

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、 〈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	かみむら よういちろう 上村 陽一郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 14200 号
学位授与年月日	平成10年11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	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* の多コピーサプ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プリング法を用い 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。複製にかかわる因子の変異株では、多くの場合垂鈴形という最終形態を示すが、*sld2-6* につい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。以上のことより、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。