



Title	Location and Characterization of Autonomously Replicating Sequences from Chromosome VI of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Author(s)	白髭, 克彦
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38886
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	白 髭 克 彦
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11242 号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Location and Characterization of Autonomously Replicating Sequences from Chromosome VI of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母第 VI 染色体上の自律的複製配列の配置と構造の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 寛 (副査) 教授 辻本 賀英 教授 杉野 明雄

論文内容の要旨

[目的]

真核生物の染色体複製は多数の複製起点より始まり、個々の複製起点は秩序正しく S 期の決められた時期に 1 回のみ複製を開始する。しかし、各複製開始点がどのような制御の元に秩序正しく複製を開始していくかという複製開始制御の分子機構については不明である。このような真核生物の染色体複製開始機構の全体像を解明するためには一本の染色体レベルで全ての複製開始点を単離、構造を詳細に解析し、それらの染色体上での役割を明らかにすることが必須である。出芽酵母の染色体は真核生物の中でも小さく、遺伝学的手法も確立しており、真核生物に共通の染色体構造、機能に関する解析を進める上で良い系である。さらに、出芽酵母では染色体と独立して、自律的に複製可能な配列 (ARS) が容易に単離出来、これらは染色体上でも複製開始点として機能していることが証明されている。しかし、出芽酵母においても、数個の ARS の構造解析がなされているのみで、一本の染色体レベルでの ARS の系統的な解析はなされていない。そこで、本研究では、真核生物染色体の複製開始機構の全体像を解明するという目的で、まず、出芽酵母の染色体の中でも、2 番目に小さい 280kb の第 VI 染色体について、全 ARS を単離し、その位置及び配列を決定し、全てについて詳細な機能領域の解析を行った。

[方法ならびに成績]

1) ARS 単離と位置の決定

酵母第 IV 染色体のセントロメア領域 CEN_4 と遺伝子マーカー LEU_2 を持つ ARS 単離、解析用ベクター pKS1 に第 VI 染色体の整列クローン群より得られた *EcoR* I (68個), *Hind* III (75個), *Xba* I (3個) 及び *EcoR* I-*Hind* III (1個) 断片をクローニングし、染色体の 82% の領域 (約 230kb) についてあますところなく、ARS 活性の測定を終了した。その結果計 9 個の ARS 断片を単離、それらの物理地図上での位置を決定し、ARS601 から 609 と命名した。

2) 複製の必須配列及び促進配列の同定

次に、各 ARS の塩基配列を決定した後、機能領域、必須領域を同定するために全 ARS 断片について欠失および、点変異導入プラスミドを作成、各プラスミドについて ARS 活性を測定した。従来、出芽酵母の ARS は、ARS 活性に必須である 11 塩基よりなるコア配列と、効率良い複製のために必要であるコア配列の 3' 側の 100 塩基対以上の配列から構成されていると指摘されてきた。しかし、我々の解析の結果、従来指摘されている構造を持つものは 5 つに過ぎず、コア配列の 3' 側 79 塩基対まで欠失させても効率良い複製が可能なのが 3 つ、二つのコア様配列の共同作用

によってARS活性が保持されているものが1つあり、ARSの構造が従来考えられていた以上に多様性に富んでいることが明かとなった。我々はこれら9つのARSが3'側の促進配列の長さにより2つの種類に分類し得ることを見いだした。

さらに、二本鎖DNAの安定性を予測するプログラムを用い、各ARS中のほどけ易い配列(局所的な解離の為に必要な ΔG を計算)を検索し、欠失プラスミドを用いた解析結果と比較したところ、一般的に複製の促進配列はコア配列の3'側でも5'側でも低い ΔG を持つ領域とおく一致しており、これらがDUE(DNA Unwinding Element)として機能していることが示唆された。

3) 複製開始点のマッピング

各ARSを含む制限酵素断片の複製中間体を二次元電気泳動法により解析したところ、ARS604, 608以外の全てのARSが複製開始点として機能していることが確認された。

[総括]

- 1) 9つのARSが出芽酵母第VI染色体の連続した230kbの領域から単離出来た。
- 2) 従来、考えられていた以上にARSの構造は多様性に富んでおり、コア配列の3'側の促進配列の長さによって、9つのARSは大きく2つのタイプに分類出来た。
- 3) 複製の促進配列については今までに様々な議論があったがそれらが、DUEとして機能していることが示唆された。すなわち、各ARSは異なる長さのDUEを効率良い複製の為に3'側のみならず5'側にも要求すると考えられた。
- 4) 9つのARSのうち7つのARSが複製開始点として機能していた。これらは平均して45kbに1つの割合で分布しており、電顕によって観察されたレプリコンの大きさと良く一致した。

論文審査の結果の要旨

染色体複製の開始は細胞周期の中心的過程であり、複製調節は細胞増殖調節の鍵をにぎっている。しかし、多数のレプリコンで構成される真核生物の染色体複製の開始とその調節の分子機構は殆んど分かっていない。白髭君はモデル生物として優れている出芽酵母を材料に1本の染色体の全ての複製開始点を同定し、構造と機能を解析して、染色体の複製開始の全体像を明らかにする研究をおこなった。

まず、280kbの第IV染色体の全連鎖DNA断片(平均7kb)をクローニング、自律的に複製する能力を測定して、9個の自律複製配列(ARS)を同定、染色体上の正確な位置を決定した。次に複製中間体の構造を解析する2次元電気泳動法を用いて、9個の内7個が染色体の複製開始点として機能することを明らかにした。さらに全てのARSについて複製開始に必須な配列と開始頻度を促進する配列の解析を行い、シス配列の不偏性と多様性を明らかにした。

1本の染色体の全ての複製開始点が決定されたのははじめてであり、この成果をもとに染色体複製とその調節の分子機構の研究の発展が期待できる。博士論文に値する研究であると評価できる。