



Title	マウスReca遺伝子の細胞周期依存的発現
Author(s)	山本, 憲
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39022">https://hdl.handle.net/11094/39022</a>
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">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	やま もと あきら 山 本 憲
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 7 5 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 7 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	マウス <i>RecA</i> 遺伝子の細胞周期依存的発現
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 西 宗 義 武  (副査) 教 授 杉 野 明 雄    教 授 秋 山 徹

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

Homologous recombination による gene targeting は最近マウス遺伝子の機能解析の手段として広く行われるようになり、将来的には遺伝子治療に対する応用も考えられる。しかしながら現状では哺乳類の細胞における遺伝子組み換え反応の基礎的なメカニズムやそれに関与する遺伝子群に関しては、ほとんど知られていない。我々の研究室では以前に *E. coli* 由来の *recA*、および出芽酵母由来 *RAD51* とアミノ酸の一次構造において高い相同性を示す *RecA* 遺伝子をマウスおよびヒトからクローニングした。今回抗 RECA 抗体を作成し RECA 蛋白の発現様式を各臓器で調べ、さらに培養細胞を用いてその発現が細胞周期依存的であることを明らかにし、DNA recombination および repair と *RecA* 遺伝子との関係を考察した。

#### 【方法】

マウス RECA 蛋白の第 1 番から第 91 番アミノ酸をコードする部分をマウス *RecA* cDNA を鋳型として PCR 法により増幅した。増幅産物を pGEX-2 T ベクターの MCS に挿入し、pGRECA プラスミドを得た。このプラスミドを *E. coli* XL1-blue 株に導入した。形質転換された大腸菌を 1 L L-Broth 中で OD<sub>600</sub> が 0.7 まで 37℃ で培養し、最終濃度 0.1 nM の IPTG を添加した。さらに 16 時間培養後、菌体から GST 融合蛋白を回収、Glutathione Sepharose (Pharmacia) を用いて精製した。上記方法で得られた融合蛋白をウサギに免疫し、抗血清を得た。得られた抗血清から抗原カラムを用いて RECA 蛋白に対する抗体を精製した。抗原の精製及び抗原カラムの作成法は供給者の方法に従った。この抗体を用いてマウス精巣粗抽出液に対し Western blot 分析を行ったところマウス *RecA* cDNA 遺伝子塩基配列から予測される分子量と一致する 37 kDa の単一の蛋白と反応した。1) はじめにこの抗体を用いてマウスの各臓器の粗抽出液に対する Western blot 分析を行った。2) 高発現が認められた各臓器から 20 μm 厚の凍結切片を作成し、免疫組織染色を行い RECA 蛋白発現細胞の臓器内局在を調べた。3) 近二倍体マウス胎児皮膚由来の m5S 培養細胞を用いて血清飢餓および薬剤により細胞周期を同調させ、臓器粗抽出液の場合と同様 Western blot 分析および Northern blot 分析を行った。4) 最後に細胞増殖と RECA 蛋白量との相関を明らかにするために、マウス脾臓由来のリンパ球細胞を T-cell 特異的な mitogen である Concanavalin A (ConA) および B-cell 特異的な mitogen である Bacterial polyliposaccharide (LPS) で刺激し Western blot 分析および Northern blot 分析を行った。細胞増殖の指標としては <sup>3</sup>H-thymidine uptake 測定値および flow cytometry による細胞内 DNA 含有量分析を

用いた。

#### 【結果】

1) 胸腺・精巣で多量の、卵巣・脾臓では中程度の、さらに小腸では微量の RECA 蛋白 (37kDa) の存在が確認された。臓器間では分子量の変化は認められなかった。成体の脳・肝では RECA 蛋白の存在は確認できなかった。この結果は以前報告した Northern blot 分析の結果とほぼ一致する。2) 小腸粘膜上皮では crypt 底部に近い細胞の核に RECA 蛋白が認められた。パイエル板および脾臓では胚中心に存在する細胞核に、胸腺では皮膜直下の細胞核に、精巣では spermatogonia および pachytene 期の spermatocyte に、さらに卵巣では内側卵胞上皮細胞と一次卵胞内の未成熟な oocyte の核にそれぞれ発現が認められた。3) 血清飢餓により G0 期に同調させた後に細胞周期進行を再開させた場合、G1/S 境界付近から M 期の間で転写産物、蛋白の発現が認められた。転写産物の場合 G1/S 境界で peak を示した。蛋白の場合発現は転写産物に少し遅れ late G1 期に始まり S 期～M 期で plateau に達した。免疫組織染色から、細胞分裂後蛋白は速やかに分解されることが示された。薬剤処理によっても同様の発現様式が確認された。4) 脾細胞を mitogen (LPS, ConA) 入りの培地で培養した場合どちらの薬剤の刺激によっても lymphocyte での *RecA* 転写産物の存在量は15ないし20倍の増加が認められた。

#### 【考察】

*S. cerevisiae* では *Rad51* mRNA 量は細胞周期依存的に変動する G1 期で細胞周期を止めた後、細胞周期を再開させると *Rad51* mRNA 量は G1/S 境界付近で増加する。この知見と今回の m5S 細胞での知見とはほぼ合致し、出芽酵母と同様の発現調節を受けていることが示唆される。RECA 蛋白が G1/S 境界～G2 期にかけて核内に局在することからこの蛋白は G1/S チェックポイントあるいは DNA 合成後における DNA 修復などに関与していることが考えられる。ラット由来の cell line では homologous recombination の効率は G1 期と比べ S 期早期では10ないし15倍に上昇し、その後細胞が S 期後期や G1 期に入ると低下することが知られている。対照的に random integration の場合その頻度は細胞周期に依存しない。RECA 蛋白の発現量と homologous recombination 頻度と並行関係が見られることは両者が密接に関連していることを予想させる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、DNA 相同組み換えに関与すると考えられる *E. coli RecA* 及び *S. Cerevisiae RAD51* 遺伝子のマウスホモログについてその発現と細胞増殖との関連を明らかにしようとしたものである。本研究では抗マウス RECA 抗体を作成し、この抗体を用いてマウス RECA 蛋白が細胞周期中の G1 後期、S 期及び G2/M 期に細胞中に存在することを明らかにし RECA 蛋白の発現が細胞周期に依存している事を示した。この知見はマウス RECA 蛋白が細胞周期のチェックポイントあるいは DNA 複製期において DNA 損傷の組み換え修復を行っている可能性を強く示唆するもので重要である。

以上の論文内容は高等真核生物における DNA 相同組み換え・修復機構の解明及び高頻度相同組み換え系の確立に貢献するものであり、学位論文に値するものと認められる。