



Title	Origin Recognition and Formation of Pre-Replicative Complex in Fission Yeast
Author(s)	高橋, 達郎
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43577">https://hdl.handle.net/11094/43577</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	高橋 達郎
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第16772号
学位授与年月日	平成14年3月25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	Origin Recognition and Formation of Pre-Replicative Complex in Fission Yeast (分裂酵母複製開始点の認識と複製開始前複合体の形成)
論文審査委員	(主査) 教授 升方 久夫
	(副査) 教授 滝澤 温彦 助教授 和賀 祥

### 論文内容の要旨

真核生物の染色体複製は、広い染色体領域を効率よく複製するために多数の複製開始点から開始する。染色体の部分的再複製を防止するために、複製開始反応は細胞周期の進行により厳密に制御されている。この制御は、G1期に染色体上に複製開始前複合体（pre-replicative complex, pre-RC）が形成され、S期開始時にpre-RCが活性化されて複製反応が開始した後、次のG1期までpre-RCの形成が抑制されることで達成されると考えられている。pre-RCは、複製開始点に結合するORC、G1期特異的に発現されるCdc6蛋白質に依存して、MCM複合体が複製開始点に結合することで形成される。MCM複合体は複製開始のヘリカーゼの有力な候補であり、複製開始反応において中心的な役割を果たすと考えられる。

一方で、真核生物の複製開始点の一次構造は生物種間で大きく異なっている。出芽酵母では、必須のコンセンサス配列（ACS）を含む100-150bpの領域が複製開始点として機能する。しかしながら、他の生物種ではより広い染色体領域が複製開始に必要であり、必須のコンセンサス配列は見いだされていない。また、出芽酵母以外の生物種では、複製開始点の認識機構やpre-RCの形成とその構造は明らかにされていない。分裂酵母では、アデニン連続配列を含む1kb程度の染色体領域が複製開始点として機能することが知られており、短い必須コンセンサス配列は見つかっていない。

本研究では、分裂酵母複製開始点においてORC、MCM複合体の結合領域を解析することで、分裂酵母複製開始点の認識機構と、pre-RCの構造を明らかにしたいと考え、以下の解析を行った。

分裂酵母ORCが複製開始点を認識、結合するかを検討するために、分裂酵母ORC免疫沈降画分とDNA断片との相互作用の解析を行った。ORC免疫沈降画分（ORC-IPs）に、我々のグループで単離した複製開始点、ars2004のDNA断片と、複製能を持たないDNA断片を加えたところ、ars2004断片のみが特異的にORC-IPsに結合した。この結合反応に対する競合阻害を指標にORC-IPsと複製開始点の相互作用を解析した結果、ars2004の複製に必須のアデニン連続配列が相互作用を示した。一方、細胞内で蛋白質とDNAを架橋した後免疫沈降を行うクロマチン免疫沈降（ChIP）により、ars2004領域内でのORCサブユニットの局在を詳細に解析したところ、ORCサブユニットはars2004の必須領域周辺にアデニン連続配列に依存して局在していた。以上の結果から、分裂酵母ORCの認識配列がアデニン連続配列であると結論した。

次に、G1期でのMCM蛋白質の複製開始点での局在をChIP法により解析した。MCMサブユニットは、G1期に

Cdc18、Cdt1蛋白質に依存して、*ars2004* の約550bp 離れた二つのアデニン連続配列の間に特異的に局在していた。MCM の *ars2004* への局在は 2 つのアデニン連続配列に依存していたが、片側のアデニン連続配列の欠失では、MCM の特異的局在は消失しなかった。これは *ars2004* の二つのアデニン連続配列が、MCM の結合に関して重複した機能を持つことを示している。一方、*ars2004* の必須領域のうち、アデニン連続配列を含まない領域は、ORC の結合には必要でないが、MCM の結合には寄与していた。これらの結果は、分裂酵母 MCM は ORC 結合領域と異なる領域に結合し、MCM の結合過程には ORC 結合配列以外の要素も寄与することを示している。

#### 論文審査の結果の要旨

申請者は、分裂酵母染色体 DNA の複製開始点の認識機構と複製前複合体の形成機構を解析した。複製開始必須配列であるアデニン連続配列は ORC によって認識・結合されることを発見し、さらに細胞周期 G1期に MCM 複合体が DNA 合成開始領域に導入されることを明らかにした。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の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。