

Title	酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 染色体DNA複製開始を制御するCdc7/Dbf4プロテインキナーゼ複合体の精製と機能
Author(s)	木原, 誠
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41603
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	木原 誠 <small>まこと</small>
博士の専攻分野の名称	博士 (理学)
学位記番号	第 14145 号
学位授与年月日	平成 10 年 9 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 生物化学専攻
学位論文名	酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 染色体 DNA 複製開始を制御する Cdc7/Dbf4 プロテインキナーゼ複合体の精製と機能
論文審査委員	(主査) 教授 杉野 明雄 (副査) 教授 品川日出夫 助教授 滝澤 温彦

論文内容の要旨

出芽酵母の CDC7 遺伝子はプロテインキナーゼをコードし、細胞周期において、START の後、DNA 複製開始直前に機能することが知られている。一方、Cdc7 は G1/S 期を境界に Dbf4 と複合体を形成し、そのプロテインキナーゼ活性が現れることが示されている。また出芽酵母では、S 期において、染色体 DNA 複製は ARS と呼ばれる特異的な複製開始点から起きることが知られている。Diffley らは、2-ハイブリッド法、あるいは 1-ハイブリッド法によって細胞内で Dbf4 と ARS が相互作用し、さらに、Cdc7 とも相互作用することを示し、Dbf4 の一つの役割として Cdc7 プロテインキナーゼを複製開始複合体にリクルートするモデルを提唱している。また、彼らによって、S 期の DNA 複製開始に先立ち、複製開始起点の ARS に結合する Orc 複合体を中心とした、Cdc6、および Mcm 複合体から形成される DNA 複製開始前複合体 (pre-RC) の存在が示されている。Mcm 複合体は、細胞周期あたり一回限りの DNA 複製が起きることを保証する因子としての機能をもつと示唆されている。さらに、2-ハイブリッド法による解析から、Dbf4 との相互作用の可能性が示されている。最近、CDC46 (MCM5) の変異株の一つとして *bob1* 変異が同定されている。*bob1* 変異株では、増殖期の細胞分裂において、CDC7 の必要性をバイパスすることが示されている。これらの知見は、Cdc7/Dbf4 プロテインキナーゼ複合体が、DNA 複製の開始において直接的な役割を担っていることを強く示唆するもので、おそらく、その制御は、複製開始起点において複製に関与するタンパク質をリン酸化することによると考えられている。近年、我々の研究室では、バキュロウイルスを用いて Sf9 細胞内で CDC7、および DBF4 を共発現させ、Cdc7/Dbf4 プロテインキナーゼ複合体を部分精製し、Cdc7/Dbf4 プロテインキナーゼ複合体が *in vitro* で Mcm2 タンパク質を強くリン酸化することを示した (Lei, M. et al. 1997)。

本研究においては、まず、バキュロウイルス系を用いて、CDC7、および DBF4 を共発現させた Sf9 細胞抽出液から、抗 Cdc7 抗体による免疫沈降法を用い、その免疫沈降試料に対して、プロテインキナーゼ活性測定を行い、Mcm2 が顕著にリン酸化を受けることを明らかにした。本研究で、ウイルス #17 (CDC7)、および #32 (DBF4) を共発現させた Sf9 細胞抽出液から、Cdc7/Dbf4 プロテインキナーゼ複合体を精製することで、初めてその酵素化学的性質を明らかにした。また、*dbf4-1~5* の各変異について、その変異部位を同定し、Cdc7 および ARS との相互作用について

考察した。さらに、Cdc7/Dbf4 プロテインキナーゼ複合体によってリン酸化した Mcm2 のリン酸化部位、並びに、Dbf4 の自己リン酸化部位を質量分析計を用いて同定し、その共通して見られたアミノ酸配列から、Cdc7/Dbf4 プロテインキナーゼ複合体の基質特異性について考察した。これらの結果は、出芽酵母 Cdc7/Dbf4 プロテインキナーゼ複合体の細胞内での機能を理解するための重要な知見を与えるもので、出芽酵母染色体 DNA 複製開始の制御を理解するための大きな前進となる。

論文審査の結果の要旨

本研究では、出芽酵母の染色体 DNA 複製開始を制御する Cdc7/Dbf4 プロテインキナーゼ複合体を高度に精製し、複製ライセンス因子である Mcm2 を *in vitro* で効率よくリン酸化することを明らかにした。この結果は、出芽酵母染色体 DNA 複製開始の制御を理解するための大きな前進となり、博士(理学)の学位論文として十分価値のあるものと認める。