

Title	Purification and characterization of XRad51.1 protein, Xenopus RAD51 homologue : recombinant XRad 51.1 promotes strand exchange reaction
Author(s)	前島, 一博
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41669
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

氏名	まえ しま かず ひろ 前 島 一 博
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 14475 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	Purification and characterization of XRad51.1 protein, <i>Xenopus RAD51</i> homologue : recombinant XRad51.1 promotes strand exchange reaction. (アフリカツメガエル Rad51ホモログ XRad51蛋白質の精製とその生化学的解析)
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 花岡 文雄

論文内容の要旨

【目的】

相同的 DNA 組み換えは、生物界においてゲノム情報の多様性を生み出し、生物進化の原動力となる一方、生物個体のゲノム情報の保全のための DNA 修復にも関与している。現在まで、バクテリオファージ、大腸菌、酵母菌、哺乳類細胞などを持ちいて、多くの遺伝学的、生化学的知見が蓄積されてきた結果、相同的組み換えに関与する個々のプロセスに対する理解は飛躍的に高まった。しかしながら、最も研究が進んでいる大腸菌でさえも、相同的 DNA 組み換えという複雑な一連の反応を完結するシステムを再構成することには未だ至っていない。

本研究においてはこれまでに蓄積された個々の知見を統合できるような試験管内システムの構築を目指し、抽出液の調製や扱いが容易であり、生化学的解析に適したアフリカツメガエルを用いて相同的 DNA 組み換え反応の解析をおこなった。

研究を大きく二段階に分け、まず相同的組み換え反応で中心的な役割をおこなっていると考えられる大腸菌 *recA* 遺伝子や出芽酵母 *RAD51* 遺伝子と高い相同性を持つツメガエル *XRAD51* 遺伝子の単離と解析、および、そのレコンピナント蛋白質を精製することにより、*RecA* 蛋白質との生化学的活性の比較検討をおこなった。次に、ツメガエルの卵細胞抽出液を用いて相同的組み換えが完結する試験管内システムを構築し、*XRad51* 蛋白質や DNA ポリメラーゼの関与など、詳細な解析をおこなった。

【方法ならびに成績】

ツメガエル卵巣 cDNA ライブラリーより 2 種類の *RAD51* ホモログ (*XRAD51.1*, *XRAD51.2*) を単離した。2 つの *XRAD51* はヒト、マウスの *RAD51* とも高い相同性を示し、卵巣、精巣を含めて広範囲に発現が観察された。両者を T7 promoter を用いて大腸菌で大量発現させ、種々のクロマトグラフィーによって精製した。その結果、精製した *XRad51* 蛋白質は試験管内の組み換えの中心的反応である Strand Exchange 活性 (ssDNA と dsDNA の交換活性) をもっていることが明らかになった。そして、小角中性子散乱法 (SANS) を用いて、水液中での *XRad51* 蛋白質の構造および DNA との複合体の構造を解析した結果、*XRad51* 蛋白質は ATP と DNA 存在下で直径、ピッチとも *RecA* 蛋白質と非常に良く似たヌクレオフィラメント構造をとっていることが分かった。さらに、様々なヌクレオチドコファクターの存在下で *XRad51* 蛋白質の構造、DNA 結合能、DNA との解離速度、組み換え能を調べた結果、

XRad51蛋白質はATPまたはdATP存在下で、DNAと非常に組織化されたヌクレオフィラメント複合体を安定に形成し、RecA蛋白質と同様、このDNAとの複合体形成が組み換え反応の促進に重要な働きをしていることが示唆された。

ツメガエルの卵細胞には初期胚発生に備えて、DNA代謝に必要な蛋白質が蓄えられており、DNA複製、修復の活性も極めて高い。従って相同的組み換えに必要な蛋白質も豊富に存在することが予想された。このため、卵細胞抽出液を用いて相同的組み換え反応の全過程が再現できる無細胞系の樹立をおこない、包括的な解析を試みた。組み換え反応の基質DNAとしては、Recipient DNAとして λ ファージのDNA、Donor DNAとして λ ファージの中央部分と相同な配列を持つプラスミドDNAを用いた。これらの基質DNAを分画した卵細胞粗抽出液に加えて反応をおこなうと、これら2種類の基質DNA分子間で相同的組換えが起こり、 λ DNAの中央部分にプラスミドのDNA配列が約5-15%という極めて高い頻度で挿入された。さらに反応産物の構造を解析することにより、プラスミドのDNA配列が相同的組み換えにより挿入されたことが示された。この反応系に特異的阻害剤や抗体を加え、その効果を検討した結果、反応には2価イオンとATPが必要であり、組み換え効率は相同領域の長さに比例すること、またその反応にはDNA合成が必須であることが明らかになった。さらに、抗体を用いた解析の結果、この組み換えはXRad51に依存していない反応であることが示唆された。

【総括】

1, ツメガエルRad51遺伝子の同定、構造解析をおこない、さらに、レコンビナントのXRad51蛋白質を精製し、その生化学解析をおこなった。XRad51についてそのヌクレオフィラメント構造、DNA組み換え活性やDNA結合能力、さらにATP加水分解活性について物理化学的な領域にまで解析を進め、RecA蛋白質とXRad51蛋白質の生化学的相違を明らかにした。

2, ツメガエル卵細胞抽出液を材料として、効率のよい相同的組換えの無細胞システムを構築した。このシステムは約5-15%という極めて高い頻度で組み換え体が生じ、この値は今までに報告されてきた相同的組み換えの無細胞システムに比べて100-1000倍も高く、出芽酵母における減数分裂期遺伝的組み換えのホットスポットの頻度に匹敵する。また、この系におけるRad51非依存性は、酵母で示唆されたXRad51に依存しない系が高等真核生物にも存在していることを示唆していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

相同的DNA組み換えは、生物ゲノムに多様性を生み出す原動力であるとともに、ゲノムDNAの修復にも深く関与するため、生命現象にとって必須な機能である。組み換え反応は一連の生化学的な過程により構成されるが、これらに関する個々の知見を統合できるような試験管内システムの構築は、従来より待たれていたところである。

本研究は、生化学的研究に適したアフリカツメガエルを用いて相同的DNA組み換え反応を再現し、そのメカニズムを解析したものである。まず、相同的組み換え反応で中心的な役割を担う大腸菌recA遺伝子や出芽酵母RAD51遺伝子と高い相同性を持つツメガエルXRAD51遺伝子の単離と解析を行なった。次に、XRAD51レコンビナント蛋白質を精製し、その生化学的活性についてRecA蛋白質との比較検討を加えている。さらに本研究において前島一博君は、ツメガエルの卵細胞抽出液を用いて一連の相同的DNA組み換え反応が完結する効率のよい試験管内システムを世界に先がけて構築した。本システムにおける組み換え効率は今までに報告されてきた無細胞システムに比べて100-1000倍も高い。従って、相同的組み換えに関与する個々の過程を生化学的に解析することに適したものであり、本研究においてもXRad51蛋白質やDNAポリメラーゼの関与などについて、詳細な解析を行っている。

以上、本研究は高等真核生物の相同的DNA組み換え機構の研究に対し、新しい道を切り開くものであり、学位の授与に値すると考えられる。