Osaka University Knowledge Archive

Title	Mechanism of Initiation Complex Formation for DNA Replication in Fission Yeast
Author(s)	山田, 芳樹
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45639
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【13】

氏　　名	山　田　芳　樹（やま　だ　よし　き）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　１９０２２　号
学位授与年月日	平成 16 年 9 月 30 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	Mechanism of Initiation Complex Formation for DNA Replication in Fission Yeast （分裂酵母を用いた DNA 複製開始複合体形成機構の解析）
論文審査委員	（主査） 教　授　升方　久夫 （副査） 教　授　滝澤　温彦　　助教授　米崎　哲朗

論文内容の要旨

真核生物の染色体上には、巨大な染色体を効率よく複製するために多数の複製開始点が存在する。また染色体を正確に倍加させるために各々の複製開始点で複製開始反応が厳密に制御されている。この制御に異常をきたすと、過剰複製や複製開始頻度の減少を引き起こし染色体の安定性が損なわれる。複製開始反応の制御には様々なタンパク因子が関わる。ORC（Origin recognition complex）は複製開始点を認識する複合体であり、G1 期になると、ORC, Cdc18, Cdt1 依存的に、MCM 複合体（Minichromosome maintenance：Mcm2-7 の６量体で構成されるリング型 DNA ヘリカーゼ）が複製開始点に結合する。この複合体は複製開始前複合体（pre-replicative complex：pre-RC）と呼ばれ、pre-RC 形成を G1 期にのみ行うよう制御することにより、各々の複製開始点の１細胞周期あたり１度だけの複製が保証される。S 期になると、複製開始点 DNA 二重鎖の開裂やポリメラーゼのリクルートに関わる複製前複合体（pre-initiation complex：pre-IC）が形成される。pre-IC は Sld3, Cdc45, Dpb11, Sld2, GINS, Mcm10 といった因子から構成されており、細胞周期の制御に関わる２つの重要なキナーゼ、CDK（cyclin dependent kinase）と DDK（Dbf4-dependent kinase）依存的に複製開始点に結合する。pre-IC 因子のうち Sld2 は CDK によってリン酸化され、このリン酸化は複製開始にとって必須である。一方、DDK の関わるステップはまだよく分かっていない。複製開始に関わるタンパク因子の多くは酵母からヒトまで広く保存されていることから、真核生物に普遍的は複製開始機構が存在すると予想される。出芽酵母やアフリカツメガエル卵抽出液系では pre-IC 因子の染色体結合は相互依存的であり、各々の因子がどのようにヘリカーゼの活性化やポリメラーゼのリクルートに関わるのか解析が困難である。本研究では、特異的なステップに欠損を持つ分裂酵母点変異株を用いて pre-IC 形成過程の解明を目指した。

分裂酵母 pre-RC 点変異の遺伝的解析：特定の機能だけに欠損をもつ点変異株は、複数のステップで機能するタンパク因子の機能解析に特に有効なツールである。分裂酵母 pre-RC 構成因子の点変異の遺伝的解析を行った結果、ほとんどの変異株は、S 期サイクリンをコードする *cig2* を欠失させることにより生育が回復した。CDK 活性の上昇は pre-RC 形成頻度を減少することが報告されており、逆に CDK 活性の減少が pre-RC 形成を促進したと解釈される。それに対し、*mcm5/nda4-108* 変異は *cig2* 欠失によって生育が回復せず、また Cdc45 と密接な遺伝的関係を示した。これらの結果から、*mcm5* 変異は pre-RC 形成ではなく、Cdc45 が関わるステップに欠損を持つと予想された。

mcm5 変異は pre-IC 形成途中で停止する：*mcm5* 変異の欠損過程を解析するために、分子レベルでの解析を行った。MCM の複製開始点結合をクロマチン免疫沈降法（ChIP 法）により解析したところ、野生型では G1～S 期に複製開始点結合がみられたのに対し、*mcm5* 変異では G1 期に結合した後、解離しなかった。一方、Cdc45 の複製開始点結合を解析したところ、*mcm5* 変異では野生型と異なり複製開始点に結合しなかった。また、MCM と Cdc45 の共免疫沈降も検出されなかった。よって、*mcm5* 変異は MCM と Cdc45 の相互作用を損なっていると結論した。これらの結果は遺伝的解析の結果と一致する。一方、*mcm5* 変異では Cdc45 の複製開始点結合に必要な因子である Sld3 が複製開始点に結合していた。よって、Sld3 は Cdc45 を伴わずに複製開始点に結合できることが示された。Cdc45 を伴わない Sld3 の複製開始点結合は *cdc45* 変異でもみられることから、pre-IC 形成過程が出芽酵母と分裂酵母で異なる可能性が示唆された。

次に *mcm5* 変異株で形成される複合体が複製開始過程の中間体である可能性を検討した。*mcm5* 停止させた細胞を許容条件に戻したところ、速やかに Cdc45 の結合が回復し、その後 Mcm6, Sld3, Cdc45 が複製開始点から消失、DNA 複製が完了した。これらの結果から *mcm5* 変異は複製開始反応の中間段階で停止していることが示唆された。さらに複製開始領域 *ars2004* 内で Mcm6 と Sld3 は共局在したことから Sld3 は pre-RC と相互作用して複製開始点に結合していることが示唆された。Mcm6 の局在を詳細に解析すると、G1 期の時と比べ *mcm5* 停止時にはピークが約 300 bp 変化することを見出した。このような局在変化は Sld3 等の因子が MCM に何らかの活性変化を引き起こすことを意味する。

Sld3 の複製開始点結合は DDK に依存するが CDK を必要としない：pre-IC 形成には pre-RC, DDK, CDK が関わることが報告されている。分裂酵母の pre-IC 形成過程では Sld3 が重要な役割を果たすと考えられるため、Sld3 の複製開始点結合に対するこれらの寄与を解析した。その結果、pre-RC 形成に欠損を示す *mcm2* 変異及び DDK に変異を持つ *hsk1* 変異では Sld3 の複製開始点結合が減少していた。一方、CDK をコードする *cdc2* 変異では Cdc45 の複製開始点結合は減少しているが Sld3 は結合していることがわかった。これらの結果は分裂酵母 Sld3 の複製開始点結合に pre-RC, DDK が必要であるが、CDK は必要でないことを示している。

結論と考察：以上の解析から、分裂酵母 MCM と Cdc45 の相互作用に Mcm5 が関与すること、Sld3 は Cdc45 を伴わずに複製開始点結合できること、Sld3 の複製開始点結合は pre-RC, DDK 依存的であることが結論された。つまり、分裂酵母 pre-IC 形成過程では Sld3 と Cdc45 が段階的に複製開始点に結合しており、一つ目のステップには pre-RC と DDK が、二つ目のステップには Mcm5 と CDK が必要である（図２）。Cdc45 を伴わずに Sld3 が複製開始点に結合したステップでは、一本鎖 DNA は認められなかったが、MCM の状態が G1 期と異なっており、MCM ヘリカーゼが pre-IC 形成過程において多段階で活性制御されている可能性がある。2 つのキナーゼのうち DDK にのみ依存するステップが今回初めて見出された。CDK は S 期開始のグローバルな制御に関わり、Sld2 がターゲットの一つである。DDK は各々の複製開始点のローカルな制御に関わっており、Sld3 がその下流にあることがわかった。pre-IC 構成因子の複製開始点結合が相互依存的な出芽酵母では、CDK, DDK に依存したステップを区別するのは困難であったが、今後、分裂酵母を用いた解析で、複製開始におけるキナーゼの寄与が明らかになると期待される。

論文審査の結果の要旨

申請者は、分裂酵母染色体 DNA の複製開始複合体の形成機構を解析した。複製開始必須因子 *mcm5* の点突然変異を用いた分子遺伝学的解析により、複製開始複合体形成の新規中間体を発見し、さらにその中間体形成の制御経路を明らかにした。これらの成果は、真核生物染色体の複製開始とその制御機構の分子レベルでの理解を深める重要な発見であり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。