

Title	DNA複製開始におけるXenopus RecQ4の機能解析
Author(s)	真津野, 久美子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47687">https://hdl.handle.net/11094/47687</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	眞津野 久美子
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 20676 号
学位授与年月日	平成 18 年 9 月 27 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	DNA 複製開始における <i>Xenopus</i> RecQ4 の機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 滝澤 温彦 (副査) 教授 升方 久夫 教授 原口 徳子

#### 論文内容の要旨

Recruitment of DNA polymerases onto replication origin is a crucial step in the assembly of eukaryotic replication machinery. A previous study in budding yeast suggests that Dpb11 controls the recruitment of DNA polymerases alpha and epsilon onto the origins. Sld2/Drc1 is an essential replication protein that interacts with Dpb11, and the interaction is thought to be important for assembly of replication machinery. In other eukaryotes, however, a homolog of Sld2/Drc1 has not been identified yet. To identify *Xenopus* Sld2/Drc1 homolog, we screened a *Xenopus* cDNA library with the *Xenopus* EST sequence showing similarities to yeast Sld2/Drc1 as a probe. The ORF of an obtained clone coded a peptide of 1503aa-about 1000aa larger than yeast Sld2/Drc1. N-terminal domain of the peptide shares sequence similarities with yeast Sld2/Drc1 (40%) while additional C-terminal domain contains a helicase motif. The entire sequence of the protein shows the highest similarity with human and mouse RecQ4 (40-70% and 80-90% similarity in N-terminal and C terminal domain, respectively), suggesting that obtained clone is *Xenopus* RecQ4 homolog (XRecQ4). To investigate the role of XRecQ4 for initiation of DNA replication, we raised antibodies against N-terminal peptides of XRecQ4. Immunodepletion of XRecQ4 from *Xenopus* egg extracts resulted in the inhibition of DNA replication and chromatin binding of DNA polymerase  $\alpha$  was suppressed, without affecting the binding of Cdc45. N-terminal 595aa of XRecQ4 (N2-XRecQ4) but not N-terminal 333aa of XRecQ4 (N1-XRecQ4) could rescue the replication activity of the depleted extract. Next, we examined the interactor of XRecQ4 in *Xenopus* egg extracts and we found that XRecQ4 and XCut5 were co-immunoprecipitated each other. In vitro pull down assay, N2-XRecQ4 but not N1-XRecQ4 was found to interact with XCut5. These results suggest that N-terminal domain of XRecQ4 interacts with XCut5 and it is required for chromatin binding of the polymerase  $\alpha$  in the initiation of DNA replication. Based on these results, we suggest that N-terminal XRecQ4 plays a critical role for initiation of DNA replication as a functional homolog of Sld2/Drc1.

複製開始領域 (origin) への DNA polymerases の誘導は、複製開始において重要なステップである。以前の報告から出芽酵母において Dpb11 が DNA polymerase  $\alpha$  (Pol  $\alpha$ ) および  $\epsilon$  (Pol  $\epsilon$ ) の origin への結合を制御することが示唆されていた。Sld2/Drc1 は、S 期 CDK によってリン酸化されることで Dpb11 と相互作用し、DNA 複製開始

に必須な働きをすると報告されている。分裂酵母 Sld2/Drc1 ホモログは報告されているが、多細胞生物におけるホモログは報告されていない。本研究では、アフリカツメガエル Sld2 ホモログの候補として RecQ4 を単離した。RecQ4 の N 末領域のアミノ酸配列は、Sld2/Drc1 と相同性を示した。RecQ4 は、RecQ helicase family のメンバーであり、ヒトの Rothmund-Thomson syndrome の原因遺伝子として知られているがその機能は報告されていない。そこで、多細胞生物において RecQ4 が Sld2 の機能ホモログとして働いている可能性を検討することにした。アフリカツメガエル間期卵抽出液において RecQ4 は DNA 複製開始に必須であり、Pol  $\alpha$  の染色体結合に機能していた。RecQ helicase を含まない RecQ4 の N 末領域 (1-596aa ; N2) は、RecQ4 を免疫除去した間期卵抽出液の DNA 複製活性および Pol  $\alpha$  の染色体結合の抑制を回復したが、RecQ4 の N 末領域 (1-334aa ; N1) では、このような回復は観察されなかった。また、N2 はアフリカツメガエル Dpb11 ホモログとして報告されている Cut5 と相互作用したが、N1 では Cut5 との相互作用は非常に弱くなっていた。これらのことから、RecQ4 の N 末領域の DNA 複製活性の回復と Cut5 との相互作用は関連している可能性が示唆された。これらの結果は、RecQ4 が Cut5 との相互作用を通して DNA 複製開始複合体形成過程において必須な機能を持つことを示唆している。

### 論文審査の結果の要旨

複製開始領域 (origin) への DNA polymerases の誘導は、複製開始において重要なステップである。以前の報告から出芽酵母において Dpb11 が DNA polymerase  $\alpha$  (Pol  $\alpha$ ) および  $\epsilon$  (Pol  $\epsilon$ ) の origin への結合を制御することが示唆されていた。Sld2/Drc1 は、S 期 CDK によりリン酸化されることで Dpb11 と相互作用し、DNA 複製開始に必須な働きをすると報告されている。しかし多細胞生物におけるホモログは報告されていなかった。真津野さんは、Sld2 の *Xenopus* ホモログ候補として RecQ4 を単離した。RecQ4 は、RecQ helicase family のメンバーであり、ヒトの Rothmund-Thomson 症候群の原因遺伝子として知られているがその機能は報告されていなかった。真津野さんは、多細胞生物において RecQ4 が Sld2 の機能ホモログとして働いている可能性を検討し、*Xenopus* 卵抽出液において RecQ4 は DNA 複製開始に必須であり、Pol  $\alpha$  の染色体結合に機能している事を発見した。また RecQ helicase を含まない RecQ4 の N 末領域 (1-596aa, N2) は、複製活性に必要十分であり、Dpb11 の *Xenopus* ホモログである Cut5 と物理的に相互作用することを見出した。これらの結果は、RecQ4 が Cut5 との相互作用を通して DNA 複製開始複合体形成過程において必須な機能を持つことを初めて示したものである。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として充分価値あるものと認める。