

氏名	山口 佳洋		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	薬 学		
学位授与番号	博甲第 2 2 2 1 号		
学位授与の日付	平成 1 3 年 3 月 2 5 日		
学位授与の要件	自然科学研究科生体調節科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)		
学位論文の題目	染色体 DNA 複製開始因子の機能解析		
論文審査委員	教授 土屋友房	教授 綿矢有佑	教授 成松鎮雄

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

遺伝情報の子孫への伝達には染色体 DNA の複製が必須である。染色体 DNA の複製反応は、原核生物、真核生物を問わず細胞周期に呼応して厳密に制御されている。この制御機構は主に、複製開始因子の活性制御によって行われていると考えられているが、その分子機構は解明されていない。私は本研究において大腸菌 DNA 複製開始因子 DnaA と、出芽酵母の DNA 複製開始因子 ORC の活性制御機構の解明を目指した。

これらの DNA 複製開始因子は、その活性制御に ATP が重要な役割を担っていることが示唆されている。このため、DnaA と ORC の ATP 結合活性について次のような研究を行った。

#### 1. DnaA と酸性リン脂質の相互作用

DnaA は細胞膜に存在しているカルジオリピンなどの酸性リン脂質と相互作用することで、不活性型である ADP 結合型から活性型である ATP 結合型に変換される。しかしながらこれまで、このような反応に預かる DnaA の機能ドメイン、並びにこの相互作用の分子機構についてはまったくわかっていなかった。そこで、私は DnaA の 2 つの両親媒性  $\alpha$ -ヘリックスの塩基性アミノ酸を酸性アミノ酸に置換した変異 DnaA を構築した。そして、変異 DnaA の ATP 結合活性に対するカルジオリピンの阻害効果を指標として、カルジオリピンとの相互作用を検討した。その結果これらの  $\alpha$ -ヘリックスが酸性リン脂質との相互作用に預かること、また両者の相互作用がイオン結合によっていることが示唆された。

#### 2. 出芽酵母 Orc5p の ATP 結合領域の染色体複製における役割

ORC には二つの ATP 結合活性を有するサブユニット(Orc1p と Orc5p)が知られている。これまで Orc5p の ATP 結合活性の機能については、まったくわかっていなかった。

そこで、Orc5p の ATP 結合活性について明らかにするため、現在知られている唯一の温度感受性変異である *orc5-1* の変異部位の決定を行い、その変異部位を同定した。また、Orc5p の ATP 結合領域に変異を導入し、併せて染色体上の ORC5 遺伝子の破壊株を樹立した。これらを用いて Orc5p の ATP 結合領域について遺伝学的に解析した結果、ATP 結合活性を消失した変異(*orc5-A*) が温度感受性を示した。この変異体の解析から、Orc5p の ATP 結合活性が G1 期から S 期への移行、及び S 期の進行に関与していることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

あらゆる生物において、染色体DNAの複製は遺伝情報の子孫への正確な伝達のために必要不可欠である。そして染色体DNAの複製開始反応は、あらゆる生物において細胞周期に対応して厳密に制御されており、1回の周期の間に複製は1回だけおこり2回複製が進行することはない。この制御は主に、複製開始制御因子の活性化と不活性化によってなされていると考えられているが、その分子機構はわかっていない。筆者は、大腸菌染色体DNA複製開始因子DnaAと、真核生物の複製開始因子ORC (Origin Recognition Complex) に関して、その活性制御機構の解明を目指して研究を行った。そして、1) 大腸菌の染色体DNA複製開始因子であるDnaAが、カルジオリピンなどの酸性リン脂質と相互作用し、不活性型であるADP結合型から活性型であるATP結合型へ変換されることがわかり、2) この相互作用によって細胞内でDnaAが活性化されて複製が開始されることが示唆された。さらにこの相互作用に関与するDnaAの機能ドメインを解析し、2つの両親媒性の $\alpha$ ヘリックスが、DnaAと酸性リン脂質との相互作用に対し協調的に関与しているだけでなく、DnaAと酸性リン脂質との相互作用がこれらの $\alpha$ ヘリックスに存在する塩基性アミノ酸と酸性リン脂質の酸性基間のイオン結合によっていることを示唆する結果を得た。さらに真核生物の染色体DNA複製開始因子ORCについて、Orc5pのATP結合活性が、G1期からS期への移行、及びS期の進行に関与し、細胞周期の進行に重要であることを明らかにした。このように本論文は染色体複製の制御の重要な一面を明らかにしたものであり、博士の学位に値するものと判断する。