

Title	Functional analysis of RAD53 involving in chromosomal DNA replication in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Author(s)	徳野, 治
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43637">https://hdl.handle.net/11094/43637</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。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	徳野 治 <small>とくの の おさむ</small>
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 16783 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 <i>RAD53</i> involving in chromosomal DNA replication in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母染色体 DNA 複製に関する <i>RAD53</i> の機能解析)
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

出芽酵母 *RAD53* は従来、DNA 損傷および DNA 複製チェックポイントにおける共通因子の一つと考えられてきた。しかし近年、*RAD53* はチェックポイント機構のみならず、染色体 DNA 複製そのものにも積極的に関与していることが示唆されるようになってきた。DNA 複製の制御機構における Rad53p の機能を解明する目的により、本研究では出芽酵母第 6 番染色体上の初期複製開始点 (ARS607)、後期複製開始点 (ARS609) およびそれらの隣接領域における Rad53p および DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$  複合体の触媒サブユニット (Pol2p)、一本鎖結合タンパクである Replication Protein A (RPA)、さらに増殖細胞核抗原 (PCNA) の結合挙動を、クロマチン免疫沈降法 (CHIP) により解析した。

正常 S 期では、Pol2p および RPA は初期および後期複製開始点に結合し、さらにそれらの隣接領域にもその結合が見られたが、初期および後期複製開始点とその隣接領域への Rad53p の結合は全くみられなかった。メチルメタンスルホン酸 (MMS) 存在下では S 期の著しい進行遅延がみられ、Pol2p および RPA は初期複製開始点とその隣接領域に対してその持続的な結合を示したが、後期複製開始点とその隣接領域には結合がみられなかった。このとき Rad53p は、初期および後期複製開始点やそれらの隣接領域のいずれにもその結合はみられなかった。さらに、ヒドロキシ尿素 (HU) 存在下での Rad53p および Pol2p、RPA の挙動を同様に解析した。Pol2p および RPA は初期複製開始点とその隣接領域にのみ結合し、後期複製開始点と隣接領域への結合は観察されなかった。DNA 含量はほとんど変化しないことが FACS 解析によって確かめられた。これらの結果は、DNA 複製フォークが初期複製開始点からある領域までは進行し、その後停止したことを示唆している。この条件下で Rad53p の挙動を解析したところ、Pol2p および RPA の場合と同様、少なくとも初期複製開始点には結合し、その時期は Pol2p および RPA のそれとほぼ一致していることが判明した。しかし、同様の条件下で Rad53p は Pol2p および RPA と同様、後期複製開始点とその隣接領域においてその結合は全くみられなかった。複製フォーク停止に伴う Rad53p の結合がチェックポイント機構の活性化によるものかどうかを検討するため、*mecl1* 欠損株を用いて、HU 存在下での Rad53p、RPA および増殖細胞核抗原 (PCNA) の挙動を同様の方法で解析した。野生型細胞の場合と同様、RPA と PCNA は初期複製開始点とその隣接領域には持続的に結合したが、後期複製開始点やその隣接領域には結合していないことが示された。このとき、Rad53p は初期および後期複製開始点、さらにその近傍領域のいずれにもその結合はみられなかった。以上の結果から、以前から示唆されているような、Rad53p が後期複製開始点の活性制御に直接関与しているという明

確な証拠は得られなかった。本研究から、Rad53p は停止した DNA 複製フォークに特異的に結合し、その安定化に寄与することが考察された。

#### 論文審査の結果の要旨

徳野君は出芽酵母 Rad53p の機能について詳細な解析を行い、これは従来から知られている細胞周期チェックポイント因子としての機能の他に、染色体 DNA 複製の制御機構においても重要な役割を担っていることを明らかにした。本研究成果は真核生物染色体 DNA 複製と細胞周期研究に新たな道を開いたものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。