



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Functions of the RAD51 and RAD52 genes involved in genetic recombination in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . |
| Author(s)    | 篠原, 彰   |
| Citation     | 大阪大学, 1991, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.11501/2964366">https://doi.org/10.11501/2964366</a>                               |
| rights       |   |
| Note         |   |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【20】

|         |  |
|---------|--|
| 氏名・(本籍) | 篠原彰  |
| 学位の種類   | 理学博士   |
| 学位記番号   | 第 9646 号   |
| 学位授与の日付 | 平成 3 年 3 月 26 日  |
| 学位授与の要件 | 理学研究科 生理学専攻<br>学位規則第 5 条第 1 項該当  |
| 学位論文題目  | Functions of the RAD51 and RAD52 genes involved in genetic recombination in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (遺伝的組換えに関する酵母 RAD51, RAD52 遺伝子の機能) |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授 小川 英行   |
|         | (副査)<br>教授 谷口 維紹    講師 小川 智子    教授 森田 敏照   |

論文内容の要旨

遺伝的組換えはゲノムの多様性の産生, DNAの障害の修復, 減数分裂期の染色体の分配に重要な過程である。この過程の分子機構は原核生物の系を通して理解されてきたが, 真核生物のそれはほとんど理解されていない。

遺伝的, 生化学的解析の容易な酵母 *S. cerevisiae* は遺伝的組換えを分子レベルで解析するのに適している。酵母には様々な組換えに関する RAD52 遺伝子群が知られている。特に RAD51, 52, 54 遺伝子の変異株では有糸分裂期, 減数分裂期の組換え, 酵母の接合型の変換, プラスミドのゲノムへの挿入などが欠損しているので, 組換えの共通過程である DNA 間の相同性の検索に関する遺伝子と考えられている。

組換えの中でも最も重要な DNA 間の相同検索の分子機構を明らかにするため RAD51, RAD52 遺伝子, 及びその産物の解析を行った。

RAD51 遺伝子をクローニングし, その全塩基配列を決定したところ, 400 アミノ酸からなる読み取り枠が同定でき, その蛋白質は原核生物の組換えで DNA 相同性の検索を行う RecA 蛋白質と 50% 相同であった。RAD51 遺伝子は真核生物の中で初めて RecA との相同性が見つかった遺伝子である。

RAD51, 52 両遺伝子の機能を知るため二つの蛋白質を大腸菌で量産させ, 精製した。RAD51 蛋白質は ATP に依存して単鎖 DNA と相互作用した。その様式は化学量論的かつ協同的だった。RAD52 蛋白質も DNA に結合するが, その結合は協同的ではなかった。最も重要なことは RAD52 蛋白質が *in vitro* で組換え反応を行なえることである。この RAD52 蛋白質による単鎖 DNA と二重鎖 DNA の間の組換え反応であるストランド, トランスファー反応は ATP のような高エネルギー化合物を必要と

しないが、基質DNAの相同性を必要とした。

また、RAD52蛋白質を担体にした Affinity Chromatography を行なったところ、精製したRAD51蛋白質が特異的にこのカラムに結合した。これら一連の結果からRAD51、RAD52蛋白質は複合体を形成し、組換え反応の中でDNA間の相同性の検索に働いていると考えられる。

このように、本研究によって今まで真核生物の組換え機構の中で未知とされてきたDNA間の相同性の検索に関与する遺伝子ならびに蛋白質が初めて同定できた。今後これらの遺伝子を解析することにより遺伝的組換えが分子レベルで解明されると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

遺伝的組換えはゲノムの多様性の産生、DNAの障害の修復、そして減数分裂期の染色体の分配に関与しており、生物の存続にとって必須の機能である。しかしこの過程の分子機構は原核生物の系を通じて主に理解されてきており、真核生物のそれはほとんど理解されていない。

篠原君は、酵母 *S. cerevisiae* を材料に選び、そのRAD51遺伝子とRAD52遺伝子、及びそれらのコードする蛋白質を解析して、真核生物の組換えの分子機構を理解するのに大きな貢献を行った。すなわち、RAD51遺伝子のクローニングに成功し、その全塩基配列の決定の結果、400アミノ酸からなる蛋白質をコードすることが明らかになった。その蛋白質のアミノ酸配列を解析した結果、驚くべきことに260アミノ酸にわたって大腸菌のRecA蛋白質と相同な配列のあることが明らかになった。原核生物の組換え蛋白質と相同なアミノ酸配列が真核生物の組換えに関与する蛋白質に見つかったのは初めてで、今後の真核生物の組換え研究に大きな影響をもたらすことは必定である。次にRAD51蛋白質を精製してその活性を調べた結果ATPに依存して単鎖DNAに結合した。その様式は化学量論的かつ協同的であった。他方RAD52蛋白質の精製にも成功し、この蛋白質もDNAに結合するが、その結合は協同的ではないことがわかった。しかし最も重要なことは、この蛋白質が組換え反応を行うことがわかったことである。つまり単鎖DNAとそれと相同な塩基配列を持つ二重鎖DNAの間でストランド・トランスファー反応を行なわせることができる。その反応には、ATPのような高エネルギー化合物は必要ではなかった。遺伝的組換えに関与していることがはっきりしている真核生物の遺伝子の中で、ストランド・トランスファー活性を持つ蛋白質をコードすることがわかったのはこの遺伝子がはじめてである。更にRAD52蛋白質を担体としたアフィニティ・カラムクロマトグラフィーを行ったところ、精製したRAD51蛋白質が特異的にこのカラムに結合したことから、RAD51とRAD52蛋白質は複合体を形成し組換え反応の中で、DNA間の相同性の識別、およびDNA鎖交換反応に働いていることが示唆された。これらの成果は、遺伝的組換えの研究に大きな知見を加えたもので理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。