The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Anatomy of the stimulative sequences flanking the ARS consensus sequence of chromosome VI in Saccharomyces cerevisiae
Author(s)	Mohammad, Bazlur Rashid
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39017
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、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

【1】

氏　　名	Mohammad Bazlur Rashid（モハマッド バズルー ラシッド）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11486　号
学位授与年月日	平成6年6月30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	Anatomy of the stimulative sequences flanking the ARS consensus sequence of chromosome VI in *Saccharomyces cerevisiae* （出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 第六染色体上に存在する自律複製配列（ＡＲＳ）の機能因子の解析
論文審査委員	（主査） 教授　辻本　賀英 （副査） 教授　杉野　明雄　　教授　品川日出夫

論文内容の要旨

「目　的」

真核生物の染色体は多数のレプリコンで構成され，それぞれ特定の部位（開始点）から複製を開始する。染色体の複製制御の分子機構を明らかにするため，酵母をモデル生物として複製開始点の構造と機能の研究が進んでいる。我々は出芽酵母において一本の染色体の複製とその制御の全体像を明らかにする目的で，第六染色体の全ての複製開始点を分離し，その構造と機能を解析している。

出芽酵母では複製開始点はプラスミドの自律複製を可能とする配列（ARS）として分離することが出来る。我々は第六染色体から9個のARS をクローニングしその染色体上の位置を決定すると共に，自律複製に必須な領域とそれに隣接する開始促進領域を決定した。一般に必須領域は11bpの既に報告されている ARS 共通配列（ACS）によく一致したが，促進配列はATに富むという以外に配列上の特徴はなく，ACS の相対位置も大きさもさまざまであった。特にそのいくつかは100－150bp の中に ARS の最大活性を発揮する情報が含まれていることが明らかになった。

このような単純な構造をもつARS はこれまで詳しく解析されていない。

一方Stillman らの研究から，開始点を識別する巨大蛋白複合体は ACS を核とする約50bpと特異的に結合することが判明している。このことは ACS の極近傍に複製開始に必要で充分な情報が存在することを示している。本研究はこのような複製開始点の構造的情報を塩基配列レベルで明らかにすることを目的に塩基置換による解析を，特に DNA の巻き戻し活性（DUE）に焦点を当てて行ったものである。

「方法ならびに成績」

ARS の最大活性に必要な塩基数がそれぞれ，101bp（ARS605），111bp（ARS607），155bp（ARS609）である3種のARS を選び，ヴェクター側の配列の影響を避けるため，周辺領域約300bp を含めて ARS 活性測定用のプラスミドに挿入し，解析に用いた。塩基置換変異は ACS をはさんで約200bp 領域について，系統的にXhol リンカーをPCR 法で導入した。また一部の領域については野性型の配列に相補的な配列によって置換した。これら多数の変異ARS を含むプラスミドの複製効率を分裂安定度により測定し，野性型と比較することによって，変異によって複製効

率が阻害される領域を決定した。つぎに開始促進配列の分子機構を解明するためその領域について単鎖ヌクレアーゼ感受性部位とその置換変異による変化の有無を塩基配列レベルで解析した。

先ずどの ARS についてもACS に進入する変異は ARS 活性を完全に消滅させ，ACS が配列特異的な必須配列であることを確認した。ついで，変異によって活性を10－30％阻害する促進領域を ACS の両側（ARS605）及び3' 側（ARS607）にそれぞれ3箇所同定した。面白いことに ARS609には促進配列は全く観察されなかった。

6個の促進配列中5個は野性型に相補的な配列では全く阻害されないことから配列非特異的で AT－rich な DUE としての機能が予想された。実際3種の ARS いずれにも単鎖ヌクレアーゼに高感受性の領域が観察された。しかし，塩基配列レベルで調べると，その領域は約150－200bp にわたって分布しており，最も感受性の強い領域は ACS から100bp 以上離れた ARS 活性に無関係な領域であることが判明した。そこで，促進領域の置換変異について詳細に検討するとARS605、607のおのおの一箇所について変異によって ACS とその近傍のヌクレアーゼ感受性が局所的に著しく変化を受けることが明らかになった。このことは ACS とその近傍の DUE としての高次構造が ARS 活性に重要であること，及びそれに対して周辺の促進配列が協調的に働いていることを強く示唆している。

「総　括」

(1) リンカーによる塩基置換変異によって，3種ARS の全てに，ACS が必須であること，又ARS605及び607にはそれぞれ3箇所の促進領域が存在することを明らかにした。ARS609には促進配列は観察されなかった。

(2) 6箇所の促進配列の内5箇所は野性型に相補的な配列による置換によって阻害されなかった。このことは促進配列がAT－rich な DUE として機能していることを示している。

(3) 全ての ARS に約150－200bp にわたって，単鎖ヌクレアーゼ（P 1）に高度感受性の領域が存在する。その中で，ACS とその極近傍の領域が，促進配列の2つの置換変異によって著しく変化した。すなわち，ACS の近傍の DUE としての高次構造が ARS 活性に重要であること及びそれに対して近傍の促進配列が協調的に働いていることを強く示唆している。

論文審査の結果の要旨

真核生物の染色体は多数のレプリコンで構成され，それぞれ特定の部位（開始点）から複製を開始する。しかし，個々の複製開始点の単離が困難なため，これらの構造および制御機構はあまり解析が進められていない。これに対し，出芽酵母では複製開始点をプラスミドの自律複製を可能とする配列（ARS）として分離することが出来るという利点があり，真核生物の中では例外的に，複製開始点の構造と機能の研究が進んでいる。

M.B.Rashidは，複製開始点の構造的情報を塩基配列レベルで明らかにすることを目的として出芽酵母の第六染色体より系統的に単離された，9個のARS のうち，最大活性に必要なDNA 領域の短い，3つのものについて塩基置換による解析を行ない，変異によって複製効率が阻害される配列を決定した。さらに，これらの配列の DNA の巻き戻し活性（DUE ）に焦点を当て，その領域について単鎖ヌクレアーゼ感受性部位とその置換変異による変化の有無を塩基配列レベルで解析した。

その結果，2つの ARS で，おのおの一箇所について，変異によってヌクレアーゼ感受性が局所的に著しく変化を受けることが明らかとなった。このことは複製開始点の巻き戻し配列（DUE）の高次構造が ARS 活性に重要であること，及び近傍の促進配列がお互いに協調的に働いていることを示している。

以上の業績は，今まで未知の問題であった，真核生物の複製開始点の詳細な構造を明らかにしたものであり，当大学院における医学博士に値するものと評価する。