



Title	Sld2, which interacts with Dpb11 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , is required for chromosomal DNA replication
Author(s)	上村, 陽一郎
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41614
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

【 7 】			
氏名	上村	陽一郎	かみむら よういちろう
博士の専攻分野の名称	博士	士(医学)	(ひしょくがく)
学位記番号	第	14200	号
学位授与年月日	平成	10年11月30日	ひやうじゆ
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	じみうけいせんこう
学位論文名	Sld2, which interacts with Dpb11 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , is required for chromosomal DNA replication. (Sld2 は出芽酵母の Dpb11 と相互作用し染色体 DNA 複製に必要である)		
論文審査委員	(主査) 教授 杉野 明雄 (副査) 教授 品川日出夫 教授 野島 博		

論文内容の要旨

【目的】

出芽酵母の染色体 DNA 複製には少なくとも 3 つの DNA ポリメラーゼ I (α), II (ϵ), III (δ) が必要である。このうち DNA ポリメラーゼ II は 256, 80, 34, 30, 29 kDa の 5 つのサブユニットからなり、各々 *POL2* (256 kDa), *DPB2* (80 kDa), *DPB3* (34 k, 30 kDa), *DPB4* (29 kDa) によってコードされている。Pol2 は触媒サブユニットであるが、それ以外のサブユニットの機能については不明である。一方、*DPB2* の温度感受性変異 *dpb2-1* の多コピーサブレッサーとして単離された *DPB11* は、その温度感受性変異 *dpb11-1* の解析から染色体 DNA 複製と細胞周期チェックポイントに必要であることが示された。しかし、Dpb11 がどのような機構で DNA ポリメラーゼ II と相互作用し染色体 DNA 複製に関与するのかは明らかでない。そこで本研究では Dpb11 と相互作用する因子を遺伝学的に同定し、Dpb11 の分子レベルにおける機能の解明を試みた。

【方法ならびに成績】

Dpb11 と相互作用する因子を同定するため、*dpb11-1* と合成致死になる *sld* (synthetic lethality with *dpb11-1*) 変異のスクリーニングを行った。その結果、*sld1~6* 変異を分離し、これらの変異を相補する *SLD1~5* 遺伝子をクローニングした。*SLD1* は DNA ポリメラーゼ II の 34, 30 kDa のサブユニットをコードする *DPB3* と、*SLD4* は染色体 DNA 複製の開始に必須な *CDC45* と同一であった。一方、*SLD2, 3, 5* は新規の遺伝子であったので、先ず *SLD2* についての解析を進めた。

SLD2 遺伝子破壊株を作製したところ、この破壊株は増殖できず、*SLD2* 遺伝子産物が体細胞増殖に必須であることがわかった。そこでプラスミドシャフリング法を用い *SLD2* の温度感受性変異 *sld2-6* を得た。*sld2-6* 変異株に *DPB11* を多コピーで導入したところその温度感受性を抑圧した。また *SLD2* も多コピーで *dpb11-1* 変異株の温度感受性を抑圧した。更に、*DPB11* は *POL2* の温度感受性変異 *pol2-11* を多コピーで抑圧するが、*SLD2* についても同様の結果を得た。

Sld2 と Dpb11 の間で観察されたこの強い遺伝学的相互作用は、両者間の物理的な相互作用を示唆する。そこで、2 ハイブリッド法によりその可能性を検討してみた。その結果 Sld2 と Dpb11 の間に物理的な相互作用を認めた、また Sld2-6 あるいは Dpb11-1 ではその相互作用が温度感受性を示すことも明らかになった。このことから Sld2-6 も含め Sld2-1～5 が sld 変異のスクリーニングで得られたのは、Dpb11-1 との相互作用が低下したためであると考えられる。そこでこれらの変異点を同定することで Sld2 の Dpb11 との相互作用に重要な領域を特定した。Sld2-5 以外の変異は全て Sld2 の N 末端側の 30 アミノ酸に集中しており、この領域が Dpb11 との相互作用に必要であることが予想された。次に、Sld2 と Dpb11 が細胞内でも相互作用していることを示すため、各々の免疫沈降実験を行った。その結果、Sld2 あるいは Dpb11 を免疫沈降すると Dpb11 あるいは Sld2 が共沈降してきた。また、2 ハイブリッド法による結果と同様に Sld2-6 あるいは Dpb11-1 ではその相互作用が低下していることも明らかとなった。

更に、Sld2 の細胞内での機能を明らかにするため、*sld2-6* 温度感受性変異株を用いて以下の実験を行った。まず、*sld2-6* 温度感受性変異株の非許容温度下における最終形態を観察した。複製にかかる因子の変異株では、多くの場合亜鉛形という最終形態を示すが、*sld2-6* に関しても同様の結果を得た。また、FACS 及びジフェニルアミン法により *sld2-6* 温度感受性変異株の非許容温度下での DNA 合成を調べてみたところ、野生株と比較して顕著な欠損がみられた。これらのこととは、Sld2 が染色体 DNA 複製に関与することを示す。2 次元電気泳動法を用いてより詳細な解析を行ったところ、この変異株では非許容温度下で複製開始のシグナルが低下していた。このことから、Sld2 は染色体 DNA 複製の初期に必要であると考えられた。

【総括】

Dpb11 と遺伝学的に相互作用する Sld1～5 を同定した。*SLD1* は DNA ポリメラーゼ II の 34, 30 kDa をコードする *DPB3* と、*SLD4* は染色体 DNA 複製の開始に関与する *CDC45* と同一であった。また *SLD2, 3, 5* は新規の遺伝子であり、このうち *SLD2* は 52 kDa をコードする体細胞増殖に必須の遺伝子であった。*SLD2* と *DPB11* の間には強い遺伝学相互作用が認められ、また、細胞内で複合体を作っていることも示された。さらに *sld2-6, dpb11-1* ではこの複合体形成能が低下していることから、この複合体が染色体 DNA 複製に必須であることが明らかになった。温度感受性変異株を用いた 2 次元電気泳動法の解析から、この複合体は染色体 DNA 複製の初期に関与すると考えられる。以上のことで、Dpb11 が Sld2 と複合体を形成し、DNA の伸長反応に関わる DNA ポリメラーゼ II を、Cdc45などを介して複製開始点に運ぶというモデルを構築した。

論文審査の結果の要旨

真核生物の染色体 DNA 複製には、少なくとも 3 つの DNA ポリメラーゼが必須である。これまでに、これらのポリメラーゼのうち DNA ポリメラーゼ II と遺伝学的に相互作用する因子とし Dpb11 が同定されている。Dpb11 の分子遺伝学的解析から、この因子は DNA ポリメラーゼ II と何らかの相互作用をし、染色体 DNA 複製に関与すると考えられていたがその機能は不明であった。本研究は、Dpb11 と相互作用する因子を遺伝学的に同定することで、Dpb11 分子の機能解明を行ったものである。その結果、Dpb11 と相互作用する Sld1～5 を同定、単離した。このうち Sld2 は Dpb11 と複合体を形成し、この複合体形成が染色体 DNA 複製の初期に重要な働きをしていることが示された。また、Dpb11, Sld の解析から、これらの因子が DNA ポリメラーゼ II を複製開始点にローディングするというモデルを構築する知見が得られた。これらの研究は、今まで知られていなかった DNA ポリメラーゼの新たな制御機構を示唆するもので、真核生物染色体 DNA 複製の理解に多いに役立つものである。よって本研究は学位に値するものと考えられる。