The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Mcm10 plays an essential role in origin DNA unwinding after assembly of the CMG components
Author(s)	Kanke, Mai
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/24953
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【47】

氏　　名	菅　家　　舞（かん け まい）
博士の専攻分野の名称	博　士（理学）
学 位 記 番 号	第　２５８２８　号
学位授与年月日	平成25年３月25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	Mcm10 plays an essential role in origin DNA unwinding after assembly of the CMG components （Mcm10 は CMG 複合体集合後に複製開始点開裂に必須の役割を果たす）
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

論 文 内 容 の 要 旨

＜背景＞

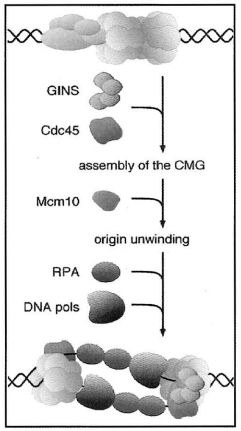
細胞が増殖するためには，遺伝情報を担うDNAを正確に複製する必要がある。真核生物のDNA複製はMcm2-7ヘリカーゼの複製開始点への結合とその活性化を経て開始する。Mcm2-7はG1期に複製開始点にロードされ複製前複合体(pre-replication complex: pre-RC)を形成するが，この段階ではヘリカーゼとして不活性である。Mcm2-7ヘリカーゼの活性化には，S期にCDK, DDKキナーゼによる複製因子のリン酸化に依存してGINS, Cdc45などの因子がMcm2-7に結合することが必要である。GINS, Cdc45は複製フォークにおいて，Mcm2-7と共にCMG複合体(Cdc45-Mcm2-7-GINS)を形成している。CMG複合体は *in vitro* でヘリカーゼ活性を示すことから，複製ヘリカーゼの核であると考えられている。興味深いことに，pre-RCのMcm2-7はdouble hexamerが二重鎖DNAに結合していると報告されているが，S期にヘリカーゼとして機能するときはsingle hexamerが一本鎖DNAに結合していると考えられている。GINS, Cdc45はこの変化を引き起こす有力な候補因子であるが，実際に細胞内でGINS, Cdc45の結合によってヘリカーゼの活性化が起こるのかは明らかでない。

Mcm10は真核生物で保存された因子であり，Mcm2-7と非常に強い遺伝学的・物理的相互作用を持つ。このことから，Mcm10はMcm2-7と密接に関連して機能する可能性が考えられる。Mcm10の中央領域には保存されたzinc finger motifがあり，これは出芽酵母においてMcm10の機能に必須であり，Mcm10同士の相互作用に必要であることが報告されている。これまでDNA複製に果たすMcm10の機能は複数報告されているが，解析方法や生物種によって異なる結果が得られており，Mcm10がDNA複製においてどのような必須機能を果たしているのかについては明確な答えが得られていないと言える。私は遺伝学的解析に優れたモデル生物である分裂酵母を用い，複製開始におけるMcm10の機能を詳細に解析した。

＜結果・考察＞

複製開始に果たす Mcm10 機能の解析

複製開始における Mcm10 の必須機能を明らかにするために，分裂酵母において新規の条件誘導的蛋白質分解系(Auxin-Inducible-Degron: AID)を応用して Mcm10 を条件誘導的に細胞から除去する系を構築し，Mcm10 を除去したとき複製開始反応がどの段階まで進むのかを詳細に解析した。Mcm10 を細胞から除去すると未複製 DNA を持つ細胞が蓄積し，Mcm10 は複製の初期段階で必要であることが示唆された。この条件下で，複製ヘリカーゼの核である CMG 複合体の構成因子が複製開始点に結合しているかをクロマチン免疫沈降法(ChIP)によって解析した。その結果，Mcm2-7, GINS, Cdc45 は複製開始点に結合し，それらは複合体を形成していることが分かった。しかしながら，一本鎖 DNA に結合する RPA や，DNA Pol α，Pol δ の複製開始点への結合は大幅に減少していた。これらの結果は CMG 構成因子が開始点に集合しているにも関わらず開始点 DNA の二重鎖開裂は起こっていないことを示している。よって，



Mcm10 は開始点に集合した CMG に作用して開始点開裂を促進すると考えられ，これまで報告されていなかった DNA 複製開始における Mcm10 の新たな機能が明らかとなった。

Mcm10 の zinc finger motif の機能解析

Mcm10 のどのような機能が複製開始点開裂に必要なのかを明らかにするために，Mcm10 の zinc finger motif に着目した。この motif に変異を導入した $Mcm10^{ZA}$ 蛋白を分裂酵母内で発現させたところ，興味深いことに，$Mcm10^{ZA}$ は複製開始点に結合したが RPA の結合を誘起できなかった。yeast two-hybrid 解析の結果，野生型 Mcm10 は Mcm2-7 サブユニットや GINS サブユニット，Mcm10 と相互作用したのに対し，$Mcm10^{ZA}$ は Mcm10 同士の相互作用が特異的に低下していた。以上の結果から，Mcm10 は複製開始点上で多量体として Mcm2-7 や GINS の複数分子と相互作用することによってその構造を変化させ，Mcm2-7 の double hexamer から single hexamer への変換を引き起こすのではないかと考えている。

論文審査の結果の要旨

細胞が分裂して増殖する過程において、遺伝子情報を担う染色体 DNA を正確に１回だけ複製し娘細胞に均等に分配することが生命の継承に必須である。このため DNA 複製の基本的機構はあらゆる生物で普遍性が見られる。真核生物では DNA が細胞周期の S 期にだけ複製するよう厳密に制御されており原核生物にはない多くのタンパク質因子が複製に必須の役割を持つようになっている。とりわけ、DNA ポリメラーゼに鋳型一本鎖 DNA を供給する DNA ヘリカーゼの機能制御は何段階にも制御されており、この制御機構の解明は真核生物複製研究の中心的課題のひとつである。

申請者は、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、複製開始反応における新規の反応段階を発見した。真核生物の複製ヘリカーゼの基本酵素活性を担う Mcm2-7 (Mcm2, 3, 4, 5, 6, 7 からなる６量体)は、G1 期に複製開始点に結合する段階ではヘリカーゼ活性を発揮しない。S 期に入り２つのタンパク質リン酸化酵素（CDK キナーゼ、DDK キナーゼ）と複数の因子に依存して GINS 複合体と Cdc45 タンパク質が Mcm2-7 に結合して CMG 複合体を形成しヘリカーゼが活性化される。CMG 複合体が複製開始点 DNA を開裂し、一本鎖結合タンパク質(RPA)と DNA ポリメラーゼが結合して複製を開始すると考えられてきた。申請者は、Mcm2-7 と物理的・遺伝学的相互作用が強い Mcm10 タンパク質の複製開始における役割を明らかにするため、植物ホルモンオーキシン依存的にタンパク質を迅速・高効率に分解する auxin-degron 系を分裂酵母で構築し、Mcm10 タンパク質を通常の 0.5%以下に減少させることに成功した。Mcm10 除去細胞内では、Mcm2-7 に GINS, Cdc45 が結合した CMG 複合体が形成されていたが、複製開始点での DNA 開裂を示す RPA が結合しなかった。さらにこの機能には、Mcm10 の保存された中央領域 Zinc-finger モチーフが必要であることを示した。これらの結果は、S 期での CMG 複合体形成は複製開始に十分ではなく、複製開始点 DNA 開裂には Mcm10 による新規の反応段階が必要であることを示すものであり、複製開始機構の研究に重要な貢献をする発見である。これらの成果を学術論文“Mcm10 plays an essential role in origin DNA unwinding after assembly of the CMG components”として The EMBO Journal 誌(2012)に発表し、学位論文「Mcm10 は CMG 複合体集合後に複製開始点開裂に必須の役割を果たす」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。