

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 井 垣 浩

本研究は、DNA複製開始を制御していると考えられる CDC45L 蛋白質に着目し、この蛋白質をコードする遺伝子の転写調節機構および蛋白質の生化学的性質を明らかにするため、転写調節領域のゲノム DNA 断片および CDC45L 蛋白質をコードする cDNA をクローニングし、それを用いた解析を行ったものであり、以下の結果を得ている。

1. *CDC45L* 遺伝子のすぐ上流には *UFD1L* 遺伝子が存在し、両遺伝子は互いに離れる向きに転写が行われているという、高等真核生物では非常に珍しい構造をしていることを発見した。両遺伝子の開始コドンはわずか 884 塩基対しか離れておらず、この 884 塩基対の DNA 断片が 2 つの遺伝子の転写調節領域として機能することを示すと同時に、この領域内には、*UFD1L* 方向への転写のために 1 箇所、*CDC45L* 方向への転写のために 2 箇所の合計 3 箇所の転写開始点が存在することを 5'-RACE 法とサザンプロットによって明らかにした。これらの転写開始点から転写を行うコアプロモーターは、いずれも TATA ボックスを持たないいわゆる TATA-less プロモーターであることが示された。

2. ホタルルシフェラーゼ遺伝子あるいはウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子に 884 塩基対の DNA 断片もしくはその変異体 DNA 断片をつないだプラスミドを用い、HeLa 細胞にトランスフェクションして行った一過性発現実験により、転写に作用するコアプロモーターおよび制御プロモーターとして機能する領域がそれぞれの転写開始点について詳細に示された。また、*CDC45L* 遺伝子上流側コアプロモーター  $P_{CDC45L/minor}$  からの転写には CHOP-C/EBP  $\alpha$  2 量体あるいは Staf という転写因子が影響を及ぼしている可能性が示唆された。

3. HeLa 細胞 cDNA ライブラリーおよびヒト胎盤 cDNA ライブラリーから、*CDC45L* 蛋白質をコードする合計 5 種類の cDNA をクローニングし、その塩基配列を明らかにした。

また、CDC45L 遺伝子の位置するゲノム領域の塩基配列と比較することにより、クローニングされた cDNA はいずれも単一の遺伝子から転写され、スプライシング部位の差によって作り分けられたものであることが示された。

4. 得られた cDNA を用いて CDC45L 蛋白質を *in vitro* 翻訳系で合成し、pull-down assay により、大腸菌を用いて合成した GST-p70 融合蛋白質および GST-hMCM7 融合蛋白質が CDC45L 蛋白質と結合することを明らかにした。この生化学的性質は、CDC45L 蛋白質が、DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  のサブユニットである p70 蛋白質と結合し、さらに、複製前複合体の構成蛋白質である hMCM7 蛋白質と結合することにより、DNA 複製開始時に DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  を DNA 複製起点に誘導する役割を持つことが強く示唆されるデータである。また、スプライシング部位の差によって生じた複数の蛋白質種の一部では、GST-p70 融合蛋白質との結合能に差が認められ、これらの蛋白質種間に機能上の差があることも示唆された。

以上、本論文は CDC45L 遺伝子の転写調節領域をクローニングしてその転写調節領域を詳細に解析し、さらに、その遺伝子産物である CDC45L 蛋白質の生化学的性質を明らかにした。特定の遺伝子プロモーターをこれほど詳細に解析した報告はこれまでほとんど例が無いだけでなく、一般的な転写調節のメカニズムは十分には解明されていないため、CDC45L 遺伝子と UFD1L 遺伝子の両者について転写調節を細かく行った研究は、今後の転写メカニズム解明の重要なデータとなる。また、CDC45L 蛋白質は DNA 複製制御にかかわることは知られていたもののその作用機序はこれまで不明であったが、本論文が示した CDC45L 蛋白質の性質は、CDC45L 蛋白質の機能を強く示唆するものであり、DNA 複製制御メカニズムの解明のための基礎となる。従って、本論文は学位の授与に値すると考えられる。