

## DNA 複製開始から DNA 鎖伸長過程への移行機構

- 複製開始にみる素過程と連携 -

荒木 弘之

( 国立遺伝学研究所・微生物遺伝研究部門 )

### 1. 研究のねらい

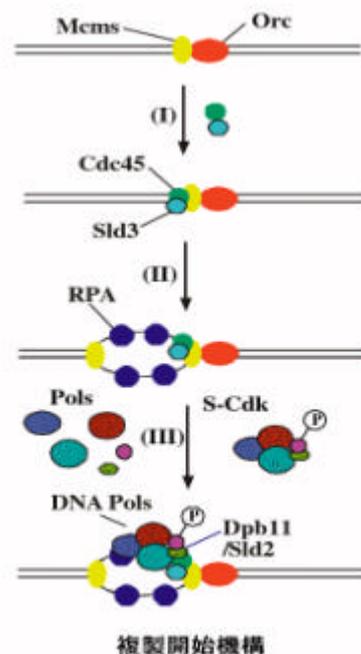
真核生物複製開始部位の活性化は、精力的に研究されているが、この活性化に続く DNA 合成の開始、そして DNA 鎖伸長反応へと続く移行過程については、全く分かっていなかった。我々は、出芽酵母 Dpb11 がこの移行過程に関与することを示唆していたので、Dpb11 及びそれと遺伝的に相互作用する Sld (Synthetic lethal with dpb11-1) タンパク質群の機能解析により、DNA 複製の開始から DNA 鎖伸長反応への移行の分子機構を解明することを目的とした。

### 2. 研究結果及び自己評価

#### 研究結果

##### (1) Dpb11 の DNA 複製における機能

真核生物の複製開始領域には、図に示すように Orc が細胞周期を通じて結合し、M 期後期に Cdc6 及び Cdt1 の働きで Mcm が加わり、pre-RC(pre-Replication Complex)を形成する。そして、Cdc45 が pre-RC に加わり(ステップ I)、開始領域が 1 本鎖に解離して 1 本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA が結合する(ステップ II)。その後、DNA ポリメラーゼが開始領域に結合すると考えられている(ステップ III)。染色体 DNA 複製には DNA ポリメラーゼ(Pol) Pol $\alpha$ 、Pol $\delta$ 、Pol $\epsilon$  が必要であるが、DPB11 遺伝子は、Pol のサブユニットをコードする POL2、DPB2 の変異を多コピーで抑圧する遺伝子として分離された。Dpb11 及び Pol2 のクロマチンへの結合を CHIP(Chromatin immunoprecipitation)法を用いて調べたところ、Dpb11 は Pol2 と同じく S 期に複製開始領域に結合することが分かった。また、dpb11-1 変異株では、Pol の複製開始領域への結合は検出されない。さらに、dpb11-1 変異では Pol の複製開始領域へのローディングも起こらないが、Pol の変異では Dpb11 は複製開始領域に結合する。一方、dpb2 変異では Dpb11 の複製開始領域への結合は起こらない。架橋剤により細胞を処理すると、Pol と Dpb11 の複合体を検出することができるので、上記の結果は、Dpb11 と Pol が複合体を作り、複製開始領域に結合した後、Pol がローディングされることを示唆している。即ち、図のステップ III に Dpb11 が必要であることを明らかにした。



##### (2) Dpb11 と複合体を形成する Sld2 のリン酸化

Dpb11 は Sld2 と複合体を形成し、この複合体の形成が染色体 DNA の複製に必須である。この Sld2-Dpb11 複合体は S 期にのみ形成されることが分かった。また、Sld2 の SDS-PAGE での移動度は G1/S 期に遅くなり、遅くなった Sld2 は G2 期から M 期にかけて消失することが分かった。この移動度の変化は、ホスファターゼ処理により解消するため、Sld2 がリン酸化されていると結論できる。次に、Sld2 はそのアミノ酸配列中に Cdk (Cyclin dependent protein kinase) によりリン酸化可能な部位を 6 つ持つため、その全ての部位のセリン、スレオニン残基をアラニン残基に置換した変異遺伝子を作成した。この変異遺伝子は、Sld2 欠失株の増殖を相補することができない。さらに、この変異 Sld2 は Dpb11 と複合体を形成しない。これらのことから、Sld2 が S 期 Cdk によりリン酸化されると、Dpb11 と複合体を作り、この複合体が(1)に記述した DNA ポリメラーゼの複製開始領域への結合に働くと考えられる。

### ( 3 ) Sld3 の機能

我々の分離した Sld3 は、前述の Cdc45 と複合体を形成することが分かった。そこで、CHIP 法により Sld3 と Cdc45 の複製開始領域への結合を調べた。Sld3 と Cdc45 は、初期複製開始領域には G1 期から S 期に結合がみられたが、後期複製開始領域には S 期でのみ結合していた。また、変異株を用いた解析から、Sld3 の開始領域への結合には Cdc45 の機能が、Cdc45 の開始領域への結合には Sld3 の機能が必要であることが分かった。更に、RPA の開始領域への挙動を調べることにより、開始領域が開裂したかを検討した結果、sld3-5 細胞では RPA の結合が観察されず、Sld3-Cdc45 複合体が複製開始領域の一本鎖解離反応に必要であることが示唆された。Dpb11 は、RPA の変異株では開始領域に結合せず、Sld3-Cdc45 は DNA ポリメラーゼローディングの早い段階、即ち図の(I)(II)のステップに関与していると考えられる。

### ( 4 ) Sld5-Psf1-Psf2 複合体の機能

Sld5 は遺伝的及び生化学的解析から、Psf1 (Partner of Sld Five)、Psf2 と細胞周期を通じて複合体を形成していることが分かった。また、この複合体が DNA ポリメラーゼ同様に、初期複製開始領域には S 期初期に、後期複製開始領域には S 期後期に結合することが、CHIP 法により明らかになった。さらに、psf1-1 温度感受性変異では、Cdc45 の強固なクロマチン結合は起らない。これらの結果は、この複合体が DNA ポリメラーゼの開始領域への結合に必要であることを示しているが、正確な作用位置を特定することは出来なかった。

### 自己評価

複製開始から DNA 鎖伸長に関わる因子を多数分離し、それらの間の相互作用を明らかに出来たことは、出芽酵母の遺伝解析法を有効に利用できたこととして評価できる。一方、各因子の生化学的解析は、タンパク質量が少ないことや多量発現系の構築が難しかったことから、予定通りには進まなかった。しかし、Sld5-Psf1 複合体の分離は順調に進んでいるので、これを突破口に今後タンパク質の解析も進めてゆきたい。

### 3 . 領域総括の見解

本研究では、出芽酵母における DNA の複製開始から DNA 鎖伸長に関わるタンパク質相互の機能順序の決定している。特に、本研究者が検出した Dpb11 と Sld2 の 2 種のタンパク質を始めとする数種のタンパク質と Orc (origin recognition complex) との協調性について着実に解明を進めている。本研究は国際的に関心の高い細胞周期制御機構に対し、DNA 複製制御機構との連携を示すことに意義があり、いずれ高く評価されるであろう。

### 4 . 主な論文

1. Masumoto, H., Sugino, A., and Araki, H. (2000). Dpb11 controls the association between DNA polymerases and , and the ARS region of budding yeast. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2809-2817.
2. Kamimura, Y., Tak, Y.-S., Sugino, A. and Araki, H. (2001). Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 20, 2097-2107.