

Title	The roles of Sacchomyces cerevisiae Cdc7-Dbf4 complex in DNA replication and replication checkpoint
Author(s)	大木, 啓央
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47214
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	大 木 啓 央
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 2 1 3 3 4 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学位論文名	The roles of <i>Sacchomyces cerevisiae</i> Cdc7-Dbf4 complex in DNA replication and the replication checkpoint (DNA 複製と複製チェックポイントにおける出芽酵母 Cdc7-Dbf4 複合体の役割)
論文審査委員	(主査) 教 授 花岡 文雄 (副査) 教 授 升方 久夫 教 授 田中亀代次

論 文 内 容 の 要 旨

細胞の遺伝情報である染色体 DNA を過不足なく正確に複製し、娘細胞に均等に分配することは、細胞が正常に増殖するために必要不可欠である。そのため染色体 DNA の複製及び分配の過程は厳密に制御されており、万一その過程で何らかの障害が生じた場合には、それらの修復を促進し、修復が完了するまで細胞周期を停止させておくためにチェックポイントと呼ばれる機構が機能する。

S 期には DNA 上の傷や DNA 合成の基質となる dNTPs 量の低下などにより、複製フォークの進行が阻害されることによって、チェックポイントが活性化される。これらの障害により、進行が妨げられた複製フォーク近傍に Mec1/Ddc2 が局在し、複製フォークの構成因子である Mrc1、Tof1/Csm3 を介して、Rad53 をリン酸化していると考えられている。Mec1/Ddc2 によるリン酸化によって活性化された Rad53 は複製フォークを安定化し、細胞周期を停止させ、Cdc7-Dbf4 のリン酸化を介して、DNA 複製が新たに開始されるのを阻害し、Dun1 のリン酸化を介して、修復や dNTPs 量の増加に関与している遺伝子の転写を活性化することによって、正常な細胞増殖を促している。

Cdc7-Dbf4 複合体は DNA 複製の開始に必要な因子であり、細胞の生育に必須な遺伝子であるが、*MCM5* 遺伝子にある変異 (*mcm5-bob1*) を導入することによって、*CDC7* または *DBF4* 遺伝子を欠失させることができる。この *mcm5-bob1 Δcdc7* 変異株は生育可能であるが、S 期の進行が遅延しており、また dNTPs の量を枯渇させ、チェックポイントを活性化させる薬剤であるヒドロキシウレア (HU) に対して感受性を示すことから、Cdc7-Dbf4 は DNA 複製の開始以外にも機能していると考えられている。そこで本研究では、DNA 複製およびチェックポイントにおける Cdc7-Dbf4 の機能の詳細な解析を行った。

mcm5-bob1 Δcdc7 及び *mcm5-bob1 Δdbf4* 変異株を作製し、フォルムアルデヒドで処理した細胞のクロマチンから、DNA ポリメラーゼ ε のサブユニットを免疫沈降することで、複製フォークの動態を調べたところ、野生型株、*mcm5-bob1* 単独変異株と比較して Cdc7-Dbf4 欠損株では複製フォークを構成している一部の因子の量が減少していた。次にこれらの変異株の薬剤に対する感受性を調べたところ、HU 及び DNA アルキル化剤である MMS に対して感受性を示した。Cdc7-Dbf4 のキナーゼ活性を喪失させた変異株でも同様に薬剤感受性を示したことから、Cdc7-Dbf4 によるリン酸化がチェックポイントにおいて重要であることが明らかになった。そこで、Dbf4 と物理的に相互作用

し、HU 存在下で Dbf4 をリン酸化することが知られている Rad53 のリン酸化状態を解析したところ、S 期のチェックポイントにおいてのみ、Cdc7-Dbf4 欠損株での Rad53 のリン酸化状態が野生型株、*mcm5-bob1* 単独変異株に比べて著しく低下していた。Cdc7-Dbf4 の温度感受性変異株を用いた実験でも同様の結果が得られ、Rad53 のリン酸化状態の低下と合わせて Rad53 の *in situ* での自己リン酸化活性も低下していた。また、精製したタンパク質を用いて *in vitro* でリン酸化実験を行ったところ、Rad53 は Cdc7-Dbf4 によって効率よくリン酸化された。次に Cdc7-Dbf4 欠損株における Rad53 のリン酸化及び活性化の低下の影響を調べるために Rad53 のチェックポイントにおける機能の 1 つである転写の活性化を測定した。Cdc7-Dbf4 欠損株では野生型株、*mcm5-bob1* 単独変異株に比べて、Rad53 にリン酸化され、転写を誘導している Dun1 のリン酸化状態が低下しており、さらに Dun1 によって転写が誘導されるプロモーターの活性も著しく低下していた。以上の実験結果から、Cdc7-Dbf4 は DNA 複製においては、複製フォークが正しく構築されることに関与しており、またチェックポイントにおいては Rad53 の標的であると同時に Rad53 の活性化に関与し、Rad53 の下流の事象を制御している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者は DNA 複製における DNA ヘリカーゼ候補である Mcm2-7 のリン酸化を介して、染色体 DNA 複製の開始に関わっていると考えられている Cdc7-Dbf4 キナーゼ複合体が、複製チェックポイントにおいて Rad53 の高リン酸化にも関わっていることを明らかにした。さらに、Rad53 が試験管内で Cdc7-Dbf4 キナーゼ複合体によってリン酸化されることに加え、Cdc7-Dbf4 キナーゼ複合体依存的な Rad53 の高リン酸化が Rad53 の下流のターゲットのひとつである Dun1 の高リン酸化を介して、複製チェックポイントの活性化に伴って活性化される *RNR3* 遺伝子の転写の活性化に関与していることを明らかにした。Rad53 の高リン酸化と転写の活性化以外の Rad53 の機能との関連や、Cdc7-Dbf4 キナーゼ複合体による Rad53 のリン酸化サイトの特定及びリン酸化サイトに変異を導入した変異株の解析にまで発展していれば、なお良かったが、申請者によって得られた結果は Cdc7-Dbf4 キナーゼ複合体の DNA 複製の開始と複製チェックポイントにおける機能を区別したという点で十分新規性があり、学位の授与に値すると考える。