

真核生物の DNA 複製開始時には、DNA 2 本鎖を巻き戻すヘリカーゼとして働く Mcm2-7 複合体が、不活性型である Mcm2-7 の 2 量体から、2 セットの活性型 CMG (Cdc45-Mcm2-7-GINS) 複合体へと変換される。この過程は、出芽酵母を用いた解析よりその詳細が明らかにされており、CMG 形成に必要な Cdc45 と GINS 複合体は、真核生物で保存された DDK (Dbf4-dependent kinase) と CDK (cyclin-dependent kinase) という 2 種類のキナーゼがこの順序で働くことにより、それぞれ別の複合体の一部として Mcm2-7 上にリクルートされることが分かっている。GINS のリクルートには、CDK による Sld3 のリン酸化が必須であるが、以前我々は、Sld3 のリン酸化が起きなくても DNA 複製を開始できる Cdc45 の変異、Cdc45^{JET1} を出芽酵母で単離した。Cdc45^{JET1} がなぜ Sld3 のリン酸化をバイパスできるのかは謎であったが、最近の解析で Cdc45^{JET1} では GINS との相互作用が亢進していることを見出したことで、その説明がある程度可能になった (未発表)。Cdc45 は真核生物間で進化的によく保存された因子であるが、Cdc45^{JET1} の変異部位は、出芽酵母特異的なループ内にあったため、このようなバイパス変異が真核生物の Cdc45 において普遍的に起きるものかどうかは分からない。

そこで、新たに GINS と相互作用できるようになった Cdc45 の変異体を多数取得し、それらの変異部位の同定と機能解析を行うことで、この疑問への答えを得ることができ、また、ヘリカーゼ活性化過程における Cdc45 の働きをより深く理解できると考えた。そこでまず、PCR を用いたランダムな変異導入により約 1000 個のクローンよりなる *CDC45* 変異ライブラリを作製した。これを用いて GINS サブユニットである Psf1 との相互作用が亢進しているものを、酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングを行い、約 1700 個の形質転換体より最終的に 8 種類の候補クローンを得た。これらのうち、5 クローンについては、アミノ酸置換を伴う変異が 1 箇所のみであり、2 箇所の置換をもつものが 1 クローン、3 箇所の置換をもつものが 2 クローンあった。その中でも、75 番めのアスパラギン酸がグリシンに置換された変異 (D75G) は、特に再現性良く、相互作用を示した。D75 は、真核生物 Cdc45 ファミリーで保存された、フォスフォエステラーゼのスーパーファミリーに見られる DHH ドメイン内の α -ヘリックス 3 の境界部に位置することより、他の真核生物 Cdc45 についても、同様の変異が得られる可能性がある。

このように、GINS と相互作用が亢進した新規 Cdc45 変異が得られたため、これらが *JET1* 変異同様に「バイパス」活性を持つか否かを調べることにした。*JET1* 変異は、内在性 *CDC45* を完全に置換しているが、複数の候補クローンについて同様の構築を行うのは実際的ではないと考え、現状のまま、すなわち、ツーハイブリッド用の構築のままで、バイパス活性を調べられる系の構築を行い、新規変異の活性を調べることにした。このような系が構築できれば、今後さらなるスクリーニングを行った場合でも、候補クローンについて迅速に活性測定ができる他、変異体の活性からバイパス活性を示す変異を直接スクリーニングすることも可能となる。これまでに複数の系を構築し、バイパス活性を調べられる系を得ることができた。