



Title	Dpb11 controls the association between DNA polymerase $\alpha$ and $\epsilon$ , and the ARS region of budding yeast
Author(s)	増本, 博司
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41791">https://hdl.handle.net/11094/41791</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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

氏名	増本博 司
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15242 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Dpb11 controls the association between DNA polymerase $\alpha$ and $\epsilon$ , and the ARS region of budding yeast (出芽酵母 Dpb11 は DNA ポリメラーゼ $\alpha$ および $\epsilon$ の染色体 DNA 複製開始起点への結合を制御している)
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】

染色体 DNA 複製機構及び複製状態をモニターするS期チェックポイント機構については今なお不明な点が多い。出芽酵母 *DPB11* 遺伝子は染色体 DNA 複製に関与する DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$  (Pol  $\epsilon$ ) の触媒サブユニットおよび二番目に大きなサブユニットをコードする *POL 2*、*DPB 2*の変異を多コピーで抑圧する遺伝子として分離された。Dpb11 は変異株を用いた解析から染色体 DNA 複製およびS期チェックポイント機構に関与していると考えられている。本論文では Dpb11 の染色体 DNA 複製およびS期チェックポイント機構における機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

#### 【方法ならびに成績】

真核生物の DNA 複製が開始するためにはまず染色体 DNA 上の複製開始点 (Autonomously Replicating Sequence:ARS) に複製前複合体 (pre-Replication Complex:pre-RC) が形成される。S期 CDK/Cyclin 複合体 (S-CDK) および Cdc 7/Dbf 4 の活性化に依存して ARS は二本鎖から一本鎖へ解離し、DNA ポリメラーゼが ARS に結合すると考えられている。Dpb11 がこれらの過程のどこに関与しているか調べた。

1. Dpb11 と Pol 2 は遺伝学的には非常に近い関係にある。そこでまず Dpb11 と Pol 2 が複合体を形成することを免疫沈降法により示した。この複合体はS期に最大量となり、その形成は ARS での pre-RC 形成に依存しないことがわかった。
2. 温度感受性変異株 *dpb11-1* を非許容温度にシフトし複製中間体をアガロース二次元電気泳動法により解析した。その結果、複製開始のシグナルは観察されず、Dpb11 が DNA 複製の極く初期に関与していることがわかった。
3. Dpb11 と ARS の結合を CHIP (Chromatin immunoprecipitation) 法を用いて調べると、Pol 2 と同じタイミングで結合していることがわかった。
4. 種々の複製変異株を用いて Dpb11 と ARS 領域との結合を調べた。その結果 Dpb11 は pre-RC が形成し ARS 領域の DNA 二重鎖が一本鎖に解離した後で ARS に結合することがわかった。またその結合は Pol  $\epsilon$  に依存していた。
5. *dpb11-1* を用いて他の複製因子と ARS 領域への結合を非許容温度で調べた。その結果 Dpb11 は DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$  および  $\alpha$  を ARS へ結合させるのに必要であることがわかった。

6. 染色体 DNA 上に点在する ARS は複製開始のタイミングの違いから早期開始型 ARS (early ARS)、後期開始型 ARS (late ARS) の二種類に分けることができる。S期チェックポイント機構が働くとヒドロキシ尿素存在下では late ARS の使用が抑制される。*dpb11-1*変異は許容温度で弱いヒドロキシ尿素感受性を示す。そこで、*dpb11-1*変異を用いて許容温度・ヒドロキシ尿素存在下で Pol 2 の late ARS への結合が抑制されるかどうか CHIP 法で調べた。その結果 Pol 2 は late ARS へ結合することから Dpb11 が S期チェックポイントの機能のひとつである late ARS の使用の抑制に関与していることがわかった。

#### 【総括】

1. Dpb11 は ARS 領域での pre-RC の形成とは独立して Pol  $\epsilon$  と複合体を形成する。
2. Dpb11 は DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$  および  $\alpha$  が複製開始領域へ結合する過程で働いている。この過程には Dpb11-Pol  $\epsilon$  複合体の形成が必要である。
3. Dpb11 は S期チェックポイントの機能として DNA 合成阻害に対応して late ARS へ DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$  が結合するのを抑制する機能を持っていると考えられる。

以上のように Dpb11 は DNA 複製開始および S期チェックポイント機構において DNA ポリメラーゼの ARS への結合を制御していると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

染色体 DNA 複製機構及び複製状態をモニターする S期チェックポイント機構については今なお不明な点が多い。本論文では変異株を用いた解析から染色体 DNA 複製および S期チェックポイント機構に関与している出芽酵母 Dpb11 の機能を明らかにすることを目的として研究を行った。主として Chromatin Immunoprecipitation (CHIP) 法を用いて、Dpb11 が DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$  および  $\alpha$  が複製開始領域へ結合する過程で働いていることを示した。一方、DNA 複製を阻害した時は、Dpb11 が DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$  が後期開始型複製開始領域へ結合するのを抑制する点を明らかにした。このことが Dpb11 の S期チェックポイントの機能として重要であると結論した。従って、Dpb11 は DNA 複製開始および S期チェックポイント機構において DNA ポリメラーゼの ARS への結合を制御していることを示唆している。本論文で得られた結果は、真核生物染色体 DNA 複製機構解明に重要な知見と示唆を与えるもので、学位の授与に値するものと考えられる。