

平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな（ローマ字）		SUGINO AKIO					
①研究代表者氏名		杉野 明雄		②所属研究機関・部局・職 大阪大学・大学院生命機能研究科・教授			
③研究課題名	和文	真核生物染色体 DNA 複製フォークの分子ダイナミズム					
	英文	Molecular Dynamics of Eukaryotic Chromosomal DNA Replication Fork					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		22,500	17,000	17,000	17,000	12,800	86,300
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）				
杉野 明雄	大阪大学・大学院生命機能研究科・教授	分子遺伝学、分子生物学	研究総括及びマウス、ヒト染色体 DNA 複製開始部位の単離とその部位に結合する複製蛋白の同定				
川崎 泰生	大阪大学・大学院生命機能研究科・助手	分子遺伝学、分子生物学	出芽酵母染色体 DNA 複製フォークの <i>in vitro</i> 再構成				
岡部 勝	大阪大学・遺伝情報実験センター・教授	分子細胞工学	DNA ポリメラーゼ δ 及び ϵ ミューテーター変異マウス ES 培養細胞の樹立				
関 丘	名古屋大学・大学院理学研究科・講師	分子遺伝学、分子生物学	DNA ポリメラーゼ ϵ 複合体と GINS, Cdc45-Sld3, Dpb11-Sld2 複合体の相互作用の解析				
奥野 友紀子	名古屋大学・大学院理学研究科・助手	分子生物学、分子細胞学	ツメガエル卵粗抽出液 <i>in vitro</i> 複製系の解析、マウス、ヒト染色体 DNA 複製開始部位の単離				
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>真核生物染色体 DNA 複製フォークで起こる複製装置の形成、解離、崩壊、及び再構成の分子機構の解明を目的に、これまで我々が行ってきた出芽酵母 DNA ポリメラーゼ ϵ を中心とした複製装置の <i>in vitro</i> 再構成研究をさらに発展、完成させるとともに、アフリカツメガエル卵粗抽出液で起こる <i>in vitro</i> DNA 複製反応、DNA damage 及び、複製チェックポイント制御反応を詳細に解析検討し、精製した複製蛋白、複製因子を用い複製フォークで起こる複製装置の形成、解離、崩壊、及び再構成反応を <i>in vitro</i>（試験管内）で再構成する。この過程で各々の複製蛋白、複製因子が複製フォーク上で繰り広げている新しい分子ダイナミズムが明らかになると期待できる。又、DNA combing と DNA microarray を使った全く新しい染色体複製開始部位決定方法を開発し、マウス、ヒト細胞染色体複製開始部位の単離と同定を行う。更にヒト、マウスのセントロメア領域全体を TAR (Transformation-Associated Recombination) クローニング法を用いてクローニングし、新しい人工染色体構築法を開発する。こうして単離、同定した複製開始部位を含むクロマチン DNA や人工染色体を鋳型とし、出芽酵母の系（二段階再構成法）（Two Step Reconstitution）を参考にしてマウスやヒト細胞粗抽出液 <i>in vitro</i> DNA 複製系を確立し、複製フォークで起こる複製装置の形成、解離、崩壊、及び再構成反応を解析し、それらの分子機構の解明に迫る。</p>							

⑦これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

(1) G1 後期に同調した出芽酵母細胞粗抽出液を用い、複製開始部位で形成される複製開始前複合体 (preRC)、その後 Cdc28-Clb5 または Cdc28-Clb6 と Cdc7/Dbf4 protein kinases によって preRC が活性化され、その結果起こると考えられる複製開始部位DNA 鎖の開裂 (unwinding) 反応を試験管内で再現した。この過程で、preRC の主要な構成成分蛋白である Mcm2-7 複合体をG1 期又は G2/M 期で同調した出芽酵母細胞粗抽出液から、迅速かつ簡便に精製する方法を確立し (図 1)、それを使って精製した Mcm2-7 複合体は複製ライセンス因子の一つである Cdt1p と 1:1 の複合体として存在すること、この複合体がpreRC 形成反応においてCdc6 依存的に染色体複製開始部位 (ARS) に結合し、その後、Cdc6p と Cdt1pは自然に preRC から遊離することを示した (図 2)。一方、精製したMcm2-7-Cdt1 複合体は、それ自身では DNA helicase や ATPase 活性は認められないが、ATP 又はATP- γ -Sの存在下で Bubble- やY構造をしたDNAに結合することができることを示し、この複合体がOrc とCdc6 蛋白によって起こると考えられるDNA 鎖開裂部を認識し結合するとするモデルを提唱している (Kim, H.-D. et al. submitted to Mol. Cell)。 (2) S 期に同調した出芽酵母細胞粗抽出液を用い、preRC 形成後起きると考えられる複製装置の複製開始部位への Loading 反応を再構成する目的で、Leading 鎖合成ポリメラーゼであるDNA polymerase ϵ 複合体と相互作用し複製開始反応に関わる Dpb11-Sld2, GINS, Cdc45-Sld3 等の蛋白、蛋白複合体 (図 3 参照) を多量発現し、精製する方法を確立した。現在、これら精製した複製開始蛋白をはじめ、3 種類の複製 DNA polymerases (α , δ , 及び ϵ) 複合体をS 期の粗抽出液に補い、本来の複製開始部位からDNA 複製が起こる反応条件を詳細に検討中である。 (3) 一方、精製したDpb11-Sld2, GINS, Cdc45, 及び Sld3 蛋白と DNA polymerase ϵ 複合体との物理的相互作用を *in vitro* で解析し、実際 DNA polymerase ϵ 複合体が直接、GINS 複合体と相互作用することを明らかにした (図 4)。この複合体は細胞内でも存在するが、非常に不安定であり、また、高塩濃度では、検出が非常に困難であった (Seki, T. et al. in preparation)。 (4) 出芽酵母DNA polymerase ϵ 遺伝子 (*POL2*) のDNA polymerase domainsを欠く変異 (*pol2-16*) が生育可能であるが、本研究では、*pol2-16* 変異株の細胞増殖異常、DNA 複製異常、細胞周期異常、染色体 DNA の不安定性、テロメア領域の染色体 DNA の長さの変化等を詳細に解析した。その結果、*pol2-16* 変異株の増殖速度は野生株に比べ著しく遅く、染色体 DNA複製開始のタイミングは野生株とほぼ同じであるが、DNA 鎖伸長反応が著しく遅くなっていること、更に、この変異株は高温 (37°C) では生育できないことが明らかになった (Hiraga, S. et al. 2005)。更に、出芽酵母染色体、特に rDNA の遺伝子が多数存在するXII 番染色体の不安定性が著しく増加していることが判明した (Sugino, A. et al. in preparation) (図 5)。これらの結果は、正常な、効率の良い染色体 DNA 複製にはDNA polymerase ϵ が必要であることを示しており、我々の以前の結論を支持した (Ohya, T. et al. 2002)。 (5) アフリカツメガエル卵粗抽出液中で起こる *in vitro* DNA 複製にも、DNA polymerase δ と同様にDNA polymerase ϵ も重要な働きをしていることを証明した (Fukui, T. et al. 2004)。そこで、アフリカツメガエルのDNA polymerase ϵ 複合体 (p260, p60, p16, p12 の四種類の蛋白からなる) の複製反応における機能解析を行う目的で、ポリメラーゼ複合体を構成している蛋白をコードする cDNA (XPOLE1, XPOLE2, XPOLE3, XPOLE4) を単離し、その遺伝子を組み込んだ Baculovirusを昆虫細胞 sf9 に共感染させ、ポリメラーゼ複合体を再構成し、精製した。こうして再構成した DNA polymerase ϵ 複合体は DNA polymerase ϵ を除いたツメガエル卵粗抽出液の DNA 複製能を完全に回復させた (Shikata, K. et al. in preparation)。また、アフリカツメガエルの染色体複製に必須である出芽酵母 Dpb11, GINS, Cdc45 ホモログのXCut5, XGINS, XCdc45 蛋白を昆虫細胞で発現させ、精製した後、XDNA polymerase ϵ 複合体との物理的相互作用を免疫沈降法等で解析した。その結果、XDNA polymerase ϵ は XCdc45 と直接相互作用すること、又、XCut5, XGINS, 及びXCdc45 はヘテロ三量複合体を形成した後 DNA polymerase ϵ 複合体と結合し更に巨大な複製装置を形成することを明らかにした (Sasa-Masuda, T. et al. in preparation) (図 6)。 (6) 一方、出芽酵母Cdc7/Dbf4 protein kinase 複合体は、preRC 複合体中の Mcm2-7 蛋白複合体に結合し、Mcm2p, Mcm6p, 及びMcm4p をリン酸化することを明らかにした。しかし、この kinase による Mcm2p のリン酸化は染色体 DNA 複製開始には必須ではなく、この Kinase 複合体 がMcm2-7 複合体に結合することによって起こると考えられる Mcm2-7 複合体の構造変化が必須であることを明らかにした (Nakai, W. et al. submitted to Genes & Dev.)。同様に、アフリカツメガエルCdc7/Dbf4 protein kinase 複合体をコードする cDNA を単離し、昆虫細胞内で発現させ、精製した。精製したXCdc7/XDbf4 protein kinase はXMcm2p をリン酸化するが、アフリカツメガエル卵粗抽出液中では、大部分のXCdc7 とXDbf4p は別々の状態で存在し、複製開始時のみ複合体として働くことを明らかにした (Furugori, et al. 2004)。更に、XCdc7 蛋白を免疫除去した卵粗抽出液では、もはや *in vitro* DNA複製は認められないが、XDbf4 が無い単独なXCdc7 を補うと DNA 複製能の回復が見られた。一方、複合体として精製したXCdc7/Dbf4 を免疫除去していない卵粗抽出液に添加すると *in vitro* DNA 複製の顕著な阻害が観測された。従って、XCdc7/XDbf4 複合体は染色体複製開始反応に正に働く因子ではなく負に働く因子である事が判明した (Iwahori, S. et al. in preparation)。 (7) マウス、ヒトの DNA ポリメラーゼ ϵ をコードしている遺伝子 (muPOLE 及び huPOLE) をクローニングし、そのゲノム構造を明らかにした。更に、出芽酵母 *pol2-16* (DNA polymerase domain の欠失変異)、*pol2-4*、*pol2C1089Y* 変異と同様な変異遺伝子を構築し、muPOLE と置換え、DNA polymerase ϵ のミューターマウスES細胞を作製した。一方、DNA polymerase ϵ 触媒サブユニットをコードする領域を含む約 8Mb のE5 Band (G Band) とF Band (R Band)の境界で少なくとも数カ所の複製開始部位を同定した。またこの複製開始部位はS期の中期に活性化されることを明らかにした (Okuno, Y. and Sugino, A. in preparation)。現在、これらの領域を含む約 1kb の DNA 断片 (繰返し配列を全て除いた) を貼り付けた DNA arrayを作成し、より詳細な複製開始部位の同定を行っている。

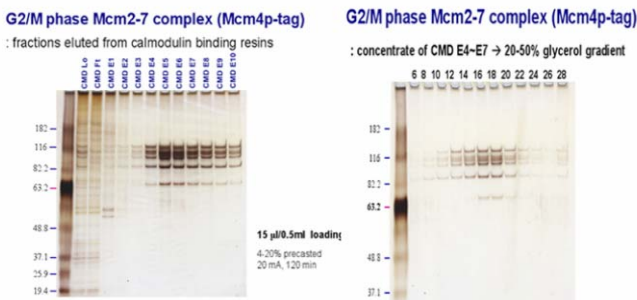


図1 G2/M 期で同調した出芽酵母細胞粗抽出液から TAP 法 (左) 及び Glycerol density gradient 遠心法 (右) で精製した Mcm2-7 複合体を SDS-PAEG で解析し、蛋白を銀染色した。6 個のサブユニット蛋白が同量存在することが明らかであるとともに、同じ量の Cdt1 蛋白も共精製される事が明らかになった。同様に、G1 期で同調した出芽酵母細胞粗抽出液からも Mcm2-7-Cdt1 複合体が精製された。

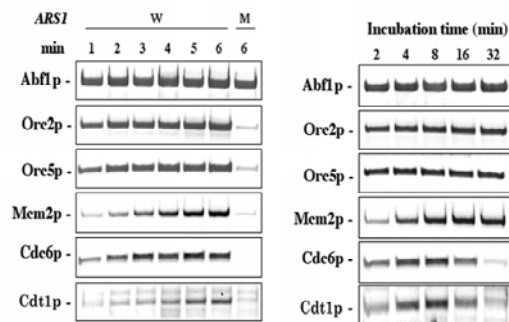


図2 *In vitro* preRC 形成系を用いて、preRC 中の各々の蛋白 (Orc1-6, Cdc6, Cdt1(Tah11), Mcm2-7) の複製開始部位 (ARS1) への結合の様子を継時的に解析した。この結果、まず、Orc 蛋白複合体が複製開始部位に結合し、続いて、Cdc6 蛋白、Cdt1-Mcm2-7 蛋白複合体が逐次的に複製開始部位に呼び込まれ、後に Cdc6 蛋白と Cdt1 蛋白が自然に解離することが分かった。

Genetic and physical interactions between Pole and other replication proteins

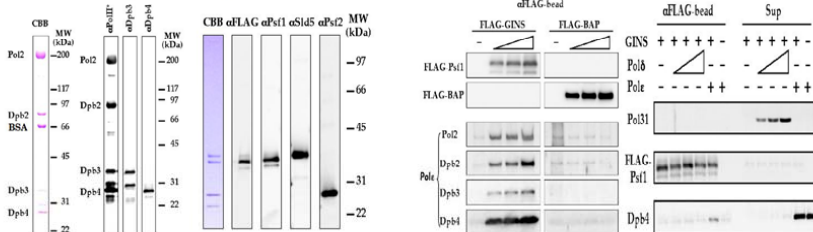
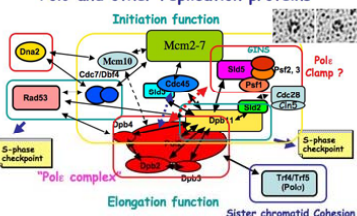


図3 4つのサブユニットから成る出芽酵母染色体複製に必須 DNA ポリメラーゼ ε と物理的に結合して色々な重要な機能を果たしている蛋白を示している。

図4 精製された染色体複製に必須な出芽酵母 DNA ポリメラーゼ ε な複合体と新に発見された複製開始に必須な GINS 複合体を SDS-PAEG で解析した (左)。この両者は更に大きな複合体を形成することが出来ることを明らかにした (右)。

Pol2-16 generates chromosome rearrangements

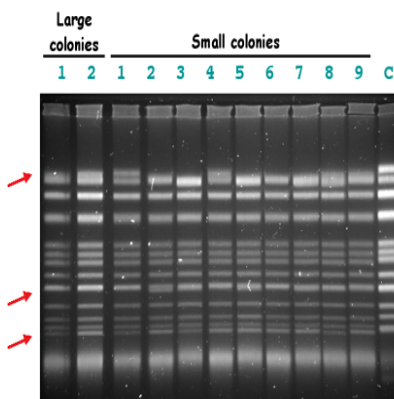


図5 出芽酵母 DNA polymerase ε の触媒サブユニットをコードする POL2 遺伝子の DNA polymerase 活性ドメイン部分のアミノ酸配列を欠失させた突然変異 pol2-16/pol2-16 は生存可能であるが、様々な成育異常が観察される。又、この変異株は高温では成育できないことが判明した。そこで、変異株の各々独立したコロニーを単離し、25°C で培養した後、染色体 DNA を抽出して、各々の染色体をアガロースゲル電気泳動で分離した。11 個の独立したコロニーを同一株から得たにも関わらず、矢印で示したように、多くのコロニーで染色体異常が観察された。ほぼ全てのコロニーで、特に一番大きい染色体において、DNA の欠失が多く見られた。又、本来は Diploid (二量体) であるはずが、ある染色体では三量体になっているものも観察される。この現象はガン細胞で多く見られるもので非常に興味深い。

XPol ε, XGINS, XCut5, and XCdc45 form a complex

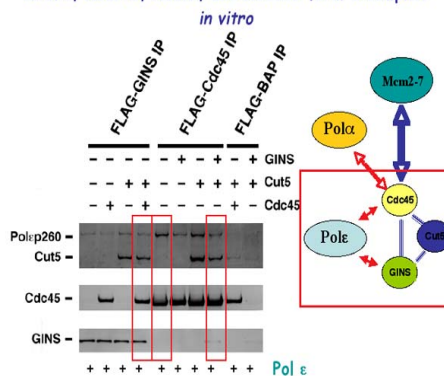


図6 昆虫細胞で発現させ、精製したアフリカツメガエルの XDNA polymerase ε 複合体、XCdc45p、XCut5p、及び XGINS 複合体を使って、その各々が更に大きな複合体を形成することを明らかにした。これより以前に、滝沢等が XCdc45 と DNA polymerase α 複合体、及び Mcm2-7 複合体と相互作用することを明らかにしている。従って酵母で明らかになったように (図3参照)、アフリカツメガエル卵粗抽出液の *in vitro* 複製反応でも DNA polymerase ε を中心とした複製装置の形成が複製開始反応に重要な働きをしていることが明らかになった。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

我々の研究成果により、出芽酵母細胞内では、DNA ポリメラーゼ ϵ 複合体が他の DNA ポリメラーゼ (例えば、DNAポリメラーゼ δ) で置換えが不可能な DNA合成反応 (おそらく Leading 鎖合成) に関与していることが証明された (Morrison et al. 1990; Araki et al. 1991; Araki et al. 1993; Araki et al. 1995; Ohya et al. 2002; Hiraga et al. 2005)。また、この反応は細胞周期に厳密に制御されていることを明らかにした。すなわち、DNA ポリメラーゼ Σ 複合体が染色体複製フォークに結合し DNA鎖伸長反応を行うためには、染色体複製開始反応に必須な Cdc45/Sld3、Dpb11/Sld2 及び GINS 複合体 [これらの蛋白複合体は、出芽酵母DNA ポリメラーゼ ϵ 複合体と相互作用している蛋白、蛋白因子として我々が始めて単離、同定したものである (Araki et al. 1995; Kamimura et al. 1998; Masumoto et al. 2000; Takayama et al. 2003)] に依存して複製開始部位に結合しなければならない (Aparicio et al. 1999; Zou and Stillman 2000; Kelly and Brown 2000; Bell and Dutta 2002; Mendez and Stillman 2003)。更に、他の研究グループによって、ヒト、マウス、アフリカツメガエルの Cdc45/Sld3、Dpb11/Sld2 蛋白複合体、GINS複合体ホモログも同定、単離されてきている (Kubota et al. 2003; Hashimoto et al. 2004)。しかし依然として高等生物、特にヒトやマウス細胞では DNA ポリメラーゼ ϵ は主に DNA 修復反応に関与し、DNA 複製反応には minor な働きしかしていないのではないかと考えている研究者が多い (Kesti et al. 1999; Fuss and Linn 2002)。そこで本研究では、これまで使用してきた出芽酵母細胞に加え、アフリカツメガエル卵粗抽出液 [この系を使って既にアフリカツメガエルの DNA ポリメラーゼ ϵ は効率の良い染色体 DNA 複製に必須であることを最近証明してきた (Fukui et al. 2004)]、マウス、ヒト細胞を使用し、高等動物細胞でも酵母細胞と同様 DNA ポリメラーゼ ϵ は染色体の全ての領域 (すなわち、複製の最初から終わりまで) の染色体複製に直接関与していることを検証するとともに、如何にして DNA ポリメラーゼ ϵ 複合体を中心とした複製装置が複製フォークに正確にロードされ (如何にして、Leading 鎖複製装置はLeading 鎖に、Lagging 鎖複製装置は Lagging 鎖にロードされるのか?) 正常な DNA 鎖合成が開始し、終了するかを分子レベルで明らかにすることを目的に研究してきた。この過程で、細胞内で複合体を形成している蛋白、蛋白複合体 (通常は弱いイオン強度で複合体を形成している場合が多い) を、簡便かつ迅速に精製する方法が確立 [この方法では、従来使用されてきた NaCl やKCl の塩に代え、Ammonium Glutamate を用い細胞粗抽出液を調整し、TAP (Tandem Affinity Purification) 法で蛋白、蛋白複合体を精製する] され (Kim, H.-D. et al. submitted to Mol. Cell)、まだその複製開始反応における機能が明らかになっていない Cdc45/Sld3、Dpb11/Sld2 蛋白複合体、GINS 複合体、Cdt1-Mcm2-7 複合体、及び Mcm2-7 複合体 [複製フォークで働くヘリカーゼと考えられている (Bell and Dutta, 2002; Laskey and Madine 2003; Mendez and Stillman 2003)] の精製が可能になった (驚くことに、これらの複合体を NaCl や KCl を使用して細胞粗抽出液を調整し同様にTAP 法で精製しようとしたが全く精製できなかった。このことは NaCl や KCl が弱いイオン結合で形成されている蛋白複合体を崩壊させていることになる)。この結果、これらの蛋白、蛋白複合体の複製開始反応、DNA 鎖伸長反応に於ける機能解析が可能になってきている。更に、この新しい精製法の確立は、未だ誰もが成し得ていない DNA ヘリカーゼ活性を持った (複製フォークで働いていると考えられる) Mcm2-7 複合体、Leading 鎖合成ポリメラーゼ (DNA polymerase ϵ 複合体と考えられる) と Mcm2-7 との複合体、Cdc45-DNA polymerase ϵ 複合体等の単離、精製を可能にし、出芽酵母染色体 DNA 複製反応の試験管内再構成、及びアフリカツメガエル卵 *in vitro* DNA 複製系の再構成実験の実現が一層近くなった点は特記すべきである。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

学術誌等に発表した論文

1. Leem, S.-H., Park, J.-E., Kim, I.-S., Chae, J.-Y., Sugino, A., and Sunwoo, Y. The possible mechanism of action of ciclopirox olamine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cells*, **15**, 55-61 (2003).
2. Araki, Y., Kawasaki, Y., Sasanuma, H., Tye, B.-K., and Sugino, A. Budding yeast mcm10/dna43 mutant requires a novel repair pathway for viability. *Genes to Cells*, **8**, 465-480 (2003).
- ③ Takayama, Y., Kamimura, Y., Okawa, M., Muramatsu, S., Sugino, A., and Araki, H. GINS, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Genes & Development*, **17**, 1153-1165 (2003).
4. Tsubota, T., Maki, S., Kubota, H., Sugino, A., and Maki, H. Double-stranded DNA binding properties of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase ϵ and of the Dpb3p-Dpb4p subassembly. *Genes to Cells*, **8**, 873-888 (2003).
5. Hashimoto, K., Shimizu, K., Nakashima, N., and Sugino, A. Fidelity of DNA Polymerase δ Holoenzyme from *Saccharomyces cerevisiae*: The Sliding Clamp Proliferating Cell Nuclear Antigen Decreases Its Fidelity. *Biochemistry*, **42**, 14207-14213 (2003).
6. Furukohri, A., Sato, N., Masai, H., Arai, K., Sugino, A., and Waga, S. Identification and Characterization of a *Xenopus* Homolog of Dbf4, a Regulatory Subunit of the Cdc7 Protein Kinase Required for the Initiation of DNA Replication. *J. Biochem.*, **134**, 447-457 (2003).
- ⑦ Fukui, T., Yamauchi, K., Muroya, T., Akiyama, M., Maki, H., Sugino, A., and Waga, S. Distinct roles of DNA polymerases delta and epsilon at the replication fork in *Xenopus* egg extracts. *Genes to Cells*, **9**, 179-191 (2004).
8. Kuriyama, I., Asano, N., Kato, I., Oshige, M., Sugino, A., Kadota, Y., Kuchitsu, K., Yoshida, H., Sakaguchi, K., and Mizushima, Y. L-Homoserylalcohol, a novel dipeptide alcohol inhibitor of eukaryotic DNA polymerase ϵ from a plant cultured cells, *Nicotina tabacum* L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **12**, 957-962 (2004).
9. Kawasaki, Y., and Sugino, A. DNA polymerase epsilon, Eukaryotic. *Encyclopedia of Biological Chemistry* (W. J. Lennarz & M. D. Lane, eds., Elsevier, Oxford) Vol. 1. pp716-719 (2004).
- ⑩ Hiraga, S., Hagihara-Hayashi, A., Ohya, T., and Sugino, A. DNA polymerases α , δ , and ϵ localise and function together at replication forks in *Saccharomyces cerevisiae* *Gene to Cells*, **10** (4), 297-309 (2005).

国際会議、学会発表

1. Hiraga, S., Hayashi-Hagihara, A., and Sugino, A. DNA polymerases α , δ , and ϵ co-localise and co-ordinately function at the replication forks in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryotic DNA Replication Meeting, September 3 - 7, 2003, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
2. Kawasaki, Y., Seki, T., Nakai, W., Diffley, J.F.X., and Sugino, A. In vitro loading of CDC7/DBF4 on pre-replicative complex in budding yeast. Eukaryotic DNA Replication Meeting, September 3 - 7, 2003, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
3. Seki, T., Hashimoto, K., Wang, C., Nakai, W., Kamimura, Y., Araki, H., and Sugino, A. Characterization of the interaction between DNA polymerase ϵ and GINS. Eukaryotic DNA Replication Meeting, September 3 - 7, 2003, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
4. Shikata, K., Masuda, T., Takisawa, H., Waga, S., and Sugino, A. Reconstitution of *Xenopus* DNA polymerase epsilon. Eukaryotic DNA Replication Meeting, September 3 - 7, 2003, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
5. Nakai, W., Asano, S., and Sugino, A. The Mcm2-binding, but not Mcm2-phosphorylation, is important for the function of Cdc7/Dbf4 protein kinase during initiation of chromosomal DNA replication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryotic DNA Replication Meeting, September 3 - 7, 2003, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.

6. Nakai, W., Kawasaki, Y., Seki, T., Ogi, H., and Sugino, A. The Mcm2p-binding, but not its phosphorylation, is essential for the function of Cdc7/Dbf4 protein kinase during the initiation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. The 4th International 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, November 9 - 13, 2003, Awaji, Hyogo.
7. Seki, T., Hashimoto, K., Wang, C., Nakai, W., Kamimura, Y., Araki, H., and Sugino, A. Characterization of the interaction between DNA polymerase ϵ and GINS. The 4th International 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, November 9 - 13, 2003, Awaji, Hyogo.
8. Shikata, K., Masuda, T., Takisawa, H., Waga, S., and Sugino, A. Reconstitution of Xenopus DNA polymerase epsilon. The 4th International 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, November 9 - 13, 2003, Awaji, Hyogo.
9. Nakai, W., Asano, S., and Sugino, A. The Mcm2-binding, but not Mcm2-phosphorylation, is important for the function of Cdc7/Dbf4 protein kinase during initiation of chromosomal DNA replication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The 4th 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, November 9 - 13, 2003, Awaji, Hyogo.
10. Kuriyama, I., Sugino, A., Yoshida, H., Sakaguchi, K., and Mizushima, Y. L-homoserylalcohol, a novel dipeptide alcohol inhibitor of eukaryotic DNA polymerase ϵ from a plant cultured cells, *Nicotina tabacum* L. The 4th 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, November 9 - 13, 2003, Awaji, Hyogo.
11. Sugino, A., Nishikawa, H., and Nakai, W. Defective DNA polymerase ϵ proofreading causes cancer susceptibility in mice? The 2nd JAPAN-AUSTRALIA SYMPOSIUM ON BIOMEDICAL SCIENCES -Drug Discovery for Infectious Diseases and Mutual Collaboration-, March 29 - 31, 2004, Kiroro, Hokkaido.
12. Nakai, W., Kawasaki, Y., Seki, T., Ogi, H., and Sugino, A. Role of MCM2-CDC7/DBF4 interaction during the initiation of chromosomal DNA replication in budding yeast. The 5th UK-Japan Cell Cycle Workshop, April 13 - 16, 2004, Nara.
13. Kawasaki, Y., Seki, T., Nakai, W., Obuse, C., Diffley, J.F.X., and Sugino, A. *In vitro* analysis of the loading of replication factors on pre-replicative complex in budding yeast. The 5th UK-Japan Cell Cycle Workshop, April 13 - 16, 2004, Nara.
14. Sugino, A. Molecular dynamics at the eukaryotic DNA replication fork and its dysfunctional consequences. Symposium of Dong-A University Medical Research center, May 20, 2004, Busan, Korea.
15. Nakai, W., Kawasaki, Y., Seki, T., Ogi, H., and Sugino, A. *In vivo* and *in vitro* analyses of the role of Mcm2p-Cdc7/Dbf4 interaction during the initiation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. DNA REPLICATION and GENOME INTEGRITY 2004. August 11 - 15, 2004, La Jolla, CA, U. S. A.
16. Sugino, A. Molecular dynamics at the eukaryotic DNA replication fork, The First US-Japan Meeting on Error-Prone DNA Synthesis. December 20-21, 2004, Maui, Hawaii, U. S. A.

国内講演、及び学会発表

1. 川崎 泰生、関 丘、中井 渉、大木 啓央、杉野 明雄。出芽酵母タンパク質抽出液を用いた複製開始領域での複合体形成の解析。酵母遺伝学フォーラム第 36 回研究報告会。平成 15 年 7 月 24-26 日、千葉県木更津市。
2. Sugino, A., Hiraga, S., Hagihara-Hayashi, A., Seki, T., Nakai, W., Hashimoto, K., and Kawasaki, Y. Molecular Dynamics at the eukaryotic DNA replication fork. 第 26 回日本分子生物学会年会。平成 15 年 12 月 10-13 日、神戸。
3. Kawasaki, Y., Seki, T., Nakai, W., Diffley, J., and Sugino, A. *In vitro* analysis of the lading of replication factors on pre-replicative complex in budding yeast. 第 26 回日本分子生物学会年会。平成 15 年 12 月 10-13 日、神戸。
4. Seki, T., Hashimoto, K., Wang, C., Nakai, W., Kamimura, Y., Araki, H., and Sugino, A. Characterization of the interaction between DNA polymerase ϵ and GINS. 第 26 回日本分子生物学会年会。平成 15 年 12 月 10-13 日、神戸。

5. 福居 智行、秋山 昌弘、真木 寿治、杉野 明雄、和賀 祥。アフリカツメガエル卵*in vitro* DNA複製におけるDNAポリメラーゼ δ 、 ϵ の異なる役割。第26回日本分子生物学会年会。平成15年12月10-13日、神戸。
6. 古郡 麻子、佐藤 憲子、正井 久雄、新井 賢一、杉野 明雄、和賀 祥。アフリカツメガエルCdc7-Dbf4ホモログの性状解析。第26回日本分子生物学会年会。平成15年12月10-13日、神戸。
7. 前佛 亜希子、白形 正樹、杉野 明雄、和賀 祥。アフリカツメガエル卵抽出液に基づくEBNA1-Oripシステムを導入した新しい*in vitro* DNA複製系の開発とその解析。第26回日本分子生物学会年会。平成15年12月10-13日、神戸。
8. 四方 孔、増田 太郎、滝澤 温彦、和賀 祥、杉野 明雄。アフリカツメガエルDNAポリメラーゼ ϵ ホロ酵素の再構成。第26回日本分子生物学会年会。平成15年12月10-13日、神戸。
9. 栗山 磯子、浅野 直樹、加藤 郁夫、杉野 明雄、大重 真彦、門田 康弘、朽津 和幸、吉田 弘美、坂口 謙吾、水品 善之。タバコ培養細胞 (BY-2株) 由来の新規ジペプチドアルコールはDNAポリメラーゼ ϵ を選択的に阻害する。第26回日本分子生物学会年会。平成15年12月10-13日、神戸。
10. 杉野 明雄。出芽酵母の染色体DNA複製開始機構とその細胞周期による制御。第16回酵母合同シンポジウム (特別講演)「いま、酵母研究に何が求められているか」。平成16年6月3-4日、大阪。
11. 川崎 泰生、関 丘、小布施 力史、中井 渉、大木 啓央、杉野 明雄。出芽酵母タンパク質抽出液を用いた複製開始領域での複合体形成の解析。第17回DNA複製・分配ワークショップ。平成16年7月12-14日、仙台。
12. 橋本 吉民、辻村 剛志、杉野 明雄、滝澤 温彦。アフリカツメガエル Cut5 機能ドメインの解析。第17回DNA複製・分配ワークショップ。平成16年7月12-14日、仙台。
13. Sugino, A., Seki, T., Kamimura, Y., Maki, S., and Araki, H. *In vitro* Reconstitution of Eukaryotic Chromosomal DNA Replication Apparatus. 第77回日本生化学会大会、シンポジウム、平成16年10月13-16日、横浜。
14. 橋本 吉民、辻村 剛志、杉野 明雄、滝澤 温彦。アフリカツメガエルCut5機能ドメインの解析。第27回日本分子生物学会年会。平成16年12月8-11日、神戸。
15. 中島 大、中野 めぐみ、平岡 康氏、杉野 明雄、舛本 寛。ヒト人工染色体形勢におけるヘテロクロマチン構造の獲得とその役割。第27回日本分子生物学会年会。平成16年12月8-11日、神戸。
16. 岡田 晃明、大関淳一郎、依田 欣哉、杉野 明雄、舛本 寛。ヒト/マウスに共通するセントロメア・クロマチンの形成機構。第27回日本分子生物学会年会。平成16年12月8-11日、神戸。
17. 小嶋 章裕、川崎 泰生、杉野 明雄。出芽酵母 Cdt1/Tah11 の分子遺伝学的解析。第27回日本分子生物学会年会。平成16年12月8-11日、神戸。
18. 中井 渉、川崎 泰生、関 丘、杉野 明雄。出芽酵母 Cdc7/Dbf4 による Mcm2-7 複合体のリン酸化とその機能解析。第27回日本分子生物学会年会。平成16年12月8-11日、神戸。
19. 大木 啓央、川崎 泰生、杉野 明雄。出芽酵母新規 *mcm5* 変異株の解析。第27回日本分子生物学会年会。平成16年12月8-11日、神戸。
20. 関 丘、橋本 恵至、王 成忠、坪田 智明、真木 智子、上村 陽一郎、荒木 弘之、杉野 明雄。出芽酵母のGINSとDNAポリメラーゼ ϵ 間の相互作用の解析。第27回日本分子生物学会年会。平成16年12月8-11日、神戸。
21. Hasan, W., Tokuno, O., Kawasaki, Y., Oogi, H., and Sugino, A. The Checkpoint guard Rad53p associates with the chromatin in a dependent manner on active Dbf4 and Cdc7.第27回日本分子生物学会年会。平成16年12月8-11日、神戸。
22. Sugino, A. Molecular dynamics at the eukaryotic DNA replication forks. COE International Symposium on "The Genetic and Cellular Basis of Life", December 13-14, 2004, Suita, Osaka.