The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	真核生物DNA複製開始に関与するCDC7キナーゼの調節サブユニットDBF4のアフリカツメガエルホモログの同定とその性状解析
Author(s)	古郡, 麻子
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45105
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

【22】

氏　　名	古郡麻子（ふるこおり あさこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　18220　号
学位授与年月日	平成15年12月22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	**真核生物DNA複製開始に関与するCDC7キナーゼの調節サブユニットDBF4のアフリカツメガエルホモログの同定とその性状解析**
論文審査委員	（主査） 教　授　杉野　明雄 （副査） 教　授　滝澤　温彦　　教　授　升方　久夫　　助教授　和賀　　祥

論文内容の要旨

酵母やヒトの研究から、真核生物の染色体DNA複製開始に必須なプロテインキナーゼであるCdc7の活性は、Dbf4によって制御されていることが報告されている。本研究ではこれまで未同定であつたアフリカツメガエルDbf4ホモログ（XDbf4）を単離同定し、*in vitro* DNA複製系を利用してその性状解析を行った。

その結果、バキュロウイルス発現系を利用して発現させたXDbf4は、ヒトや酵母と同様にCdc7と結合してそのキナーゼ活性を上昇させ活性を持っていた。また、アフリカツメガエル卵抽出液中にはアフリカツメガエルCdc7（XCdc7）とXDbf4が存在し、両者は免疫沈降法により共沈することが確かめられ、またそのXCdc7-XDbf4複合体はキナーゼ活性を有していた。

アフリカツメガエル卵抽出液から、抗体を用いてXDbf4を除き、それを用いて*in vitro* DNA複製反応を行わせたところ、DNA合成は顕著に阻害されたことから、XDbf4はDNA複製に関与している可能性が示唆された。ところが、両者の卵抽出液中の濃度を測定したところ、XDbf4はXCdc7の約6分の1しか存在していなかった。また、卵抽出液のゲル濾過クロマトグラフィーによる解析の結果、卵抽出液中に存在するXCdc7は約400 kDの大きなコンプレックスとして存在していたが、それらの大部分はXDbf4とは結合してはいなかった。これらのXCdc7はXDbf4と結合していないにもかかわらず、Mcm2をリン酸化する活性を有していた。また、抗体を用いてXDbf4を除いた卵抽出液中でもXCdc7はキナーゼ活性を持つことを確かめられた。

一方、酵母やヒトなどの研究からDbf4のタンパク量が細胞周期を通じて変動し、それに従いCdc7が複製開始時に高い活性を示すこと、さらに、酵母Dbf4はanaphase promoting complex（APC）により分解されることが報告されている。そこで次に細胞周期に伴うXDbf4の挙動の変化について詳しく調べた。その結果、XDbf4は、間期アフリカツメガエル卵抽出液にnon-degradable cyclin B mutant proteinを加えて調製したM期様卵抽出液中でも安定に存在した。また第二減数分裂中期に停止した未受精卵から調製したM期卵抽出液を用いてAPC活性化状態にしても、XDbf4の分解は認められなかった。その一方で、これらM期卵抽出液中におけるXDbf4のリン酸化状態が間期抽出液中とは大きく異なること、またCdc7も間期に比べよりリン酸化されていることが示された。さらに、M期のXDbf4-Cdc7複合体はキナーゼ活性を有し、またクロマチンに結合したXDbf4、Cdc7をM期卵抽出液で処理してもクロマチンから遊離しなかった。一方M期から間期に移行する際、XDbf4のクロマチン結合とリン酸化状態変化は

ほぼ同時期に起こった。また XDbf4 の間期におけるクロマチン結合は、Pre-RC には依存せず Cdc7 とは独立に結合することが示された。

本研究から、XDbf4 はこれまで知られている酵母やヒトの Dbf4 ホモログと同じく DNA 複製に重要な役割を持つと考えられるものの、その挙動が大きく異なることが明らかになった。卵割期における Cdc7-Dbf4 の制御機構が体細胞型 DNA 複製における制御様式と異なる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

真核生物の染色体 DNA 複製は細胞周期を通じて S 期に正確に一度行われる事が必要であり、その開始反応は多くの複製関連因子により厳密に制御されている。その複製開始反応に必須なキナーゼである Dbf4-Cdc7 キナーゼは、はじめ出芽酵母で見いだされ、触媒サブユニット Cdc7 とその活性化に働く制御サブユニットである Dbf4 からなることが報告された。Dbf4-Cdc7 キナーゼは、分裂酵母、マウス、ヒトなど様々な種でそのホモログが見いだされ、高等動物まで広く保存されている事が明らかとなり、真核生物の DNA 複製開始反応を制御する上で非常に重要な働きを担っていると考えられている。

本論文では、真核生物の *in vitro* DNA 複製系のなかでは最も効率良く DNA 複製を行わせる事ができ、生化学的解析に適していると考えられるアフリカツメガエル *in vitro* DNA 複製系を用いて Dbf4-Cdc7 キナーゼの解析を行った。まず、未同定であったアフリカツメガエル Dbf4 (XDbf4) のクローニングを行い、その性状解析を行った。その結果、XDbf4 が *in vitro* で XCdc7 に結合し、そのキナーゼ活性を活性化する事が明らかとなった。また、卵抽出液でも両者がキナーゼ活性を持つ複合体を形成している事が明らかとなった。XDbf4 を除いた卵抽出液を用いた *in vitro* DNA 複製系においては、DNA 合成が著しく阻害を受けた事から、XDbf4 も DNA 複製に必須である事を示唆する結果が得られた。その一方で、卵抽出液中の XCdc7 のキナーゼ活性には影響は見られなかったことから、XDbf4 の DNA 複製における役割が XCdc7 の活性化のみならず、それに加えて何らかの機能を持つ可能性が示唆された。*In vitro* DNA 複製系において XDbf4 は MCM や XCdc7 よりも早い時期にクロマチンに結合し、また、pre-RC の形成に必須である ORC に依存せず、XDbf4 は大部分の XCdc7 とは異なる様式でクロマチンに結合している事が明らかとなった。また、卵抽出液中の XDbf4、XCdc7 の細胞周期における変動を調べたところ、酵母とは異なりアフリカツメガエル卵抽出液中では Dbf4 はタンパク量は変動しなかったが、Cdc7、Dbf4 共に M 期特異的なリン酸化を受けている事が明らかとなった。

本論文により、XDbf4 は、Cdc7 への結合やその活性化、DNA 複製への必要性等、基本的な働きは他の生物種における Dbf4 と同様の機能をもつが、クロマチン結合の様式や細胞周期によるタンパク量の変動等の点で、これまで報告された酵母やヒトの Dbf4 とは異なる性質を持つ事を明らかとし、初期胚においては体細胞型細胞周期とは異なる機構により Dbf4-Cdc7 キナーゼが DNA 複製に関与する可能性を示唆する重要な結果を示した。また、高等動物における Cdc7 の制御機構がこれまで考えられてきたより複雑かつ多様なものである可能性が示唆され、染色体 DNA 複製開始制御に関する新たな知見が得られた。以上の事から本論文は博士学位申請に相応しい内容であると考えられる。