

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

# 博士論文概要

## 論文題目

相同組換え酵素 RAD51 の  
減数分裂期特異的な機能に関する  
生化学的研究

Biochemical studies on the meiosis-specific  
function of RAD51 recombinase

申請者

小林	航
Wataru	KOBAYASHI

電気・情報生命専攻 構造生物学研究

2015年11月

細胞は生物の基本単位であり、その遺伝情報はゲノム DNA に記されている。DNA の遺伝情報は体細胞分裂によって、親細胞から娘細胞に受け継がれ、生殖細胞を通じて世代から世代へと伝えられる。多くの真核生物は、父親由来と母親由来の染色体を1セットずつ有し、合計2セットの染色体をもつ二倍体細胞である。一方、真核生物の配偶子は一倍体の細胞である。生物は減数分裂と呼ばれる特殊な形式の細胞分裂を行うことで、一倍体の配偶子を形成する。形成された父親由来および母親由来の配偶子が融合することで、二倍体の接合子となり、互いの遺伝情報が混ざった新たな個体が生まれる。このように、生物は有性生殖によって二個体のゲノム DNA を混ぜ合わせ、その多様性を獲得してきた。

相同組換えは、体細胞と減数分裂期の細胞の両方で機能しており、生物に必須の機構である。体細胞における相同組換えは、電離放射線や DNA 複製時のエラー等によって生じた DNA 二重鎖切断損傷を修復する機構として働く。一方、減数分裂期の細胞において、相同組換えは相同染色体の均等分配と、ゲノム DNA 配列の変動に重要な役割を果たす。このように、相同組換えは生物のゲノム DNA の安定維持とその変動による生物進化の推進という、相反する役割を担う。減数分裂期組換えは、染色体上の特定の位置に DNA 二重鎖切断が導入されることで開始される。DNA 二重鎖切断後、形成された単鎖 DNA と相同な配列を有する二重鎖 DNA が対合し、ヘテロ二重鎖 DNA が形成される。この一連の過程を相同的対合反応という。相同的反応後、形成されたヘテロ二重鎖 DNA 領域は DNA 鎖交換反応によって拡大される。続いて、DNA の修復合成が起こり、相同組換え反応の中間体である Holliday 構造が形成される。その後、Holliday 構造が解離することでキアズマが形成される。減数分裂期組換えによって形成されるキアズマは、物理的に相同染色体を連結し、正確な染色体分配に重要な役割を果たす。

相同組換えの中核である、相同的対合反応はバクテリア *RecA* のホモログの *RAD51* および *DMC1* によって触媒される。*RAD51* および *DMC1* は真核生物における相同組換えの中心的酵素であり、酵母、植物から哺乳類などに広く進化的に保存されている。*RAD51* および *DMC1* は両者共に、DNA 結合活性を有し、DNA 依存的な ATP 加水分解活性を示す。また、両者は ATP 存在下で相同的対合反応および相同鎖交換反応を触媒することがわかっている。このように *RAD51* および *DMC1* の生化学的性質は酷似している。興味深いことに、*RAD51* は体細胞および減数分裂期の細胞で働くのに対して、*DMC1* は減数分裂期特異的に発現し、機能することがわかっている。そのため、減数分裂期組換えは *RAD51* と *DMC1* の両者が協調して働くと考えられている。遺伝学的解析から、*DMC1* は減数分裂期組換えにおけるキアズマ形成に必須の因子であり、その中心的な役割を果たすことが明らかになっている。しかし、減数分裂期組換えにおける *RAD51* の役割と機能については未だ不明瞭な点が多い。近年、シロイヌナズナにおいて *rad51* 遺伝子欠損株に、*RAD51* の C 末端に GFP が付加された融合タンパク質（以下、*RAD51*-GFP

と表記)を発現させると、DNA二重鎖切断損傷を誘発する薬剤であるマイトマイシンCに対して高感受性を示すのに対し、減数分裂期における交叉組換え体の形成効率は野生型と同程度であることが示された。このことは、RAD51は相同的対合活性とは異なる、減数分裂期特異的な機能を有することを示唆している。

本研究では、減数分裂期組換えの分子機構を理解することを目的とし、RAD51の減数分裂期特異的な機能に着目した。RAD51-GFPを発現させたシロイヌナズナの減数分裂期組換えは野生型と同様に進行するという報告から、RAD51-GFPは減数分裂期特異的な機能を解明する上で有用な変異体であると考えた。そこで、本研究ではその生化学的解析を行うことでRAD51の減数分裂期特異的な機能を明らかにすることを試みた。本研究により、RAD51-GFPは相同的対合活性が著しく低下した変異体であることを示した。さらに、相同対合活性が低下したRAD51-GFPは、DMC1依存的な相同的対合反応を促進することを明らかにした。また、DMC1依存的な相同的対合反応を促進するというRAD51の補助的機能は、イネとヒトにおいて保存されていることを示した。

本論文は、四章で構成されており、各章の概要を以下に述べる。

第一章では、これまでに明らかになっている減数分裂期組換えの機構の概要、及びRAD51とDMC1の先行研究における知見を解説する。さらにこれらの背景に基づいて、本研究の目的と位置づけ、意義を示す。

第二章においては、本研究で行った実験方法について述べる。リコンビナントタンパク質の精製方法やDNAの調製方法、さらに生化学的解析手法について示す。

第三章では、RAD51-GFPの生化学的解析を行った結果を示す。植物のRAD51代表として、イネ (*Oryza sativa* subsp. *Japonica*) 由来のRAD51に着目し、イネRAD51A1、RAD51A2、RAD51A1-GFP、RAD51A2-GFP、およびDMC1Aをリコンビナントタンパク質として精製した。まず、GFPがイネRAD51による相同的対合反応に及ぼす影響を生化学的手法を用いて解析した。植物および哺乳類のRAD51-GFPを発現させた体細胞はマイトマイシンCや電離放射線に対して高感受性を示す。このことは、体細胞における相同組換えを介したDNA損傷修復において、RAD51-GFPが相同組換え因子として機能しないことを示唆した。そこで、イネRAD51A1-GFPおよびイネRAD51A2-GFP依存的な相同的対合反応を解析した。その結果、イネRAD51-GFPの相同的対合活性は、野生型RAD51と比較して著しく低下していることが明らかになった。RAD51-GFPの相同的対合活性が野生型と比較して低下している理由を明らかにするために、DNA結合活性およびATP加水分解活性の解析を行ったところ、RAD51-GFPは野生型と同程度の活性を有することがわかった。次に、相同的対合反応において必須の過程である、RAD51-単鎖DNA-二重鎖DNAの三者複合体形成能を野生型と比較した。その結果、イネRAD51-GFPの三者複合体の形成能は、野生型RAD51と比較して著しく低下して

いることがわかった。以上の結果から、RAD51のC末端に付加されたGFPは、三者複合体形成の過程を阻害することを示した。減数分裂期組換えではRAD51に加え、DMC1が発現する。さらに、出芽酵母のRad51は、Dmc1依存的な相同的対合反応を活性化することが示されており、減数分裂期組換えにおいてRad51がDmc1の活性化因子として機能することが示唆されている。そこで、組換え活性が顕著に低下したRAD51-GFPを用いて、RAD51のDMC1の活性化因子としての機能を明らかにすることを試みた。そして、イネRAD51-GFPがイネDMC1A依存的な相同的対合反応を促進することを明らかにした。これらの結果から、DMC1依存的な相同組換え反応の促進には、RAD51の組換え活性は必須でないことが明らかになった。さらに、同様の活性がヒトRAD51においても保存されていることがわかった。

第四章では、これまでの知見と本研究で得られた知見を総括し、減数分裂期におけるRAD51の役割について考察した。また、これまでに明らかになっている出芽酵母Rad51の立体構造を元に、RAD51-GFPのモデル構造を構築した。このモデル構造を元に、RAD51のC末端に付加されたGFPが相同的対合反応を阻害する原因について考察した。

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 小林 航 印

(2016年 2月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○<u>Wataru Kobayashi</u>, Sekine Satoshi, Shinichi Machida, Hitoshi Kurumizaka. Green fluorescent protein fused to the C terminus of RAD51 specifically interferes with secondary DNA binding by the RAD51-ssDNA complex. <i>Genes Genet Syst.</i> <b>89</b>, pp169-179. 2014.</p>
講演	<p>学会発表</p> <p>・国際学会発表</p> <p>○<u>Wataru Kobayashi</u>, Motoki Takaku, Mutsumi Teramoto, Shinichi Machida, Hiroaki Tachiwana, Noriko Hosoya, Kiyoshi Miyagawa, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa, and Hitoshi Kurumizaka Biochemical analyses of RAD51 and DMC1 in the synaptonemal complex International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 2015, August</p> <p>○<u>Wataru Kobayashi</u>, Motoki Takaku, Shinichi Machida, Hiroaki Tachiwana, Yasuyuki Ohkawa, Hitoshi Kurumizaka Biochemical analysis of DMC1-mediated homologous pairing in chromatin The 9th 3R Symposium, 2014, November</p> <p>○<u>Wataru Kobayashi</u>, Shinichi Machida, and Hitoshi Kurumizaka FUNCTIONAL ANALYSES OF RAD51 AND DMC1 RECOMBINASES IN RICE Plant Genome Stability and Change 2014, July</p> <p>・国内学会発表</p> <p>○小林航、高久誉大、寺本睦美、町田晋一、立和名博昭、細谷紀子、宮川清、前原一満、大川恭行、胡桃坂仁志 シナプトネマ複合体による減数分裂期相同組換えの制御機構 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会合同大会 2015年12月</p> <p>○小林航、町田晋一、寺本睦美、細谷紀子、宮川清、胡桃坂仁志 シナプトネマ複合体構成因子 SYCP3 の減数分裂期組換えにおける機能解析 第23回DNA複製・組換え・修復ワークショップ、2015年10月</p>

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>○小林航、高久誉大、町田晋一、立和名博昭、大川恭行、胡桃坂仁志 クロマチンにおける減数分裂期特異的相同組換え酵素 DMC1 の機能解析 第 87 回日本生化学会大会、 2014 年 9 月</p> <p>○小林航、高久誉大、町田晋一、松本亮平、立和名博昭、胡桃坂仁志 クロマチンでの相同組換え反応における DMC1 の機能 第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2013 年 11 月</p> <p>○小林航、高久誉大、町田晋一、両角佑一、松本亮平、立和名博昭、胡桃坂仁志 減数分裂特異的な相同組換え酵素 DMC1 のクロマチンにおける反応機構 第 86 回日本生化学会大会、 2013 年 9 月</p>
受賞	<p>若手優秀発表賞 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年 12 月</p>
その他	<p>Clemens Uanschoua, Arnaud Ronceretb, Mona Von Hardera, Arnaud De Muyt, Daniel Vezonb, Lucie Pereira, Liudmila Chelysheva, <u>Wataru Kobayashi</u>, Hitoshi Kurumizaka, Peter Schlögelhofer and Mathilde Grelon Sufficient amounts of functional HOP2/MND1 complex promote interhomolog DNA repair but are dispensable for intersister DNA repair during meiosis in Arabidopsis. <i>Plant Cell</i>. <b>25</b>, pp4924-4940. 2013.</p> <p>Shinichi Machida, Motoki Takaku, Masae Ikura, Jiying Sun, Hidekazu Suzuki, <u>Wataru Kobayashi</u>, Aiko Kinomura, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, Yasunori Horikoshi, Atsuhiko Fukuto, Ryo Matsuda, Kiyoe Ura, Satoshi Tashiro, Tsuyoshi Ikura and Hitoshi Kurumizaka. Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1. <i>Scientific Reports</i>, <b>4</b>, Article number:4863, 2014.</p>