

Title	Activation of Xenopus MCM on replicating chromatin : MCM-Cdc45 complex as a replicative DNA helicase
Author(s)	笹, 太郎
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44043
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	笹 太 郎
博士の専攻分野の名称	博士 (理 学)
学位記番号	第 17535 号
学位授与年月日	平成 15 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	Activation of <i>Xenopus</i> MCM on replicating chromatin: MCM-Cdc45 complex as a replicative DNA helicase (DNA 複製中の染色体上におけるアフリカツメガエル MCM の活性化—DNA 複製に働く DNA ヘリケースとしての MCM-Cdc45 複合体)
論文審査委員	(主査) 教授 滝澤 温彦 (副査) 教授 升方 久夫 教授 杉野 明雄

論文内容の要旨

私は真核生物の DNA 複製について、ツメガエル卵抽出液の無細胞 DNA 複製系を用いて研究を進めてきた。今回、私は DNA 複製中の染色体上で形成された強固な MCM-Cdc45 複合体が、複製に必要な DNA ヘリケースとして働いていることを強く示唆する結果を得たので報告する。また、DNA ポリメラーゼ ϵ (Pol ϵ) が DNA 複製の際に他のポリメラーゼとは異なる挙動を示すことを見出したので、そこから考察される Pol ϵ の機能についてもあわせて報告する。

Cdc45 との結合による MCM 複合体の S 期における活性化

MCM2-7 複合体及び Cdc45 は DNA 複製の開始と伸長に必要とされる。近年の研究から、精製した MCM4/6/7 複合体は DNA ヘリケース活性を示すことが分かっているが、染色体に結合した MCM 及び Cdc45 の生化学的な活性は明らかではない。そこで私はツメガエル卵抽出液を用いて、染色体に結合した MCM の生化学的性質を調べた。界面活性剤存在下で抽出した MCM を免疫沈降する実験から、DNA 複製開始に伴って MCM の 6 つのサブユニットが Cdc45 を含む強固な複合体 (MCM-Cdc45 複合体) を形成することが分かった。この強固な複合体の形成には S 期 CDK の活性が必要であり、また Cdc45 は MCM の複合体の安定化に必要であった。さらに、染色体に結合している蛋白質の免疫沈降実験から、DNA 複製中の染色体上に形成される MCM 及び Cdc45 を含む複合体が DNA ヘリケース活性を有していること、及びこのヘリケース活性の発現に CDK の活性及び Cdc45 が必要であることが分かった。これらの結果は、DNA 複製中の染色体上での MCM-Cdc45 の強固な複合体の形成と、MCM のヘリケース活性が強く相関していることを示している。私はこの MCM-Cdc45 複合体が細胞内における DNA 複製の際に、DNA ヘリケースとして働くと考えている。

DNA 複製中の染色体上における Pol ϵ の特異的な挙動

真核生物の DNA 複製に必要な 3 種の DNA ポリメラーゼのうち、Pol ϵ は酵母において生存に必須であるが、DNA 複製に際して果たす役割は良く分かっていない。そこで Pol ϵ の機能を調べるため、ツメガエル卵無細胞 DNA 複製系を用いて Pol ϵ の挙動を調べた。Pol ϵ は複製中に Cdc45、RPA、Pol α 、PCNA といった DNA 複製関連蛋白質と同じ時間経過で染色体に結合した。また Pol ϵ の染色体への結合はプライマーゼ活性を持つ Pol α には依存せず、Pol

ϵ が DNA の新生鎖の伸長反応以外の役割を持っていることが示唆された。さらに、Pol ϵ 非存在下では、複製関連蛋白質の染色体への結合は影響を受けないが、複製の進行に伴うそれらの蛋白質の染色体からの解離が顕著に阻害された。この結果は、Pol ϵ が DNA 複製の伸長段階において重要な機能を果たしていることを示唆する。Pol ϵ の非存在下では Pol α が染色体上に蓄積することを考えると、これらの結果は Pol ϵ が複製関連蛋白質を協調させ、効率的な DNA 伸長反応を起こさせるために働いている可能性を示している。

論文審査の結果の要旨

笹太郎君は、アフリカツメガエル卵抽出液無細胞 DNA 複製系を用いて、DNA 複製開始複合体の構成成分である MCM2-7 と DNA ポリメラーゼ ϵ の機能について研究を行い、次の二点を明らかにした。第一は DNA 複製の開始と伸長に必要とされる MCM2-7 と Cdc45 が S 期開始時に強固な複合体を形成して DNA ヘリケースとして働くことを強く示唆する結果を得たことである。近年の研究から、精製した MCM4/6/7 複合体は DNA ヘリケース活性を示すことが分かっていたが、染色体に結合した MCM の生化学的な活性は明らかではなかった。笹君は、染色体に結合した MCM の生化学的性質を調べ、DNA 複製開始に伴って MCM2-7 が Cdc45 を含む強固な複合体を形成すること、DNA 複製中の染色体上に形成される MCM2-7 と Cdc45 を含む複合体は DNA ヘリケース活性を有していること、また強固な複合体の形成とヘリケース活性の発現に CDK 及び Cdc45 が必要であることを示した。第二は、DNA 複製開始におけるポリメラーゼ ϵ の特異的な挙動を明らかにしたことである。笹君は真核細胞の DNA 複製に必須なポリメラーゼ ϵ の複製開始時における挙動を特異的な抗体を用いて調べ、このポリメラーゼが DNA 鎖合成に加えて、複製装置の形成と崩壊に関わっていることを示唆する結果を得た。これらの成果は、これまで機能が明確にされていなかった MCM とポリメラーゼ ϵ の複製開始における働きを解明する上で重要な第一歩となるものであり、博士 (理学) の学位論文として十分価値のあるものと認める。