

Title	Studies on key reactions of meiotic recombination : resection of 5' ends of double-strand breaks, functions of RecA-like proteins and meiotic recombination-related DNA synthesis
Author(s)	寺澤, 匡博
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49746
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	寺澤匡博
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 22530 号
学位授与年月日	平成20年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Studies on key reactions of meiotic recombination : resection of 5' ends of double-strand breaks, functions of RecA-like proteins and meiotic recombination-related DNA synthesis (減数分裂期組換えで鍵を握る反応の研究 : DNA 二重鎖切断の 5' 末端の削り込み反応、RecA 様蛋白質の機能、減数分裂期組換えに伴う DNA 合成反応)
論文審査委員	(主査) 教授 篠原 彰 (副査) 教授 升方 久夫 教授 滝澤 温彦 教授 米崎 哲朗 名誉教授 小川 英行

論文内容の要旨

減数分裂は生殖細胞を作り出す過程である。その過程で細胞は一度の複製を終えた後、二度の連続的な分裂により二倍体から一倍体の配偶子を形成する。減数分裂期組換えは減数第一分裂前期に起こり、その中でも交叉型組換えは、第一分裂の正確な染色体分配に必須である。

組換えは、減数分裂期染色体の特定の位置(組換えホットスポット)に、時期特定的に生じる二重鎖切断(DSB)の導入で開始する。DSBは、Mre11-Rad50-Xrs2(MRX)複合体とSpo11など約12種類の蛋白質の働きで起こる。そのDSBの5'端は、MRXとSae2の働きにより削られ、末端に3'の一本鎖DNA(ssDNA)を形成する(DSB resection)。このssDNAはRecA様蛋白質(Rad51、Dmc1)の相同染色体間の相同部位の検索に使われるが(homology search)、この相同検索には、Rad52、Rad55、Rad57やRPAなどの補助因子が必要である。この後、組換えは、交叉型、非交叉型組換え体形成反応に分歧し、削られた部分を埋める合成反応と、ssDNA端からの伸張合成(減数分裂期組換えに依存したDNA合成:MRDS)等を経て組換え体の形成に向う。組換えを完了したパキテン期染色体は、ディプロテン期を経て、二つの核に分配されるが、特にダブルホリデイジャンクションと呼ばれる中間体を経る交叉型組換えは染色体分配に必要なキアズマ形成に関与する。

私は組換えの過程の中でも特に、DSB後のssDNA形成、組換え反応と染色体構造変化の関連、MRDSの反応をより詳細に解析することを目的とした。細胞学的解析に遺伝学的、生化学的解析を加えることにより、上記反応に関与する蛋白質機能が明らかになり、組換え過程の理解が深まった。

研究成果のあらまし

私はSae2のリン酸化がssDNA形成の制御に関わると考え、リン酸化されたSae2の役割を調べた。Sae2のリン酸化は、ssDNA形成の開始と、その開始の効率の上昇に必要であること、Sae2とMre11(MRX複合体)が染色体上に共局在するために、リン酸化が必要であることを見つけた。

減数分裂期の組換え過程と減数第一分裂前期の染色体構造変化の関連を調べるために、1995年に、私はユリの二種類のDNA鎖交換活性を持つRecA様蛋白質、Rad51、Lim15を用いて間接蛍光抗体法で染色体の変化と

これらの蛋白質の局在を詳細に解析した。組換えがレプトテン期に開始し、さらにクロマチンループ上で始まることを見つけ、また両蛋白質の染色体上での局在が時期特異的であることを示した。この研究により、特定の組換え蛋白質と染色体構造との関連が明らかになった画期的な成果であった。

今まで検出が困難とされたMRDSの解析を、出芽酵母にハロゲン化ウリジンを効率良く取り込ませ、その時間を制御する方法を確立し、MRDSの検出に成功した。また、DNA combing法によりMRDSを一本の染色体DNA上に位置付けた。MRDSの存在様式が交叉型組換えの頻度が低下する変異株では野生株と異なることを見だし、二種の組換え体形成の違いがMRDSの長さや位置の違いで検出できた。

論文審査の結果の要旨

減数分裂は生殖細胞を作り出す過程である。その過程で細胞は一度の複製を終えた後、二度の連続的な分裂により二倍体から一倍体の配偶子を形成する。減数分裂期組換えは減数第一分裂前期に起こり、その中でも交叉型組換えは、第一分裂の正確な染色体分配に必須である。

組換えは、減数分裂期染色体の特定の位置(組換えホットスポット)に、時期特定的に生じる二重鎖切断(DSB)の導入で開始する。DSBは、Mre11-Rad50-Xrs2(MRX)複合体とSpo11など約12種類の蛋白質の働きで起こる。そのDSBの5'端は、MRXとSae2の働きにより削られ、末端に3'の一本鎖DNA(ssDNA)を形成する(DSB resection)。このssDNAはRecA様蛋白質(Rad51、Dmc1)の相同染色体間の相同部位の検索に使われるが(homology search)、この相同検索には、Rad52、Rad55、Rad57やRPAなどの補助因子が必要である。この後、組換えは、交叉型、非交叉型組換え体形成反応に分歧し、削られた部分を埋める合成反応と、ssDNA端からの伸張合成(減数分裂期組換えに依存したDNA合成:MRDS)等を経て組換え体の形成に向う。組換えを完了したパキテン期染色体は、ディプロテン期を経て、二つの核に分配されるが、特にダブルホリデイジャンクションと呼ばれる中間体を経る交叉型組換えは染色体分配に必要なキアズマ形成に関与する。

私は組換えの過程の中でも特に、DSB後のssDNA形成、組換え反応と染色体構造変化の関連、MRDSの反応をより詳細に解析することを目的とした。細胞学的解析に遺伝学的、生化学的解析を加えることにより、上記反応に関与する蛋白質機能が明らかになり、組換え過程の理解が深まった。

研究成果のあらまし

私はSae2のリン酸化がssDNA形成の制御に関わると考え、リン酸化されたSae2の役割を調べた。Sae2のリン酸化は、ssDNA形成の開始と、その開始の効率の上昇に必要であること、Sae2とMre11(MRX複合体)が染色体上に共局在するために、リン酸化が必要であることを見つけた。

減数分裂期の組換え過程と減数第一分裂前期の染色体構造変化の関連を調べるために、1995年に、私はユリの二種類のDNA鎖交換活性を持つRecA様蛋白質、Rad51、Lim15を用いて間接蛍光抗体法で染色体の変化とこれらの蛋白質の局在を詳細に解析した。組換えがレプトテン期に開始し、さらにクロマチンループ上で始まることを見つけ、また両蛋白質の染色体上での局在が時期特異的であることを示した。この研究により、特定の組換え蛋白質と染色体構造との関連が明らかになった画期的な成果であった。

今まで検出が困難とされたMRDSの解析を、出芽酵母にハロゲン化ウリジンを効率良く取り込ませ、その時間を制御する方法を確立し、MRDSの検出に成功した。また、DNA combing法によりMRDSを一本の染色体DNA上に位置付けた。MRDSの存在様式が交叉型組換えの頻度が低下する変異株では野生株と異なることを見だし、二種の組換え体形成の違いがMRDSの長さや位置の違いで検出できた。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。