

Title	Establishment of a site-specific replication origin and Investigation of origin unwinding using <i>Xenopus</i> in vitro replication system
Author(s)	讃岐, 陽介
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/52290
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨

氏名 (讃岐 陽介)

論文題名 **Establishment of a site-specific replication origin and Investigation of origin unwinding using *Xenopus in vitro* replication system**
(ツメガエル卵無細胞複製系における配列特異的複製起点の構築及び複製起点開裂機構の解析)

論文内容の要旨

〈研究背景、目的〉 DNA複製は遺伝情報を次世代に伝えるための非常に重要なプロセスである。真核生物の染色体DNA複製は、DNA上の複製起点へ複製因子が段階的に結合する事で開始する。はじめにM期後期からG1期において複製起点上にpre-RC (複製前複合体) が形成される。pre-RCは、複製起点に結合したORCに依存してCdc6、Cdt1が染色体に結合し、これら三者依存的に複製ヘリカーゼであるMcm2-7が不活性な状態で染色体上に呼び込まれることで完成される。このpre-RC形成により複製起点はS期にDNA複製を開始するための「ライセンス化」された状態になる。続いてS期に進行すると、CDK、DDKによりpre-RCは活性化され、Mcm2-7、Cdc45、GIN5からなるCMG複合体に変換される。CMG複合体は複製複合体であるレプリソーム中で、二重鎖DNAを開裂する複製ヘリカーゼとして働くと考えられている。しかしCMG複合体がどのように活性化され二重鎖開裂を開始するのか、その分子機構は不明な点が多い。

DNA複製時の二重鎖開裂機構を理解する上で、複製因子の複製起点への結合と、DNA構造の違いを同時に検出することは重要である。これまで複製起点を中心とした複製因子の挙動は、特定のDNA配列を複製起点にもつ出芽酵母を用いて解析が進められてきた。しかし高等真核生物の複製因子には出芽酵母と相同性の低いものも存在し、出芽酵母と高等真核生物ではDNA複製機構に異なる点が存在すると予想される。高等真核生物のDNA複製を理解する上で、高等真核生物のDNA複製を試験管内で再現できる唯一の実験系であるツメガエル卵無細胞複製系は、生化学的解析における強力なツールである。しかしこの系の複製起点は決まっておらず、鑄型DNA上のランダムな位置から複製が開始する。従って複製起点を中心に解析を行うことは困難であり、さらにpre-RC形成の場とDNA複製が実際に開始する場との関係性も明らかでなかった。そこで私は、ツメガエル卵無細胞複製系を用い、DNA上に配列特異的にpre-RCを形成し、DNA複製を開始させることを試みた。そしてこの系を用いて複製因子の複製起点への結合、DNA二重鎖開裂とDNA複製を解析することで、高等真核生物のDNA複製開始機構を解明することを目指した。

〈研究方法、結果〉 私は配列特異的な複製起点を構築するためにまず、pre-RC構成因子の1つであるCdc6を、GAL4蛋白質のDNA結合ドメインと融合したGAL4-Cdc6を精製した。そしてGAL4-Cdc6をGAL4結合配列特異的にプラスミドに結合させ、続いてそのプラスミドを、内在Cdc6を免疫除去した卵抽出液内で反応させた (図1)。その結果、GAL4結合配列を含むプラスミド特異的にpre-RCが形成され、さらにChIP解析によりGAL4結合配列近傍にpre-RCが形成されていることを明らかにした。次にGAL4結合配列特異的にpre-RCを形成したプラスミドにS期の核抽出液であるNPEを加える事で、レプリソームを構築し、DNA複製を開始させることを試みた。その結果NPEの添加によりCMG複合体やDNAポリメラーゼであるPolaがGAL4結合配列近傍に結合し、さらにその近傍からDNA複製が開始されることを見いだした。これらの結果から配列特異的に形成されたpre-RCの近傍からDNA複製が開始される事、すなわち配列特異的な複製起点の構築に成功したことが考えられた。

次に、複製開始時にみられる様々な複製因子の複製起点への結合を調べたところ、高等真核生物特有の複製因子であるRecQ4とTreslinが複製起点へ結合することを見いだした。RecQ4は、これまで卵無細胞複製系において、Cdc45やGIN5のDNA結合には必要がないが、Polaや一本鎖結合蛋白質であるRPAのDNA結合に必要であることが報告されている。そこで卵抽出液からRecQ4を除き、配列特異的複製起点への複製因子の結合を解析した。その結果、RecQ4を除去することで複製反応やPolaの結合は抑

制されるが、Cdc45の配列特異的複製起点への結合には影響しなかった。さらにRecQ4を除去してもDNA上にCMG複合体の構成因子は強固に結合していることを見いだした。これらの結果からRecQ4は、CMG複合体の複製起点上での形成には必要とされない事が考えられた。続いて私は、二重鎖開裂時のRecQ4の働きを明らかにするために、一本鎖DNA特異的に切断するP1ヌクレアーゼを用い解析を試みた。その結果、RecQ4除去によりDNA複製時に観察される二重鎖DNAの開裂が抑制された。さらにRecQ4除去による二重鎖開裂やDNA複製への影響は、RecQ4のN末断片を卵抽出液に加えることにより回復を促すことができた。しかしCDKによりリン酸化され得る配列をアラニンに変異させたRecQ4のN末断片では、野生型ほどの回復がみられず、RecQ4の働きにCDKの活性が必要であることが示唆された。これらの結果から高等真核生物のDNA複製時にRecQ4は、CMG複合体が複製起点上に形成された後、CMG複合体を活性化して二重鎖開裂を開始する反応を促進すると考えた。またこれまでCDKの活性はCMG複合体を形成するのに必要であると考えられてきたが、それに加えてRecQ4が働く過程においてもCDKによるリン酸化が重要であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (讃 岐 陽 介)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	滝澤 温彦
	副 査	教授	升方 久夫
	副 査	教授	篠原 彰
	副 査	助教	高橋 達郎

論文審査の結果の要旨

真核生物の染色体DNA複製は、DNA上の複製起点へ複製因子が段階的に結合する事で開始するが、複製起点の二本鎖DNAが1本鎖に開裂することで複製が開始する分子レベルでの機構は、ほとんど解明されていない。この機構を解明するためには、試験管内複製系を用いて複製起点における複製因子の挙動を解析することが重要である。高等真核生物のDNA複製を試験管内で再現できる唯一の実験系であるツメガエル卵無細胞複製系は、生化学的解析における強力なツールであるが、鋳型DNA上のランダムな位置から複製が開始する。従って複製起点を中心に解析を行うことは困難であった。讃岐君は、ツメガエル卵無細胞複製系において配列特異的複製起点の構築を試み、GAL4結合ドメインを融合したCdc6をGAL4結合配列特異的にプラスミドに結合させ、内在Cdc6を除いた卵抽出液内で反応させることで、DNA配列特異的にpre-RCを構築し、DNA複製を開始することに成功した。さらに配列特異的複製起点には、複製開始前から不活性な状態で結合しているDNAヘリカーゼの本体Mcm2-7に加えてCdc45、DNAポリメラーゼ α 、さらに高等真核生物特有な複製因子であるRecQ4とTreslinが結合することを見いだした。RecQ4は、これまで卵無細胞複製系においてCdc45などのDNA結合には必要がないが、複製開始に必要であることが報告されている。そこで卵抽出液からRecQ4を除き、配列特異的複製起点への複製因子の結合を調べたところ、RecQ4の除去により複製開始反応やDNAポリメラーゼ α の結合は抑制されたが、Cdc45の配列特異的複製起点への結合には影響しなかった。さらにRecQ4を除去してもDNA上にDNAヘリカーゼの本体であるCMG複合体の構成因子は強固に結合している事を見いだした。また二重鎖DNAの開裂を検出するP1ヌクレアーゼ解析を試み、RecQ4除去によりDNA複製時の二重鎖の開裂が抑制されることを示した。これらのRecQ4除去によるDNA複製活性の阻害は、RecQ4のN末断片を卵抽出液に加えることで回復させたが、S期開始の引き金となるCDKによりリン酸化され得る配列をアラニンに変異させたRecQ4のN末断片では、野生型ほどの回復がみられないことが分かった。これらの結果は、高等真核生物のDNA複製時にRecQ4が複製起点上にCMG複合体形成後、CMG複合体を活性化して二本鎖開裂を開始する反応を促進し、この過程においてCDKによるリン酸化が重要であることを示唆するものである。これらの成果は、高等真核生物における複製開始の分子機構解明に大きく貢献すると考えられる。よって、本論文は、博士(理学)の学位論文として十分価値のあるものと認める。

