

## 審査の結果の要旨

氏名 増田 晃士

申請者は、「分裂酵母における複製起点決定因子の解明」について、博士論文審査発表を行った。

細胞の遺伝情報が正確に継承されるためには、細胞の持つ DNA が正確に倍加することが必須である。母細胞で複製された DNA は、それぞれの娘細胞に等しく分配されることで正しく継承される。そのため、細胞のもつ全てのゲノム DNA は細胞周期ごとに正確に一度だけ複製されなければならない。複製回数の過不足は遺伝情報の欠落・重複を引き起こしてしまう。また、倍加が部分的にしかおきていない複製途中の染色体は、構造的に非常に不安定であることが知られる。実際、DNA 複製に関わる遺伝子の変異が様々な疾患の原因遺伝子として報告されている。従って、DNA 複製機構の理解は生物学的な興味のみならず、疾患の原因解明においても非常に重要である。

DNA 複製は複製起点と呼ばれるゲノム DNA 上の特定領域から開始される。大きなゲノム DNA を有する真核生物ではゲノム DNA の大きさに応じて数百から数万ヶ所の複製起点が存在することが知られている。DNA 複製の破綻は細胞にとって致命的であるため、複製の開始から完了までは厳密に制御されたステップからなる。最初のステップは複製起点に複製起点認識タンパク質 (Origin Recognition Complex, ORC) が結合することである。次にこれらの ORC 結合領域からいくつかを選択され、MCM2-7 ヘリケースと呼ばれる六量体のリング状タンパク質をはじめとする複数のタンパク質因子が段階的に複製起点にリクルートされる。以上の過程を経て複製前複合体 (pre-replicative complex, pre-RC) が複製開始までに複製起点に形成される。このような複製前複合体形成から複製の完了までのタンパク質側の詳細な分子機構が明らかとなってきた一方、ゲノム DNA 上のどこが複製起点として機能するのかという問題、すなわち複製起点の規定因子については必ずしも明らかでない。

歴史的に最初に複製起点が同定された真核生物は出芽酵母であり、プラスミドの自己複製を誘導できる DNA 領域として同定された。この DNA 領域は特徴的な 11 bp のコンセンサス配列を有し、ORC はこのコンセンサス配列を認識して複製起点に結合することが知られる。すなわち、出芽酵母では DNA 配列によって複製起点が規定されている。面白いことに、他の真核生物種では ORC 複合体は存在するにもかかわらずこのようなコンセンサス配列が見出されない。DNA 配列とは異なる別のメカニズムによる複製起点の決定が行なわれていることがわかってきた。分裂酵母 *Schizosaccharomyces*

*pombe*において複製起点として同定された DNA 領域は、A-T リッチであること、非遺伝子領域に存在することが知られている。しかし、そのような特徴を満たす領域はゲノム DNA 上に数千か所存在しており、実際に複製が開始される複製起点の数よりも大幅に多かった。そのため、複製起点の cis 決定因子の普遍的な理解が進んだとは言いがたい状況にあった。本論文の目的は、分裂酵母における複製起点をゲノムワイドに解析し、複製起点を規定する因子を明らかにすることであった。

分裂酵母においては、ORC の複製起点への結合はサブユニットの一つである Orc4 のみに依存していることが知られている。ORC の結合領域をゲノムワイドに決定するため、申請者は ChIP-seq 法を用いて Orc4 の結合領域を解析した。申請者が同定した Orc4 ピークのモチーフ解析の結果、Orc4 ピークにおいて A または T 塩基が少なくとも 3 つ連続する特徴的なモチーフ配列 (AAA[A/T]AAA[A/T]AAA[A/T]AAA) を同定し、ポリ(dA/dT)トラックと呼ぶことにした。Orc4 ピーク周辺のモチーフ配列数を調べたところ、1 つの Orc4 ピークに対して 2 つ以上のモチーフ配列が存在するケースが多く見られた。さらに、Orc4 の染色体結合効率とポリ(dA/dT)トラックの数に関係を調べたところ、Orc4 の染色体への結合効率はポリ(dA/dT)トラックの数が多いほど高くなることを示した。

次に、分裂酵母において、遺伝子の転写が複製起点を規定しうるか調べるため、申請者は複製起点周辺遺伝子の転写方向を解析した。その結果、pre-RC の周辺では複製起点がない場合に比べて、両隣の遺伝子が複製起点から離れる方向に転写される divergent 型の遺伝子配置の割合が大きいくことを明らかにした。さらに、複製起点の両隣で 2 つの遺伝子が同じ方向に転写される tandem 型の遺伝子配置のうちの一つの遺伝子 (*urg1*) の転写方向を反転させ、両方の遺伝子の転写方向が複製起点に向かう convergent 型の遺伝子配置に変換したときの pre-RC の形成を調べた。その結果、転写方向を反転させた遺伝子の隣の複製起点では、Mcm2 の結合量は約 60% 程まで減少することを示した。

本論文において申請者は、分裂酵母における複製起点の決定因子の探索を行った。Orc4 と Mcm2 の ChIP-seq のデータ解析の結果、ORC はポリ(dA/dT)トラック依存的に染色体へ結合することが示された。また、遺伝子上流領域が pre-RC の形成にとって好ましい領域であること、pre-RC 近傍遺伝子の転写方向の反転によって pre-RC の形成が阻害されたことが見いだされた。これらの研究成果は、DNA の複製起点を規定する因子を見出すものであり、分子生物学の基礎及び応用に貢献するものである。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。