

氏 名 渡 邊 光 一

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第407号

学位授与の日付 平成11年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 出芽酵母の相同組換えにおけるRad55とRad57の役割

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 荒木 弘之

教 授 石濱 明

教 授 嶋本 伸雄

教 授 井上 弘一（埼玉大学）

教 授 品川 日出夫（大阪大学）

## 論文内容の要旨

遺伝的組換えは両親由来の遺伝子を組み換えて子孫に伝える重要な機能を担っている。また、組換えは DNA の損傷を正しく修復することにも関与している。真核生物における遺伝的組換え機構の研究は出芽酵母において進展してきた。出芽酵母の組換えは DNA 二重鎖の切断 (DSB : Double Strand Break) で開始する。RAD52 エピスタシスグループに属する遺伝子群はこの DSB の形成とその修復に機能する遺伝子である。これらの遺伝子に変異が起ると、体細胞分裂期の細胞では、変異原に感受性になり、減数分裂期の細胞では、染色体を正確に分配できなくなるため、胞子の形成ができなくなるか、胞子を形成できても、その胞子は致死となる。このグループに属する遺伝子として現在までに、RAD50、MRE11、XRS2、RAD51、RAD52、RAD54、RAD55、RAD57 の 8 遺伝子が同定されている。このグループに属する遺伝子のホモログは、真核生物に広く保存されており、構造的にも機能的にも似ていることから、組換えの基本的メカニズムが真核生物を通して共通であると考えられている。

減数分裂においては、組換えが高頻度にかかるホットスポットと呼ばれる染色体上の領域に DSB が入り、その切断末端で一方の DNA 鎖が消化されて 3' に単鎖 (ss)DNA を持つ末端が形成される。この ssDNA に Rad51 が結合して、相同な配列を持つ DNA を検索、対合して、DNA 鎖を交換する。その後、相手の DNA を鋳型として、DSB 形成時に消化された塩基配列が修復合成され、特異的なエンドヌクレアーゼにより DNA 鎖の交叉が解消されて、組換え体が形成されることが考えられている。ホットスポットでの DSB 形成から ssDNA の露出までには、Mre11、Rad50 と Xrs2 と共に Spo11、Sae2/Com1 が関与する。ssDNA と相同な DNA の検索から相手二重鎖 (ds)DNA との対合から DNA 鎖の交換までのステップには、単鎖 DNA 結合タンパク質である RPA と Rad51、Rad52、Rad54、Rad55、および、Rad57 の機能が関与する。

Rad51 は、大腸菌の組換え蛋白質である RecA 蛋白質のホモログであり、DNA 鎖交換反応を行う。DNA 鎖交換反応は、presynaptic filament と呼ばれる、Rad51 が ssDNA に結合して作る特徴的なラセン構造を持つ複合体の形成で始まる。この presynaptic filament 形成では、ssDNA、RPA、Rad51 と Rad52 の間の相互作用が presynaptic filament 形成を促進することが示されている。しかし、Rad55 と Rad57 の組換えにおける機能はわかっていなかった。

体細胞分裂期の RAD55 と RAD57 の機能を遺伝学的に解析した結果、RAD55 と RAD57 は RAD51 の上位で機能すると予想された。そこで、遺伝的組換えでの RAD55 と RAD57 の役割を知るために、減数分裂期組換えにおける RAD55 の機能を調べた。rad55 Δ 変異株で胞子の形成率が低いこと、減数分裂期遺伝子内組換えの頻度が低いこと、そして、胞子の生存率が、spo13 変異ではなく、rad50 spo13 二重変異を rad55 Δ 変異株に導入することによって回復するが spo13 変異では回復しないことから、RAD55 は相同組換え機構の DSB 形成後の段階で働くことが示された。また、野生株を減数分裂に導入すると、極めて早い時期に RAD55 の転写が誘導されるが、mRNA の発現量は RAD50、RAD52 の mRNA 量と比較して、極めて少ないことがわかった。

Rad55 と Rad57 が複合体を形成することが示唆されていたので、Rad55 と Rad57 を酵

母から精製して、これらが安定な複合体を形成することを示した。細胞抽出液からの免疫沈降実験と GST pull down assay を行ったが、Yeast Two-Hybrid 法の実験からいわれたような、Rad55 と Rad51 の相互作用は検出できなかった。

次に、GST RAD55 と GST RAD57 を大腸菌で発現させ精製した。精製した両蛋白質は単鎖 DNA と二重鎖 DNA に対してヌクレオチド非依存性 DNA の結合活性を示した。さらに、Rad55 の DNA 結合領域は 269aa から 320aa までの領域であり、Rad57 の DNA 結合領域は、350aa から 380aa までの領域であることがわかった。Rad55 は C 末端側が DNA 結合領域であり、GST Rad55 が *rad55* Δ 変異株の MMS 感受性を相補できなかったため、N 末端側が他のタンパク質との結合領域であると予想した。Rad55、および、Rad57 は、アミノ酸配列上、Walker type-A のヌクレオチド結合配列を持ち、実際に Rad55 にあるヌクレオチド結合配列は、Rad55 の機能に必要である。Rad55 のヌクレオチド結合配列は N 末端側にあることから、ヌクレオチドの結合とタンパク質間相互作用、そして、Rad55-57 の機能の発現に相関があることを期待できる。

GST Rad57 は 3' 突出末端をもつ二重鎖 DNA に対する親和性が高い。3' 突出末端をもつ二重鎖 DNA と GST Rad57 の複合体を電子顕微鏡で観察したところ、GST Rad57 が DNA の末端に結合している分子が多数、観察された。また、GST Rad57 と反応させた複数の DNA 分子が平行に寄せ集められている様子が観察された。DNA が凝集した結果、分子間の衝突頻度が高くなり、相同な DNA 分子と対合する機会が増加して、それが組換えに有利に働くと考えられた。

Rad55 の発現量が極めて少ないことと Rad55 と Rad57 が実際に複合体を形成することから、Rad55-57 複合体は、ランダムに DNA に結合するのではなく、減数分裂期組換えに見られるような、3' OH 末端が突出した ssDNA を認識して結合すると考えた。そして、特徴的な DNA 結合活性と RAD55 と RAD57 の遺伝学的解析から、Rad55-57 複合体は 3' OH 末端が突出した ssDNA に結合し、Rad51 の ssDNA への結合の起点となり、DNA の一方の末端から効率良く presynaptic filament が形成されるように機能することであると予想した。

## 論文の審査結果の要旨

遺伝的組換えは両親由来の遺伝子を組換えて子孫に伝える重要な機能を担っている。また、遺伝的組換えは DNA の損傷を正しく修復することにも関与する。出芽酵母の組換えは DNA 二重鎖の切断 (DSB: Double Strand Break) により開始するが、この DSB の形成とその修復に機能する *RAD52* エピスタシスグループに属する遺伝子群のなかで、Rad55 と Rad57 は DNA 鎖の交換反応を行なう Rad51 同様にヌクレオチド結合アミノ酸配列を持つが、組換えにおける機能はよくわかっていなかった。渡辺光一君は、遺伝的・生化学的解析によりこれら遺伝子の減数分裂組換えにおける機能を明らかにした。

まず、*rad55* Δ変異株で減数分裂期遺伝子内組換え頻度が低いことから、減数分裂期組換えに *RAD55* の機能が必要であることを示した。また、*rad55* Δ変異株では孢子の形成率・生存率が低く、第一減数分裂をスキップする *spo13* 変異を *rad55* Δ変異株に導入しても孢子生存率は回復しなかった。しかし、DSB の起こらない *rad50* 変異を *spo13* 変異と同時に *rad55* Δ変異株に導入すると孢子生存率は回復し、*RAD55* は相同組換え機構の DSB の修復に働くことが示された。一方、野性株を減数分裂に導入すると、極めて早い時期に *RAD55* の転写が誘導されるが、mRNA の発現量は同じエピスタシスグループに属する *RAD50*、*RAD52* の mRNA 量と比較して、極めて少ないことを見つけた。

次に、出芽酵母から Rad55 と Rad57 タンパク質が安定な複合体として精製できることを示した。そして、大腸菌で GST と融合した Rad55 と Rad57 を発現・精製し、両タンパク質とも単鎖および二重鎖 DNA に対して NTP, dNTP 非依存性の結合活性を持つことを見つけた。さらに、精製した GST Rad57 の DNA 結合能を詳細に調べ、Rad57 が 3' 突出末端をもつ二重鎖 DNA に対して親和性が高いことを明らかにした。そして、これが GST Rad57 が DNA の 3' 末端に結合するためであることを、3' 突出末端をもつ二重鎖 DNA と GST Rad57 複合体の電子顕微鏡観察から示している。また、Rad55 タンパク質の欠失変異の解析から C 末側が DNA 結合領域であり、N 末に GST を融合した Rad55 が *rad55* Δ変異株の MMS 感受性を相補できなかったため、N 末側が他のタンパク質との結合領域であると予想している。

これらのことから、Rad55-57 複合体は、ランダムに DNA に結合するのではなく、減数分裂期組換えに見られるような 3' OH 末端が突出した単鎖 DNA を認識して結合すると考察している。さらに、結合した Rad55-Rad57 が Rad51 の単鎖 DNA への結合の起点となり、DNA の一方の末端から効率良く Rad51 presynaptic filament が形成されるというモデルを提案している。

以上のように渡辺君は多数の実験を注意深く行い、減数分裂期における Rad55、Rad57 の機能について新しい知見を与えたことは、この分野への寄与も大きく、学位授与の要件を満たすものと判断した。