK が必要であるが、その制御ユニット Dfp1 は HP1 結合モチーフを

もつ。そこで複製制御におけるこのモチーフの重要性を解析したところ、このモチーフを介して Dfp1 が Swi6/HP1 と結合すること、およびモチーフの点変異株では CEN, MAT の複製が遅れることを発見した。さらに Swi6/HP1 破壊株において人為的に Dfp1 を CEN, MAT へ局在させたところ複製の欠損が回復した。これらの結果から、Swi6 が DDK をリクルートすることで CEN, MAT の複製開始点を活性化するというモデルを提唱した。この研究により、DDK の複製開始点への作用が染色体構造によって制御されうること、そしてヘテロクロマチン構成因子がこの過程を促進することで複製を活性化するという新しい制御機構の存在を明らかにした。

#### 論文審査の結果の要旨

生物の遺伝子情報を担う染色体 DNA は細胞周期で全体がただ1回だけ正確に複製され、細胞分裂時に娘細胞に均等に分配されることが生命の継承に必須である。膨大な情報を含む染色体 DNA を限られた時間内に複製するため染色体上には多数の複製開始点が存在し、それぞれが固有の時期に複製を開始するように細胞周期と染色体構造によって制御されている。

申請者は、染色体 DNA と結合タンパク質が形成するクロマチン構造によって複製開始が制御されるしくみを明らかにする目的で研究を行った。真核生物のモデル系として有用な分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いて、染色体上のすべての複製開始点を網羅的に同定することに成功し、S 期初期複製開始点と後期複製開始点とが広範囲の染色体ドメインとして制御されていることを示した。さらに一般に後期に複製するとされるヘテロクロマチン形成領域のセントロメアと性決定領域 (mat) は初期に複製するのに対し、テロメアは後期に複製し、ヘテロクロマチン特異的制御の存在を示唆した。ヘテロクロマチンでありながら初期に複製する機構を解析した結果、抑制的ヘテロクロマチン構造の主要なタンパク質である HP1/Swi6 が複製開始制御キナーゼ DDK の活性化サブユニットと相互作用し、DDK をセントロメアと mat 領域にリクルートすることが複製開始を促進するという分子メカニズムを解明した。これらの結果はきわめて新規性が高くクロマチン構造による複製開始制御を理解する上で重要性がある。これらの結果を学位論文「クロマチン構造による複製開始点の制御機構の解析」としてまとめた。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分に価値があるものと認める。