

Title	Cell cycle specific association of fission yeast Mis5 protein, a member of MCM proteins, with a chromosomal replication origin
Author(s)	小川, 裕也
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41578
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	小 川 裕 也
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 0 8 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 6 月 30 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 生理学専攻
学 位 論 文 名	Cell cycle specific association of fission yeast Mis5 protein, a member of MCM proteins, with a chromosomal replication origin. (MCM ファミリーに属する分裂酵母 Mis5 蛋白質の細胞周期特異的な染色体複製開始点への結合)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 杉野 明雄 (副査) 教 授 小倉 明彦 助教授 滝澤 温彦 助教授 升方 久夫

論 文 内 容 の 要 旨

真核生物染色体 DNA の複製は 1 回の細胞周期に染色体全体を正確に倍加させるように複製開始の段階で制御されている。複製開始の制御機構には複製開始点を認識する ORC (origin recognition complex) をはじめ多数のタンパク因子が関与することが知られているが、とりわけ重要な役割を果たすと考えられているのが MCM (minichromosome maintenance) ファミリータンパクである。MCM タンパクは細胞周期特異的な細胞内での局在の変化や染色体との相互作用の変化によって S 期に一度限り DNA を複製させる機構に関与していると考えられる。

ORC, MCM タンパクをはじめ, DNA 複製開始時に働くと思われる多くのタンパクは真核生物において広く保存されている一方で, 出芽酵母以外の真核生物では複製開始点の構造に大きな違いがあると考えられている。そのため, 複製開始点の構造上, 高等真核生物と類似点が見られる分裂酵母の MCM タンパクの役割を明らかにすることは, 真核生物における染色体 DNA の複製開始機構を理解する上で大切であると考えられる。そこで, 今回, 私は分裂酵母 MCM ファミリータンパクの 1 つである Mis5 タンパクに対する特異的な抗体を作製し, Mis5 タンパクの細胞内局在と染色体 DNA との相互作用の細胞周期特異的な変化を解析した。

anti-Mis5 抗体を用いた間接蛍光抗体法の解析から, 分裂酵母 Mis5 タンパクは細胞周期を通じて核内に局在することが示された。核内における Mis5 タンパクの局在をさらに詳しく解析するために, 核を展開し染色体を広げたサンプルに対して anti-Mis5 抗体による免疫染色を行ったところ, Mis5 タンパクは細胞周期の G1-S 期の細胞にのみ染色体上に foci として局在し, 他の細胞周期では染色体上に検出されなかった。一方, 細胞を染色体を含む不溶性画分と可溶性画分に画分すると, 出芽酵母 ORC 構成因子のホモログである Orp1 タンパクは細胞周期を通じて染色体画分に検出されたのに対し, Mis5 タンパクは G1-S 期にのみ染色体画分に検出された。micrococcal nuclease によって染色体 DNA を断片化することによって Mis5 タンパクは不溶性の染色体画分から解離することから, 染色体 DNA と直接にまたは染色体 DNA 結合タンパクとの相互作用によって結合していることが示された。Mis5 タンパクの染色体への結合は, cdc10-129 変異株を制限温度化で培養し G1 期で増殖を停めたときには観察されないが, Cdc10 によって G1/S 期特異的な転写制御を受けている Cdc18 タンパクを発現させたときには結合が見られた。これらの結果から, Mis5 タ

ンパクの染色体 DNA との相互作用には Cdc18 タンパクが必要であることが示唆された。Orp1, Mis5 タンパクが結合している染色体領域を特定するため、染色体免疫沈降法を行い、Orp1 および Mis5 タンパク-DNA 複合体を回収して解析した。その結果、Orp1 タンパクは細胞周期を通じて複製開始点に結合していたのに対し、Mis5 タンパクは G1-S 期に複製開始点特異的に結合しその後解離することが示された。顕微鏡で観察された Mis5 foci の数は分裂酵母染色体上の複製開始点の数よりもはるかに少ないことを考えると、複数の複製開始点の集合した構造体に Mis5 タンパクが含まれる可能性が示唆された。

以上の結果から、Mis5 タンパクは細胞周期の G1-S 期に複製開始点特異的に結合し、Orp1 タンパク複合体などの複製開始に必須のタンパクと高次複合体を形成し、複製の開始の制御ならびに再複製の防止に関与していると思われる。

論文審査の結果の要旨

申請者は、真核生物複製開始機構の解析のモデル系として、高等真核生物との類似性が見られる分裂酵母を用い、複製開始制御に関与すると考えられる Mis5 蛋白質が、細胞周期中で複製反応が開始する前後の短い期間だけ染色体上の複製開始点に特異的に結合することを証明した。この成果は複製開始制御の分子機構を解明する上で重要な発見であり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。