

Title	Functional analysis of fission yeast SpSld3 in DNA replication
Author(s)	柳原, 玲子
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43596
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	柳 原 玲 子 <small>やなぎ はら れい こ</small>
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 16785 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	Functional analysis of fission yeast SpSld3 in DNA replication (DNA複製における分裂酵母 SpSld3の機能解析)
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

【背景と目的】

真核生物の DNA 複製は複製開始点における秩序だったタンパク質のアセンブリーを経て開始される。この過程において、Cdc45の複製開始点への結合は複製開始点の活性化と非常に密接に関わっているとされている。よって、複製開始点の活性化制御機構を明らかにするためには、Cdc45の制御機構の解析が必須であると考えられる。そこで私は、Cdc45のクロマチン結合制御機構を理解することを目的として、2 hybrid 法により Cdc45と相互作用することが示されていた出芽酵母 Sld3の分裂酵母ホモログを単離し、その解析を行った。

【結果】

分裂酵母ゲノムデータベースを検索したところ、出芽酵母 Sld3と14%の相同性を示すアミノ酸配列をコードする遺伝子 (*sld3*⁺) が見つかった。*sld3*⁺ 遺伝子は細胞の生育に必須であり、また温度感受性株を作製、解析した結果、SpSld3は G1-S transition あるいは DNA 複製に機能する因子であることが示唆された。そこで次に、クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) による解析を行ったところ、SpSld3は Hsk1 kinase に依存して G1-S 期に染色体上の複製開始点、*ars2004* に結合していることがわかった。またこの時期に一致して、SpSld3は MCM 複合体のサブユニットの1つである SpMcm6, SpCdc45と順次相互作用することが免疫沈降法により明らかになった。これらの結果から、SpSld3は MCM 複合体、SpCdc45と複製開始点上で複製開始前複合体を形成していることが示唆される。また、*sld3-10* 変異株は制限温度において SpMcm6のクロマチン結合には欠損を示さず、SpCdc45のクロマチン結合に欠損を示すことがわかった。この変異株の温度感受性は SpCdc45をコードする *sna41*⁺ 遺伝子を多コピーで持たせることにより回復した。以上の結果を合わせると、SpSld3は SpCdc45のクロマチン結合に必須の因子であると考えられる。Hsk1は個々の複製開始点の活性化に必要であることから、各複製開始点の活性化のタイミングは Hsk1を介した SpSld3の複製開始点への結合によって制御されているのかもしれない。

一方、*sld3-10*株を許容温度で hydroxyurea (HU) 添加により S 期初期に停止させた後に制限温度にシフトすると、すでにクロマチンに結合していた SpCdc45が解離することがわかった。よって、SpSld3は複製開始前だけでなく、複製開始後に SpCdc45をクロマチン上に維持するためにも必要であることが示唆された。MCM 複合体、SpCdc45は複製フォークの構成因子であると考えられていることから、SpSld3もまた複製フォークの構成因子であることが予

想される。

以上の結果より、SpSld3は DNA 複製開始期、DNA 合成期を通じて必須の因子であり、DNA 複製制御における重要なターゲットとなっていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者は、分裂酵母染色体の DNA 複製開始に必須の新規因子 Sld3を同定し、その機能を解析した。Sld3は複製開始点の発火タイミング制御に依存して複製開始点に結合し、必須因子 Cdc45蛋白質の複製開始点への結合過程に機能することを明らかにするとともに、複製開始後も複製フォークの維持に機能することを示した。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。