

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)

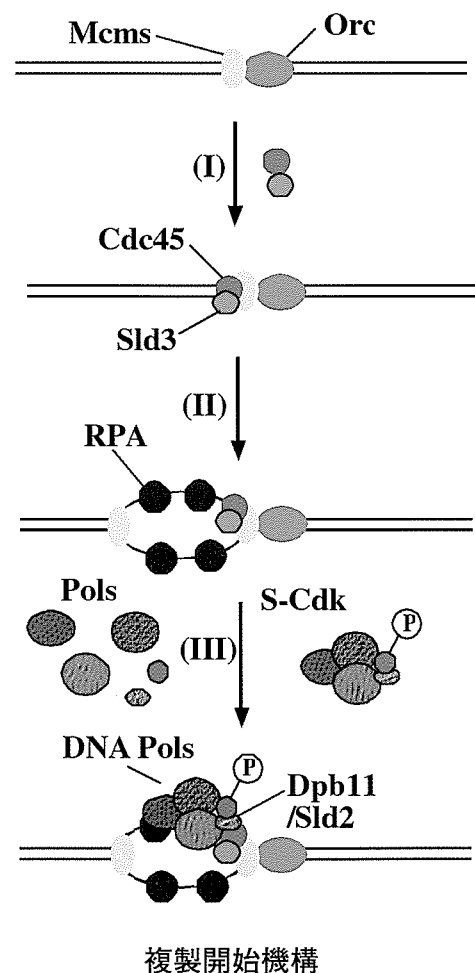
1. 研究のねらい

真核生物における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一連の移行過程については、全く分かっていなかった。我々が研究を進めていた出芽酵母Dpb11が、この移行過程に関与することが示唆されていたので、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. 研究成果と考察

(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) α 、 δ 、 ϵ が必要であるが、*DPB11* 遺伝子は、Pol ϵ 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の染色体DNA複製における機能を調べるために、CHIP (Chromatin immunoprecipitation) 法を用いて、Dpb11及びPol2のクロマチンへの結合を調べたところ、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 ϵ 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 α の複製開始領域へのローディングも起こらないが、Pol α 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 ϵ 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 ϵ が複合体を作り、複製開始領域に結合した後、Pol α がローディングされることを示唆している。即ち、図の (III) のステップにDpb11が必要であると考えられる。



(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。そこで、細胞周期の各時期におけるSld2-Dpb11複合体の形成を調べたところ、複合体はS期にのみ形成された。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、Sld3の機能をより詳しく解析するため、CHIP法によりSld3とCdc45の複製開始領域への結合を調べた。Sld3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。この挙動は、Cdc45とよく似ている。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)と(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遺伝子は、細胞増殖に必須であったので、温度感受性変異を分離し、多コピーでこの変異を抑圧する遺伝子PSF1 (Partner of Sld Five)を得た。Psf1も細胞増殖に必須であったので、温度感受性変異psf1-1を分離し、この変異を多コピーで抑圧する必須遺伝子PSF2を分離した。遺伝的及び生化学的解析から、Sld5、Psf1、Psf2は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できない。

3. 主な論文

1. Masumoto, H., Sugino, A., and Araki, H. (2000). Dpb11 controls the association between DNA polymerases α and ϵ , 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.