

Title	Characterization of the roles of the Saccharomyces cerevisiae RAD54 gene and a homologue of RAD54, RDH54/TID1, in mitosis and meiosis
Author(s)	篠原, 美紀
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40788
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">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	しの はら み き 篠 原 美 紀
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 3 6 8 1 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	Characterization of the roles of the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RAD54 gene and a homologue of RAD54, RDH54/TID1, in mitosis and meiosis (出芽酵母 RAD54 とそのホモログ RDH54/TID1 の相同組換えにおける機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 品川日出夫 (副査) 教授 辻本 賀英 教授 野島 博

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

DNA 組換えは、細胞内において様々な理由から生じる DNA 傷害の修復や、減数分裂時の生殖細胞への正確な染色体分配を保証するために重要な役割を果たし、遺伝子の多様性を生むことにおいても大切な機能である。

原核生物においては RecA 蛋白が組換え反応の中心的役割を果たすことが知られている。真核生物においても酵母からヒトまで RecA 様蛋白が見つかっており、やはり組換え反応の中心的役割を果たすと考えられている。一方、真核生物では原核生物とは異なり RecA が行う反応を複数の蛋白が役割を分担し蛋白質複合体として機能し、細胞の置かれた状況によってその複合体の構成因子を変化させてメカニズムの特異性を与えていると考えられる。たとえば、出芽酵母においては体細胞分裂期、減数分裂期を通じて DNA 組換えに中心的な役割を果たす RAD51 と減数分裂期特異的な DMCl, 2 つの RecA 様蛋白遺伝子が存在してそれぞれ機能を分担していると考えられている。そして、遺伝学的に RAD51 と同じ形質を示す RAD54 が存在し、この RAD54 は原核生物には存在しないがヒトを含む高等真核生物まで保存され DNA 組換えにおいて RecA 様蛋白同様に重要な役割を担っていると考えられている。RAD54 はクロマチン構造変化にかかわる SNF2 ファミリーに属する DNA/RNA ヘリカーゼモチーフを持つ蛋白をコードしている。RAD54 が DNA 組換え反応においてどのような機能を持つかを知ることは RAD51 の関与する組換えのメカニズムを理解する上で非常に重要であると考えられる。本研究においては RAD54 の解析とともに、RAD54 ホモログである RDH54/TID1 を新たに発見し、その詳細な解析を行い RDH54/TID1 が主に減数分裂期において機能を持つこと、さらに RAD54 との機能分担における関係について明らかにした。

【方法ならびに成績】

出芽酵母においては全ゲノムの塩基配列が明らかになっており、データベース検索の結果 RAD54 のホモログ、RDH54/TID1 が存在することが明らかになった。rdh54 破壊株を作成し DNA アルキル化剤であるメチルメタンサルホン酸 (MMS) に対する感受性を調べた。rad54 は、MMS に対して感受性を示したのに対し、rdh54 破壊株は MMS に対して感受性を示さなかった。一方、rad54 rdh54 二重破壊株は、rad54 破壊株よりもさらに MMS に対して強い感受性を示すことがわかった。これらの結果は体細胞分裂期においては DNA 傷害の修復は主に RAD54 によって行われ、RAD54 がいない場合のマイナー修復経路として RDH54/TID1 が機能することを示している。

次に rad54 と rdh54, 二重破壊株それぞれの減数分裂期における機能を解析した。野生型では減数分裂期には相同染色体間組換えが体細胞分裂期に比べて約1000倍上昇することがわかっている。この事象は減数分裂期特異的に自ら染色体に二重鎖切断 (DSBs) を導入することによって誘発されることがわかっている。rad54 破壊株では体細胞分裂期の染色体間組換えに欠損を示すが, 減数分裂期に導入することによって DSBs 形成が野生型と同様に入り速やかに修復され組換え体も形成される。それにもかかわらず, 胞子形成頻度は30%と低く, できた胞子の生存率も60%と低くなる。一方, rdh54 破壊株では体細胞分裂期組換えは正常だが, 減数分裂期に DSBs が修復されずに残る傾向がある。そして, それにともなって減数分裂の進行が遅れることがわかった。また, 胞子の形成頻度は45%と低く, できた胞子の生存率も低い。rad54 rdh54 二重破壊株においてはそれぞれの単独破壊株よりもさらに染色体間組換えが3桁低く, DSBs は導入されるが全く修復されずに切断部位から分解されており, 結果として減数分裂期組換え体を全く形成しないことがわかった。また, 減数分裂に導入することで, 90%の細胞は致死となり, 胞子形成頻度は0.5%と極端に低くできた胞子は致死だった。このことは減数分裂期において RAD54 が存在せず, RDH54/TID1 のみが機能する場合には DSBs は見かけ上, 修復されるが正常な修復でないためにその後の胞子形成, 生存に支障を来すと考えられる。RAD54 のみが機能する状況では, DSBs の修復効率が悪いために減数分裂の進行が遅れると考えられ, また減数分裂期にはこの2つの遺伝子の両方の機能が必須であることが示された。

【総括】

以前は rad54 変異株が rad51 変異体に比べ減数分裂期において欠損が顕著でないために減数分裂期組換えにおいては Rad54 の機能が不要でないような分子機構があると考えられていた。本研究の結果から出芽酵母 RAD54 にはホモログである RDH54/TID1 が存在し, RAD54 と RDH54/TID1 は機能的に重複しているが, 体細胞分裂期には RAD54 が重要な働きを示す一方, 減数分裂期には両者, 特に RDH54/TID1 が重要になることがわかった。また, このことは相同検索および DNA 鎖交換反応といった組換え後期過程における体細胞分裂期組換えと減数分裂期組換えの分子機構の違いは, Rad54 と Rdh54/Tid1 の要求性によって決まっている可能性を示唆する。

論文審査の結果の要旨

本研究は真核生物特異的な組換え遺伝子であり, SW12/SNF2 ヘリカーゼファミリーに属する RAD54 の DNA 組換え反応における機能を明らかにすることを目的とし行われた。本研究では RAD54 の解析とともに, RAD54 ホモログである RDH54/TID1 遺伝子を新たに発見し, この遺伝子が相同組換えに関与することを明らかにした。詳細な遺伝学的解析の結果, 体細胞分裂期組換えには RAD54 が主な機能を担う一方で, RDH54/TID1 が主に減数分裂期組換えにおいて重要な機能を持つこと, さらに減数分裂期組換え過程においての RAD54 との機能分化について明らかにした。本研究の結果は体細胞分裂期と減数分裂期における組換え過程の分子メカニズムの相違点を理解する上で非常に重要な知見を与えるものであり, 学位の授与に値すると考えられる。