OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Central role for Xenopus Cdc45 in the initiation of DNA replication
Author(s)	三村, 覚
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41930
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

氏名	三村 覚（みむら さとる）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第 15186 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 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Central role for Xenopus Cdc45 in the initiation of DNA replication （アフリカツメガエルCdc45蛋白質のDNA複製開始における機能）
論文審査委員	（主査） 教授 升方 久夫 （副査） 教授 杉野 明雄　教授 小倉 明彦　助教授 滝澤 温彦

論文内容の要旨

真核細胞のDNA複製の開始は、複製開始前複合体（pre－RC）に、S期CDKが働きかけて起こると考えられているが、複製開始のどの様な過程がS期CDKの活性によって制御されているのかは明らかではない。また、複製が開始するためには、プライマーゼ活性をもつDNAポリメラーゼα（pol α）が複製開始領域に呼び込まれる必要がある。しかしpol αが呼び込まれる機構は明らかではない。私は、pre－RCの活性化に関与する因子の候補として、出芽酵母Cdc45蛋白質に着目し、アフリカツメガエルのCDC45相同遺伝子（XCDC45）を単離し、その遺伝子産物の機能をアフリカツメガエル卵無細胞DNA複製系を用いて調べた。

XCdc45蛋白質は複製開始に必要であり、そのクロマチン結合は、pre－RCの構成成分とは異なり、S期CDKの活性に依存して起こった。卵抽出液を抗XCdc45抗体で免疫沈降すると、pol αの共沈降が認められた。複製中の核内のXCdc45蛋白質とpol αの局在を間接蛍光抗体法で調べると、これらは複製の盛んな領域に共局在し、複製が終了するとクロマチンから遊離していた。さらに、XCdc45蛋白質を卵抽出液から免疫除去するとpol αのクロマチン結合が起きないこと、組み換えXCdc45蛋白質を卵抽出液に過剰に加えるとpol αのクロマチン結合が促進されることから、XCdc45蛋白質がpol αのクロマチン結合に必須の役割を果たすことが示唆された。

複製開始には、一本鎖DNA結合蛋白質RPAをはじめ、プライマーゼ活性を持つpol α、伸長反応に関わると考えられるDNAポリメラーゼδ（pol δ）、及びε（pol ε）、その補因子であるPCNA等が関わることが知られている。私は卵抽出液からこれらの蛋白質の一成分だけを特異的に免疫除去することによりこれらの蛋白質がどの様な順序でクロマチンに結合するのかを調べた。その結果、MCM、XCdc45、RPA、pol α、そして、PCNAの順にクロマチンに結合することがわかった。RPAは一本鎖DNAに強固に結合することが知られているので、XCdc45蛋白質が二本鎖DNAを開裂する過程に関わっていることが考えられる。またpol εのクロマチン結合は、XCdc45蛋白質に依存していたが、RPAやpol αには依存していなかった。この結果は、pol εがプライマー合成が起きる前に何らかの役割をもつ可能性を示唆している。

これらの蛋白質がクロマチン上でどの様な蛋白質複合体を形成しているのかを調べるために、複製時のクロマチン画分を過剰量のヌクレアーゼで処理し、可溶化された画分に対して免疫沈降を行った。その結果、MCMとXCdc45蛋白質、および、XCdc45蛋白質とpol αの共沈降が認められたが、MCMとpol αの共沈降は認められなかった。このことから、XCdc45蛋白質はMCMとpol αのそれぞれとクロマチン上で複合体を形成していることが考えられ

る。

これらの結果から、Cdc45蛋白質の複製開始における役割は、MCMとpol αのそれぞれと相互作用することにより、二本鎖DNAを開裂させ、そこにpol αを呼び込むために必要であること、また、S期CDKの複製開始における役割の一つはCdc45蛋白質をクロマチンに結合させることであることを提唱したい。

論文審査の結果の要旨

申請者は、アフリカツメガエル試験管内複製系を用いて真核生物のDNA複製に必須な役割を果たすCdc45蛋白質の機能を解析した。Cdc45蛋白質は細胞周期の制御キナーゼS－CDKに依存して染色体に結合し、複製開始点にDNAポリメラーゼを導入する過程に機能することを解明するとともに、他の蛋白質の染色体への結合過程を明らかにした。これらの成果は真核生物の複製開始とその制御機構の分子レベルで理解を深める重要な発見であり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。