



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on factors related to DNA replication in cell cycle [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	李, 昊
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第16281号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95499
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hao_Li_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 李 昊

審査担当者	主査	教 授	尾瀬 農之
	副査	教 授	相沢 智康
	副査	准教授	上原 亮太

学 位 論 文 題 名

Study on factors related to DNA replication in cell cycle
(細胞周期における DNA 複製に関連する因子の研究)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

DNA 複製は、二重らせん構造が 2 本の一本鎖に分かれ、それぞれが新しい相補的鎖の鋳型として機能することで進行し、その結果、2 つの同一の DNA 分子が生成される（半保存的複製）。DNA 複製の正確な過程は、遺伝情報を娘細胞へ正しく伝達するために不可欠であり、細胞の完全性と機能を維持する上で重要である。その後、G2 期で染色体が形成され、M 期で細胞質が 2 つの娘細胞に分裂する。

本論文は、S 期における DNA 複製の開始に注目して構造学的解析を進めたものである。真核生物の細胞周期における染色体 DNA 複製は、二本鎖 DNA (dsDNA) が一本鎖 DNA (ssDNA) に解離することで始まり、活性型ヘリカーゼ Cdc45-MCM-GINS (CMG) 複合体が形成される。最初に、複製起点にある自己複製配列 (ARS) 上に不活性型ヘリカーゼ MCM 六量体リングが 2 つロードされ、2X 六量体 (MCM DH) を形成する。その後、Dbf4 依存性プロテインキナーゼ (DDK) による MCM DH のリン酸化を経て、初期因子 Sld3 とそのパートナー Sld7 が Cdc45 (Sld7-Sld3-Cdc45 複合体) を各 MCM にリクルートする。さらに、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) による MCM 上の Sld3 のリン酸化により、Dpb11, CDK リン酸化された Sld2, DNA ポリメラーゼ ϵ が GINS を MCM に結合させ、活性型 DNA ヘリカーゼ CMG 二量体が形成される。最終的に、Sld2, Sld3, Sld7, Dpb11 は活性型 CMG から解離し、双方向複製が開始されるが、その詳細なリクルートと解離メカニズムは未解明であった。

本研究では、まず、Sld3 の Cdc45 結合ドメイン (Sld3CBD) と Cdc45 の複合体構造 (Sld3CBD-Cdc45) を決定し、Sld3CBD と Cdc45 の詳細な相互作用を明らかにした。Sld3CBD の α ヘリックス ($\alpha 8, \alpha 9$) は Cdc45 と結合すると複合体が形成され、さらに Cdc45 の DHHA1 ドメインも Sld3CBD との結合によって構造変化を示すことが判明した。変異解析の結果、Sld3CBD と Cdc45 の結合は比較的脆弱であり、1 つの結合部位を破壊するだけで両者の分離が誘導されることを示した。また、Cdc45 に関する先行研究と本研究の Sld3CBD-Cdc45 構造を比較した結果、Cdc45 上の Sld3CBD 結合部位は GINS や MCM が結合する部位とは空間的に異なり、Sld3CBD, Cdc45, GINS が MCM に同時に結合するモデルを構築した。また、Sld7 を加えた Sld7-Sld3 Δ CTD-Cdc45 複合体 (Sld3 の C 末端ドメインを欠損した複合体) の粒子サイズの解析の結果と先行研究に合わせて、Sld3 がパートナー Sld7 と 2 量体 Cdc45-Sld3-[Sld7]₂-Sld3-Cdc45 の形で、2 個の Cdc45 を MCM DH にリクルートするモデルも構築した。

加えて、さらに、Sld3 およびその複合体の一本鎖 ARS1 断片 (ssDNA) に対する結合アッセイを

行った。その結果、Sld3CBD-Cdc45 は Sld3CBD よりも ssDNA 結合親和性が低下したが、Sld7 が保持されている場合には親和性が回復した。この結果は、Sld7-Sld3 の CMG からの解離と CMG による一本鎖 DNA の形成が関係している可能性を示唆する。これらの結果より、Cdc45-Sld3-[Sld7]₂-Sld3-Cdc45 によって、Cdc45 を MCM DH ヘリクルートして CMG 複合体の形成、ヘリカーゼの反応進行による Sld3-Sld7 複合体の解離など、初めて具体的な CMG 複合体形成のモデルを提唱することができることなど、新規発見に富むことから、著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。