

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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	はぶとしゆき 土生敏行
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第13680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 Dmcl 遺伝子を単離するため、マウス Rad51、酵母 Dmcl、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 (Dmcl-d)、マウス Dmcl cDNA 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 Dmcl cDNA をプローブとして、ヒト Dmcl cDNA も得ることに成功し、ヒトにおいても Dmcl-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 Dmcl cDNA 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 Dmcl、Dmcl-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 Dmcl 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、サイゴテン期、パキテン期前期に発現していた。さらに Dmcl, Dmcl-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ブ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、大腸菌で産生させたマウス 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 Dmcl 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 Dmcl-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 Dmcl 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 Dmcl 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 Dmcl 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。