



Title	The mouse and human homologs of DMC1, the yeast meiosis-specific homologous recombination gene, have a common unique form of exon-skipped transcript in meiosis
Author(s)	土生, 敏行
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40782
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	土 生 敏 行
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 6 8 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成10年3月25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	The mouse and human homologs of DMC1, the yeast meiosis-specific homologous recombination gene, have a common unique form of exon-skipped transcript in meiosis (ヒト, マウス減数分裂期特異的相同組換え遺伝子 DMC1 の解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 西宗 義武
	(副査) 教 授 島田 和典 教 授 田中亀代次

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

遺伝的組換えは、今世紀初頭に連鎖する遺伝子群の組換え現象として発見された。そのころ観察された遺伝的組換え現象は相同遺伝子間で相反的に起きることから、Morganは“交叉”(crossing-over)と呼んだ。その後、Morganは、交叉現象より連鎖地図ができることを示し、現在におけるその寄与は計り知れない。相同組換えは、相同染色体間でお互いに対応する相同な塩基配列間で正確に切断、再結合が起こり、遺伝子の並びは変わらない。相同組換えはウィルスからヒトに至るまで全生物種に普遍的な現象である。その機構の詳細な研究は、これまで主に大腸菌や出芽酵母の実験系でなされ、大腸菌のRecA、酵母のRAD51が相同なDNAの対合、一方のDNAの相手DNAへの転移という組換え初期反応において重要な機能を果たしていることが知られている。また酵母では減数分裂期特異的なRecAに類似したDMC1が存在し、2種のRecA様タンパク質の機能が必要であることが示されている。今回、減数分裂期に特異的なDMC1をヒト、マウスより単離し、その機能を調べることを目的とした。

【方法及び成績】

マウスDmc1遺伝子を単離するため、マウスRad51、酵母Dmc1、Rad51で保存された領域をもとにオリゴヌクレオチドプライマーを作成し、マウス精巣RNAを基にRT-PCRにより230bpのDNA断片を得た。このDNA断片をプローブとしマウス精巣cDNAライブラリーをスクリーニングし、2,203bpのcDNAを得、ORFが1,020bp、340アミノ酸より成ると予想された。これと同時に、1,920bpのcDNAも得(Dmc1-d)、マウスDmc1cDNAのアミノ酸配列で142から196番目の領域を欠失していることが明らかとなった。マウスDmc1cDNAをプローブとして、ヒトDmc1cDNAも得ることに成功し、ヒトにおいてもDmc1-dが存在していた。ゲノムDNAの塩基配列決定の結果、2つのエクソンを跳ばした転写産物であることが明らかとなった。今回得られたDmc1cDNAから予想されるアミノ酸配列と他のRecA様タンパク質の比較を行った結果、マウスとヒトで96.4%、酵母と54.1%、またマウスRad51と53.6%の相同性を持っていた。

次にマウスでの各臓器での発現をノーザンブロットで調べた結果、成体のマウスにおいては減数分裂の盛んな精巣のみに発現し、さらに卵巣での発現とDmc1、Dmc1-dの2種のmRNAの存在を確かめるためRT-PCRを行った結果、減数分裂の盛んな胎児期の卵巣でも発現し、マウス精巣、胎児期の卵巣、ヒトの精巣の全てで2種のmRNAが

存在していた。次に Dmc1 が減数分裂のどの時期に発現しているかを in-situ ハイブリダイゼーションを行った結果、減数分裂前期のレプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期前期に発現していた。さらに Dmc1, Dmc1-d の 2 種の mRNA が翻訳されタンパク質として存在するかを調べるために、DMC1 の N 末端に対するペプチド抗体を作成し、大腸菌で発現させた DMC1, DMC1-D から予想される分子量のシグナルを得、RAD51 と交差しない DMC1 抗体で精巣総タンパク質に対してウェスタンプロットにより調べた結果、DMC1, DMC1-D 双方共に精巣で発現していた。

DMC1 タンパク質の機能を明らかにするため、大腸菌で產生させたマウス DMC1, DMC1-D, RAD51 を精製し、それらの in-vitro での活性（DNA-dependent ATPase 活性、単鎖及び二重鎖 DNA への結合性、DNA 鎖交換促進活性）の違いを調べた。その結果、DMC1 と RAD51 タンパク質とでは単鎖及び二重鎖 DNA への結合の親和性が異なり、RAD51 では単鎖 DNA により強く結合するのに対し、DMC1 では二重鎖 DNA により強い結合の親和性を持ち、この DNA 鎖への結合性の違いが DNA 鎖交換反応にも表れていた。

【総括】

ヒト、マウスより減数分裂期に特異的な RecA 様遺伝子 Dmc1 を単離し、ヒト、マウスでは新たにスプライスの違いによる Dmc1-d が存在しており、減数分裂期の相同組換えにおいて DMC1 に加えて新たな役割を持つものと考えられる。

また、in-vitro での DMC1 と RAD51 タンパク質との活性の違いを明らかとしたことで、減数分裂期の相同組換え反応に 2 種の RecA 様タンパク質が反応性を変えることで関与することを示した。

論文審査の結果の要旨

本論文では減数分裂期に特異的に発現し、その相同遺伝子組換えに関与すると考えられるマウス Dmc1 遺伝子を単離し、その発現また、スプライス派生体について明らかにしたものである。減数分裂を行う生殖細胞にのみ発現している大腸菌 RecA 様遺伝子 Dmc1 をヒト、マウスよりクローニングした。さらにこの遺伝子の mRNA にはスプライスの異なったものがあり、RecA タンパクのファミリーに重要な ATP 結合部位や DNA 結合部位を欠失したタンパクをコードし発現していることを明らかにした。このような mRNA はヒト、マウス精巣とマウス胎児卵巣にも存在していることから、それらが相同染色体組換えに新たな役割を担っていると考えられる。

既にクローニングされている大腸菌 RecA 様遺伝子 Rad51 が有糸分裂と減数分裂の両方で発現しているのに対し、哺乳動物の減数分裂期に特異的な相同組換え遺伝子の単離の報告は初めてであり独創的である。今回得られた Dmc1 遺伝子が減数分裂期の組換え機構を解明する上で重要な業績であり、学位論文に値すると考えられる。