

氏名	高橋直子
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2706号
学位授与の日付	平成16年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	出芽酵母の染色体DNA複製におけるOrc5pのATP結合活性の役割に関する研究
論文審査委員	助教授 水島 徹 教授 土屋 友房 教授 森山 芳則

学位論文内容の要旨

Orc5pはOrigin Recognition Complex (ORC)と呼ばれる、真核生物の染色体DNA複製開始因子だと考えられている蛋白質複合体を構成するサブユニットの一つである。Orc5pはATP結合活性を持っていることが報告されていたが、その細胞内DNA複製における役割については、これまでほとんど分かっていなかった。そこで私はOrc5pのWalker Aモチーフに変異を持つ出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の変異株、*orc5-A*株を構築し、その解析を行った。*orc5-A*株は温度感受性を示し、非許容温度である37°Cで培養すると、2C DNAを含む細胞が蓄積した。また、この株では37°Cで細胞内のORCが不安定化することがわかった。次に、*orc5-A*株の温度感受性に対するマルチコピーサプレッサー遺伝子としてORCを構成するサブユニットの一つであるOrc4pをコードする遺伝子*ORC4*を単離した。Orc4pの過剰発現によって*orc5-A*株の非許容温度における表現型、すなわち、2C DNAの蓄積及びORCの不安定化が相補されることを見出した。*orc5-A*株の温度感受性の抑圧は*ORC4*特異的であったことから、Orc5pのATP結合活性とOrc4pとは密接に関連していると考えられた。そこで、yeast two-hybrid 法により、Orc5pとOrc4pとの結合を調べたところ、Orc5ApはOrc4pとの相互作用が減弱していることがわかった。これらの結果から、Orc5pのATP結合活性は細胞内でOrc4pとの相互作用に重要であり、Orc5pとOrc4pとの相互作用がORCを安定に保つために重要であると考えられる。

論文審査結果の要旨

真核生物の染色体DNA複製反応は、複製開始部位(origin)に複数の蛋白質が結合することにより開始する。originに特異的に結合する蛋白質複合体であるORC (origin recognition complex)は種を超えてよく保存されており、複製開始反応の中で主要な役割を担っていると考えられる。ORCを構成する6つのサブユニットのうち、Orc1pとOrc5pはATP結合活性を持っている。このうちOrc1pのATP結合活性はORCがoriginに特異的に結合するために必要であることが分かっているが、Orc5pのATP結合活性の役割はこれまで分かっていなかった。そこで本研究ではOrc5pのATP結合活性の役割を明らかにするために、Orc5pのWalker Aモチーフ(ATP結合蛋白質の共通配列)に存在するリジン残基をグルタミン酸残基に変化させた変異ORC蛋白質(ORC5A)を構築し、それを発現する*orc5-A*株を構築した。*orc5-A*株は温度感受性を示し、非許容温度で培養を続けることによりS期あるいはG2/M期の細胞が蓄積した。さらに、*orc5-A*株を非許容温度で培養すると細胞内のORC5Aの量が減少していくことを見出し、その原因としてORC5Aが不安定化していることを示唆した。一方、*orc5-A*株の温度感受性に対するmulticopy suppressor geneとしてORCを構成するサブユニットの一つをコードする*ORC4*を単離した。*ORC4*を多量発現させると、*orc5-A*株が非許容温度でも増殖できるようになると同時に、細胞内のORC5Aも安定化した。以上の結果から、Orc5pのATP結合活性は、ORCの安定性に寄与していること、及びそのメカニズムとして、Orc5pのATP結合活性がOrc5pとOrc4pとの結合を安定化させていることが示唆された。このようにこの研究は学術上優れており、審査委員会は博士に値すると判断した。