Osaka University Knowledge Archive

Title	DNA polymerization-independent essential functions of DNA polymerase epsilon in assembly and progression of the replisome in fission yeast
Author(s)	半田, 哲也
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60097
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【17】

氏　　　　　名　半　田　哲　也（はん　だ　てつ　や）

博士の専攻分野の名称　博　士（理学）

学 位 記 番 号　第　２５６９５　号

学位授与年月日　平成 24 年 9 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　DNA polymerization-independent essential functions of DNA polymerase epsilon in assembly and progression of the replisome in fission yeast

（分裂酵母におけるレプリソームの形成と進行におけるポリメラーゼ活性に依存しない DNA Pol εの必須機能解析）

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

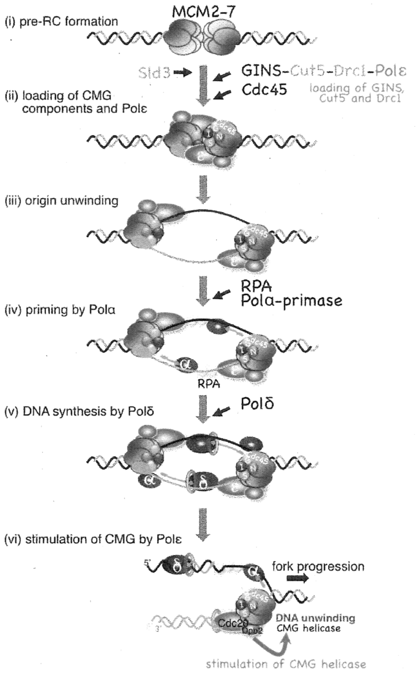
＜背景と目的＞

遺伝情報を安定に次世代に伝えるために染色体 DNA の複製は必須の反応である。DNA 複製は複製開始点と呼ばれる染色体上の特定の部位から開始し、両方向へと進行する複製フォークで行われる。複製フォークでは、DNA ヘリカーゼが DNA 二重鎖を開裂して一本鎖 DNA をつくりだし、それらを鋳型として DNA ポリメラーゼが連続的に合成されるリーディング鎖と不連続に合成されるラギング鎖を合成する。真核生物では、Mcm2-7 ヘテロ６量体複合体と Cdc45、GINS（Go-Ichi-Nii-San)複合体から構成される CMG（Cdc45/Mcm2-7/GINS）複合体が複製ヘリカーゼとして機能することが示されている。いっぽう、複製には３種類の DNA ポリメラーゼが必須であり、ラギング鎖の合成には RNA プライマーゼ活性を持つ DNA ポリメラーゼ α（Pol α)と Pol δ が関与し、リーディング鎖合成は Pol ε が行うことが知られている。これらのうち Pol ε は非常に興味深い性質を持つ。Pol ε は DNA 合成活性を持つ Pol2/Cdc20/p261、アクセサリーサブユニット Dpb2/p59、Dpb3/p12、Dpb4/p17 の４量体として存在する。触媒サブユニット Pol2/Cdc20/p261 は N 末端側の DNA ポリメラーゼドメインに加えて同じくらい大きな C 末端ドメインを持ち、不思議なことに N 末側ポリメラーゼドメインを欠失しても成育できる。いっぽう C 末端ドメインは必須である。このことは Pol ε の必須機能は DNA 合成以外にあることを示しており、出芽酵母では Pol ε は複製開始過程に必要であることが報告されている。

複製開始過程では、細胞周期の制御のもとに複製開始点に複製因子が決まった順序で集合する。G1 期には複製開始点認識複合体と他の因子に依存して Mcm2-7 複合体が結合し複製前複合体（pre-RC）を形成する。S 期移行後に、細胞周期依存的キナーゼ Dbf4-dependent kinase と Cyclin-dependen kinase による複製因子のリン酸化に依存して GINS、Cdc45 が Mcm2-7 に結合して CMG 複合体を形成し、DNA ヘリカーゼとして活性化される。この過程には Sld3、Cut5、Drc1 という複製開始特異的に必要な因子や Mcm10 が関与する。ついで、ヘリカーゼによって開裂した複製開始点に一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA が結合し、DNA ポリメラーゼが集合して複製装置（レプリソーム）が完成する。出芽酵母の研究から、Pol ε は GINS-Cut5-Drc1 と複合体を形成して複製開始過程の CMG 複合体形成に必須機能を担うことが示されているが、他の生物種でも同様の機能を果たすかどうか不明である。さらに、複製フォークにおいてリーディング鎖合成を行う Pol ε が、複製伸長過程において DNA 合成活性以外の必須機能を持つか否かについては明らかではない。私は Pol ε の DNA 複製における必須機能を理解するために、分裂酵母をモデル系として用いて、複製開始と進行における機能を解析した。

＜結果と考察＞

私はまず Cdc20 の必須 C 末端ドメイン（CTD）の機能を明らかにする目的で、CTD に点変異を導入して温度感受性変異株を分離し、その欠損を解析した。Cdc20 の CTD に変異を持つ *cdc20-ct1* 変異株では、Cdc20-Dpb2 複合体が減少し、両サブユニットの開始点結合が減少していた。興味深いことに、この変異株では CMG 複合体構成因子、さらに Pol α、Pol δ が開始点に結合し、開始点での複製が検出された。しかし、Cdc45、RPA は複製開始点から周辺に移動できず、複製も進行しなかった。これらの結果から Cdc20 CTD は CMG 複合体の進行に必須であると示唆された。Cdc20-ct1 変異タンパク質に Dpb2 を融合させると温度感受性が緩和されたことから、CMG 複合体の進行には Cdc20-Dpb2 複合体が重要だと考えられる。Pol ε が特異的に CMG 複合体の進行に必要であることを調べるため、Pol α を条件特異的タンパク質除去システム（*off-aid* システム）を用いて除去した結果、複製を伴わずに Cdc45 と Pol ε が開始点から数 kb 以上進行し、この進行は *cdc20-ct1* 変異を導入すると失われた。これらの結果から、CMG 複合体が開始点から進行するためには、Pol α や DNA 合成ではなく Cdc20 CTD の機能が必要であると結論した。



複製フォークでの CMG 複合体進行に Pol ε（Cdc20-Dpb2）がどのような相互作用を介して機能するかを明らかにするために、酵母 2-hybrid 解析を行った結果、*cdc20-ct1* 変異が Cdc20 と Mcm7 との相互作用を特異的に低下させた。このことから、Cdc20-Mcm7 間の相互作用が CMG 複合体の進行に関与することが示唆された。さらに、*cdc20-ct1* 変異がもつ４つのアミノ酸置換のうちの２箇所のアミノ酸置換（*cdc20-Y-S*）だけで温度感受性と DNA 複製の欠損を示し、Cdc20-Y-S タンパク質の複製開始点への結合は増加したが、Dpb2 は開始点に結合できず、Cdc45 は開始点から周辺に移動しなかった。このことから Dpb2 が開始点に結合することが CMG 複合体の進行に重要であると考えられる。Dpb2 は、酵母 2-hybrid 解析において CMG 複合体構成因子の多数と相互作用したため、これらの相互作用の意義を解析するため Dpb2 と CMG 複合体構成因子を融合させた結果、Dpb2-Mcm4 融合タンパク質の発現によって *cdc20-Y-S* 変異株の温度感受性が抑制された。以上の結果から、Cdc20 と Mcm7 の相互作用、Dpb2 と Mcm4 の相互作用が Mcm2-7 複合体のヘリカーゼ活性を促進し、CMG 複合体を進行させることとのモデルを提案した（Fig. vi）。

次に、Pol ε が複製開始に必要かどうかを明らかにするために、私は *off-aid* システムを用いて、Cdc20

タンパク質を分解除去し、DNA 複製がどの段階で停止するのかを解析した。Cdc20 除去細胞では、pre-RC が形成され Sld3 が開始点に結合するが、それ以降に結合する GINS、Cut5、Drc1、Cdc45 は結合しなかった。よって、Cdc20 は複製開始過程で GINS、Cdc45 を含む CMG 複合体形成に必要であることが分かった。また、G2 期後期から Pol ε、GINS、Cut5 は複合体として存在し、この複合体形成には Cdc20 が必要であった。よって、Pol ε は GINS、Cut5 との複合体形成を経て複製開始点に結合し、複製開始過程に必須であることが示された（Fig. ii）。このように CMG 複合体の進行に必要な Pol ε を複製開始における形成段階から物理的、機能的に連動させておくことは協調的な複製フォークの進行制御に重要かつ合理的なメカニズムだと考えられる。

＜発表論文＞

Handa T, Kanke M, Takahashi TS, Nakagawa T, Masukata H (2012). DNA polymerization-indeoendent functions of DNA polymerase epsilon in assembly and progression of the replisome in fission yeast. Mol Biol Cell *23*, 3240-3253.

論文審査の結果の要旨

細胞が分裂して増殖する過程において、遺伝子情報を担う染色体 DNA を正確に 1 回だけ複製し娘細胞に均等に分配することが生命の継承に必須である。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の複製装置では、重要な機能を担う多数のタンパク質が互いに連携して働いている。とりわけ DNA 二重鎖を開裂する DNA ヘリカーゼと、開裂された DNA 鎖を鋳型として DNA を合成する DNA ポリメラーゼは重要な役割を担う。

申請者は、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、複製に必須の DNA ポリメラーゼ ε（イプシロン）の遺伝子に点突然変異を導入して高温感受性変異株を作成して分子生物学的解析を行った。その結果、DNA ポリメラーゼ ε は、DNA 合成反応のみならず、複製開始以前の複製装置の集合形成過程に必須であり、さらに複製装置においては DNA 合成活性とは別に DNA ヘリカーゼを進行させる必須の機能を持つことを明らかにした。これらの結果はきわめて新規性が高く、真核生物のゲノム維持機構を理解する上で重要性がある。これらの結果を学位論文「分裂酵母におけるレプリソームの形成と進行におけるポリメラーゼ活性に依存しない DNA Pol ε の必須機能解析」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。