

Title	サッカロマイセス・セレビスエ(酵母)のRAD52蛋白質の精製とその性質
Author(s)	東, 研二
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35320
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【1】

氏名・(本籍)	東 研 二
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 7368 号
学位授与の日付	昭 和 61 年 6 月 21 日
学位授与の要件	理学研究科生理学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	サッカロマイセス・セレビシエ(酵母)のRAD52蛋白質の精製と その性質
論文審査委員	(主査) 教授 小川 英行 (副査) 教授 松原 央 助教授 伊藤 建夫 講師 小川 智子

論 文 内 容 の 要 旨

二種類のDNA分子同志が相互作用して、その持つ遺伝情報の新たな組合わせを生じる現象は、「遺伝的組換え」と呼ばれ、真核生物の減数分裂時に最も特徴的に観察されるほか生物界普遍に存在する現象であり、さまざまな生命現象に深く関与していることが知られている。しかしながら、その分子機構については、不明な点が数多く残っている。

本研究では、真核生物における遺伝的組換え機構を分子レベルで理解することを目的として、遺伝学的背景が豊富で、遺伝子操作技術の適用可能な*Saccharomyces cerevisiae* (酵母)を研究材料に選んだ。ここで注目しているRAD52遺伝子は、古くから酵母の遺伝的組換えに中心的役割を果たしていることが知られている遺伝子で、まず、このRAD52遺伝子を単離し、その構造を、塩基配列決定により明らかにした。

その結果、1512ヌクレオチドからなる大きなオープンフレームが、RAD52構造遺伝子の少なくとも一部に対応することが明らかになった。次に、RAD52メッセンジャーRNAをS1マッピング法により解析したところ、このRNAはスプライシングを受けていないこと、また、その5末端は、大きなオープンフレーム上の第3番目のATGコドンの40ヌクレオチド上流、第2番目のATGコドンの15ヌクレオチド下流に存在することが明らかになった。このことから、RAD52タンパク質は、471アミノ酸からなる分子量52404のタンパク質であることが示された。

ひき続いて、酵母の強力なプロモーターのひとつである、PHO5プロモーターの下流にRAD52構造遺伝子を連結し、RAD52タンパク質を、酵母内で大量に誘導合成する系を確立した。この系と、先に得られていた、RAD52タンパク質に対する抗血清とを用いて、酵母内から、RAD52タンパク質を

完全精製することに成功した。

精製したRAD52タンパク質は、強いDNA結合能をもつことが明らかになった。また、通常の条件下では、二本鎖DNAより一本鎖DNAに対し、より強い親和性を示すこと、二本鎖DNAに対する結合は、マグネシウムイオンにより強く阻害されることが明らかになった。これらのことは、RAD52タンパク質が、酵母内で直接に遺伝的組換え反応に寄与していることを強く示唆している。今後、ここで精製されたRAD52タンパク質を用いて、さらに研究を進めることにより、遺伝的組換えの分子機構が明らかにできると期待できる。

論文の審査結果の要旨

遺伝的組換えの機構は、遺伝学が成立して以来その中心課題の一つとして研究され続けてきた。しかしその分子機構についてはこれまでバクテリオフェージや大腸菌を材料にして、大きな進展がみられたものの、真核生物ではまったくといってよいほどその知見がなかった。

東君は真核生物でその方途を開くために酵母を材料に果敢に行ったのが本研究である。これまでに酵母で組換えに関与する遺伝子が多数知られているが、その機能の多様性から最も興味を集め最も良く研究されているのがRAD52遺伝子である。この遺伝子をDNAレベルで明らかにし、そのタンパクを明らかにできれば一つの重要な突破口を開くことになるという見通しのもとで、先ずこの遺伝子のクローニングが行われた。ショットガン法によってrad52変異を相補するDNA断片が分離され相補できる領域の限定、その領域の塩基配列の決定、S1マッピング法による転写領域の同定、rad52-1変異部位の塩基配列上での決定等によってRAD52遺伝子部位の確定が厳密になされた。これらの実験結果は期せずして競走相手となった米国グループを完全に制して発表された。また更にRAD52遺伝子のプロモーター部位を酵母酸性ホスファターゼ遺伝子のプロモーターと置換して酵母内でRAD52タンパクを量産させる系を作ることに成功、それを利用して初めてRAD52タンパクの同定と精製にも成功した。その上に精製したタンパクはDNA結合能力を有していることも初めて明らかにした。これによってまさに真核生物の組換えの分子機構を解明して行く、確かな手掛りが得られたわけで、この研究結果は画期的であり、理学博士の学位論文として十分に価値のあるものと認める。