The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	紫外線感受性を示す出芽酵母RFA1遺伝子上の変異の分離と解析
Author(s)	小堂, 直彦
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42607
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

【2】

氏　　名	小　堂　直　彦（こ どう なお ひこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15597　号
学位授与年月日	平成12年4月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学　位　論　文　名	**紫外線感受性を示す出芽酵母 *RFA1* 遺伝子上の変異の分離と解析**
論文審査委員	（主査） 教　授　田中亀代次 （副査） 教　授　杉野　明雄　　教　授　花岡　文雄

論文内容の要旨

[目的]

ヒト replication protein A（RPA）は試験管内 SV40 DNA 複製系で必須の因子として分離された蛋白質で、単鎖 DNA 結合活性を有し、3つのサブユニット（70,34,11kDa）から構成される。RPA は真核生物のなかで良く保存されており、出芽酵母では70, 36, 14kDa のサブユニットが各々 *RFA1*、*RFA2*、*RFA3* 遺伝子にコードされている。近年主に生化学的な解析から、RPA が複製のみならず、組換え、ヌクレオチド除去修復、ミスマッチ修復、チェックポイント、転写といった核内の多くの生命現象に関与していることが明らかになってきた。一方、出芽酵母では遺伝学的な手法により、紫外線感受性を示す *RFA* 遺伝子上の変異が報告されている。しかし、いかなる生命現象の欠損により紫外線感受性が引き起こされるかは、十分に明らかにされていない。本研究では、RPA の DNA 修復における機能を in vivo で明らかにするため、紫外線感受性を示す出芽酵母 *RFA1* 遺伝子上の変異を分離し、この表現形質がいかなる生命現象の欠損により引き起こされるのかを調査することを目的とした。

[方法ならびに成績]

1. プラスミドシャッフル法を用いた紫外線感受性を示す *RFA1* 遺伝子上の変異の分離

PCR 法でランダムに変異を導入した *RFA1* 遺伝子断片を用いてプラスミドシャッフル法を行ったところ、最終的に2つの紫外線感受性を示す変異が得られた。1つは Rfa1蛋白質の他の蛋白質との相互作用に関与するN末端領域において、36番のリジンがアルギニン、60番のロイシンがプロリンへと置換する36+60変異であった。もう一つは中央部の単鎖 DNA 結合ドメイン内のサブドメイン（SBD-B）で351番のセリンがプロリンへと置換する t6変異であった。単鎖 DNA 結合ドメインは2つの縦列した相同なサブドメインから成るが、以前の研究によりもう一方のサブドメイン（SBD-A）で t6変異と同じ部位で同様のアミノ酸置換を引き起こす紫外線感受性を示す変異（m51）が報告されていたので、これを加えて以下の解析を行った。

2. 紫外線ならびにメチルメタンスルホン酸（MMS）に対する感受性

各 *rfa1* アレルを染色体上の *RFA1* 遺伝子座上に持つ株を作成し、紫外線感受性について調査した。どの株も野生株に比べ強い感受性を示したが、特に36+60株と m51株が強い感受性を示し、t6株はそれらより若干穏和な感受性を示した。m51株と t6株では紫外線照射後25度で培養するよりも30度で培養したほうが、より強い感受性を示した。さ

らに、両株では、変異 *rfa1*遺伝子を染色体上に持つ方が、染色体複製起点 *ARS* とセントロメア配列を含むプラスミド（YCplac22）上に持つものよりも、より強い感受性を示した。これらのことは、36+60株では観察されなかった。MMS に対してはいずれの株でも強い感受性を示し、紫外線照射と同様に36+60株と m51株が t6株よりもより強い感受性を示した。

3. エピスタシス解析

つづいて、紫外線感受性がいずれの DNA 修復機構の欠損により引き起こされるのかを調査するために、*rad14*、*rad52*、*rad6*遺伝子との 2 重変異株を作成し、紫外線感受性を単独変異株と比較した。その結果、どの変異も *rad14*や *rad6*遺伝子との 2 重変異株では各々単独の変異株よりもより強い感受性を示す一方で、*rad52*遺伝子との 2 重変異株では各々単独の変異株のものと同程度の感受性を示した。したがって、これらの変異は *RAD52*のエピスタシスに属すること、すなわち組換え修復の欠損により紫外線感受性を示すことが明らかになった。

4. 変異株中で各種遺伝子を強発現させることによる紫外線感受性の抑圧

各変異株に、2μmDNA の複製起点をもつ YEp 型プラスミドに *RAD52*、*RAD14*、各々の *rfa1*遺伝子を連結したものを導入し、紫外線感受性の変化を調査した。36+60株では *RAD52*遺伝子を強発現したときのみ部分的に紫外線感受性が抑圧された一方で、m51株や t6株では *RAD52*遺伝子のみならず変異 *rfa1*遺伝子を強発現した際も部分的に抑圧された。

5. 変異株中の RPA 量の変化

対数増殖期にある各々の変異株から細胞抽出液を調製し、抗 RPA 抗体を用いたウエスタン法により細胞内での RPA 量を調査した。その結果、36+60株では野生株と同等の RPA 量が観察されたのに対し、m51株と t6株では RPA の著しい減少がみられた。

[総括]

本研究では、プラスミドシャッフル法を用いて紫外線感受性を示す 2 つの *RFA1*遺伝子上の変異を分離した。RPA は各種 DNA 修復やチェックポイントにも関与することが示されている。本研究で用いた紫外線感受性を示す 3 つの *rfa1*遺伝子変異株は、MMS に対しても感受性を持ち、エピスタシス解析の結果から組換え修復が欠損していることが明らかになった。m51株と t6株では、細胞内の RPA 量が減少することが組換え修復欠損を示す主な原因と考えられた。また、36+60株では RPA 量の減少が観察されずに組換え修復欠損を示すことから、組換え修復蛋白質との相互作用異常などの可能性を含め、他の2株とは異なる原因が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、出芽酵母 RPA（replication protein A）の大サブユニットをコードする *RFA1*遺伝子上の変異により引き起こされる、紫外線感受性について解析を行ったものである。紫外線感受性はヌクレオチド除去修復、組換え修復、チェックポイント機構などの欠損により引き起こされるが、これらの変異によりいずれの機構が欠損することにより本表現形質がもたらされるかはこれまで明らかにされてこなかった。本研究では、新たに分離した変異を加え、全ての変異による紫外線感受性が組換え修復の欠損によることを示した。同時に、*RFA1*遺伝子上の変異の位置により、同じ組換え修復欠損でも原因が異なることを明らかにした。RPA は、上述するものを含む多くの機構に関与することから、in vivo での個々の機構における機能解析は困難であったが、本研究の成果は組換え機構における RPA の機能を in vivo で今後さらに解析するうえで大変意義あるものと考えられる。また、本研究で解析した変異の一つは、DNA の欠失や染色体転座を引き起こすことが報告されている。これらの現象は癌を引き起こす主要な原因であることからも、本研究の成果は、組換え機構の解析だけでなく、癌研究やゲノム研究といった他の研究分野にも貢献するものと考えられる。以上から、本研究は学位に値すると考えられる。