



Title	Functional analysis of the replication factor, Mcm10, in the initiation of chromosomal DNA replication in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Author(s)	Watase, Joji (George)
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/26246
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨

[題 名] Functional analysis of the replication factor, Mcm10, in the initiation of chromosomal DNA replication
in *Saccharomyces cerevisiae*
(出芽酵母の染色体 DNA 複製開始反応における Mcm10 の機能解析)

学位申請者 渡瀬 成治

細胞が増殖するためには、自己の遺伝情報をコードする DNA を正確に複製し、その複製された DNA を均等に娘細胞に受け継ぐことが必要である。真核生物の場合、DNA 複製は細胞周期の S 期に一度だけ起きるように制御されている。

真核生物の複製開始は、M 期の終わりから G1 期にかけて染色体上に多数存在する複製開始点に複製ヘリカーゼである Mcm2-7 複合体がロードされ、複製前複合体 (pre-RC) が形成されることから始まる。その後、Dbf4-dependent kinase (DDK) 及び Cyclin-dependent kinase (CDK) の活性化により、細胞が S 期に入ると Cdc45 及び GINS 複合体と呼ばれる複製因子が pre-RC の Mcm2-7 と結合し、CMG (Cdc45-Mcm2-7-GINS) 複合体が形成される。現在、この CMG 複合体が活性型複製ヘリカーゼの実体として考えられており、Mcm2-7 はヘリカーゼとして活性化する。ヘリカーゼ活性化後は、複製開始点の二本鎖 DNA が開裂し、DNA ポリメラーゼが呼び込まれることによって巨大な複製装置 (レプリソーム) が完成する。その後、レプリソームが複製フォークと共に DNA 上を進行することによって複製開始に至る。これまでに多くの複製開始因子が pre-RC 及び CMG 複合体形成に必要であることが報告してきた。その一方で、CMG 複合体形成後どのようにして複製フォークの形成が起きるのかその分子メカニズムはまだよく理解されていない。

Mcm10 は酵母からヒトまで保存された生存に必須なタンパク質で、複製開始反応に必要であることが知られている。しかし、Mcm10 の複製開始における具体的な機能については未だに議論の余地が残されていた。その原因の一つとして、これまで最も精力的に Mcm10 の機能解析が行われてきた出芽酵母において Mcm10 の機能を速やかに細胞内から除くことが可能な変異株が存在していないかったことが挙げられる。

そこで、私は当研究室で開発されたオーキシン誘導デグロン法と *mcm10-1* 温度感受性変異を組み合わせた新たなコンディショナル変異株 *mcm10-1-aid* 株を作製した。この株は植物ホルモンであるオーキシンを添加することで細胞内の Mcm10 が速やかに分解され、複製開始に著しい欠損を示す。そこで、Mcm10 の分解除去を行った際の複製開始における影響を調べたところ、CMG 複合体は形成されるものの複製開始点からは動いて行かないこと、また、複製開始点の開裂に欠損が生じていることが分かった。これらの結果は CMG 複合体の形成のみではヘリカーゼ活性化には不十分であり、その後 Mcm10 が関与するヘリカーゼ活性化のための新たなステップが存在していることを示唆している。さらに、Mcm10 は CMG 複合体構成因子の中で Mcm2 及び Mcm6 特異的に強く相互作用していることが分かった。Mcm10 が DNA 結合能を持ち合わせていることを併せて考えると、CMG 複合体の活性化プロセスにおいて、Mcm10 は DNA と Mcm2-7 の間の構造変換に寄与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (渡瀬 成治)	
	(職)
論文審査担当者	主査 教授 滝澤 温彦
	副査 教授 升方 久夫
	副査 教授 篠原 彰
	副査 准教授 (国立遺伝学研究所) 鐘巻 将人

論文審査の結果の要旨

真核生物の DNA 複製は染色体上に多数存在する複製開始点より開始し、多くの進化的に保存された複製因子が複製開始反応に関与している。複製開始の鍵となるプロセスは、G1 期に複製開始点へ装着された不活性な Mcm2-7 ヘリカーゼを S 期に活性型ヘリカーゼである Cdc45-Mcm2-7-GINS (CMG) 複合体へと変換することにある。CMG 複合体形成後、複製フォークは形成されるが、その過程の分子メカニズムはまだよく理解されていない。Mcm10 は真核生物で保存されている複製開始に必須な DNA 結合能を有するタンパク質であり、その機能を理解することは複製開始に至る分子メカニズムを知る上で重要であると考えられる。渡瀬君は、Mcm10 の機能を明らかにするために、出芽酵母を用いてオーキシン誘導デグロン法と *mcm10-1* 温度感受性変異を組み合わせた *mcm10-1-aid* 変異株を作成した。この変異株は、従来の Mcm10-1 等の変異株と異なり、オーキシン添加によって Mcm10 が分解除去されると複製開始に著しい欠損を示す。そこで、Mcm10 の分解除去を行った際の複製開始における複合体形成への影響をクロマチン免疫沈降法を用いて調べたところ、CMG 複合体は複製開始点上に形成されるものの複製開始点からは動いていないこと、またその原因は複製開始点の開裂に欠損が生じているためであることを強く示唆する結果を得た。さらに Mcm10 は CMG 複合体構成因子の中で Mcm2 及び Mcm6 と強く相互作用することが分かった。以上の結果は、CMG 複合体の形成後に Mcm10 を必要とするヘリカーゼ活性化のための新たなステップが存在することを示しており、Mcm10 は DNA と Mcm2-7 の間の構造変換に寄与している可能性が示唆された。これらの成果は、複製開始における Mcm10 の機能を解明し、真核生物の複製開始の分子機構解明に大きく寄与するものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。