



Title	The dual role of Xenopus Cut5 in the initiation of DNA replication and the replication checkpoint
Author(s)	橋本, 吉民
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45145
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	橋本吉民
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 18402 号
学位授与年月日	平成 16 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 dual role of <i>Xenopus</i> Cut5 in the initiation of DNA replication and the replication checkpoint (アフリカツメガエル Cut5 の DNA 複製開始および複製チェックポイントにおける機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 滝澤 温彦 (副査) 教授 杉野 明雄 教授 升方 久夫

論文内容の要旨

分裂酵母 Cut5/Rad4 およびその出芽酵母ホモログ Dpb11 は、DNA 複製開始および複製チェックポイントに必要な因子であるが、これまで高等真核生物での解析はほとんど行われていなかった。本研究では、アフリカツメガエル卵抽出液無細胞 DNA 複製系を用いた生化学的解析を行い、複製開始における S 期 CDK の作用に必要なことを明らかにした (part 1)。また Cut5/Dpb11 は、Pol ϵ との遺伝的相互作用から複製装置の一部として複製モニターに関わると考えられているが、複製開始に必須であるため、モニター機能については解析が困難であった。本研究では、卵抽出液を用いて複製開始と伸長反応を分離する系を開発し、複製モニターにおける Cut5/Dpb11 の役割を解析した (part 2)。

(Part 1) Cut5 は複製開始における CDK の作用に必要な

特異的抗体を用いた免疫除去実験から、Cut5 は卵抽出液中での DNA 複製に必須であることが分かった。Cut5 非存在下では、Cdc45 と DNA ポリメラーゼのクロマチン結合が起こらないことから、複製装置の形成過程に必要であると考えられる。一方、pre-RC の形成や DNA 複製伸長過程に Cut5 は必要ではなかった。Cut5 はクロマチン結合タンパク質であり、CDK 活性化前から低レベルで結合しているが、CDK 活性化後複製中に結合量が最大となり、複製の進行と共に次第に減少する。このうち CDK 非依存的結合だけで複製開始が起きることを見出した。さらに、CDK の作用における必要性を調べた結果、CDK は Cut5 非存在下では標的への作用が完了できないが、Cdc45 非存在下ではその作用を完了できることが明らかとなった。これらの結果は、Cut5 は複製装置形成過程において S 期 CDK が作用するために必須であり、Cdc45 の結合はその下流で起きることを示している。

(Part 2) Cut5 の RPA 依存的クロマチン結合が ATR 経路の活性化に必要な

Cut5 の CDK 非依存的クロマチン結合が複製開始に十分な機能をもっている (part 1) ことは、複製中に増加する結合は複製開始には不要であることを示唆している。本研究では、この結合量の増加が複製モニターと関係があると考え、CDK 非依存的 Cut5 結合で複製開始したクロマチンが複製阻害を受けた時、ATR-Chk1 経路を活性化できるかどうか調べた。その結果、CDK 非依存的結合しか起こらない条件下では Cdc45 やポリメラーゼの結合は影響を受けないが、複製阻害による Chk1 の活性化が著しく低下することを見出した。また、複製中のクロマチンを単離し

て塩処理により Cut5 を除去した結果、複製伸長活性は保たれていたが、複製阻害による Chk1 の活性化は消失した。また、複製中の Cut5 の結合は RPA 依存的に増加することを明らかにした。これらの結果は、Cut5 の結合量の増加は、複製開始後、一本鎖 DNA 領域の増加に伴って起こり、複製阻害に応答して ATR-Chk1 経路を活性化する複製進行をモニターする複製チェックポイント機構と密接に関係していることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

分裂酵母 Cut5 とその出芽酵母ホモログ Dpb11 は、複製開始と S 期チェックポイントに必要であるが、高等真核生物におけるホモログの機能解析はほとんどなされていなかった。橋本吉民君は、アフリカツメガエル Cut5 を同定し、アフリカツメガエル卵無細胞系を用いて Cut5 の生化学的解析を行い、複製開始における S 期 CDK の作用に Cut5 が必須の役割をもっていることを明らかにした。特に、複製開始に関わる Cdc45 の染色体結合に必須である事、しかし複製鎖の伸長反応や複製前複合体の形成には必要とされないこと明らかにした。さらに、アフリカツメガエル Cut5 の複製チェックポイントにおける機能の解析を初めて行った。従来、複製開始は S 期チェックポイントの確立に必要であるため、Cut5 のような複製開始因子のチェックポイントへの関与については研究が困難であった。橋本君は複製開始と複製鎖の伸長反応を分離した系を開発し、Cut5 が複製開始とは独立した機能として複製進行をモニターする機構に直接関与していることを示唆する結果を得た。以上の結果は、高等真核生物ばかりでなく、酵母の系においても複製開始とチェックポイント機構を解明する上で重要な知見となるものである。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。