The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	染色体DNAの複製伸長過程における制御機構の分裂酵母を用いた解析
Author(s)	二谷, 直樹
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47664
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

【70】

氏　　名	二谷直樹（にたなおき）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２０８７９　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 理学研究科生物科学専攻
学　位　論　文　名	**染色体 DNA の複製伸長過程における制御機構の分裂酵母を用いた解析**
論文審査委員	（主査） 教　授　升方　久夫 （副査） 教　授　滝澤　温彦　　教　授　篠原　　彰

論　文　内　容　の　要　旨

複製の伸長は様々な要因によって阻害されることが知られている。このとき、どのようにして複製中間体が維持され、伸長が再開できるかについてはほとんど分かっていない。私は DNA の開裂に働く複製因子、MCM ヘリケースと Cdc45 が複製の伸長が阻害されたときに果たす役割を明らかにするために分裂酵母を用いて解析を行った。

DNA 複製の停止時における Cdc45-MCM の制御

ヒドロキシウレア（HU）は dNTP を枯渇させることで DNA 複製の伸長を阻害する。Mrc1 は HU により複製が阻害されたときに、２つの重要な働きを果たす。１つは、複製チェックポイントの活性化である。もう一つは、ヘリケースにより鋳型 DNA が開裂した構造を持つ複製フォークと DNA 合成（酵素）との DNA 上の距離を一定にする（カップリング）ことである。私は Mrc1 がどのようにして働くのかを知るために、複製の開始にのみ必要な Orc1、または、開始だけでなく伸長にも必要な Cdc45 の変異株と *mrc1* 破壊（*Δ*）株との二重変異株を作製し、HU 感受性を調べた。その結果、*cdc45* 変異を導入した場合にのみ *mrc1Δ* 株の HU 感受性が抑制された。このことから、複製の伸長が低下することで *mrc1Δ* 株の HU 感受性が抑制されると考えられる。Mrc1 は Cdc45-MCM ヘリケースの活性を負に制御することで DNA 合成（酵素）と複製フォークとをカップリングし、複製伸長の再開に寄与しているのではないかと考えられる。

DNA 複製の再開における Mcm4 の C 末領域の役割

真核生物の MCM ヘリケースの６つのサブユニットの中で Mcm4 は古細菌に存在する単一種類の MCM との相同性が最も高いことから、重要なサブユニットであると考えられる。古細菌 MCM は、複合体形成に関わる N 末領域、中央のヘリケースモチーフ、そして、機能未知の C 末領域から成る。私は C 末領域の役割を知るために、この領域を欠いた分裂酵母 *mcm4-c* 株を作成した。通常の培養条件では *mcm4-c* 株は野生株と同様に増殖した。一方、HU に対して高感受性を示した。この結果から、Mcm4 の C 末領域は複製が阻害された場合に特異的な役割を持つと考えられる。HU 除去後の細胞の DNA 含量を調べたところ、野生株に比べ、*mcm4-c* 株では DNA 含量の増加が遅れることが分かった。また、このとき、細胞周期の進行再開も遅れた。これらの結果から、*mcm4-c* 株では停止した複製フォークが複製を正常に再開できない可能性が考えられる。そこで、野生株と *mcm4-c* 株で形成される複製中間体構造を比

較するため、二次元ゲル電気泳動法を行った。その結果、HU 除去後、*mcm4-c* 株では野生株よりも多くの十字型 DNA を蓄積することが分かった。これらの結果から、Mcm4 は一度停止した複製フォークの進行再開に必要であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

遺伝情報を複製し娘細胞へと分配することはすべての生物に必須である。このため、DNA 合成基質の枯渇や DNA の傷害などの複製ストレスによって複製進行が阻害されたときには、停止した複製装置を維持し複製を再開させる機構が重要となる。申請者は、分裂酵母を用いた解析において、DNA 二重鎖の開裂に働く MCM ヘリカーゼと Cdc45 の機能が抑制的に調節されることが複製装置維持ならびに複製再開に必要であることを示した。さらに MCM ヘリカーゼ構成因子である Mcm4 のカルボキシル末端領域が、停止した複製の再開に必須の機能を果たすことを明らかにした。

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。