The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Regulation of DNA replication by Cyclin-dependent kinase in fission yeast
Author(s)	福浦, 正義
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59475
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

【11】

氏　　名	福　浦　正　義（ふくうらまさよし）
博士の専攻分野の名称	博　士（理学）
学位記番号	第　２４８８３　号
学位授与年月日	平成23年９月20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	Regulation of DNA replication by Cyclin-dependent kinase in fission yeast （分裂酵母におけるサイクリン依存性キナーゼによるDNA複製の制御）
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

<背景と目的>

細胞が正常に分裂・増殖するためには染色体を一細胞周期あたり一度だけ正確に複製しなければならない。そのため、染色体複製の開始は細胞周期によって厳密に制御されている。CDKは細胞周期を制御する蛋白リン酸化酵素であり、この活性は染色体複製の開始に必要である。それゆえ、細胞周期に依存した染色体複製反応を理解するためにはCDKによる複製開始の制御機構を明らかにすることが重要である。

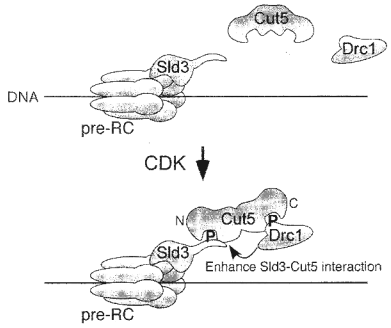
染色体複製は染色体上に存在する開始点と呼ばれる特定の領域から起こる。G1期にDNAヘリカーゼであるMcm2-7が開始点上にロードされpre-RCと呼ばれる複合体が形成される。S期に入るとMcm2-7の活性化に必要ないくつかの複製因子がpre-RC上に集合し、複製が開始される。これらの反応の中で、CDKはS期の複製因子の集合に必要である。近年の出芽酵母の解析から、複製因子Sld2とSld3のCDKによるリン酸化が染色体複製の開始に必要であることが報告された。Sld2とSld3はこのリン酸化によりDpb11との相互作用が促進される。しかしながら、Sld2やSld3のリン酸化がどのようにして開始点上での複製因子の集合を促進しているのかは明らかでない。また、多細胞動物種ではSld2とSld3のような複製開始に必要なCDKの標的が発見されていないことから、Sld2やSld3を介したCDKによる制御が真核生物を通して保存されているのかはわかっていない。

出芽酵母から進化的に離れた分裂酵母にはSld3とSld2のホモログが同定されている。Drc1(分裂酵母Sld2ホモログ)はCDKにリン酸化されることが示されているが、このリン酸化の機能は明らかでない。また、分裂酵母Sld3がCDKの標的として働いているかは明らかでない。私はCDKによる複製開始の制御機構を理解するために、分裂酵母をモデル生物に用いてSld3とDrc1の機能を解析した。

<結果と考察>

分裂酵母Sld3の生体内でのリン酸化を調べたところ、Sld3はS期にCDK依存的なリン酸化を受けることがわかった。酵母Two-hybrid法において、Sld3はCut5(分裂酵母Dpb11ホモログ)とpre-RC構成因子のMcm2と相互作用した。Sld3のCDKコンセンサス部位(CDK部位)をアラニンに置換したSld3-9AはCut5との相互作用が特異的に低下した。Cut5はリン酸化蛋白結合に働くBRCTモチーフをN末とC末に2つ持つ。Sld3とCut5の相互作用領域を調べたところ、この相互作用はSld3のC末99アミノ酸とCut5のN末BRCTモチーフを介していた。次に、生体内でのSld3のリン酸化の機能を調べるために、分裂酵母*sld3-9A*株を作製した。この変異株は低温での増殖低下とS期の遅延を示した。*sld3-9A*株の複製因子の開始点結合を調べたところ、Sld3の開始点結合は見られたが、Cut5およびDrc1の開始点結合が大きく低下することがわかった。また、*sld3*遺伝子の部分欠失株の解析から、Sld3のCut5との相互作用領域(C末99アミノ酸)は生育に必須であること、この領域を欠いたものとCut5を融合することで生育可能になることがわかった。これらの結果より、Sld3とCut5の相互作用は生育に必須であり、Sld3のCDKによるリン酸化はCut5の開始点結合を促進すると考えられる。

興味深いことに、*sld3*-9A株の生育欠損はDrc1の過剰発現により抑制された。このことから、Sld3とDrc1がともにCut5の開始点結合に機能する可能性が考えられた。出芽酵母Sld2のThr84はCDKの必須の標的である。この部位は分裂酵母Drc1のThr111(T111)に保存されており、マススペクトロメトリー解析から生体内でT111がリン酸化されることがわかった。T111のリン酸化が複製に機能するかを調べるためにT111をアラニンに置換した*drc1-T111A*株を作製したところ、この変異株は複製開始の欠損を示し致死となった。さらに、Drc1のT111のリン酸化はCut5のC末BRCTモチーフとの相互作用に必要であること、S期におけるCut5の開始点結合に必要であることがわかった。これらのことから、Cut5の開始点結合にはリン酸化されたSld3とDrc1がそれぞれ別々のBRCTモチーフに結合することが必要であると考えられた。酵母Three-hybrid法を用いてこの可能性を調べたところ、Sld3とDrc1はCut5と三者複合体を作ること、この複合体の形成にSld3とDrc1の両方のCDK部位が必要であることがわかった。さらに、Drc1がSld3とCut5の相互作用を促進することが示唆された。以上の解析から、分裂酵母においてCDKはSld3-Cut5-Drc1複合体の形成に必要であり、この複合体形成を通して開始点上の複製因子の集合を制御すると考えられる。また、この研究結果はCDKに依存した複製開始機構が分裂酵母と出芽酵母に保存されていることを示す。



Fukuura, M., Nagao, K., Obuse, C., Takahashi, T.S., Nakagawa, T., and Masukata, H. (2011). CDK promotes interactions of Sld3 and Drc1 with Cut5 for initiation of DNA replication in fission yeast. Mol Biol Cell *22*, 2620-2633.

論文審査の結果の要旨

あらゆる生物は固有の遺伝情報をもとに生命反応を営み、その遺伝情報を個体から個体へと正確に継承することにより生命の連続性が維持される。真核生物では遺伝子情報を担う染色体DNAが細胞分裂周期のS期にただ1回だけ正確に複製されることが必要である。膨大な情報を含む染色体DNAを限られた時間内に複製するため染色体上には多数の複製開始点が存在し、それぞれが固有の時期に複製を開始するように細胞周期によって制御されている。とりわけ、細胞周期制御の主要キナーゼであるサイクリン依存キナーゼCDKが複製開始に必須であることが真核生物に共通している。

申請者は、CDKキナーゼによるリン酸化に依存して誘起されるタンパク質間相互作用に着目

して、真核生物染色体 DNA の複製開始反応が細胞周期によって制御されるしくみを明らかにする研究を行った。真核生物のモデル系として有用な分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いて、複製必須因子である Sld3 が CDK キナーゼにより S 期にリン酸化されることを示し、そのリン酸化が Sld3 と Cut5（出芽酵母では Dpb11、ほ乳類では TopBP1 という）との相互作用に必要であることを示した。さらに Cut5 が複製開始点に結合するためには、CDK がさらに Drc1 というタンパク質をリン酸化し、このリン酸化は Drc1 と Cut5 を結合させるとともに、Sld3-Cut5 の相互作用をも促進することを見いだした。申請者の研究成果により、出芽酵母やほ乳類での研究と合わせて鑑みるに、真核生物における複製開始複合体形成における CDK の役割は保存されていることを示唆している。これらの結果を学位論文「分裂酵母におけるサイクリン依存性キナーゼによる DNA 複製の制御」としてまとめた。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分に価値があるものと認める。