The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	DDK-dependent Sld3 loading and sequential assembly of replication machinery onto replication origins in regulation of chromosomal DNA replication initiation
Author(s)	藪内, 隼人
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48777
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

【53】

氏　　名	藪　内　隼　人（やぶうちはやと）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２１７６８　号
学位授与年月日	平成 20 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	DDK-dependent S1d3 loading and sequential assembly of replication machinery onto replication origins in regulation of chromosomal DNA replication initiation （染色体 DNA 複製開始制御における DDK 依存的 S1d3 結合と段階的複製装置形成過程の研究）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　升方　久夫 （副査） 教　授　篠原　　彰　　教　授　滝澤　温彦

論　文　内　容　の　要　旨

〈研究の背景と目的〉

遺伝情報を正確に子孫へ伝えるため、染色体の複製開始段階は細胞周期によって非常に厳密に制御されている。DNA 複製準備期（G1 期）には、染色体上に分布する複製開始点上に複製 DNA へリカーゼと考えられる MCM 複合体が結合、複製前複合体（pre-replicative complex, pre-RC）が形成される。細胞周期が進行し DNA 合成期（S 期）になると、pre-RC 上に多くの複製因子が集合し、複製装置が形成され、MCM の活性化の後複製が開始する。G1 期における pre-RC 形成機構については詳細が明らかとなりつつあるが、S 期における複製開始機構は不明な点が多く残されている。S 期における複製装置形成には Sld3、Cdc45、GINS など多くの因子が関与し、また２種類のリン酸化酵素、cyclin-dependent kinase（CDK）と Dbf4-dependent kinase（DDK）によって制御される。私は S 期における複製装置形成とその制御機構を解明するため、分裂酵母をモデル生物として用い解析を行った。

〈結果と考察〉

分裂酵母 GINS 複合体の解析

GINS は Sld5、Psf1、2、3 からなる複合体で、複製開始に必須な因子である。分裂酵母 GINS 構成因子の一つ Psf3 の温度感受性変異株は制限温度において正常な GINS 複合体が形成されず、複製開始に欠損を示した。複製開始点上への GINS 複合体の結合を調べた結果、*psf3* 変異株では野生株で見られる GINS の開始点結合が見られなかった。これらの結果から、*psf3* 変異株では S 期初期に GINS が開始点に結合しないため複製装置形成が正常に進まず、結果複製開始に欠損を示すことが示唆された。

複製因子変異株を用いた装置形成過程の解析

次に、*psf3* 及びその他複製因子の温度感受性変異株を用い複製装置形成過程の解析を試みた。*psf3* 変異株では Mcm6、Sld3 は開始点に結合していたが Cdc45、Cut5 は結合していなかった。一方 GINS の結合を調べた結果、*sld3*、*cut5* 変異株では結合が見られなかったが、*cdc45* 変異株ではその結合が見られた。以上の結果から、分裂酵母におけ

る複製装置形成では Sld3-›GINS&Cut5-›Cdc45 という依存関係があることが明らかとなった。また CDK、DDK の変異株を用いた別の解析から、これらの段階のうち DDK は Sld3 の結合過程に、CDK はそれ以降の結合過程に寄与することが明らかとなった。

DDK 依存的 Sld3 結合過程の詳細な解析

以上の結果、Sld3 の結合が装置形成の最も上流に位置することが明らかとなり、装置形成制御に重要な段階であると考えられた。そこで、この段階についての詳細な反応機構の解析を試みた。Sld3 の開始点結合に DDK が十分であるかどうかを検討するため、G1 期停止細胞を用いた系を利用した。G1 停止細胞に強制的に pre-RC を形成させ、さらに本来この時期には発現していない DDK の制御サブユニットを発現させたところ、Sld3 の開始点結合が見られた。この結果から、pre-RC 形成以降 Sld3 の結合には DDK が必要十分であることが示唆された。一連の解析より DDK 依存的な Sld3 の開始点結合が S 期における複製開始機構において重要な制御段階であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者藪内隼人君は、真核生物染色体 DNA の複製開始過程での分子集合の制御機構を明らかにすることを目的として研究を行った。染色体 DNA の複製は細胞周期によって巧妙に制御されており、S（複製）期には複製開始点に一過的かつダイナミックに複製因子が集合し、その結果として DNA 二重鎖を開裂し複製が開始する。申請者は、分裂酵母の変異株中での解析から、複製開始時の蛋白因子分子集合が因子間の決められた依存性に従って進行することを明らかにし、さらに複製開始に必要な２種類のキナーゼが制御するステップを解明した。

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。