

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：63801

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2015～2019

課題番号：15H05975

研究課題名（和文）染色体3D構造の複製を基盤とした染色体動態の連携

研究課題名（英文）Coordination of chromosome behavior based on the replication of chromosomal 3D structure

研究代表者

荒木 弘之（ARAKI, HIROYUKI）

国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・特任教授

研究者番号：20151160

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 95,800,000円

研究成果の概要（和文）：DNA複製系を出芽酵母の精製タンパク質から再構成し、最適化した後、解析に用いた。そして、複製開始に働くpre-Replicative Complexの複製開始部位へのローディングの新たな機構、複製ヘリカーゼ構成因子であるGINSとDNAポリメラーゼの相互作用の染色体DNA合成への寄与、複製開始因子Sld3-Sld7ヘテロ4量体構造の機能的意味、を明らかにした。さらに、複製フォーク停止のin vitro系を構築し、フォーク停止にDNAポリメラーゼが関わっていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物の複数の複製タンパク質の機能を明らかにし、染色体動態との繋がりとして、複製フォークが停止する機構を解明した。これらの学術的意義も大きい。解析に用いたin vitro複製系を稼働させたことも大きな意義がある。この系は、世界でも限られた研究室でしか動いておらず、国内では我々のところだけであった。この系を用いては、姉妹染色体間を結びつけるコヒーシンの導入を共同研究により行うなど、他の研究グループの指導も行ったので、国内においてもより多くの研究者がin vitro複製系を使用し、それぞれの研究に役立てることを期待している。

研究成果の概要（英文）：The in vitro DNA replication system was reconstituted from budding yeast purified proteins and optimized for analyses of chromosome dynamics. Using this reconstituted system, we have revealed a novel molecular mechanism of replication-origin loading of the pre-replicative complex at the initiation step of DNA replication, contribution of the interaction between DNA polymerase epsilon and GINS, a component of replicative helicase, to chromosomal DNA synthesis, and functional implication of the heterotetramer structure of the Sld3-Sld7 complex working for the initiation of DNA replication. We also established the in vitro system for pausing the replication forks and showed that DNA polymerase epsilon functions for pausing the replication fork.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製 染色体 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

真核生物染色体 DNA の複製機構の概要は、主に酵母を用いた研究から明らかになって来た。我々は出芽酵母を用いて、DNA 複製開始機構の研究を行い、細胞周期を司るサイクリン依存性キナーゼ(CDK)が複製開始を促進する機構を解明した。特にこの機構に必要な大半の因子を遺伝的手法により見出し、個々の因子の働きの概要を示すことに成功した(1)。しかし、個々の因子の精細な機能解析には *in vitro* での複製反応の解析が必須である。2011 年に細胞粗抽出液を用いた DNA 複製系が発表され(2)、我々もこの系を立ち上げたが、詳細な解析には個々のタンパク質を組み合わせた反応系が必要であった。本研究を開始した 2015 年には、精製したタンパク質からなる DNA 複製の再構成系が報告され(3)、我々もこの系を立ち上げることに全力をあげた。

一方、複製タンパク質の細胞内での挙動の概要は分かって来つつあったが、その他の染色体動態因子の複製時の挙動の詳細は分からない部分が多かった。これら因子の挙動と複製因子の挙動・連携を明らかにすることができれば、染色体が調和して機能する仕組みに迫ることができると、DNA 複製再構成系での解析を企画した。

2. 研究の目的

遺伝情報を担う染色体上では様々な反応が調和して起こることにより、染色体が安定に維持され、倍加し、娘細胞へと分配されていく。この染色体が調和して機能する仕組みを理解するため、染色体がその構造を維持しながらどのように倍加して行くのか、そして他の染色体動態とどのように連携しているのかを解明することを目的とした。

我々は出芽酵母を真核生物のモデル系として、DNA 複製フォークが形成される複製開始反応の研究を行い、世界に先駆けて真核生物の複製開始に働く多数の因子を同定し、それらの機能と細胞分裂周期による複製の制御を明らかにしてきた。本研究では、我々の発見した複製因子の働きのみならず、染色体上で起こる反応として複製フォークの停止を取り上げ、その反応の解析を行った。

3. 研究の方法

本研究では、*in vitro* DNA 複製系を基盤として進めた。本研究開始時に既に立ち上げていた出芽酵母の細胞粗抽出液を用いた系を当初は用いながら、精製タンパク質から再構成した *in vitro* 複製系を構築した。そのために必要なタンパク質の精製系を立ち上げ、最終的に *in vitro* 複製の最適化を行った。複製反応は多くの反応からなっているが、精製タンパク質を用いてこれら個々の反応の解析も行った。本報告書では、特に説明がないかぎり、*in vitro* 複製系は“精製タンパク質から再構成した DNA 複製系”を指す。

この *in vitro* 複製系あるいは個々の複製反応に、DNA 複製以外の染色体動態に関わる因子を加え、その挙動を調べた。姉妹染色体を結びつけるコヒーシン、染色体分配時に紡錘体の結合するセントロメア、クロマチン構造による変化、DNA に結合するタンパク質による複製フォークの停止反応も調べ、複製フォーク停止においては明確な分子機構を提唱できた。

このように主として生化学的解析を主に行ったが、そこで得られた結果は *in vivo* の系により、細胞内でも働いていることを確認することとした。

4. 研究成果

(1) 精製タンパク質による *in vitro* DNA 複製系の確立と最適化

鑄型 DNA (複製開始点を含む)
+ 精製タンパク質

(pre-RC) 1. ORC, Cdc6, MCM2-7-Cdt1, ATP
2. DDK

(Firing) 3. Sld3-Sld7, Sld2, Dpb11, GINS, Cdc45, Pol ϵ , Mcm10, RPA, CDK, Pol α , RFC, PCNA, Top2, Pol δ , NTP, dNTP, Biotin-dUTP

↓
アルカリ電気泳動

↓
IRDye streptavidin による検出

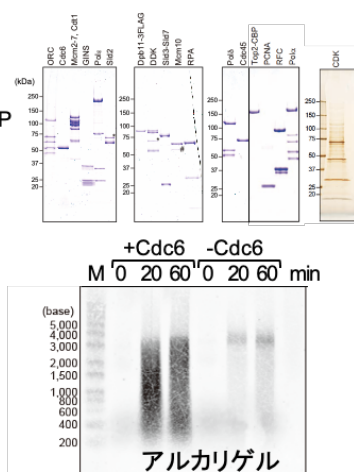


図1. 出芽酵母のタンパク質から再構成した *in vitro* DNA 複製系

鑄型 DNA に左に記したタンパク質群を 1 → 2 → 3 の順番に加へ、新生鎖に取り込まれたビオチン化ウラシルをアルカリゲル電気泳動後、IRDye streptavidin のビオチンへの結合により調べた (右下)。Cdc6 は pre-RC 形成 (左) に必要で、DNA 合成開始に必須である。右上は精製したタンパク質を SDS ポリアクリルアミド電気泳動で分離した後、染色したもの。Cdt1 は Mcm2-7 との複合体として精製した。

複製に必要な出芽酵母の18種類のタンパク質、タンパク質複合体を精製する方法を確立し、それらを混ぜ合わせることによって複製反応を起こさせる系を確立した(図1)。また、放射性同位元素により標識したヌクレオチドの代わりに Biotin-dUTP を用いることにより、一般の実験室で誰でも容易に DNA 複製能の測定や複製機構の解析ができるようにした。さらに、各タンパク質の濃度を最適化した。その結果、例えば GINS では当初必要量の1/10となった。この濃度の最適化により、変異タンパク質を用いた反応の細かな解析が可能となった。

(2) 複製タンパク質機能の解析

① pre-Replicative Complex (pre-RC) 形成 (4)

2本鎖 DNA を1本鎖にほどく DNA ヘリカーゼのコアである Mcm2-7 は、細胞周期の M 期後期から G1 期に複製開始部位にロードされる。この反応には、複製開始部位に結合した Origin recognition complex (Orc)、Mcm2-7 に結合した Cdt1、そして Cdc6 が必要であり、複製開始部位での Orc と Mcm2-7 の複合体を pre-RC と呼んでいる。Mcm2-7 は6つのよく似たサブユニットが同じ方向に会合したドーナツ状で、DNA 上にロードされると図2Aのように、2本鎖 DNA をその穴の部分に通し、N 末でもう一つの Mcm2-7 の N 末と結合した構造をとると思われていた。

精製した Orc, Mcm2-7, Cdt1, Cdc6 から *in vitro* で形成した pre-RC の構造を原子間力顕微鏡 (AFM) により観察したところ、図2の B や C のようなものが観察された。B では、2つの Mcm2-7 の間に隙間があり、下の Mcm2-7 の穴を DNA は真っ直ぐに通っているが、上の Mcm2-7 では DNA が Mcm2-7 複合体の途中から外にでていく。C では2つの Mcm2-7 の間で、DNA がループ構造を作っている。pre-RC 中の Mcm2-7 のドーナツ構造内には隙間があることが知られており、A のような構造を作る中間体として、B や C のような構造ができると考えられる。このことは、2分子の Mcm2-7 が別々にロードされた後、様々な中間体を経て、A のような構造ができることを示唆している。

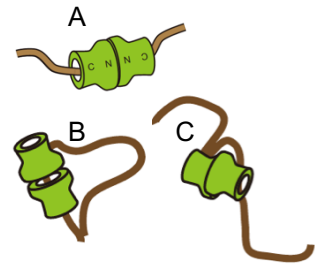


図2. AFM により観察される Mcm2-7 の模式図
高塩濃度で処理するため、Orc は DNA から解離する。

② GINS 変異の解析 (5)

GINS は Sld5, Psf1, Psf2, Psf3 の4つのサブユニットからなり、サブユニット名の数字の日本語読み、Go, Ichi, Nii, San から我々が命名したものである。GINS は Cdc45 とともに、Mcm2-7 に結合し、活性なヘリカーゼ Cdc45-Mcm2-7-GINS (CMG) 複合体を作る。そして CMG 複体内に位置する GINS の Psf1 サブユニットは、リーディング鎖を主として合成する DNA ポリメラーゼ ϵ (Pol ϵ) と結合する。そのため、複製ヘリカーゼとポリメラーゼの共役が起こると考えられている。

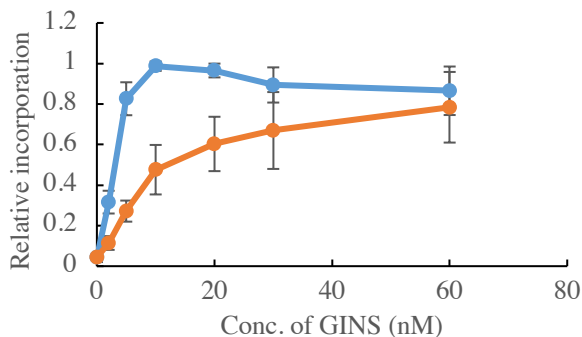


図3. *psf1-1* 変異を持つ GINS (Psf1-100) と野生型 (Psf1) との活性の比較

GINS-Pol ϵ 相互作用の低下を、GINS 濃度を上げることによって補っており、GINS-Pol ϵ の結合が DNA 複製に重要であることを意味している。ポーランドのグループとの共同研究からは、*psf1-100* 変異を持つ細胞においては Pol ϵ が複製フォークから離れやすく、離脱した Pol ϵ の代わりに DNA 損傷を乗り越える DNA ポリメラーゼ ζ が働いていることが示唆された。

③ Sld3-Sld7 分子の構造と機能

Sld3 は複製開始に必須なタンパク質である。Sld3 は Sld7 とそれぞれの N 末側で結合する。さらに Sld7 の C 末側は、もうひとつの Sld7 の C 末側と結合するため、Sld3 と Sld7 は2分子ずつからなるヘテロ4量体を形成する(図4)。Sld3 の中央に位置する Cdc45-Binding-Domain (CBD) には Cdc45 が結合し、C 末の600番目のスレオニン (T600) と622番目のセリン (S622) が CDK によりリン酸化されると、Dpb11 が結合する。Dpb11 にもう一つの CDK 基質である Sld2 がリン酸化に依存して結合すると、GINS も Dpb11 に結合する。さらに、CDK 同様に G1 期後期に活性化される Dbf4 依存性キナーゼ (DDK) により Mcm2-7 がリン酸化されると、Sld3 は Cdc45 とともに Mcm2-7 に結合する。従って、Mcm2-7 とともに活性なヘリカーゼ CMG を作る2つの因子、Cdc45 と GINS が、Sld3 との結合を介して複製開始部位上の Mcm2-7 にリクルートされることになる。

一方で、Sld3 は複製開始に必須であるが、Sld7 を欠失した細胞は増殖が抑えられるが致死に

はならない。Sld7 を欠失した細胞では Sld3 の量が減少しており、Sld7 の Sld3 への結合により Sld3 タンパク質が安定化されるためであると考えている。実際に、Sld7 の N 末側半分のみで Sld3 は安定化され、細胞の増殖も正常に戻った。この条件下で種々の薬剤に対する細胞の感受性を調べたところ、DNA に損傷を起こす Zeocin に弱い感受性を示すことが分かった。この理由は現在のところ分からない。

Sld3-Sld7 のヘテロ 4 量体構造の機能的意味はわからないので、*in vitro* の複製系を用いて解析した。まず、Sld3 と Sld3-Sld7 の複製活性を比較すると違いはなかった。Sld3 C 末の T600 と S622 をともにリン酸化不可能なアラニンに変えた変異では、細胞は増殖しないが、*in vitro* の系では野生型同様に DNA 複製が起こった。さらに、両リン酸化部位を欠いた Sld3 (1-430) は単独では複製を起こさないが、Sld7 との複合体では複製を起こすことができる。特に、T600 と S622 のリン酸化が起こらなくても、複製を開始させる Cdc45^{TEI} を精製し、Cdc45 の代わりに用いると顕著である。さらに、これが Sld7 を介したヘテロ 4 量体形成によることを確かめるため、Sld7 の N 末半分と DmrB を融合した Sld7N-DmrB を作成し、人工的にヘテロ 4 量体形成を制御する系を作った。DmrB は iDimerizer 存在化で 2 量体化する。その結果、Sld7N-DmrB では iDimerizer を添加した時のみ、*in vitro* の複製を促進することが分かった。これらの結果は、ヘテロ 4 量体形成によって、Sld3 機能の増強が起こっていることを意味する。細胞内では、Sld3 (1-430) は CDC45^{TEI} 変異存在化でも致死となるため、CBD 内の温度感受性変異である *sld3-5* 変異を持ち、Sld7 を Sld7N-DmrB に置き換えた細胞を作成した。この細胞は、*sld3-5* の許容温度で iDimerizer を添加すると増殖するが、添加しないと増殖しない。このことは、細胞内でもヘテロ 4 量体形成により、活性の増強が起こることを示唆する。活性の増強が、弱い活性を持つ 2 分子の Sld3 を同時に 1 分子の Mcm2-7 上にリクルートすることによるのか、2 分子の Sld3 を複製開始部位の 2 分子の Mcm2-7 に効率よくリクルートすることによるのか、は現段階では分からない。

In vitro DNA 複製では、Sld3 の T600 と S622 のリン酸化が必要なくなることは、これらのリン酸化の位置が Dpb11 との結合に重要ではないことを示唆している。Sld3 には 11 箇所の CDK によりリン酸化される部位があり、*in vitro* 複製系では、T600 や S622 以外の部位がリン酸化され、Dpb11 に結合することによって、GINS を複製開始部位にリクルートするものと推測している。細胞内では、CDK やフォスファターゼの働きやすさや、他のタンパク質によるリン酸化・脱リン酸化阻害によって、T600 及び S622 がリン酸化状態になりやすい、あるいはリン酸化が維持されやすくなっていることが考えられる。実際、フォスファターゼや他のタンパク質を含む細胞粗抽出液による *in vitro* 複製系では、これら 2 箇所のリン酸化は複製に必須である。

(3) *in vitro* DNA 複製を用いた複製フォーク停止機構 (8)

DNA 複製フォークは、染色体上の障害物、例えば強固に結合したタンパク質により停止される。それが単純な物理的衝突によるものか、あるいはフォークが障害物を検知し停止しているのかは分からなかった。そこで、*in vitro* 系を用いてこの現象を再現できるかまず調べた。

in vitro 複製系で、まず大腸菌のリプレッサーである LacI や LexA を加えて複製フォークの進行を調べた。その際、図 5 に示すように、複製開始部位を LacI または LexA の結合部位である LacO または SOS box で挟み込むようなプラスミドを作成し、鋳型とした。その結果、LacI を加えた時には LacO を持つプラスミドで、LexA を加えた時には SOS box を持つプラスミドで複製の阻害が観察された。逆に、結合部位を持たないプラスミドには影響はなく、タンパク質の結合によって複製フォークの停止が起こっていることが分かった。

LacI や LexA は大腸菌のリプレッサーで、人工的な系である。出芽酵母 rDNA のフォーク停止部位 (RFB) では、RFB の方向依存的に DNA 複製が停止する。この系には、RFB に結合する Fob1 に加えて、Fork Protection Complex (FPC) として知られている Tof1-Csm3

図 5. *in vitro* 複製系における複製フォークの停止
左に示すプラスミドを鋳型として、LacI または LexA を加えて反応を行い、アルカリアガロースゲル電気泳動 (右) により解析した。合成鎖が LacI や LexA の添加により短くなっていることが分かる。

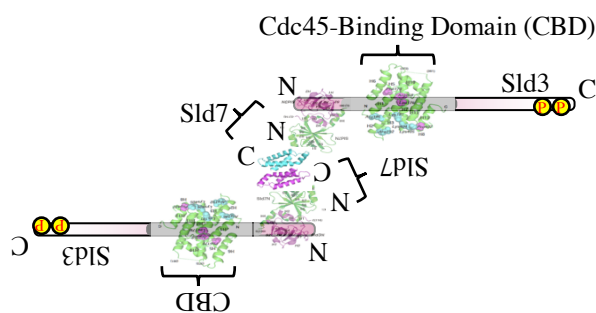
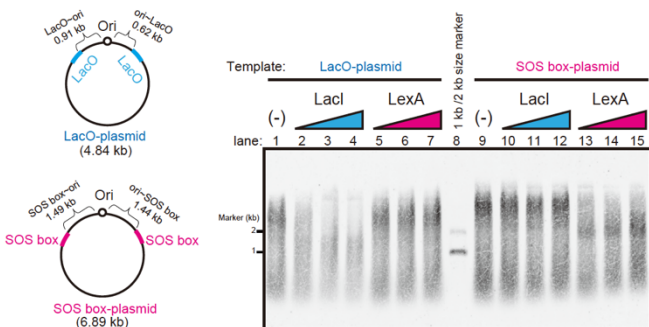


図 4. Sld3-Sld7 ヘテロ 4 量体の模式図

これまで部分的に決定した構造(6, 7)を含めて描いている。Sld3 C 末は非構造領域と考えられ、この部分に必須なリン酸化部位 T600 と S622 がある。

複合体が必要である。そこで、RFBを持つ鋳型プラスミドを作成し、DNA複製を調べたところ、精製した Fob1 と Tof1-Csm3 を *in vitro* 複製系に添加した場合にのみ複製フォークの停止が観察された。しかもフォーク停止は、RFBの方向に依存しており、細胞内の状況を再構成系がよく模倣していた。このことは、再構成した *in vitro* 複製系に用いた18種類のタンパク質、タンパク質複合体と Fob1 及び Tof1-Csm3 複合体があれば、RFBの方向に依存して複製フォークが停止することを示す。

DNAヘリカーゼのコアであるドーナツ状の Mcm2-7 は、複製開始部位では2本鎖DNAを穴に通しているが(図2)、ヘリカーゼ活性を持つ CMG となると、リーディング鎖の鋳型となる一本鎖DNAをその穴に通し、複製フォークの先頭で2本鎖を1本鎖にほどきながら、3'→5'方向に移動する(図6)。そのため、CMGヘリカーゼの進行が鋳型に結合したタンパク質により阻害されると考え、CMGのヘリカーゼ活性を測定した。CMGをフォークDNAに加えると1本鎖のDNAが観察でき、2本鎖DNAがほどかれていることが分かる(図7)。しかし、LacOを持つフォークDNAにLacIを加えても、同じように1本鎖DNAが観察され、CMGヘリカーゼは結合タンパク質に関係なく2本鎖DNAをほどく。In *in vitro* の複製系では複製フォークは停止するので、複製系に入っているタンパク質を調べたところ、Polεを加えるとヘリカーゼ活性が抑えられることが分かった。Polεは、触媒サブユニットの Pol2 と Dpb2, Dpb3, Dpb4 の4つのサブユニットからなる。Pol2の触媒ドメインを含む

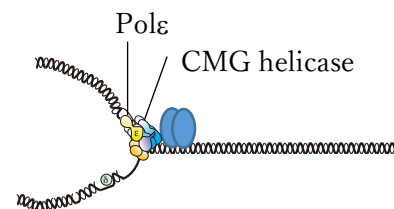


図6. 停止した複製フォーク
CMGヘリカーゼが先頭に位置し、その後で Polεがリーディング鎖を合成し、ラギング鎖を Polδ(δ)が合成する。この図では、CMGの右に結合したタンパク質によりフォークは停止する。

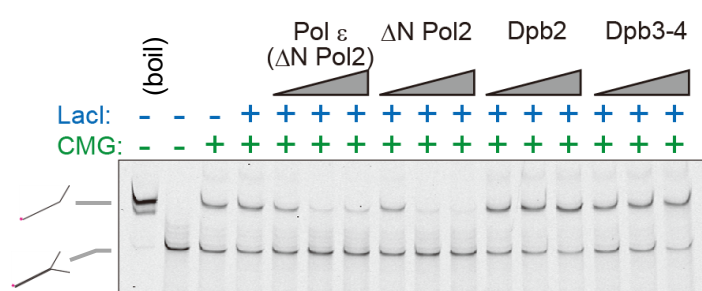


図7. Polεによる CMGヘリカーゼ活性の抑制
CMGのヘリカーゼ活性を、LacOを持つフォークDNA(左)の解離により測定した。DNA鎖の1方のみ蛍光標識し、アガーロースゲル電気泳動後の蛍光を検知した。Dpb3とDpb4はヘテロ2量体を作っているため、ヘテロ2量体(Dpb3-4)としてこの系に添加した。

LacIの結合した場合には、Polεの関与が明らかになったが、RFBで同様な解析を行なってもヘリカーゼ活性を抑制する機構は分からなかった。FPCとして知られる Tof1-Csm3の存在時には、他の複数の因子の関与があるのではないかと推測している。

<引用文献>

- ①Araki, H. (2016) Molecular mechanism of DNA replication. In "DNA replication, recombination, and repair (eds. F. Hanaoka and K. Sugawara)", pp. 3-22, Springer Japan, Tokyo.
- ②Heller, R.C., Lam, W.M., Chen, S., Chan, C.S. and Bell, S.P. (2011) Eukaryotic origin-dependent DNA replication *in vitro* reveals sequential action of DDK and S-CDK kinases. *Cell* 141, 80 - 91.
- ③Yeeles, J.T.P., Deegan, T.D., Janska, A., Early, A. and Diffley, J.F.X. (2015) Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature* 519, 431- 435.
- ④Hizume, K., Kominami, H., Kobayashi, K., Yamada, H. and Araki, H. (2017) Flexible DNA path in the MCM double hexamer loaded on DNA. *Biochemistry*, 56 (19), 2435-2445.
- ⑤Denkiewicz-Kruk, M., Jedrychowska, M., Endo, S., Araki, H., Jonczyk, P., Dmowski, M., Fijalkowska, I.J. (2020) Recombination and Pol ζ rescue defective DNA replication upon impaired CMG helicase—Pol ε interaction. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 9484
- ⑥Itou, H., Muramatsu, S., Shirakihara, Y. and Araki, H. (2014) Crystal structure of the homology domain of the eukaryotic DNA replication proteins Sld3/Treslin. *Structure* 22, 1341-1347.
- ⑦Itou, H., Shirakihara, Y. and Araki, H. (2015) The quaternary structure of the eukaryotic DNA replication proteins Sld7 and Sld3. *Acta Cryst. D* 71, 1649-1656.
- ⑧Hizume, K., Endo, S., Muramatsu, S., Kobayashi, T. and Araki, H. (2018) DNA polymerase ε-dependent modulation of the pausing property of CMG helicase at the barrier. *Genes & Dev.*, 32, 1315-1320.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Denkiewicz-Kruk, M., Jedrychowska, M., Endo, S., Araki, H., Jonczyk, P., Dmowski, M., Fijalkowska, I.J.	4. 巻 21
2. 論文標題 Recombination and Pol rescue defective DNA replication upon impaired CMG helicase-Pol interaction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 9484
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21249484	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hizume Kohji, Araki Hiroyuki	4. 巻 593
2. 論文標題 Replication fork pausing at protein barriers on chromosomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1449 ~ 1458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hizume Kohji, Endo Shizuko, Muramatsu Sachiko, Kobayashi Takehiko, Araki Hiroyuki	4. 巻 32
2. 論文標題 DNA polymerase -dependent modulation of the pausing property of the CMG helicase at the barrier	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 1315 ~ 1320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/gad.317073.118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyazawa-Onami, M., Araki, H. and Tanaka, S.	4. 巻 18
2. 論文標題 Pre initiation complex assembly functions as a molecular switch that splits the Mcm2-7 double hexamer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 EMBO Rep.	6. 最初と最後の頁 1752-1761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201744206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hizume Kohji, Kominami Hiroaki, Kobayashi Kei, Yamada Hirofumi, Araki Hiroyuki	4. 巻 56
2. 論文標題 Flexible DNA Path in the MCM Double Hexamer Loaded on DNA	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2435 ~ 2445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.6b00922	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Carroni Marta, De March Matteo, Medagli Barbara, Krastanova Ivet, Taylor Ian A., Amenitsch Heinz, Araki Hiroyuki, Pisani Francesca M., Patwardhan Ardan, Onesti Silvia	4. 巻 7
2. 論文標題 New insights into the GINS complex explain the controversy between existing structural models	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep40188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Okimoto, H., Tanaka, S., Araki, H., Ohashi, E. and Tsurimoto, T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Conserved interaction of Ctf18-RFC with DNA polymerase is critical for maintenance of genome stability in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 482-491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Araki, H.	4. 巻 35
2. 論文標題 Elucidating the DDK dependent step in replication initiation.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 EMBO J.	6. 最初と最後の頁 907-908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.201694227	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itou Hiroshi, Shirakihara Yasuo, Araki Hiroyuki	4. 巻 71
2. 論文標題 The quaternary structure of the eukaryotic DNA replication proteins Sld7 and Sld3	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography	6. 最初と最後の頁 1649 ~ 1656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S1399004715010457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計27件 (うち招待講演 16件 / うち国際学会 14件)

1. 発表者名 荒木 弘之
2. 発表標題 DNA polymerase epsilon: its function at the initiation and elongation steps of chromosome replication
3. 学会等名 Chromosome Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Araki, Shizuko Endo, Sachiko Muramatsu, Kohji Hizume
2. 発表標題 Non enzymatic function of yeast DNA polymerase epsilon in chromosomal DNA replication
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒木 弘之
2. 発表標題 酵母を用いた複製機構の解析
3. 学会等名 第25回DNA複製・組換え・修復ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Hizume, Shizuko Endo, Sachiko Muramatsu, Hiroyuki Araki
2. 発表標題 Requirements for replication fork pausing at the barriers
3. 学会等名 The 2019 meeting on Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohji Hizume, Shizuko Endo, Sachiko Muramatsu, Hiroyuki Araki
2. 発表標題 Formation and progression of replication forks in budding yeast; replication fork pausing at the barriers
3. 学会等名 The 44th FEBS Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohji Hizume, Shizuko Endo, Sachiko Muramatsu, Takehiko Kobayashi and Hiroyuki Araki
2. 発表標題 A novel role of DNA polymerase epsilon at replication forks; its involvement in replication fork pausing at the barriers
3. 学会等名 岡崎フラグメントー不連続DNA複製モデル50周年記念国際シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日詰光治、遠藤静子、村松佐知子、荒木弘之
2. 発表標題 出芽酵母の染色体DNA複製機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日詰光治、遠藤静子、村松佐知子、小林武彦、荒木弘之
2. 発表標題 DNA複製バリアにおける複製フォークの停止機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohji Hizume, Shizuko Endo, Sachiko Muramatsu, Takehiko Kobayashi, Hiroyuki Araki
2. 発表標題 DNA polymerase epsilon-dependent modulation of the pausing property of the CMG helices at the barrier
3. 学会等名 The 11th 3R & 3C Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒木弘之、遠藤静子、村松佐知子、日詰光治
2. 発表標題 試験管内再構成系を用いた出芽酵母の染色体DNA複製機構の解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日詰光治、遠藤静子、村松佐知子、小林武彦、荒木弘之
2. 発表標題 染色体DNA上の障害によるDNA複製フォークの停止機構
3. 学会等名 第51回酵母遺伝学フォーラム年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Araki
2. 発表標題 Formation, progression and stalling of bidirectional replication forks in budding yeast
3. 学会等名 EMBO/EMBL Symposium: DNA replication: From basic biology to disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日詰光治、遠藤静子、村松郁子、小林武彦、荒木弘之
2. 発表標題 CMG helices activity on chromatinized DNA and at the replication fork barrier
3. 学会等名 The 2017 meeting on eukaryotic DNA replication & genome maintenance (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroyuki Araki, Shizuko Endo, Masaru Yagura, Sachiko Muramatsu, Koji Hizume, Izumi Ishizaki, Koji Kato, Min Yao
2. 発表標題 Structure and function of the Sld3-Sld7 complex essential for the initiation of chromosomal DNA replication
3. 学会等名 The 2017 meeting on eukaryotic DNA replication & genome maintenance (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 日詰光治、遠藤静子、村松郁子、小林武彦、荒木弘之
2. 発表標題 リーディング鎖ポリメラーゼPol 依存的な複製ヘリカーゼの停止反応
3. 学会等名 第24回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 日詰光治、遠藤静子、村松郁子、小林武彦、荒木弘之
2. 発表標題 真核生物ヘリカーゼCMG複合体の、クロマチンあるいは複製バリア (Replication Fork Barrier) に対する活性の生化学的解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroyuki Araki, Nishiho Makino, Masaru Yagura, Sachiko Muramatsu, Shizuko Endo, Hiroshi Itou
2. 発表標題 Bidirectional initiation of chromosomal DNA replication in budding yeast
3. 学会等名 The 2016 Cold Spring Harbor Asia Conference: DNA metabolism, genomic stability and diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Araki, H.
2. 発表標題 Molecular mechanism of eukaryotic DNA replication
3. 学会等名 Gordon Research Conference: Genomic instability (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 荒木弘之、矢倉勝、牧野仁志穂、遠藤静子、村松佐知子、日詰光治、田中誠司
2. 発表標題 出芽酵母のDNA複製開始複合体の形成機構
3. 学会等名 第89回日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hiroyuki Araki, Nishiho Makino, Masaru Yagura, Shizuko Endo, Sachiko Muramatsu, Hiroshi Itou
2. 発表標題 he initiation mechanism of chromosomal DNA replication ensuring bidirectional DNA synthesis in budding yeast
3. 学会等名 10th 3R international symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 HIZUME, Kohji, Endo, Shizuko, Muramatsu, Ikuko, Kobayashi, Takehiko, ARAKI Hiroyuki
2. 発表標題 Biochemical analysis of the pausing of the eukaryotic replicative helices, CMG complex
3. 学会等名 10th 3R International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hiroyuki Araki, Nishiho Makino, Masaru Yagura, Shizuko Endo, Sachiko Muramatsu, Hiroshi Itou, Kohji Hizume, Seiji Tanaka
2. 発表標題 Molecular mechanism of chromosomal DNA replication in eukaryotes
3. 学会等名 The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 日詰 光治、遠藤 静子、小林 武彦、荒木 弘之
2. 発表標題 真核生物複製ヘリカーゼCMG複合体の進行阻害に関する生化学的研究
3. 学会等名 第39回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hiroyuki Araki, Hiroshi Itou, Nishiho Makino, Masaru Yagura, Shizuko Endo, Sachiko Muramatsu
2. 発表標題 Bidirectional initiation of chromosomal DNA replication in budding yeast
3. 学会等名 2015 Cold Spring Harbor Meeting on "Eukaryotic DNA replication & genome maintenance" (国際学会)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Kohji Hizume, Shizuko Endo, Hiroyuki Araki
2. 発表標題 Nucleosome on helices activity of CMG complex
3. 学会等名 2015 Cold Spring Harbor Meeting on "Eukaryotic DNA replication & genome maintenance" (国際学会)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 日詰光治、矢倉勝、遠藤静子、荒木 弘之
2. 発表標題 真核生物複製ヘリカーゼCMG複合体のクロマチン基質に対する活性
3. 学会等名 第38回日本分子生物学会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 矢倉勝、牧野仁志穂、伊藤啓、村松佐知子、日詰光治、田中尚美、田中誠司、荒木弘之
2. 発表標題 出芽酵母の複製開始複合体の形成機構
3. 学会等名 第38回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Araki H. (Hanaoka F, Sugasawa, K. eds)	4. 発行年 2016年
2. 出版社 Springer Japan	5. 総ページ数 555 (3-22)
3. 書名 DNA replication, recombination, and repair	

1. 著者名 Tanaka S, Araki, H. (Kaplan, DL. ed)	4. 発行年 2016年
2. 出版社 Springer International Publishing	5. 総ページ数 563 (263-278)
3. 書名 The initiation of DNA replication in eukaryotes	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ポーランド	Institute of Biochemistry and Biophysics		