The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The Mcm2p-binding, but not Mcm2p-phosphorylation, is important for the function of Cdc7/Dbf4 protein kinase during initiation of chromosomal DNA replication in Saccharomyces cerevisiae
Author(s)	中井, 渉
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44085
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　中井（なかい）　渉（わたる）

博士の専攻分野の名称　博　士（理　学）

学位記番号　第　17539　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　The Mcm2p-binding, but not Mcm2p-phosphorylation, is important for the function of Cdc7/Dbf4 protein kinase during initiation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*.
（出芽酵母染色体DNA複製開始におけるCdc7/Dbf4 protein kinaseの機能はMcm2pのリン酸化ではなくMcm2pとの結合である）

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

真核生物の染色体DNA複製の開始は複数の蛋白質によって厳密に制御されており、細胞周期を通じてS期にのみ1回だけ行われ完全に終了することが必要である。これまでに真核生物のDNA複製開始に関与する因子としてORC、Cdc6、MCM、Cdc45等が同定されてきた。この中でMCM複合体は複製ライセンシング因子として機能していると考えられている。出芽酵母*CDC7*はprotein kinaseをコードし、G1/S期に発現されるDbf4pと複合体を形成することにより、protein kinase活性が現れる。このCdc7/Dbf4複合体は染色体DNA複製開始を制御していることが知られており、Cdc7/Dbf4複合体による複製開始前複合体（pre-replicative complex、pre-RC）中のMCM複合体のリン酸化がS期の開始を引き起こすと考えられている。

これまでに我々は、バキュロウイルス系を用いてSf21細胞内で発現させたCdc7/Dbf4複合体を精製し、酵母から精製したGST-Mcm2pを*in vitro*で効率良くリン酸化することを明らかにしてきた。しかし、*in vivo*においてもCdc7/Dbf4複合体がMcm2pを基質としているのか、またそのリン酸化が複製の開始をどのように制御しているのかなどまだ不明な点が多い。そこで本研究では、Cdc7/Dbf4複合体によるMcm2pのリン酸化の役割を明らかにしたいと考え、Mcm2pのリン酸化部位の同定およびその解析を行った。

酵母から精製したGST-Mcm2pはCdc7/Dbf4複合体により効率良くリン酸化されるが、Alkaline Phosphataseにより脱リン酸化処理したGST-Mcm2pはほとんどリン酸化されなかった。これは、未同定のprotein kinaseにより*in vivo*であらかじめリン酸化された蛋白のみが基質になることを示している。

そこで、複製開始におけるMcm2pのリン酸化の役割を解明するために、MALDI-TOFを用いてリン酸化部位の同定を行った。その結果、酵母菌体内においてGST-Mcm2pはすでに8箇所リン酸化されていることが分かった。リン酸化部位だと推測されるセリンは全てアラニンもしくはグルタミン酸に置換し、変異GST-Mcm2pおよび変異*mcm2*株を作成した。この変異GST-Mcm2pは*in vitro*においてCdc7/Dbf4複合体により全くリン酸化されず、また、脱リン酸化処理した変異株抽出液中のMcm2pはSDS-PAGEにおいて移動度の違いは見られなかった。従って、本研究でアラニンに置換した部位は同時にCdc7/Dbf4 protein kinaseのリン酸化部位であると考えられる。しかし、変異

*mcm2*株は成育可能であり、FACS解析においてもS期の進入と進行は正常であった。

これまで、two-hybrid解析によってMcm2pとDbf4pとは相互作用するが、変異Mcm2-1pではDbf4pとの相互作用が弱くなり、*mcm2-1*変異と*dbf4-1*変異の二重変異株は致死となることが報告されている。今回、この変異Mcm2pとDbf4pとの相互作用を調べたところ、その相互作用は弱く、さらに、温度感受性変異Dbf4pとの間には相互作用が見られなかった。この実験結果と一致して、この二重変異株も致死になった。これらの結果から、細胞内において、Cdc7/Dbf4複合体によるMcm2pのリン酸化は成育に必須では無いが、リン酸化されたMcm2pを含むMcm2-7複合体に少なくともDbf4pが結合し、その複合体の構造変化をもたらすことが染色体DNA複製開始に必須であると結論される。

論文審査の結果の要旨

本研究では、染色体複製開始に必須なCdc7/Dbf4複合体によるMcm2pのリン酸化の複製開始反応における役割を解明する為に、MALDI-TOFを用いてMcm2pのリン酸化部位の同定を行った。その結果、酵母菌体内においてGST-Mcm2pはすでに8箇所リン酸化されていることが分かった。リン酸化部位のSer、Thrを全てAlaに置換し、変異GST-Mcm2pおよび変異mcm2株を作成した。この変異GST-Mcm2pはin vitroにおいてCdc7/Dbf4複合体により全くリン酸化されず、また、脱リン酸化処理した変異株抽出液中のMcm2pはSDS-PAGEにおいて移動度の違いは見られなかった。しかし、変異mcm2株は成育可能であり、S期の進入と進行は正常であった。一方、two-hybrid解析、及びin vitro結合実験によって、Cdc7p/Dbf4pは野生型Mcm2pのみならず、変異Mcm2-1pとも相互作用していることを明らかにした。しかし、この相互作用は温度感受性Dbf4pと変異mcm2pではなくなっていることから、細胞内において、Cdc7/Dbf4複合体によるMcm2pのリン酸化は成育に必須では無く、Cdc7pDbf4pがMcm2-7複合体に結合し、その複合体の構造変化をもたらすことが染色体DNA複製開始に必須であると結論された。これらの研究結果は真核生物染色体複製開始機構の理解に多大の貢献をするもので、博士（理学）の学位論文として十分価値があると認める。