

[ 別紙 2 ]

審 査 結 果 の 要 旨

氏名 内 山 雅 司

本研究は真核生物の遺伝子複製の開始機構を明らかにするため、分裂酵母において G1 期に細胞周期を停止する温度感受性株を単離し、変異の原因遺伝子の解明と遺伝子産物の機能の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. FACS を利用し、1C DNA 含量で細胞周期進行の障害がおきる一連の温度感受性株のスクリーニングを行った。これにより、既存の S 期開始を障害する変異株とは異なる 3 個の変異株をも得た。Linkage Mapping により 2 つの遺伝子に分類されたこれらを *goal*、*goa2* (**G** **O**ne **A**rrest) と名づけた。さきに想定したとおり *goal* は制限温度で単一な cdc phenotype を示さず、cut と cdc が混ざった phenotype を示した。それに対して *goa2* は単一な cdc phenotype を示した。また S 期開始の障害を特異的に監視する変異株 *rad26.a14* との二重変異株の解析から、*goal* は複製開始、*goa2* は START の制御に関係する遺伝子であることが判明した。
2. これら変異株の温度感受性を相補する遺伝子を発現ライブラリーの導入により得たところ、*goal* では出芽酵母の *CDC45* のホモログ、*goa2* では *res1* 及び *rep2* の遺伝子全長を含む染色体断片を得た。*goal* については作成した遺伝子破壊株が、温度感受性株の原因遺伝子が同じ遺伝座にあることを確認した。さらに変異部位を同定したところ、真核生物でもっともよく保存されている領域にあることが分かった。
3. *goal* (*spcdc45*) の DNA 複製制御における機能を解析するために、既存の DNA 複製関連遺伝子の温度感受性株群を使い遺伝学的結合を調べたところ、DNA 複製開始の RNA Primer 合成や DNA 複製をつかさどる DNA 複製酵素 DNA Polymerase  $\alpha$  とのみ相互に機能を相補する活性を見出すことができた。
4. *spcdc45* 遺伝子のカルボキシ末端に 3 つの HA 抗原配列、*pol $\alpha$*  遺伝子のカルボキシ末端に 2 つの FLAG 抗原をそれぞれ導入した。これにより SpCdc45 および Pol  $\alpha$  触媒サブユニット遺伝子産物を Western 解析および免疫沈降による結合たんぱく質の検出が可能となった。これらの株を利用し、SpCdc45 と Pol  $\alpha$  および出芽酵母で CDC45 との遺伝学的、生化学的結合が報告されている MCM たんぱく質 Mis5 との結合を検討した。これら 3 つのたんぱく質の量は細胞周期を通して一定であった。また SpCdc45 と Pol  $\alpha$  は細胞周期を通じて結合しているが、SpCdc45 と Mis5 は DNA 複製期の初期段階で結合していることが判明した。

5. これら3つの蛋白質は S 期開始の前後に核の不溶性画分、すなわち染色体分画に一時的に局在することを発見した。このことからこれらの蛋白質の結合と細胞内局在を検討したところ SpCdc45 は Pol $\alpha$  と局在にかかわりなく、Mis5 とは染色体画分において結合することが判明した。
6. *spcdc45* 温度感受性株において Pol $\alpha$  の染色体分画への移行を検討したところ、染色体分画への移行は正常であることがわかった。しかしながら、SpCdc45 が遺伝学的にも生化学的にも Pol $\alpha$  と相互作用すること、*spcdc45* 温度感受性株が制限温度下において S 期に進行できないことを考え合わせれば SpCdc45 が Pol $\alpha$  の機能を制御する因子であることが妥当である。そこで私は、*spcdc45* 温度感受性株において Pol $\alpha$  と Mis5 との生化学的結合を検討した。cdc20 (DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$  触媒サブユニット)温度感受性株では、その制限温度下において Pol $\alpha$  と Mis5 は結合しているが、*spcdc45* 温度感受性株では、その制限温度下において Pol $\alpha$  と Mis5 は結合できないことが判明した。これら二つの温度感受性株の細胞周期停止位置が隣接していることを考えれば、Pol $\alpha$  の Mis5 への結合の違いは単に細胞周期で結合が制御されているということではなく、本来その細胞周期の位置では結合しているものが *spcdc45* に変異があることにより阻害されていることを示していると考えられる。

以上、本論分は分裂酵母 Cdc45 相同遺伝子の単離と、遺伝子産物の機能解析をつうじ、Cdc45 相同遺伝子産物が、DNA Polymerase  $\alpha$  と細胞周期を通じて結合していること、S 期開始に Mcm たんぱく質と結合することにより複製開始点に DNA Polymerase  $\alpha$  を Loading するのに必須であることを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、遺伝子複製開始における DNA 複製酵素の複製開始点への結合機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。