

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

2016年 2月

小林 航

Wataru KOBAYASHI

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

2016年 2月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科  
電気・情報生命専攻 構造生物学研究

小林 航

Wataru KOBAYASHI

目次		
略語一覧		5
<b>第 1 章 序論</b>		
1-1	はじめに	6
1-2	減数分裂	6
1-3	減数分裂期組換え	9
1-4	相同組換え酵素 RAD51	12
1-5	減数分裂期特異的相同組換え酵素 DMC1	15
1-6	減数分裂組換えにおける RAD51 の機能	18
1-7	本研究	19
<b>第 2 章 実験方法</b>		
2-1.	リコンビナントタンパク質の精製	22
2-1-1.	イネ RAD51A1 および RAD51A2 の精製	22
2-1-2.	イネ RAD51A1-GFP および RAD51A2-GFP の精製	23
2-1-3.	イネ DMC1A の精製	23
2-1-4.	ヒト RAD51 の精製	24
2-1-5.	ヒト RAD51-GFP の精製	25
2-1-6.	ヒト DMC1 の精製	26
2-2.	DNA 基質	27
2-2-1.	$\phi$ X174DNA	27
2-2-2.	環状二重鎖 DNA	27
2-2-3.	オリゴ DNA	27
2-3.	D-loop formation アッセイ	28
2-4.	ゲルシフトアッセイ	29
2-5.	ATPase アッセイ	30
2-6.	三者複合体形成アッセイ	30
<b>第 3 章 結果</b>		
3-1.	イネ相同組換えタンパク質の精製	32
3-2.	C 末端に付加された GFP は RAD51 の相同的対合反応を阻害する	32

3-3.	イネ RAD51-GFP は DNA 結合活性を有する	34
3-4.	イネ RAD51-GFP は野生型と同程度の ATP 加水分解活性を有する	34
3-5.	C 末端に付加された GFP は RAD51-単鎖 DNA-二重鎖 DNA の三者複合体形成を阻害する	37
3-6.	イネ RAD51-GFP はイネ DMC1A の相同的対合反応を促進する	40
3-7.	RAD51 が有する DMC1 補助因子としての機能はイネからヒトに至るまで保存されている	42
<b>第 4 章</b>	<b>総合討論</b>	
4-1.	RAD51-GFP が相同組換え修復に与える影響	47
4-2.	減数分裂期組換えにおける RAD51 の機能	52
4-3.	今後の展望	55
	引用文献	57
	謝辞	69
	研究業績	

## 略語一覽

ATP	:	adenosine 5'-triphosphate
bp	:	base pair
BSA	:	bovine serum albumin
CBB	:	coomassie brilliant blue
D-loop	:	displacement loop
DNA	:	2'-deoxyribonucleic acid
dsDNA	:	double-stranded DNA
EDTA	:	ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	:	ethidium bromide
GFP	:	green fluorescent protein
IPTG	:	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
LB	:	lysogeny broth (Luria-Bertani)
MMC	:	mytomycin C
Ni-NTA	:	nickel-nitrilotriacetic acid
OD	:	optical density
PAGE	:	polyacrylamide gel electrophoresis
rDNA	:	ribosomal DNA
SDS	:	sodium dodecyl sulfate
ssDNA	:	single-stranded DNA
TAE	:	Tris-acetate-EDTA
TBE	:	Tris-borate-EDTA
Tris	:	Tris(hydroxymethyl)aminomethane

## 第 1 章 序論

### 1-1 はじめに

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。有性生殖を行う生物の細胞は、次世代へ遺伝情報を伝える役割を果たす生殖細胞と、体を形成する体細胞に大別される。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。

多くの生物は、父親由来および母親由来の二組の染色体をもつ二倍体細胞である。一方、生殖細胞から生み出される配偶子（動物では卵、および精子）は一倍体の細胞である。生物は、一倍体の配偶子を形成するために、減数分裂と呼ばれる特殊な形式の細胞分裂を行う。そして、父親由来および母親由来の配偶子が融合することにより二倍体の接合子となり、互いの遺伝情報が混ぜ合わさ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。

### 1-2 減数分裂

上述のように、一倍体の配偶子を形成するためには、二倍体の細胞から一倍体の細胞をつくりださなければならない。そのため、生物は減数分裂によって染色体数を半減させることで、一倍体の配偶子を形成する。

二倍体細胞には、父親由来と母親由来の DNA 配列の似た染色体が一对ずつ存在する。この一对の染色体は、同一ではないが、その DNA 配列が似ていることから相同染色体とよばれる。また、相同染色体からそれぞれ複製された二本の染色体を姉妹染色分体とよぶ。体細胞分裂では、相同染色体が複製された後に、姉妹染色分体が娘細胞へと均等

に分配されるため、同一の DNA 配列をもつ二つの娘細胞が生じる (図 1 A)。一方、減数分裂では、DNA 複製後、二回の連続した細胞分裂が行われることで、一倍体の配偶子が形成される (図 1 B)。この二回の連続した細胞分裂は、第一減数分裂および第二減数分裂と呼ばれる。第一減数分裂期では、倍化した相同染色体間に相同組換えによってキアズマが形成された後、一对の相同染色体が娘細胞に別々に分配される。この時、父方由来と母方由来の相同染色体が娘細胞のどちらに分配されるかはランダムであり、原理的な組み合わせは  $2^n$  ( $n$  は染色体数) となる。その後、第二減数分裂期において姉妹染色分体が均等に分配され、一倍体の配偶子が形成される (図 1 B)。

減数第一分裂期は染色体の構造変化に伴って、レプトテン期、サイゴテン期、パキテン期、ディプロテン期、ディアキネシス期の五つの段階に分けられている (Fraune *et al.*, 2012)。レプトテン期では、染色体が凝集し紐状の構造が観察される。サイゴテン期では相同染色体同士が対合し、パキテン期において減数分裂期特異的な染色体構造体であるシナプトネマ構造が形成され、相同染色体同士が接着する。ディプロテン期には、相同染色体間が交叉するキアズマが観察され、ディアキネシス期で染色体が赤道面に移動する。第二減数分裂期は、体細胞分裂と同様に数時間以内に進行するが、減数第一分裂期の期間は精母細胞と卵母細胞で異なることが知られている。減数分裂期相同組換え (以降、減数分裂期組換えとする) は、レプトテン期からパキテン期において行われると考えられている。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、正確な染色体分離に重要な役割を果たす (Petronczki *et al.*, 2003; Neale & Keeney, 2006)。キアズマの形成不全は、染色体の不分離を引き起こし、染色体分配異常に起因する不妊症、およびダウン症の原因となる (Pittman *et al.*, 1998)。また、キアズマ形成による相同染色体の乗換えによって、父方由来と母方由来の遺伝情報が部分的に交

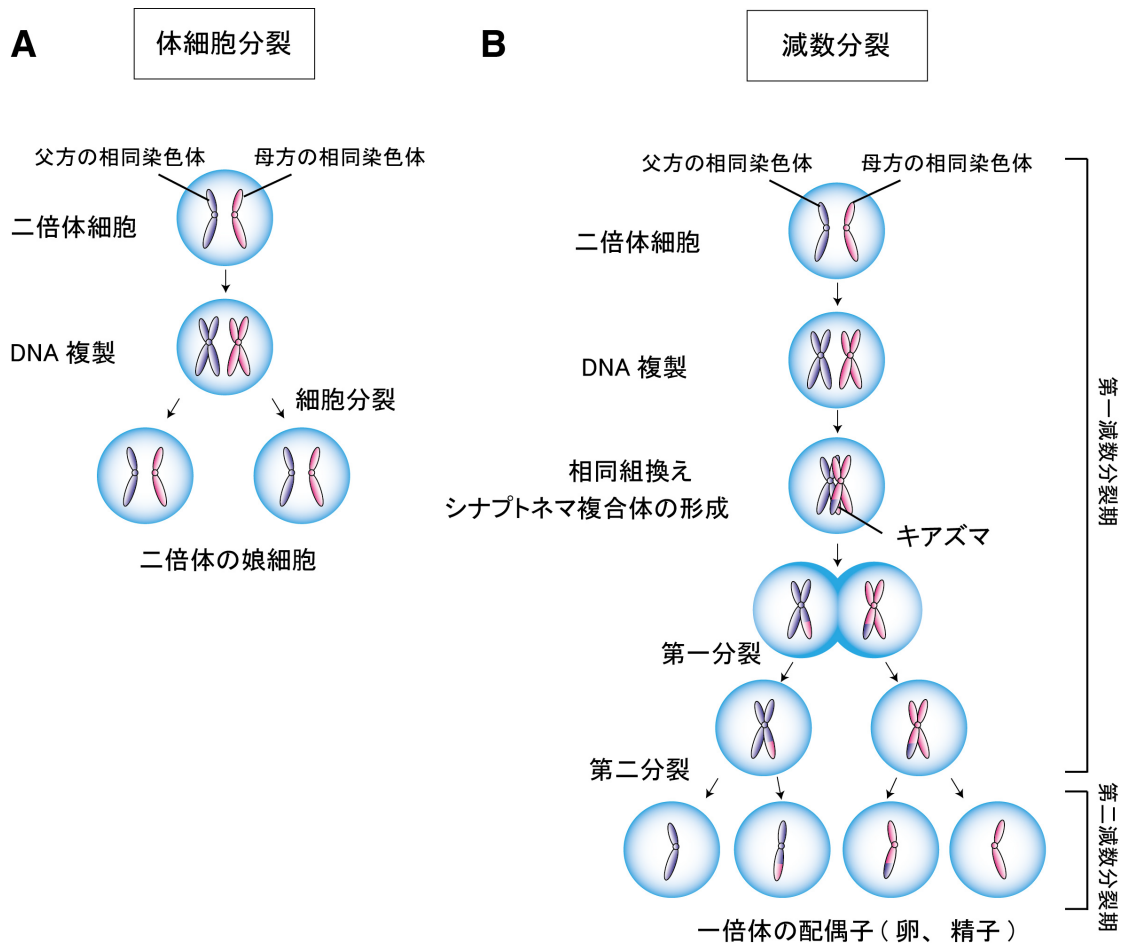


図1 体細胞および減数分裂の模式図

(Molecular Biology of the Gene FIFTH EDITION を参照)

- (A) 体細胞分裂では、DNA複製後、父方と母方の染色体のそれぞれ1対ずつが娘細胞に均等に分配される。そのため、親細胞の遺伝情報を引き継いだ二倍体の娘細胞が二つ生じる。
- (B) 減数分裂では、第一減数分裂、第二減数分裂の二回連続した細胞分裂が行われる。そのため、一つの二倍体細胞から四つの一倍体細胞が生じる。第一減数分裂期では、相同染色体間が対合した後、相同組換えが行われる。相同組換えによって形成されるキアズマは、第一減数分裂における正確な染色体分配に必須である。シナプトネマ複合体は減数分裂期特異的な染色体構造であり、相同染色体間を接着させる役割をもつ。



換される。このように、減数分裂期組換えはゲノム DNA 配列の変動をもたらすことから、生物の多様性を生む要因であると考えられている。

### 1-3 減数分裂期組換え

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経路として働く (Symington, 2002; West, 2003; Sung & Klein, 2006)。一方で、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 配列の変動において重要な役割を果たす (Petronczki *et al.*, 2003; Neale & Keeney, 2006)。体細胞における相同組換え修復は、S 期で複製された姉妹染色体を利用し、組換えを行う。そのため、相同組換え修復は細胞周期に依存し、主に S 期から G2 期にかけて行われる (Branzei & Foiani, 2008)。一方で、減数分裂期組換えでは、姉妹染色体間よりも優先的に相同染色体間で組換えが行われることが報告されている (Roeder, 1997; Schwacha & Kleckner, 1997)。

減数分裂期組換えの反応機構を以下に示す (図 2)。減数分裂期組換えは、SPO11 によって DNA 二重鎖切断が導入されることで開始される (図 2 A)。SPO11 は古細菌トポイソメラーゼ VI のホモログであり、活性中心部位であるチロシン残基のエステル転移反応によって DNA 鎖を切断する (Keeney *et al.*, 1997; Keeney, 2008)。また、SPO11 は DNA 切断後に DNA と共有結合した状態で残存する (Keeney *et al.*, 1997; Keeney, 2008)。次に、エキソヌクレアーゼによって DNA の 5' 端が消化され、3' 端突出型の単鎖 DNA 領域が数キロベースにわたって形成される (Mimitou & Symington, 2008; Zhou *et al.*, 2014; 図 2 B)。その際に、DNA に共有結合している SPO11 は、DNA とともに二重鎖切断部位か

ら遊離する (Keeney *et al.*, 1997; Keeney, 2008)。その後、形成された単鎖 DNA 領域と相同な塩基配列を有する無傷な二重鎖 DNA が検索され、その相同な領域間において単鎖 DNA と二重鎖 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 (図 2 C)。相同的対合反応後、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 (Symington, 2002; West, 2003; San Filippo *et al.*, 2008; Renkawitz *et al.*, 2014; 図 2 D)。次に、DNA ポリメラーゼがヘテロ二重鎖 DNA を形成した単鎖 DNA の 3'端を起点とし、DNA 合成を行うことで損傷を受けた DNA 領域が復元される (図 2 E)。DNA 合成後、合成された DNA 末端と切断されたもう一方の末端が結合することで Holliday 構造が形成される (図 2 H)。相同組換えは、Holliday 構造を介さない SDSA (Synthesis-dependent strand annealing) 経路、または Holliday 構造を介した修復経路によって修復が完了すると考えられている。SDSA 経路では、単鎖 DNA 由来の 3'端を起点として新たに合成された DNA 鎖が DNA ヘリケースによって解離し、切断されたもう一方の相補的な単鎖 DNA とアニーリングし、DNA 合成が行われることで修復が完了する (図 2 F)。そのため、SDSA 経路では非交叉型組換え体 (遺伝子変換型) のみが生じる (Nassif *et al.*, 1994; Allers *et al.*, 2001; 図 2 G)。一方で、Holliday 構造を介した修復経路では、切断されたもう一方の単鎖 DNA が、ヘテロ二重鎖形成によって置き換えられた DNA ループ (Displacement loop; D-loop) 領域とアニーリングし、連結することで、Double Holliday 構造が形成される (Szostak *et al.*, 1983; 図 2 H)。その後、Double Holliday 構造は Holliday 構造特異的な働くヌクレアーゼによって解離され、染色体が交叉する交叉型組換え体、または非交叉型組換え体が生じる (図 2 I, J)。交叉組換え体は、第一減数分裂期においてキアズマとして観察される。興味深いことに、減数分裂期組換えでは、相同染色体間での交叉部位が少なくとも一つは生じる機構

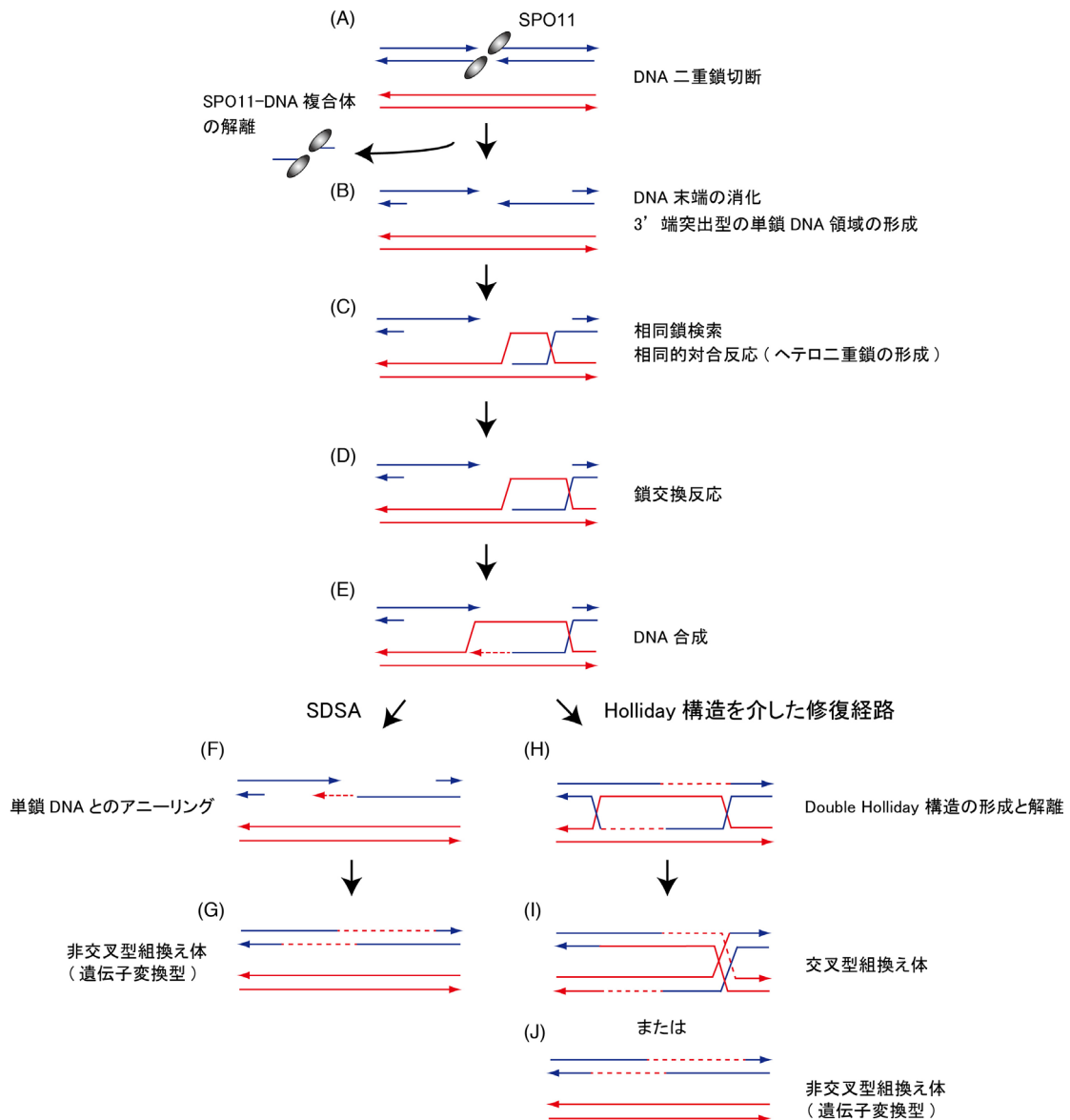


図 2 減数分裂期組換えのモデル

(Neale & Keeney, 2006; Krejci *et al.*, 2012 より改変)

減数分裂期組換えは SPO11 による 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、エキソヌクレアーゼによって DNA 末端が消化されることで、3' 端突出型の単鎖 DNA 領域が形成される。その後、形成された単鎖 DNA 領域と相同な領域を無傷な二重鎖 DNA から検索され、ヘテロ二重鎖 DNA が形成される。さらに、DNA ポリメラーゼが二重鎖 DNA に侵入した単鎖 DNA の 3' 端をプライマーとして、DNA 合成することで、失われた遺伝情報を復元する。SDSA 経路では、新たに合成された単鎖 DNA がヘリケースによって解離し、アニーリングすることで非交叉組換え体が生じる。Holliday 構造を介した修復経路では Double Holliday 構造が形成された後、その解離の仕方によって、非交叉組換え体もしくは交叉組換え体が生じる。

(Crossover assurance)と、複数の交叉部位の近接を防ぐ機構が (Crossover interference)が働くことがわかっている (Bishop & Zickler, 2004; Shinohara *et al.*, 2008)。また、相同染色体での交叉部位の数は、DNA 二重鎖切断の数に依存せず、一定数に保たれることも報告された (Crossover homeostasis) (Martini *et al.*, 2006; Cole *et al.*, 2012)。このように、減数分裂期組換えにおける交叉組換え体の形成は厳密に制御されている。しかし、その詳細なメカニズムは不明である。

相同組換えの中核を担う相同的対合反応は、バクテリアでは RecA によって触媒される。RAD51 および DMC1 はバクテリア RecA の機能的ホモログとして同定された、真核生物における相同組換えの中心的な酵素である (Aboussekhra *et al.*, 1992; Basile *et al.*, 1992; Bishop *et al.*, 1992; Shinohara *et al.*, 1992, 1993; Habu *et al.*, 1996)。RAD51 は体細胞および減数分裂期の細胞で発現するのに対して、DMC1 は減数分裂期のみにおいて発現し、機能する (Shinohara *et al.*, 1992, 1993; Bishop *et al.*, 1992; Habu *et al.*, 1996)。

#### 1-4 相同組換え酵素 RAD51

RAD51 は体細胞における相同組換え修復で機能する中心的な酵素であり、酵母から植物、哺乳類に至るまで広く進化的に保存されている (Aboussekhra *et al.*, 1992; Basile *et al.*, 1992; Shinohara *et al.*, 1992, 1993)。マウスにおいて *RAD51* 遺伝子を欠損させると胎生致死となることがわかっている (Lim & Hasty, 1996; Tsuzuki *et al.*, 1996)。さらに、ニワトリ由来の DT40 細胞において *RAD51* 遺伝子を欠損させると、DNA 損傷が蓄積し細胞死が引き起こされることが報告されている (Sonoda *et al.*, 1998)。これらのことから、RAD51 は生物の生存に不可欠なタンパク質である。

生化学的解析から、RAD51 は単鎖 DNA および二重鎖 DNA との結合活性を有し、

DNA 依存的な ATP 加水分解活性を示すことがわかっている (Ogawa *et al.*, 1993; Sung, 1994; Benson *et al.*, 1994)。また、RAD51 は ATP 依存的に相同的対合反応及び相同鎖交換反応を触媒することが明らかになっている (Sung, 1994; Baumann *et al.*, 1996; Maeshima *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 1997)。さらに、電子顕微鏡および X 線結晶構造解析から、RAD51 は右巻きのフィラメント構造を形成することが報告されている (Ogawa *et al.*, 1993; Benson *et al.*, 1994; Sung *et al.*, 1994; Conway *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2010)。興味深いことに、RAD51 フィラメントのらせんのピッチは ATP の有無で変化し、ATP 存在下では ATP 非存在下と比較してピッチが長いことがわかっている。また、ATP 存在下では、RAD51 のフィラメント構造に結合した DNA は B 型 DNA と比較して、約 1.5 倍に引き伸ばされていることがわかっている (Ogawa *et al.*, 1993)。このことから、DNA が引き伸ばされることが、相同的対合反応において重要な役割を果たすことが考えられているが、その詳細な分子機構は未だ不明である。

相同的対合反応過程のモデルを図 3 に示す。RecA、RAD51 および DMC1 を含む相同組換えタンパク質は、ATP 存在下で単鎖 DNA に結合 (Primary DNA binding) し、右巻きのフィラメント構造を形成する (図 3 B)。その後、相同組換えタンパク質-単鎖 DNA 複合体は二重鎖 DNA に結合 (Secondary DNA binding) し、相同組換えタンパク質-単鎖 DNA-二重鎖 DNA の三者複合体を形成する (図 3 C)。この時、二重鎖 DNA が結合する部位は、単鎖 DNA が結合している部位と異なると考えられている (Kurumizaka *et al.*, 1996, 1999; Renkawitz *et al.*, 2014)。この三者複合体の中で相同鎖検索が行われ、相同な領域が見つかる則ち相同的対合反応によってヘテロ二重鎖が形成され、置き換えられた一本鎖 DNA が解離する (図 3 D)。RecA-DNA 複合体の X 線結晶構造解析から、RecA は L1 ループおよび L2 ループとよばれる 2 つのループを介して DNA と結合することが明

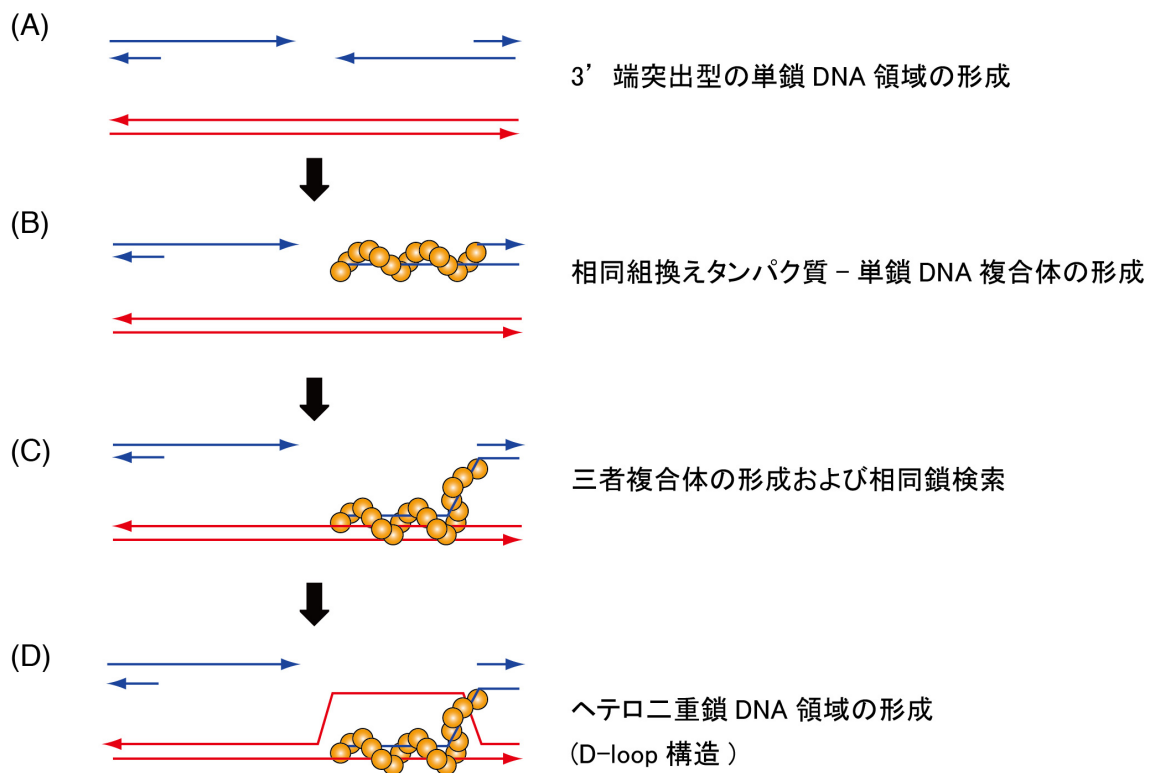


図 3 相同的対合反応過程の模式図

(引場樹里, 2009 より改変)

- (A) エキソヌクレアーゼによって 3' 端突出型の単鎖 DNA 領域が形成される。
- (B) 相同組換えタンパク質- 単鎖 DNA 複合体の形成。RecA、Rad51、および DMC1 を含む相同組換えタンパク質は、ATP 存在下で右巻きのフィラメント構造を形成し、活性型となる。
- (C) 相同組換えタンパク質- 単鎖 DNA 複合体は、鋳型の二重鎖 DNA に結合し、三者複合体を形成する。三者複合体は単鎖 DNA と相同な DNA 配列を鋳型鎖から探し出す、相同鎖検索の中間体である。
- (D) 相同な領域が見つかり、ヘテロ二重鎖 DNA 領域が形成される。このとき、置き換えられた一方の DNA 鎖が分離する。この構造を D-loop 構造とよぶ。

らかになった (Chen *et al.*, 2008)。この DNA 結合ループは RAD51 においても保存されている (Matsuo *et al.*, 2006; Reymer *et al.*, 2009)。相同的対合反応は、単鎖 DNA と二重鎖 DNA の両方が DNA 結合ループに結合することで、触媒されると考えられている。そのため、相同組換えタンパク質-単鎖 DNA 複合体に結合した二重鎖 DNA は、フィラメントの内側に導かれる必要がある。相同組換えタンパク質-単鎖 DNA 複合体に二重鎖 DNA が結合する部位 (以降、secondary DNA binding site と称する) は RecA において同定され、C 末端ドメインが二重鎖 DNA との結合に重要であることが示された (Kurumizaka *et al.*, 1996, 1999)。この C 末端ドメインは、フィラメントの外側に結合した DNA を内側の DNA 結合ループへと導くゲートウェイであると考えられている (Kurumizaka *et al.*, 1996, 1999)。一方で RAD51 では、N 末端ドメインが RecA の C 末端ドメインと同様の機能を持つことが考えられている (Aihara *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2001; Galkin *et al.*, 2006)。近年、出芽酵母 Rad51 (出芽酵母由来は Rad51 と表記) の変異体解析から、188 番目のアルギニン残基、361 番目のリジン残基、371 番目のリジン残基が、Rad51 の secondary DNA binding に重要なアミノ酸残基として特定された (Cloud *et al.*, 2012)。実際に、これらの 3 つの塩基性のアミノ酸残基をアラニンに置換した Rad51 変異体 (以下、Rad51-II3A 変異体と表記) は、単鎖 DNA に結合し、フィラメント構造を形成するが、三者複合体形成能および相同的対合活性は欠損していることが明らかになっている (Cloud *et al.*, 2012)。このように、RAD51 が相同的対合反応を触媒するために重要な DNA 結合部位などが明らかになりつつあるが、相同的対合反応の詳細な分子機構は依然として不明瞭である。

## 1-5 減数分裂期特異的相同組換え酵素 DMC1

DMC1 は RAD51 同様にバクテリア RecA のホモログとして同定されたが、RAD51 は体細胞および減数分裂期の細胞の両方で発現するのに対して、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 (Bishop *et al.*, 1992; Habu *et al.*, 1996)。DMC1 遺伝子を欠損させたマウスは、RAD51 遺伝子欠損のよう胎生致死にはならないものの、減数分裂期組換え欠損を示し、配偶子形成不全を引き起こし不妊になることが明らかになっている (Pittman *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998)。また、*dmc1* を欠損させた出芽酵母では、DNA 二重鎖切断が蓄積しシナプトネマ複合体の形成不全が引き起こされる (Bishop *et al.*, 1992)。さらに、ヒトの不妊症患者から相同組換え活性が低下した DMC1 の一塩基多型がみつかっており、DMC1 遺伝子多型と不妊症との関連性が指摘されている (Mandon-Pépin *et al.*, 2002; Mandon-Pépin *et al.*, 2008; Hikiba *et al.*, 2008)。

DMC1 は、RAD51 と約 50% のアミノ酸配列の相同性を有しており、RecA や RAD51 同様に、DNA 結合活性を有し、DNA 依存的な ATP 加水分解活性を示すことがわかっている (Li *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 2001; Sehorn *et al.*, 2004)。また、DMC1 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示された (Li *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 2001; Sehorn & Sung, 2004, Sakane *et al.*, 2008)。このように、DMC1 と RAD51 の生化学的な性質は類似しているが、それぞれ異なる会合状態を示すことがわかっている。電子顕微鏡による観察から、DMC1 は 8 量体のリング構造を形成し、そのリング構造が積み重なるように DNA に結合することが明らかになった (Masson *et al.*, 1999; Passy *et al.*, 1999)。また、X 線結晶構造解析による解析からも、DMC1 は 8 量体のリング構造を形成することが示された (Kinebuchi *et al.*, 2004)。この DNA 上で観察される DMC1 のリング構造は RAD51 ではみられないことから、リング構造を形成して DNA に結合することは DMC1 の特徴であるといえる。その一方で、DMC1 は ATP 存在下において、



RAD51 と同様に DNA 上でらせん状のフィラメント構造を形成し、相同的対合反応および鎖交換反応を触媒することも報告された (Sehorn *et al.*, 2004; Burgreev *et al.*, 2005)。そのため、DMC1 のリング構造は ATP と結合することによって、活性化型のフィラメント構造へと変換されることが考えられている (Kagawa & Kurumizaka, 2010)が、DMC1 のリング構造の機能とその意義は明らかになっていない。

上述のように、DMC1 と RAD51 の生化学的な性質は似ているが、DMC1 は減数分裂期特異的に発現することから、RAD51 とは異なる機能を有することが考えられている。出芽酵母における解析から、RAD51 は姉妹染色体間で相同組換えを行うのに対し、DMC1 は姉妹染色体間ではなく、相同染色体間での相同組換えに優位に働くことが明らかになっている (Roeder, 1997; Schwacha & Kleckner, 1997)。このことは、DMC1 は相同染色体間でのキアズマ形成に重要な役割を果たすことを示唆している。また、DMC1 によって形成された D-loop 構造は、RAD51 のそれと比べて DNA ヘリケースによって解離しにくいことが明らかになった (Bugreev *et al.*, 2012)。このことは、DMC1 依存的な相同組換え反応では、非交叉組換え体を生じる SDSA 経路ではなく、Holliday 構造を介した修復経路が選択されることを示唆している (図 2 を参照)。さらに、DMC1 は RAD51 や RecA とは異なり、鎖交換反応によって形成される塩基対間にミスマッチを含んでいても、安定的な塩基対を形成することが明らかになった (Lee *et al.*, 2015)。父方および母方由来の相同染色体の DNA 配列は、ほぼ同一であるものの若干異なる。そのため、このミスマッチ存在下でも鎖交換反応を触媒できるという DMC1 の性質は、相同染色体間での相同組換えに重要であると考えられている。RAD51 と DMC1 の機能差異の解明は、減数分裂期組換えによるキアズマ形成のメカニズムを理解する上で重要である。

## 1-6 減数分裂期組換えにおける RAD51 の機能

減数分裂期の細胞では、RAD51 に加えて、DMC1 も機能する。そのため、減数分裂期組換えでは RAD51 と DMC1 の両者が協調して働くことが考えられている。遺伝学的解析により、DMC1 は減数分裂期組換えに必須であり、中心的な役割を果たすことが明らかになっているが、RAD51 の役割については未だ不明瞭な点が多い。

出芽酵母を用いた解析から、減数分裂期組換えにおいて Rad51 依存的な組換え反応は Hed1、Mek1、Red1 によって抑制されることが報告された (Busygina *et al.*, 2008, 2012; Niu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2014)。Hed1 は Rad51 と直接結合することによって、Rad51 の補助因子である Rad54 との結合を阻害する一方で、Mek1 は Rad54 をリン酸化することで、Rad51 の Rad54 との相互作用を阻害する。また、Red1 は姉妹染色体間における Rad51 依存的な組換えを抑制することがわかっている。興味深いことに、これらの Rad51 依存的な組換え反応の抑制を解除すると、相同染色体間での組換え効率が低下することが明らかになった (Liu *et al.*, 2014)。そのため、Rad51 依存的な組換え反応の抑制は、Dmc1 による優先的な相同染色体間での組換えに重要であることが考えられている。

近年、相同的対合活性が欠損した Rad51 II3-A 変異体を導入した酵母株は、電離放射線に対して高い感受性を示す一方で、減数分裂期組換えにおける相同染色体間の組換え効率は野生型と同程度であることが報告された (Cloud *et al.*, 2012)。このことは、Rad51 の相同的対合活性は減数分裂期組換えには必須でないことを示唆している。また、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 (MMC) 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 (Da Ines *et*

*al.*, 2013)。これらの事実は、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。

## 1-7 本研究

減数分裂期組換えは、相同染色体の正確な分配とゲノム DNA 配列の変動による生物進化の推進に重要な役割を果たしている。減数分裂期組換えの中核である相同的対合反応は、真核生物において RAD51 と DMC1 によって触媒される。減数分裂期には RAD51 に加え、DMC1 が発現することから、両者が協調的に働くことが考えられている。減数分裂期組換えにおいて、DMC1 はその中心的な役割を担うことが知られているが、RAD51 の役割とその機能については明らかになっていない。RAD51 と DMC1 の機能差異の解明は、減数分裂期組換えの分子機構を理解する上で重要である。また、減数分裂期組換えの分子機構の理解は、不妊治療や、農作物の品種改良に向けたゲノム加工技術への応用が期待される。

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ついて着目した。前述のように、Rad51-Il3A 変異体および RAD51-GFP は体細胞における相同組換え修復は阻害するが、減数分裂期組換えには影響を与えないことが示されている (Cloud *et al.*, 2012; Da Ines *et al.*, 2013)。このことは、減数分裂期組換えにおいて、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。しかし、減数分裂期組換えにおいて RAD51 がどのように機能するかについては、その詳細な分子機構は明らかでない。

シロイヌナズナにおいて、*Rad51* 遺伝子欠損株に RAD51-GFP を発現させると、相同組換え修復欠損を示す一方で、減数分裂期組換えによるキアズマの形成効率は野生型と

同程度であること示された (Da Ines *et al.*, 2013)。この事実から、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、本研究ではその生化学的な解析を行うことで RAD51 の減数分裂期特異的な機能を明らかにすること試みた。シロイヌナズナの RAD51 の生化学的解析は、これまでに全く行われておらず不明である。そこで、本研究を行うにあたり、シロイヌナズナ RAD51 と 90% の高い相同性を示すイネ (*Oryza sativa* subsp. *Japonica*) 由来の RAD51 を用いた。イネ RAD51 は RAD51A1、RAD51A2 の非対立性遺伝子が二つ同定されており、その生化学的な性質は胡桃坂研究室の先行研究によって既に明らかになっている (Morozumi *et al.*, 2013)。そのため、RAD51 の減数分裂期特異的な機能を明らかにする上で、イネ RAD51 は有用な実験材料であると判断した。

RAD51 の減数分裂期特異的な機能を解明するために、イネ RAD51-GFP をリコンビナントタンパク質として大腸菌内で発現させ、精製する系を確立した。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な手法を用いて解析した。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いことが明らかになった。減数分裂期には RAD51 に加え、DMC1 が発現しているため、両者が協調的に働くことが予想された。そこで、イネ RAD51-GFP がイネ DMC1 依存的な相同的対合反応に与える影響を解析した。その結果、イネ RAD51 はイネ DMC1 依存的な相同対合反応を著しく促進することがわかった。次に、相同的対合活性が低下したイネ RAD51-GFP が、イネ DMC1 依存的な相同的対合反応に与える影響を解析した。その結果、イネ RAD51-GFP は野生型と同様にイネ DMC1 依存的な相同的対合反応を促進することから、RAD51 の相同的対合活性は DMC1 依存的な相同的対合反応の促進に必須でないことが明らかになった。さらに、ヒト RAD51 を用いて同様の解析を行った結

果、ヒトにおいても同様の活性が保存されていることがわかった。以上のことから、RAD51 は自身で相同的対合反応を触媒できるのに加えて、DMC1 依存的な相同的対合反応を促進する補助因子としての活性を有することが明らかになった。これらの結果を総括し、RAD51 の減数分裂期組換えにおける役割とその機能について考察した。

## 第 2 章 実験方法

### 2-1 リコンビナントタンパク質の精製

#### 2-1-1 イネ RAD51A1 および RAD51A2 の精製

イネ RAD51A1 および RAD51A2 の精製は引用文献 (Morozumi *et al.*, 2013)を参考にした。イネ *RAD51A1* または *RAD51A2* 遺伝子を *NdeI-BamHI* 部位に挿入した、pET-15b ベクター (Novagen)を用いて大腸菌 BLR(DE3)pLysS を形質転換させた。プレート上のコロニーを LB 培地で懸濁しながら回収し、100  $\mu\text{g/ml}$  アンピシリンおよび 35  $\mu\text{g/ml}$  クロラムフェニコールを添加した LB 培地に植菌し、30°C で振盪培養した。OD<sub>600</sub>= 0.4-0.5 まで培養した後、IPTG を最終濃度 1 mM になるように加え、His<sub>6</sub> タグ融合 RAD51A1 または RAD51A2 (以下、His<sub>6</sub>-RAD51A1 または His<sub>6</sub>-RAD51A2 と略)の発現誘導を行った。6,810×g、4°C で 10 分間遠心し、集菌した菌体を A バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 M NaCl, 10 mM EDTA, 10% glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol,)で懸濁し、超音波破碎機を用いて細胞を破碎した。その後、細胞破碎液を 27,216×g、4°C で 20 分間遠心分離した。得られた上清の可溶性画分を 3 ml の cComplete His-Tag Purification Resin (Roche) を混合し、4°C で 1 時間ゆるやかに混合することで、His<sub>6</sub>-RAD51A1 または His<sub>6</sub>-RAD51A2 を cComplete His-Tag Purification Resin へ結合させた。His<sub>6</sub>-RAD51A1 または His<sub>6</sub>-RAD51A2 を結合させた cComplete His-Tag Purification Resin をエコノカラム (Bio-Rad)に充填し、20 mM Imidazole を含む 150 ml の A バッファーで洗浄した後に、20-300 mM imidazole の直線的な濃度勾配にてレジンに結合した目的タンパク質を溶出した。His<sub>6</sub>-RAD51A1 または His<sub>6</sub>-RAD51A2 を含む溶出画分に、タンパク質 1 mg あたり 8 ユニットの Thrombin protease (GE Healthcare Bio-science)を加え、B バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol)に対

して透析を行いながら、His<sub>6</sub> タグを切除した。切除後、C バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 M NaCl, 10 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol) で平衡化した Superdex 200 HiLoad 26/60 (GE Healthcare Bio-science) に His<sub>6</sub> タグを除去したタンパク質溶液を付加した。溶出画分を回収し、D バッファー(20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 400 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol) に透析後、-80°Cで保存した。

#### 2-1-2 イネ RAD51A1-GFP および RAD51A2-GFP の精製

イネ *RAD51A1* または *RAD51A2* 遺伝子が組み込まれた pET-15b ベクターを改変し、RAD51A1-GFP および RAD51A2-GFP の発現ベクターを作製した。イネ *RAD51A1* または *RAD51A2* 遺伝子の終止コドンの代わりに、リンカー配列の Pro-Val-Ala-Thr および *EGFP* 遺伝子を挿入した。RAD51-GFP 遺伝子は pET-15b ベクターの *NdeI-BamHI* 部位に挿入されている。イネ RAD51A1-GFP および RAD51A2-GFP の精製は野生型と同様の方法で行った。

#### 2-1-3 イネ DMC1A の精製

イネ DMC1A の精製は引用文献 (Sakane *et al.*, 2008)を参考にした。イネ *DMC1A* 遺伝子を *NdeI-BamHI* 部位に挿入した、pET-15b ベクターを用いて大腸菌 BL21(DE3) *condon plus RIL* を形質転換させた。プレート上のコロニーを LB 培地で懸濁しながら回収し、100  $\mu$ g/ml アンピシリンおよび 35  $\mu$ g/ml クロラムフェニコールを添加した LB 培地 5 L に植菌し、30°Cで OD<sub>600</sub>= 0.4 になるまで培養した。その後、IPTG を最終濃度 1 mM になるように加え、His<sub>6</sub> タグ融合イネ DMC1A (以下、His<sub>6</sub>-DMC1A と略)の発現誘導を

行った 30℃で一晩培養した。6,810×g、4℃で 10 分間遠心し、集菌した菌体を、40 ml の A バッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole, 10% glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol,)で懸濁し、超音波破碎機を用いて細胞を破碎した。細胞破碎液を 27,216×g、4℃で 20 分間遠心分離し、得られた上清と 3ml の Ni-NTA アガロースレジンを (QIAGEN) を混合し、4℃で 1 時間ゆるやかに混合することで、His<sub>6</sub>-DMC1A を Ni-NTA アガロースレジんに結合させた。その後、Ni-NTA アガロースビーズをエコノカラム (Bio-Rad)に充填し、150 ml の B バッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole, 10% glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol,) で洗浄した後に、10–500 mM imidazole の直線的な濃度勾配にてレジんに結合した目的タンパク質を溶出した。His<sub>6</sub>-DMC1A を含む溶出画分に、タンパク質 1 mg あたり 2 ユニットの Thrombin Protease (GE Healthcare Bio-science)を加え、C バッファー (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.2 M KCl, 0.25 mM EDTA, 10% glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol) に対して一晩透析を行ないながら、His<sub>6</sub> タグを DMC1A から切除した。Heparin Sepharose (GE Healthcare) 4ml をエコノカラムに充填し、ペリスタポンプを用いてタンパク質溶液をエコノカラムに負荷した。60 ml の C バッファーで洗浄後、0.2–1.0 M KCl の直線的な濃度勾配により DMC1 A を溶出した。溶出画分を SDS-PAGE により確認し、最終精製物として D バッファー (20 mM HEPES-KOH (pH7.5), 0.5 M KCl, 0.25 mM EDTA, 10% glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol) に透析し、-80 °Cで保存した。

#### 2-1-4 ヒト RAD51 の精製

ヒト RAD51 の精製は引用文献 (Ishida *et al.*, 2008; 石田恭子, 2010; 高久誉大, 2010)を参考にした。ヒト *RAD51* 遺伝子を *NdeI-BamHI* 部位に挿入した、pET-15b ベクターを用



いて大腸菌 JM109(DE3) codon plus RIL を形質転換させ、His<sub>6</sub>-tag RAD51 を過剰発現させた。過剰発現させた菌体を超音波破碎で破碎した後、Ni-NTA アガロースレジン (QIAGEN) を用いて精製した。溶出された His<sub>6</sub>-tag RAD51 に Thrombin protease を加え、His<sub>6</sub>-tag を切除した。切除後、スペルミジンによって RAD51 を沈殿させた。沈殿した RAD51 を溶解し、MonoQ カラム(GE Healthcare) に負荷した。その後、溶出したサンプルを回収し、最終精製物とした。

#### 2-1-5 ヒト RAD51-GFP の精製

ヒト *RAD51* 遺伝子が組み込まれた pET-15b ベクターを改変し、RAD51-GFP の発現ベクターを作製した。ヒト *RAD51* 遺伝子の終止コドンの代わりに、リンカー配列の Pro-Val-Ala-Thr および *EGFP* 遺伝子を挿入した。RAD51-GFP 遺伝子は pET-15b ベクターの *NdeI*-*Bam*HI 部位に挿入されている。このプラスミドベクターを大腸菌 BLR(DE3) pLysS に導入し、形質転換させた。プレート上のコロニーを LB 培地で懸濁しながら回収し、100 µg/ml アンピシリンおよび 35 µg/ml クロラムフェニコールを添加した LB 培地に植菌し、30°C で振盪培養した。OD<sub>600</sub>=0.6 まで培養した後、IPTG を最終濃度 0.5 mM になるように加え、His<sub>6</sub> タグ融合 RAD51-GFP (以下、His<sub>6</sub>-RAD51-GFP と略) の発現誘導を行った。6,810×g、4°C で 10 分間遠心し、集菌した菌体を、A バッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 500 mM NaCl, 5 mM imidazole, 10% glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol) で懸濁し、超音波破碎機を用いて細胞を破碎した。その後、細胞破碎液を 27,216×g、4°C で 20 分間遠心分離した。得られた上清の可溶性画分を 2 ml の Ni-NTA アガロース (QIAGEN) を混合し、4°C で 1 時間ゆるやかに混合することで、His<sub>6</sub>-RAD51-GFP を Ni-NTA アガロースへ結合させた。His<sub>6</sub>-RAD51-GFP を結合させた Ni-NTA アガロース

レジンをエコノカラム(Bio-Rad)に充填し、100 ml の B バッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, 5 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol) で洗浄した。洗浄後、10-500 mM imidazole の直線的な濃度勾配にてレジンに結合した目的タンパク質を溶出した。His<sub>6</sub>-RAD51-GFP を含む溶出画分に、タンパク質 1 mg あたり 7 ユニットの Thrombin protease を加え、C バッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 200 mM KCl, 0.25 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol) に対して透析を行いながら、His<sub>6</sub> タグを RAD51-GFP から切除した。Heparin Sepharose (GE healthcare) 3 ml をエコカラムに充填し、タンパク質をエコノカラムに負荷した。その後、150 ml の C バッファーで洗浄し、0.2-1 M KCl の直線的な濃度勾配にて Heparin Sepharose に結合した RAD51-GFP を溶出した。溶出した RAD51-GFP の画分を、C バッファーへ透析し、MonoQ (GE healthcare) へ負荷した。10 ml の C バッファーで洗浄後、D バッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 600 mM KCl, 0.25 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol) で溶出した。最終精製物を E バッファー (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析し、-80 °C で保存した。

#### 2-1-6 ヒト DMC1 の精製

ヒト DMC1 の精製は引用文献 (Hikiba *et al.*, 2008; 引場樹里, 2009) を参考にした。ヒト *DMC1* 遺伝子を *NdeI-BamHI* 部位に挿入した、pET-15b ベクターを用いて大腸菌 BL21(DE3) *condon plus RIL* を形質転換させ、His<sub>6</sub>-tag DMC1 を過剰発現させた。過剰発現させた菌体を超音波破碎で破碎した後、Ni-NTA アガロースレジン (QIAGEN) を用いて精製した。溶出された His<sub>6</sub>-tag DMC1 に Thrombin protease を加え、His<sub>6</sub>-tag を切除した。切除後、DMC1 を Heparin Sepharose (GE healthcare) に負荷した。その後、溶出し

たサンプルを回収し、最終精製物とした。

## 2-2 DNA 基質

本研究に用いた DNA 基質について以下に記す。本論文での DNA 濃度の表記は全てヌクレオチドあたりのモル濃度である。

### 2-2-1 $\phi$ X174DNA

$\phi$ X174 環状単鎖 DNA および  $\phi$ X174 二重鎖 DNA は、New England Biolabs より購入した。 $\phi$ X174 直線状二重鎖 DNA は *Pst*I で切断後、フェノールクロロホルムで除タンパク処理し、エタノール沈殿させることで精製した。

### 2-2-2 環状二重鎖 DNA

環状二重鎖 DNA の精製は参考文献 (Kagawa *et al.*, 2001) を参考に行った。環状二重鎖 DNA は、アルカリ変性を行わず、界面活性剤を用いた非変性の精製法によって調製した。環状二重鎖 DNA は pIC20R ベクターを改変した CP943 を用いた (Sinha *et al.*, 2008)。CP943 には、5S rDNA 配列がタンデムに 10 個連結された中央に、Gal4 結合部位および E4 プロモーターの配列が挿入されている。

### 2-2-3 オリゴ DNA

三者複合体形成アッセイおよび D-loop formation アッセイに用いたオリゴ DNA の配列を示す。オリゴ DNA は日本遺伝子研究所にて合成したものを購入した。

イネ RAD51A1、イネ RAD51A2、イネ RAD51A1-GFP、イネ RAD51A2-GFP、および

イネ DMC1A の三者複合体形成アッセイおよび D-loop formation アッセイは 70 mer のオリゴ DNA を用いて解析した。その配列を以下に示す。

5'-CCGGTATATTCAGCATGGTATGGTCGTAGGCTCTTGCTTGATGAAAGTTAAGCTA  
TTTAAAGGGTCAGGG-3'

また、ヒト RAD51、ヒト RAD51-GFP、ヒト DMC1 の三者複合体形成アッセイおよび D-loop formation アッセイは 90 mer のオリゴ DNA を用いて解析した。その配列を以下に示す。

5'-CCGGTATATTCAGCATGGTATGGTCGTAGGCTCTTGCTTGATGAAAGTTAAGCTA  
TTTAAAGGGTCAGGGATGTTATGACGTCATCGGCT-3'

これらの配列は 5S rDNA 配列と相同な DNA 配列である。5S rDNA 配列は CP943 環状二重鎖 DNA に 10 箇所存在することから、相同的対合反応の効率が良く、その解析に適している。

### 2-3 D-loop formation アッセイ

D-loop formation アッセイは、Shibata *et al.*, 1979 に示された方法を改変して行った。イネ RAD51A1、イネ RAD51A2、イネ RAD51A1-GFP、イネ RAD51A2-GFP、イネ DMC1A の反応は、25 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 1 mM DTT, 3 mM ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub> の条件で行った。2 価のカルシウムイオンはヒト RAD51 および DMC1 の相同的対合活性を亢進することが知られている (Bugreev & Mazin, 2004; Bugreev *et al.*, 2005)。そのため、ヒト RAD51、ヒト RAD51-GFP、およびヒト DMC1 の反応は、20 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 1 mM DTT, 1 mM ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM creatine phosphate, 0.75 mg/ml creatine kinase の条件で行った。単鎖 DNA-相同組換えタンパク質複合体を

形成するために、単鎖 DNA (3  $\mu$ M) とイネ RAD51A1、イネ RAD51A2、イネ RAD51A1-GFP、イネ RAD51A2-GFP、ヒト RAD51、またはヒト RAD51-GFP を 9  $\mu$ l の反応溶液で混合し、氷上で 15 分間おいた後、37°C で 5 分間反応させた。次に、1  $\mu$ l の環状二重鎖 DNA を混合し、37°C で 10 分間反応させた。その後、2  $\mu$ l の 0.2% SDS と 1.5mg/ml proteinase K (Roche) を加え、37°C で 15 分間反応させることで除タンパク質処理を行った。反応産物を 1% アガロースゲル、1×TAE バッファーで 4V/cm で 120 分間電気泳動することで分離した。電気泳動後、アガロースゲルを乾燥させ、イメージングプレートに露光し、FLA-7000 (GE Healthcare) によって検出した。

イネ RAD51A1、イネ RAD51A2、イネ RAD51A1-GFP、イネ RAD51A2-GFP、イネ DMC1A の反応は 70 mer の単鎖 DNA (3  $\mu$ M) および環状二重鎖 DNA (30  $\mu$ M) を用いて行った。また、ヒト RAD51、ヒト RAD51-GFP、ヒト DMC1 の反応は 90 mer の単鎖 DNA (3  $\mu$ M) および環状二重鎖 DNA (100  $\mu$ M) を用いて行った。

## 2-4 ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは、Garner *et al.*, 1981 に示された方法を改変して行った。 $\phi$ X174 環状単鎖 DNA (20  $\mu$ M) または  $\phi$ X174 直線状二重鎖 DNA (20  $\mu$ M) をイネ RAD51A1、イネ RAD51A2、イネ RAD51A1-GFP、イネ RAD51A2-GFP、ヒト RAD51、またはヒト RAD51-GFP と混合し、10  $\mu$ l の反応溶液で 37 °C で 15 分間反応させた。イネ RAD51A1、イネ RAD51A2、イネ RAD51A1-GFP、およびイネ RAD51A2-GFP の反応は、25 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 1 mM DTT, 3 mM ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub> の条件で行った。ヒト RAD51 およびヒト RAD51-GFP の反応は、20 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 1 mM DTT, 1 mM ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM creatine phosphate, 0.75 mg/ml creatine kinase の条件で

行った。反応溶液を 0.8%アガロースゲル、3.3V/cm で 150 分間電気泳動することで反応産物を分離した。その後、エチジウムブロマイドを用いて DNA を染色し、LAS-4000 (GE Healthcare)で撮影した。

## 2-5 ATPase アッセイ

ATPase アッセイは、Shibata *et al.*, 1979 に示された方法を改変して行った。1.5  $\mu$ M のイネ RAD51A1、イネ RAD51A2、イネ RAD51A1-GFP、イネ RAD51A2-GFP、ヒト RAD51、またはヒト RAD51-GFP を 10  $\mu$ l の反応溶液(24 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 mM NaCl, 0.4 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM DTT, 5  $\mu$ M ATP, 5 nCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (NEG502A, PerkinElmer))に混合し、 $\phi$ X174 環状単鎖 DNA (20  $\mu$ M)存在下または非存在下において 37 °Cで 30 分間反応させた。その後、5  $\mu$ l の 0.5 mM EDTA を加えることで反応を停止させ、遊離したリン酸を展開溶液 (0.5 M LiCl, 1M formic acid)を用いた薄層クロマトグラフィーによって展開した。展開した薄層クロマトグラフィーを、イメージングプレートに露光し、FLA-7000 (GE Healthcare)によって検出した。

## 2-6 三者複合体形成アッセイ

三者複合体形成アッセイは、Kagawa *et al.*, 2002 に示された方法を改変して行った。イネ RAD51A1、イネ RAD51A2、イネ RAD51A1-GFP、およびイネ RAD51A2-GFP の反応は、25 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 1 mM DTT, 3 mM ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>の条件で行った。ヒト RAD51 およびヒト RAD51-GFP の反応は、20 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 1 mM DTT, 1 mM ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM creatine phosphate, 0.75 mg/ml creatine kinase の条件で行った。単鎖 DNA-相同組換えタンパク質複合体を形成させるために、

単鎖 DNA (3  $\mu$ M)とイネ RAD51A1、イネ RAD51A2、イネ RAD51A1-GFP、イネ RAD51A2-GFP、ヒト RAD51、またはヒト RAD51-GFP を 9  $\mu$ l の反応溶液で混合し、氷上で 15 分間おいた後、37°C で 5 分間反応させた。次に、単鎖 DNA-二重鎖 DNA-相同組換えタンパク質の三者複合体を形成させるために、1  $\mu$ l の環状二重鎖 DNA を混合し、37°C で 10 分間反応させた。その後、グルタルアルデヒドを 0.09% の濃度になるように加え、37°C で 10 分間反応させた。反応産物を、1%アガロースゲル、0.5×TBE バッファーで 3.3V/cm で 150 分間電気泳動することで分離した。電気泳動後、アガロースゲルを乾燥させ、イメージングプレートに露光し、FLA-7000 (GE Healthcare)によって検出した。

イネ RAD51A1、イネ RAD51A2、イネ RAD51A1-GFP、イネ RAD51A2-GFP の反応は 70 mer の単鎖 DNA (3  $\mu$ M)および環状二重鎖 DNA (30  $\mu$ M)を用いて行った。また、ヒト RAD51 およびヒト RAD51-GFP の反応は 90 mer の単鎖 DNA (3  $\mu$ M)および環状二重鎖 DNA (100  $\mu$ M)を用いて行った。

## 第3章 結果

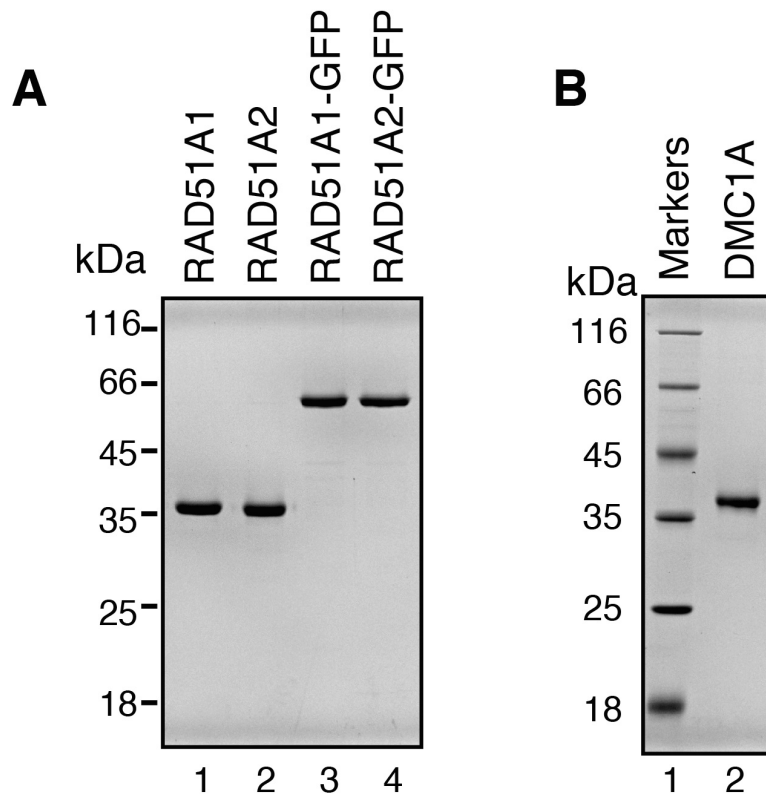
### 3-1 イネ相同組換えタンパク質の精製

RAD51-GFP は DNA 二重鎖切断を誘発する MMC や電離放射線に対して高感受性を示すことが報告されている (Da Ines *et al.*, 2013)。一方で、RAD51-GFP を発現させた減数分裂期の細胞では、交叉組換え体の形成効率が野生型と同程度であることが報告されている (Da Ines *et al.*, 2013)。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する。そこで、RAD51-GFP を用いて、減数分裂期特異的な RAD51 の機能を解析することを試みた。現在までに、植物を用いた RAD51-GFP の遺伝学的解析が行われてきた。そこで、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。最終精製物を SDS-PAGE によって解析し、高純度にイネ RAD51A1、RAD51A2、RAD51A1-GFP、RAD51A2-GFP、および DMC1A を精製できたことを確認した (図 4)。

### 3-2 C 末端に付加された GFP は RAD51 依存的な相同的対合反応を阻害する

RAD51-GFP は MMC や電離放射線に対して高感受性を示すことが報告されている (Da Ines *et al.*, 2013)。このことは、RAD51-GFP が相同組換え活性が低下していることを示唆する。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 D-loop formation アッセイにより生化学的に解析した。この解析では、相同的対合反応の反応産物である D-loop 構造を指標とし、イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP の相同的対合活性を評価した (図 5 A)。解析の結果、野生型イネ





**図4 イネ相同組換えタンパク質の精製**

- (A) イネ RAD51A1、イネ RAD51A2、イネ RAD51A1-GFP、イネ RAD51A2-GFP の精製。それぞれの最終精製物 (0.75  $\mu$ g) を 12% SDS-PAGE で展開し、クマシーブリリアントブルー (CBB) で染色した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 1A より引用)
- (B) イネ DMC1A の精製。最終精製物 (0.75  $\mu$ g) を 12% SDS-PAGE で展開し、クマシーブリリアントブルー (CBB) で染色した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 4A より引用)

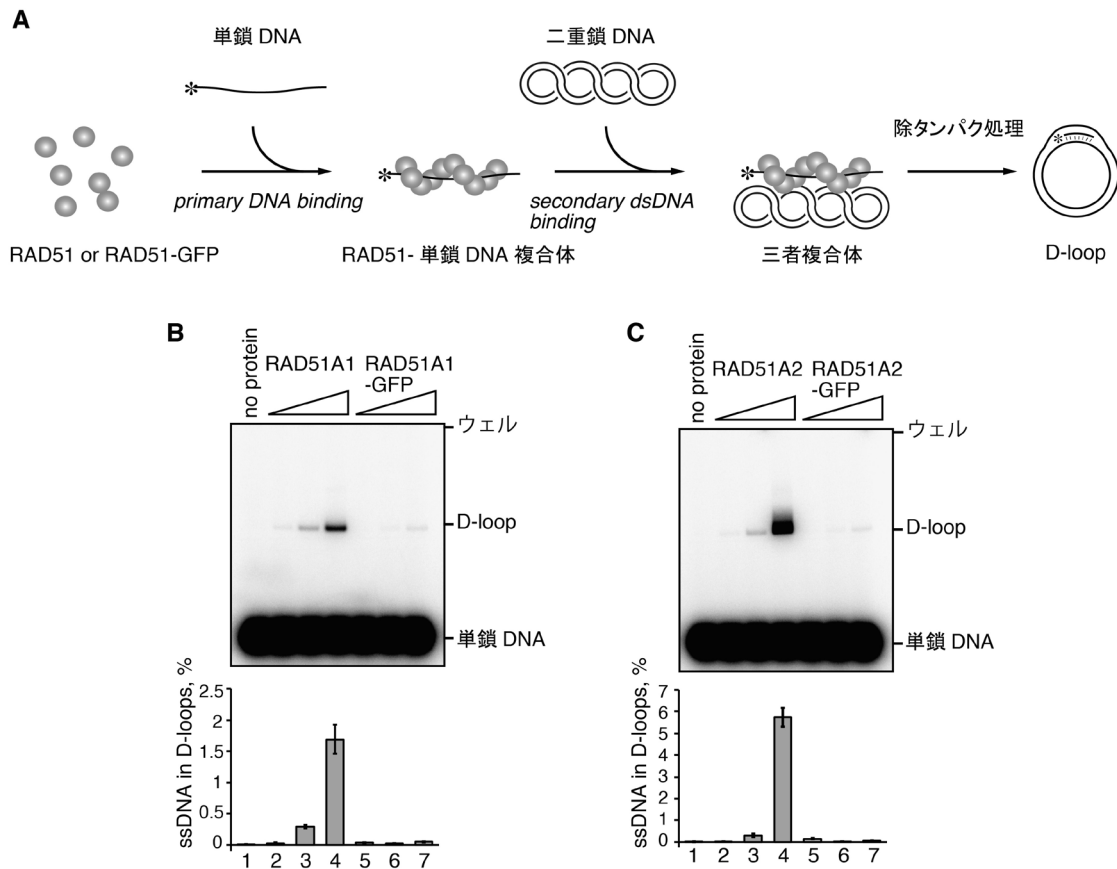
RAD51A2 の相同的対合活性は、野生型イネ RAD51A1 と比較して高いことがわかった。このことは、先行研究の結果と一致する (Morozumi *et al.*, 2013)。そこで、イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51-GFP の相同的対合活性を野生型と比較した。その結果、イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP の相同的対合活性は、野生型と比較して、著しく低いことがわかった (図 5 B, C)。これらの結果から、C 末端に付加された GFP は RAD51 依存的な相同的対合反応を阻害することが明らかになった。

### 3-3 イネ RAD51-GFP は DNA 結合活性を有する

3-2 において、RAD51-GFP の相同的対合活性が、野生型と比較して、著しく低いことが明らかになった。そこで、RAD51-GFP の相同的対合活性が野生型と比較して低い理由を明らかにするために、イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP の DNA 結合活性をゲルシフトアッセイにより解析した。その結果、イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP は単鎖 DNA および二重鎖 DNA に結合することがわかった (図 6 A, B)。二重鎖 DNA におけるイネ RAD51-GFP の DNA 結合は、野生型と比較してやや亢進し、そのバンドの帯域も異なることがわかる (図 6B)。このことから、GFP が RAD51 の DNA 結合性もしくは、RAD51 の会合状態に影響を与えている可能性が考えられる。

### 3-4 イネ RAD51-GFP は野生型と同程度の ATP 加水分解活性を有する

野生型イネ RAD51A1 およびイネ RAD51A2 は、単鎖 DNA 依存的な ATP 加水分解活性を有する (Morozumi *et al.*, 2013)。3-3 において、イネ RAD51-GFP は単鎖 DNA および二重鎖 DNA に結合することが明らかになった。そこで次に、イネ RAD51A1-GFP およ



**図5 イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP の相対的対合活性**

- (A) D-loop formation アッセイの模式図。アスタリスクは  $^{32}\text{P}$  で標識した単鎖 DNA の 5' 端を示す。RAD51 または RAD51-GFP を単鎖 DNA ( $3 \mu\text{M}$ ) と混合することで、RAD51-単鎖 DNA 複合体が形成される。その後、環状二重鎖 DNA ( $30 \mu\text{M}$ ) を加えることで、RAD51-単鎖 DNA-二重鎖 DNA の三者複合体が形成される。その後、除タンパク質処理することで、D-loop 構造を検出した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 3A より引用)
- (B) イネ RAD51A1-GFP の相対的対合活性。タンパク質濃度は、それぞれ  $0.2 \mu\text{M}$  (レーン 2, 5)、 $0.6 \mu\text{M}$  (レーン 3, 6)、 $1 \mu\text{M}$  (レーン 4, 7) である。レーン 1 はタンパク質非存在下におけるコントロール実験である。同実験を独立に三回に行い、その平均値と標準偏差を図中に示した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 3B より引用)
- (C) イネ RAD51A2-GFP の相対的対合活性。タンパク質濃度は、それぞれ  $0.2 \mu\text{M}$  (レーン 2, 5)、 $0.6 \mu\text{M}$  (レーン 3, 6)、 $1 \mu\text{M}$  (レーン 4, 7) である。レーン 1 はタンパク質非存在下におけるコントロール実験である。同実験を独立に三回に行い、その平均値と標準偏差を図中に示した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 3C より引用)

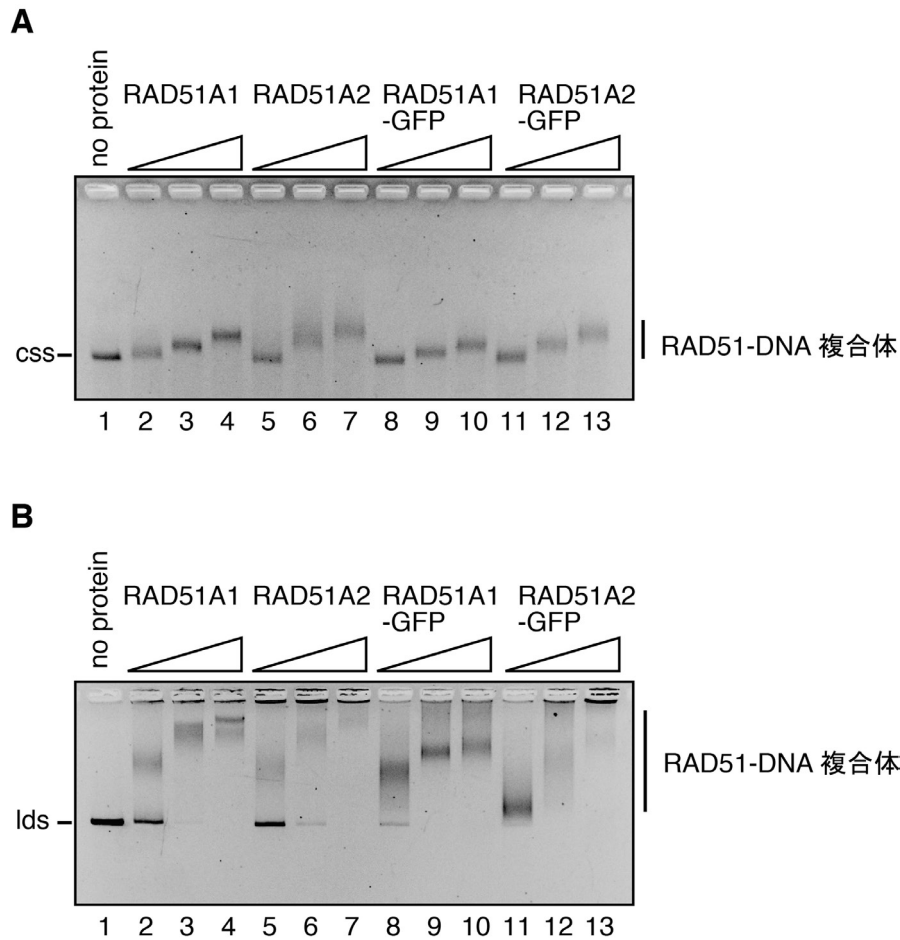


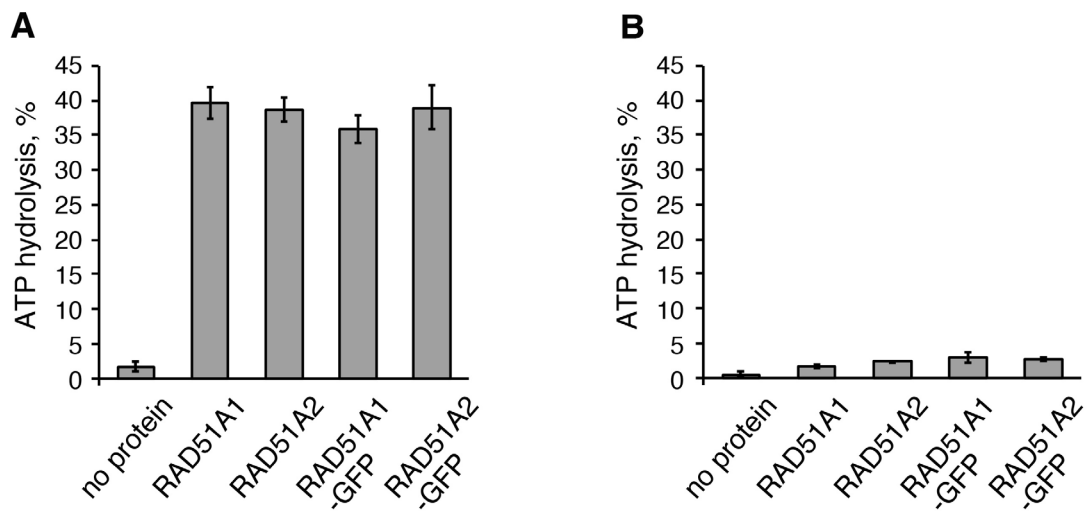
図 6 イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP の DNA 結合解析

- (A) 単鎖 DNA に対するイネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP の結合解析。φX174 単鎖 DNA (20 μM) とイネ RAD51A1 (レーン 2-4)、イネ RAD51A2 (レーン 5-7)、イネ RAD51A1-GFP (レーン 8-10)、もしくはイネ RAD51A2-GFP (レーン 11-13) を混合し、37°C で 15 分間インキュベートした。反応させたサンプル溶液を 0.8% アガロースゲルで展開し、EtBr で染色した。タンパク質濃度はそれぞれ 1 μM (レーン 2, 5, 8, 11)、2 μM (レーン 3, 6, 9, 12)、4 μM (レーン 4, 7, 10, 13) である。レーン 1 はタンパク質非存在下のコントロール実験である。css: circular single-strand。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 1B より引用)
- (B) 二重鎖 DNA に対するイネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP の結合解析。直線状 φX174 二重鎖 DNA (20 μM) とイネ RAD51A1 (レーン 2-4)、イネ RAD51A2 (レーン 5-7)、イネ RAD51A1-GFP (レーン 8-10)、もしくはイネ RAD51A2-GFP (レーン 11-13) を混合し、37°C で 15 分間インキュベートした。反応させたサンプル溶液を 0.8% アガロースゲルで展開し、EtBr で染色した。タンパク質濃度はそれぞれ 1 μM (レーン 2, 5, 8, 11)、2 μM (レーン 3, 6, 9, 12)、4 μM (レーン 4, 7, 10, 13) である。レーン 1 はタンパク質非存在下のコントロール実験である。lds: linear double-strand。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 1C より引用)

よびイネ RAD51A2-GFP の DNA 依存的な ATP 加水分解活性を解析した。その結果、単鎖 DNA 存在下において、イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP は野生型と同程度の ATP 加水分解活性を有することがわかった (図 7 A)。また、野生型と同様に、単鎖 DNA 非存在下では、イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP は ATP 加水分解活性をほとんど示さないことがわかった (図 7 B)。これらの結果から、野生型と同様に、イネ RAD51-GFP は DNA 依存的な ATP 加水分解活性を有することが示唆された。

### 3-5 C末端に付加された GFP は RAD51-単鎖 DNA-二重鎖 DNA の三者複合体の形成を阻害する

相同的対合反応の過程において、単鎖 DNA に結合した RAD51 は二重鎖 DNA に結合し、相同鎖検索の中間体である、RAD51-単鎖 DNA-二重鎖 DNA の三者複合体を形成する (図 3)。そこで、イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP の三者複合体形成能を野生型と比較した。解析では、<sup>32</sup>P により放射性標識した単鎖 DNA とイネ RAD51A1、RAD51A2、RAD51A1-GFP、または RAD51A2-GFP を混合し、RAD51-単鎖 DNA 複合体を形成させた。その後、RAD51-単鎖 DNA-二重鎖 DNA の三者複合体を形成させるために、環状二重鎖 DNA を混合し、反応させた (図 8 A)。解析の結果、野生型イネ RAD51A1 およびイネ RAD51A2 はその濃度依存的に三者複合体を形成することがわかった (図 8 B, C レーン 3-5)。一方、イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP は、野生型と比較して、三者複合体形成能が著しく低いことが明らかになった (図 8 B, C レーン 7-9)。また、この実験においてもイネ RAD51A1-GFP またはイネ RAD51A2-GFP-単鎖 DNA の複合体の形成量は野生型と同程度であることを確認できた (図 8 B, C レーン 6, 10)。これらの結果は、RAD51-GFP は野生型 RAD51 と比較して、三者複合体形成



**図 7 イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP の ATP 加水分解活性**

- (A) 単鎖 DNA 存在下におけるイネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP の加水分解活性。ATP 加水分解活性の測定には  $\{\gamma\text{-}^{32}\text{P}\}$  ATP (5  $\mu\text{M}$ ) を用いた。 $\phi\text{X174}$  単鎖 DNA (20  $\mu\text{M}$ ) とイネ RAD51A1、イネ RAD51A2、イネ RAD51A1-GFP、もしくはイネ RAD51A2-GFP と混合し、37°C で 30 分間反応させた。同実験を独立に三回に行い、その平均値と標準偏差を図中に示した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 1D より引用)
- (B) DNA 非存在下におけるイネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP の加水分解活性。イネ RAD51A1、イネ RAD51A2、イネ RAD51A1-GFP、もしくはイネ RAD51A2-GFP と混合し、37°C で 30 分間反応させた。同実験を独立に三回に行い、その平均値と標準偏差を図中に示した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 1E より引用)

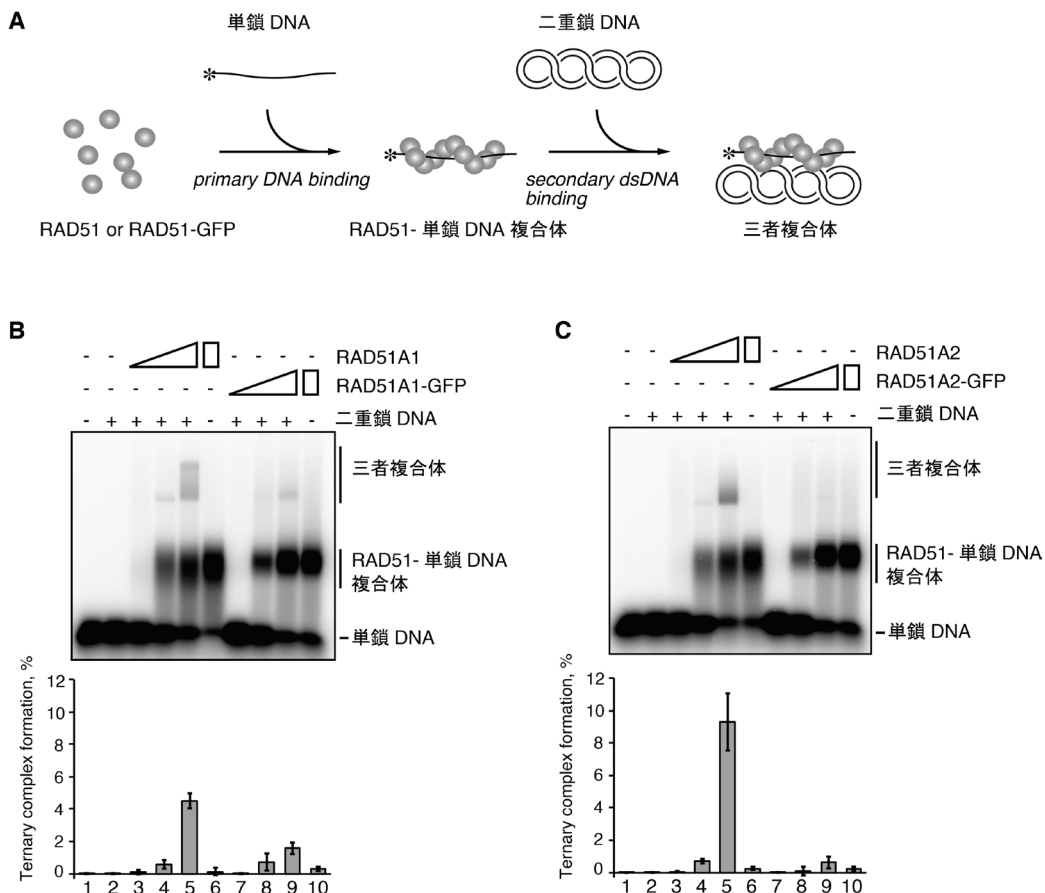


図8 イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP の三者複合体形成

- (A) 三者複合体形成アッセイの模式図。アスタリスクは  $^{32}\text{P}$  で標識した単鎖 DNA の 5' 端を示す。RAD51 または RAD51-GFP を単鎖 DNA ( $3 \mu\text{M}$ ) と混合することで、RAD51-単鎖 DNA 複合体が形成される。その後、環状二重鎖 DNA ( $30 \mu\text{M}$ ) を加えることで、RAD51-単鎖 DNA-二重鎖 DNA の三者複合体が形成される。三者複合体はグルタルアルデヒドで架橋し、1%アガロースゲルで分離した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 2A より引用)
- (B) イネ RAD51A1-GFP の三者複合体形成。タンパク質濃度は、それぞれ  $0.2 \mu\text{M}$  (レーン 3, 7)、 $0.6 \mu\text{M}$  (レーン 4, 8)、 $1 \mu\text{M}$  (レーン 5, 6, 9, 10) である。レーン 1, 2 はタンパク質非存在下における二重鎖 DNA の有無を比較したコントロール実験である。レーン 6, 10 は RAD51A1 のコントロール実験である。同実験を独立に三回に行い、その平均値と標準偏差を図中に示した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 2B より引用)
- (C) イネ RAD51A2-GFP の三者複合体形成。タンパク質濃度は、それぞれ  $0.2 \mu\text{M}$  (レーン 3, 7)、 $0.6 \mu\text{M}$  (レーン 4, 8)、 $1 \mu\text{M}$  (レーン 5, 6, 9, 10) である。レーン 1, 2 はタンパク質非存在下における二重鎖 DNA の有無を比較したコントロール実験である。レーン 6, 10 は RAD51A1 のコントロール実験である。同実験を独立に三回に行い、その平均値と標準偏差を図中に示した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 2C より引用)

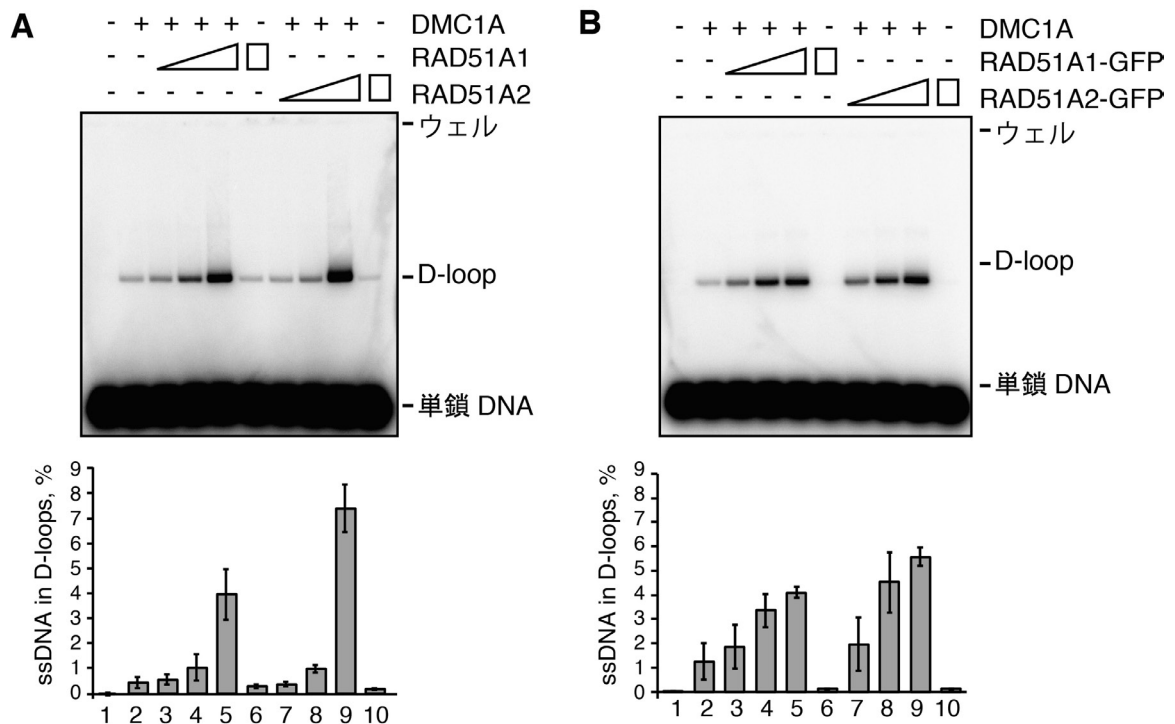
活性が低いため、相同的対合活性が低下したことを示唆する。

### 3-6 イネ RAD51-GFP はイネ DMC1A 依存的な相同的対合反応を促進する

RAD51-GFP を発現させた減数分裂期の細胞では、交叉組換え体の形成効率が野生型と同程度であることが報告されている (Da Ines *et al.*, 2013)。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。前項までに、イネ RAD51-GFP は野生型と同程度の DNA 結合活性および ATP 加水分解活性を有するが、その三者複合体形成能および相同的対合活性は、野生型と比較して著しく低下していることを明らかにした。そこで、相同組換え活性が著しく低下した RAD51-GFP を用いて、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。

減数分裂期組換えでは RAD51 に加え、DMC1 が機能する (Shinohara *et al.*, 1992, 1993; Bishop *et al.*, 1992; Habu *et al.*, 1996)。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、Rad51 が Dmc1 の活性化因子として減数分裂期組換えにおいて機能することが示唆されている (Cloud *et al.*, 2012)。そこで、イネ RAD51 がイネ DMC1 依存的な相同的対合反応に与える影響を、D-loop formation アッセイにより解析した。DMC1 依存的な D-loop 形成量は、反応開始から 10 分で最大となる。そのため、本解析では反応開始から 10 分後に反応を停止させた。解析の結果、出芽酵母の Rad51 と同様に、イネ RAD51A1 および RAD51A2 は、イネ DMC1A 依存的な相同的対合反応を相乗的に促進することがわかった (図 9 A)。次に、相同的組換え活性が低下した RAD51-GFP が、DMC1 依存的な相同的対合反応に与える





**図 9 イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP による  
イネ DMC1A の相対的対合活性の促進**

- (A) イネ RAD51A1 およびイネ RAD51A2 によるイネ DMC1A の相対的対合活性の促進。イネ DMC1A (1  $\mu\text{M}$ ) と  $^{32}\text{P}$  で標識した単鎖 DNA を RAD51A1 または RAD51A2 存在下で反応させた。RAD51A1 および RAD51A2 の濃度はそれぞれ 0.2  $\mu\text{M}$  (レーン 3, 7)、0.4  $\mu\text{M}$  (レーン 4, 8)、0.6  $\mu\text{M}$  (レーン 5, 6, 9, 10) である。その後、環状二重鎖 DNA (30  $\mu\text{M}$ ) を加え、37°C で 10 分間反応させた。レーン 2 はイネ DMC1A 単独でのコントロール実験である。また、レーン 6, 10 は RAD51A1 および RAD51A2 単独での実験である。同実験を独立に三回に行い、その平均値と標準偏差を図中に示した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 4B より引用)
- (B) イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP によるイネ DMC1A の相対的対合活性の促進。イネ DMC1A (1  $\mu\text{M}$ ) と  $^{32}\text{P}$  で標識した単鎖 DNA を RAD51A1-GFP または RAD51A2-GFP 存在下で反応させた。RAD51A1-GFP および RAD51A2-GFP の濃度はそれぞれ 0.2  $\mu\text{M}$  (レーン 3, 7)、0.4  $\mu\text{M}$  (レーン 4, 8)、0.6  $\mu\text{M}$  (レーン 5, 6, 9, 10) である。同実験を独立に三回に行い、その平均値と標準偏差を図中に示した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 4C より引用)

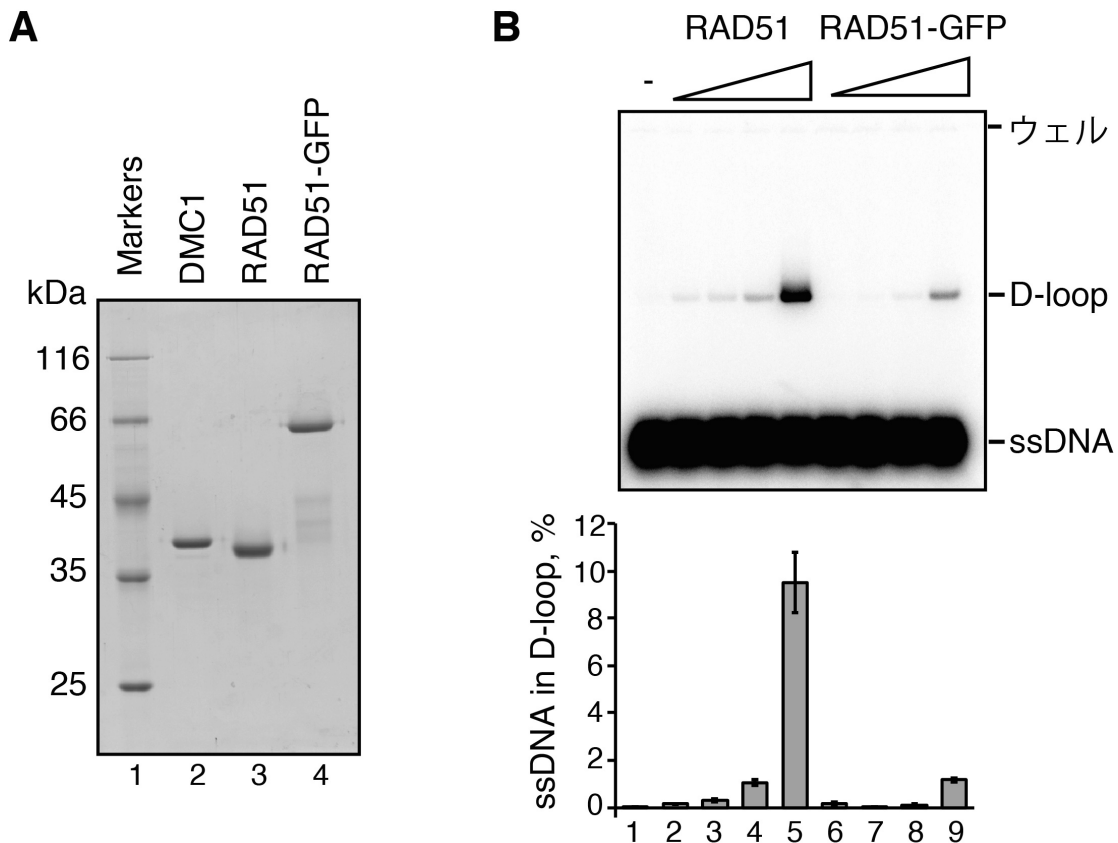
影響について解析した。その結果、イネ RAD51A1-GFP および RAD51A2-GFP は、野生型と同程度にイネ DMC1A 依存的な相同的対合反応を促進することが明らかになった (図 9 B)。また、野生型 RAD51 では、一定の濃度 (0.6  $\mu$ M) でイネ DMC1 依存的な相同的対合反応を著しく促進するのに対し (図 9A レーン 5, 9)、RAD51-GFP では、その濃度的に促進することがわかった (図 9B レーン 3-5, 7-9)。これらの結果から、DMC1 依存的な相同的対合反応の活性化に RAD51 の相同組換え活性は必須ではないことが示唆された。

### 3-7 RAD51 が有する DMC1 補助因子としての機能はイネからヒトに至るまで保存されている

イネ RAD51 を用いた解析から、RAD51 は DMC1 依存的な相同的対合反応を促進する補助的な活性を有することが明らかになった。そこで、同様の活性がヒト RAD51 において保存されているかを解析した。解析を行うために、ヒト RAD51、RAD51-GFP、および DMC1 をリコンビナントタンパク質として精製した。最終精製物を SDS-PAGE によって解析し、高純度にヒト RAD51、RAD51-GFP、および DMC1 を精製できたことを確認した (図 10 A)。

精製したヒト RAD51-GFP の生化学的性質を解析した。ヒト RAD51-GFP の相同的対合活性を、D-loop formation アッセイにより解析した。その結果、ヒト RAD51-GFP の相同的対合活性は野生型と比較して著しく低いことがわかった (図 10 B)。次に、単鎖 DNA および二重鎖 DNA に対する、ヒト RAD51-GFP の DNA 結合活性をゲルシフトアッセイにより解析した。その結果、ヒト RAD51-GFP は単鎖 DNA、および二重鎖 DNA に対して結合することがわかった (図 11 A, B)。さらに、ヒト RAD51-GFP の DNA 依存

的な ATP 加水分解活性を解析した。その結果、ヒト RAD51-GFP は単鎖 DNA 存在下において ATP 加水分解活性を示すことが明らかになった (図 11 C)。また、ヒト RAD51-GFP の三者複合体形成能を解析した。その結果、ヒト RAD51-GFP の三者複合体形成能は野生型と比較して、著しく低下していることがわかった (図 12 A, B)。これらの結果は、イネ RAD51-GFP を用いた生化学的解析の結果と一致する。そこで次に、ヒト RAD51 がヒト DMC1 依存的な相同的対合反応に与える影響を D-loop formation アッセイにより解析した。その結果、ヒト RAD51 はヒト DMC1 依存的な相同的対合反応を促進することがわかった (図 12 C)。さらに、相同的対合活性が低下したヒト RAD51-GFP は、野生型と同程度に、ヒト DMC1 依存的な相同的対合反応を促進することが明らかになった(図 12 C)。これらのことから、RAD51 が有する DMC1 の補助因子として活性は、イネとヒトにおいて保存されていることが明らかになった。



**図 10 ヒト相同組換えタンパク質の精製およびヒト RAD51-GFP の相同的対合活性**

- (A) ヒト DMC1、ヒト RAD51、ヒト RAD51-GFP の精製。それぞれの最終精製物(0.75  $\mu\text{g}$ )を 12% SDS-PAGE で展開し、クマシーブリリアントブルー (GBB) で染色した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 5A より引用)
- (B) ヒト RAD51-GFP の相同的対合活性。RAD51 (0.125  $\mu\text{M}$ , 0.25  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ ) または RAD51-GFP (0.125  $\mu\text{M}$ , 0.25  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ ) を  $^{32}\text{P}$  で標識した単鎖 DNA (3  $\mu\text{M}$ ) と混合し、その後、環状二重鎖 DNA (100  $\mu\text{M}$ ) を加えることで D-loop 構造を形成させた。同実験を独立に三回に行い、その平均値と標準偏差を図中に示した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 6B より引用)

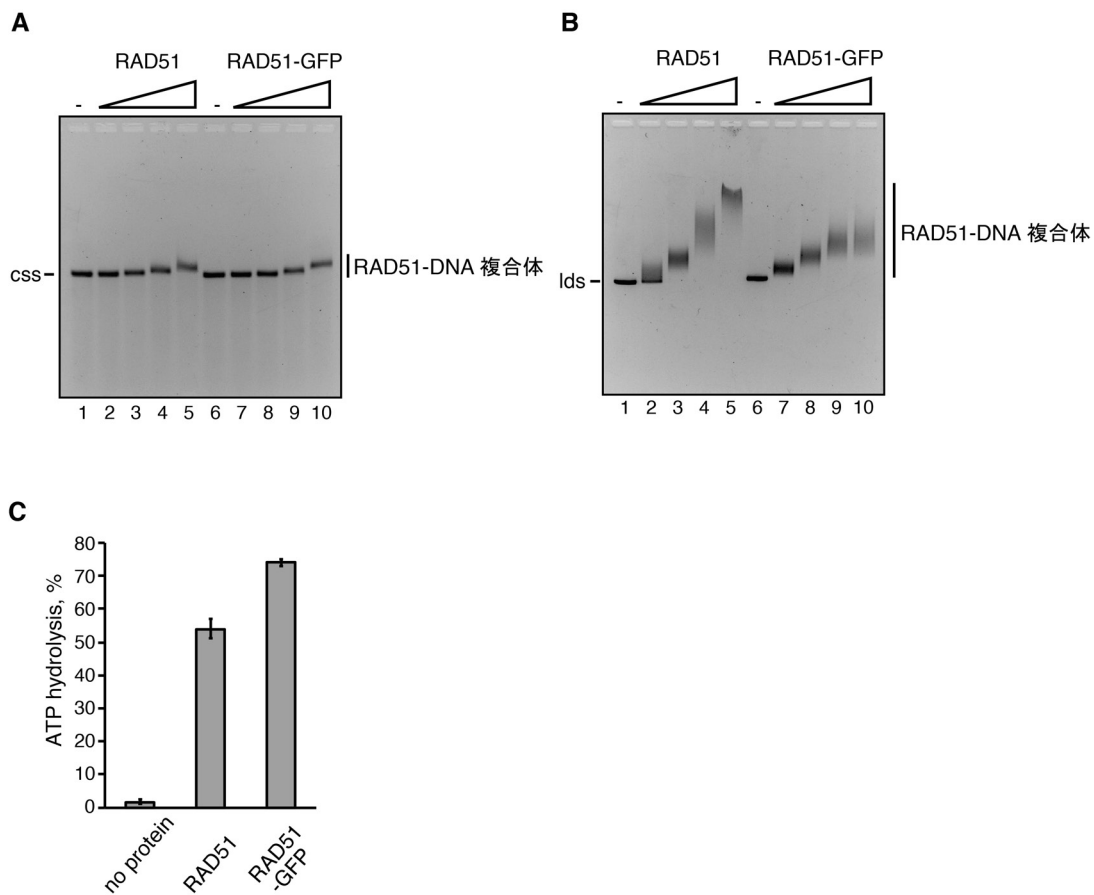


図 11 ヒト RAD51-GFP の DNA 結合活性および ATP 加水分解活性の解析

- (A) 単鎖 DNA に対するヒト RAD51-GFP の結合解析。φX174 単鎖 DNA (20 μM) とヒト RAD51 レーン 2-5)、もしくはヒト RAD51-GFP (レーン 6-10) を混合し、37°C で 15 分間インキュベートした。反応させたサンプル溶液を 0.8% アガロースゲルで展開し、EtBr で染色した。タンパク質濃度はそれぞれ 0.5 μM (レーン 2, 7)、1 μM (レーン 3, 8)、2 μM (レーン 4, 9)、4 μM (レーン 5, 10) である。レーン 1 はタンパク質非存在下のコントロール実験である。css; circular single-strand。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 5B より引用)
- (B) 二重鎖 DNA に対するヒト RAD51-GFP の結合解析。直線化 φX174 二重鎖 DNA (20 μM) を用いて、(A) と同じ実験を行った。css; circular single-strand。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 5C より引用)
- (C) 単鎖 DNA 存在下におけるヒト RAD51-GFP の加水分解活性。φX174 単鎖 DNA (20 μM) とヒト RAD51 もしくはヒト RAD51-GFP と混合し、37°C で 30 分間反応させた。ネガティブコントロールとしてタンパク質非存在下の実験を行っている。同実験を独立に三回に行い、その平均値と標準偏差を図中に示した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 5D より引用)

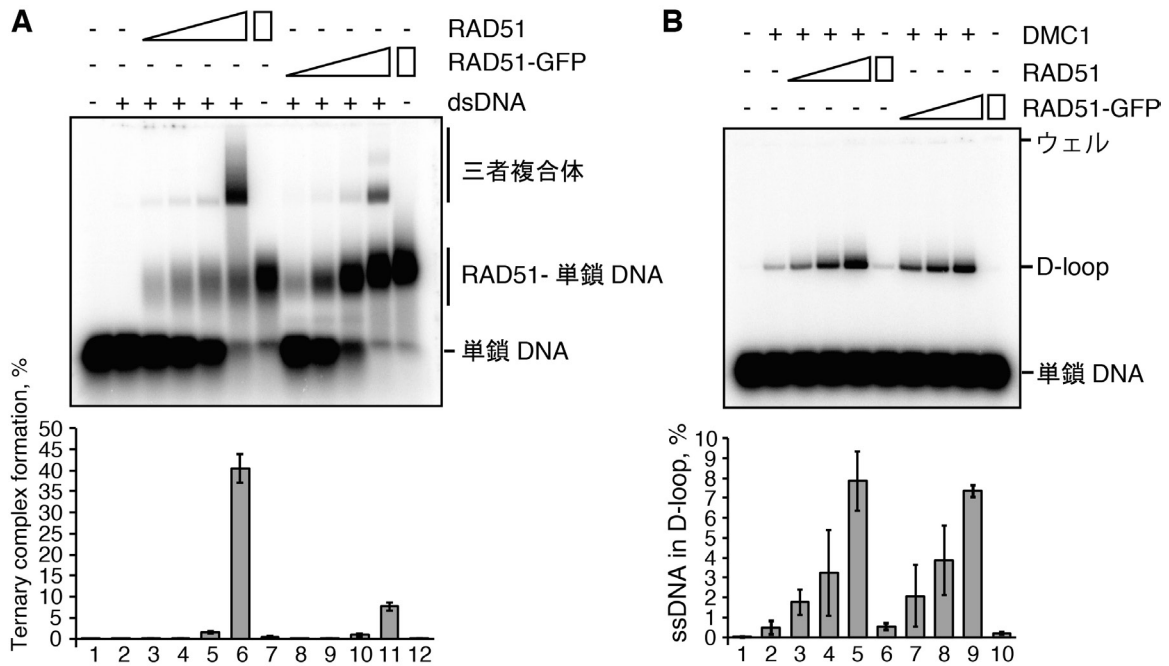


図 12 ヒト RAD51-GFP による三者複合体形成およびヒト DMC1 の相同的対合活性の促進

(A) ヒト RAD51-GFP の三者複合体形成。タンパク質濃度は、それぞれ 0.125  $\mu\text{M}$  (レーン 3, 8)、0.25  $\mu\text{M}$  (レーン 4, 9)、0.5  $\mu\text{M}$  (レーン 5, 10)、1  $\mu\text{M}$  (レーン 6, 7, 11, 12) である。レーン 1, 2 はタンパク質非存在下における二重鎖 DNA の有無を比較したコントロール実験である。レーン 7, 12 は RAD51 のコントロール実験である。同実験を独立に三回に行い、その平均値と標準偏差を図中に示した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 6A より引用)

(B) ヒト RAD51-GFP によるヒト DMC1 の相同的対合活性の促進。ヒト DMC1 (1  $\mu\text{M}$ ) と  $^{32}\text{P}$  で標識した単鎖 DNA をヒト RAD51 またはヒト RAD51-GFP 存在下で反応させた。ヒト RAD51 およびヒト RAD51-GFP の濃度はそれぞれ 0.125  $\mu\text{M}$  (レーン 3, 7)、0.25  $\mu\text{M}$  (レーン 4, 8)、0.5  $\mu\text{M}$  (レーン 5, 6, 9, 10) である。その後、環状二重鎖 DNA (100  $\mu\text{M}$ ) を加え、37°C で 10 分間反応させた。同実験を独立に三回に行い、その平均値と標準偏差を図中に示した。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 6C より引用)

## 第 4 章 総合討論

シロイヌナズナにおける解析から、*Rad51* 遺伝子欠損株に RAD51-GFP を発現させると、相同組換え修復欠損を示す一方で、減数分裂期組換えによるキアズマの形成効率は野生型と同程度であること示された (Da Ines *et al.*, 2013)。この事実から、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。そこで本研究は、RAD51-GFP を用いて、RAD51 の減数分裂期特異的な機能を明らかにすることを目的とした。そのために、RAD51-GFP をリコンビナントタンパク質として精製し、生化学的解析を行った。その結果、RAD51-GFP は野生型と同程度の DNA 結合活性および ATP 加水分解活性を有するが、その三者複合体形成能および相同的対合活性は、野生型と比較して著しく低下していることが明らかになった。減数分裂期組換えでは RAD51 に加え、DMC1 が発現する (Shinohara *et al.*, 1992, 1993; Bishop *et al.*, 1992; Habu *et al.*, 1996)。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 (Cloud *et al.*, 2012)。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の詳細を明らかにすることを試みた。具体的には、RAD51-GFP が DMC1 依存的な相同的対合反応に与える影響を解析し、RAD51-GFP が 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。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示唆された。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。本章では、これらの解析の結果から、RAD51 が有する相同的対合活性と減数分裂期特異的な補助的機能について議論する。

#### 4-1 RAD51-GFP が相同組換え修復に与える影響

RAD51-GFP の生化学的解析の結果から、RAD51-GFP が相同組換え修復に与える影響を考察した。シロイヌナズナを用いた解析から、*Rad51* 遺伝子欠損株に RAD51-GFP を発現させると、MMC に対して高感受性を示すことがわかっている (Da Ines *et al.*, 2013)。また、RAD51-GFP を発現させたニワトリ DT40 細胞およびマウス ES 細胞は放射線や MMC に対して高感受性を示すことが報告されている (Yu *et al.*, 2003; Forget *et al.*, 2007; Uringa *et al.*, 2015)。これらの結果は、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する。

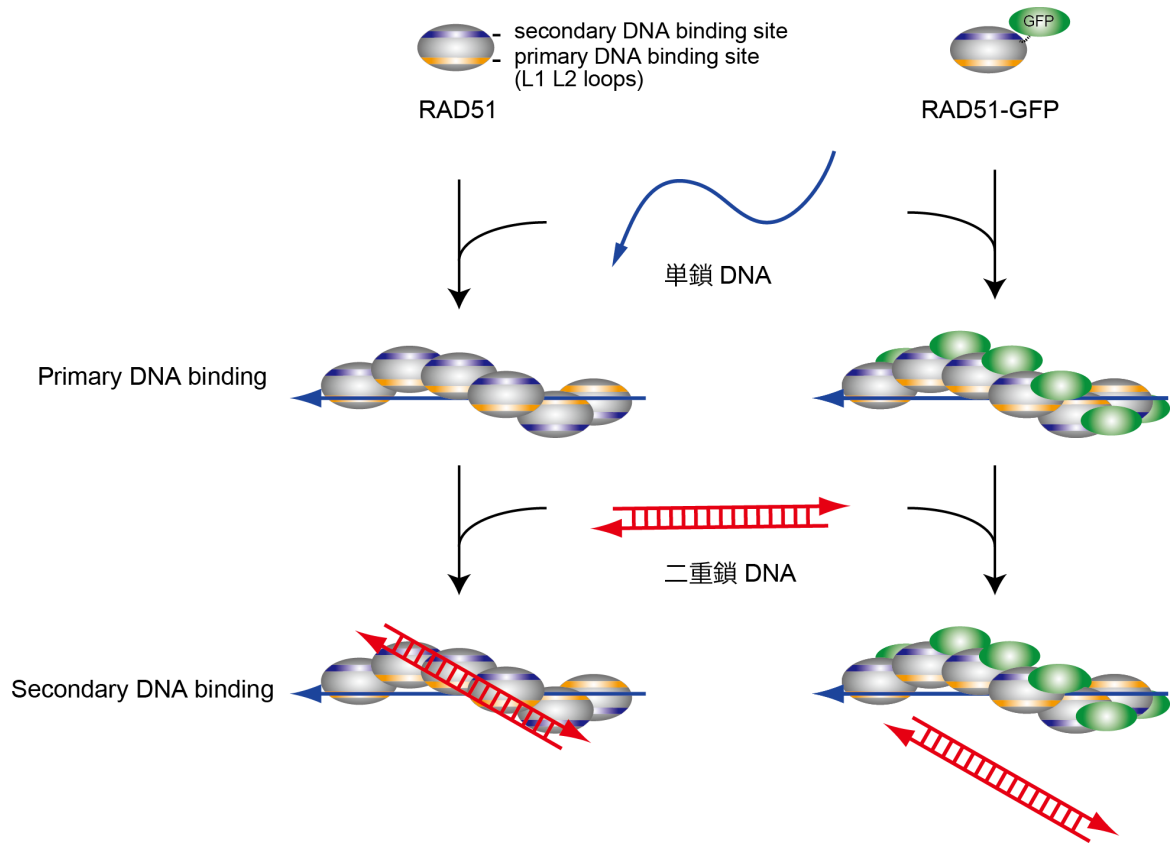
本研究の解析の結果から、イネ RAD51A1-GFP および RAD51A2-GFP の相同的対合活性は、野生型と比較して著しく低下していることが明らかになった (図 5)。RAD51-GFP の相同的対合活性が野生型と比較して低い理由を明らかにするために、イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP の DNA 結合活性を解析した。その結果、イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP は、野生型と同程度に単鎖 DNA および二重鎖 DNA に結合することが明らかになった (図 6)。また、イネ RAD51A1-GFP およびイネ RAD51A2-GFP は単鎖 DNA 依存的な ATP 加水分解活性を有することが明らかになった (図 7)。野生型 RAD51 は、DNA 結合ループ (L1 ループおよび L2 ループ) を介して DNA に結合することが知られている (Matsuo *et al.*, 2006; Reymer *et al.*, 2009)。

RAD51-GFP は野生型と同程度に、DNA に結合することから、RAD51-GFP は DNA 結合ループ (L1 ループおよび L2 ループ) を介して DNA に結合すると考えられる。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 の三者複合体形成に関して解析を行った。その結果、イネ RAD51-GFP およびイネ RAD51A2-GFP の三者複合体形成能は、野生型と比較して著しく低下していることがわかった (図 8)。



このことは、RAD51 の C 末端に付加された GFP は、secondary DNA binding site への DNA 結合を阻害することを示唆している。さらに、ヒト RAD51-GFP を用いて同様の解析を行ったところ、イネ RAD51-GFP の解析結果と一致した (図 10, 11, 12A)。以上の結果より、RAD51 の C 末端に付加された GFP は、相同的対合反応の過程における三者複合体形成の過程を阻害することが明らかになった (図 13)。

これまでに、出芽酵母由来の Rad51 フィラメントの立体構造が明らかになっている (Conway *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2010)。そこで、この立体構造を元に RAD51-GFP のモデル構造を構築した (図 14 A)。このモデル構造は、Rad51 の C 末端にリンカー配列を介して GFP を付加させた立体構造を示す (図 14 B)。図 14 B に示すように、GFP は RAD51 フィラメントの外側に位置していることがわかる。RecA の変異体解析を元に、出芽酵母 Rad51 の 188 番目のアルギニン残基、361 番目のリジン残基、371 番目のリジン残基は、secondary DNA binding に重要なアミノ酸残基として特定されている (Kurumizaka *et al.*, 1996, 1999; Cloud *et al.*, 2012)。これらの塩基性のアミノ酸残基は Rad51 フィラメントの外側に位置することがわかる (図 14 B マゼンダ)。そのため、C 末端に付加された GFP は、DNA が RAD51 の secondary DNA binding site に近接するのを物理的に阻害することが考えられる。また、RAD51 の secondary DNA binding に重要な部位として、N 末端ドメインが知られている (Aihara *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2001; Galkin *et al.*, 2006)。RAD51 の N 末端ドメインは、結合した DNA を内側の DNA 結合ループ領域へと導くゲートウェイであると考えられている (図 14 B レッド; Aihara *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2001; Galkin *et al.*, 2006)。そのため、C 末端に付加された GFP は、N 末端ドメインの DNA 結合を阻害している可能性が考えられる。しかし、構築したモデル構造では、C 末端に付加された GFP は RAD51 の N 末端ドメイン付近に位置しない。これらのことから、C 末



**図 13 C 末端に付加された GFP は三者複合体形成過程を阻害する**

本研究により、RAD51-GFP は単鎖 DNA に結合し、フィラメント構造を形成するが、その後の三者複合体形成およびヘテロ二重鎖の形成が阻害されることが明らかになった。そのため、RAD51-GFP は体細胞の相同組換え修復において機能しないことが考えられる。

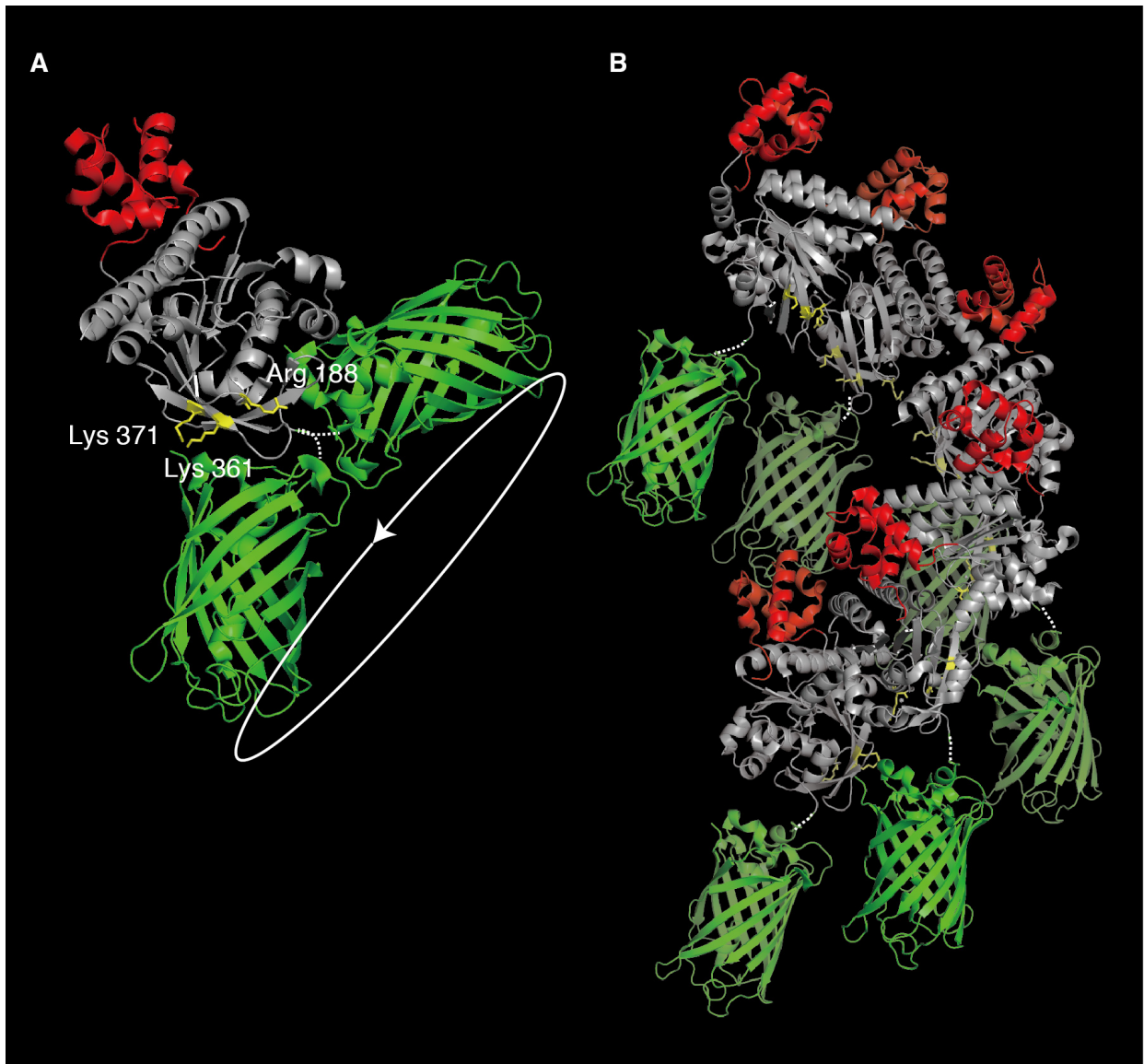


図 14 RAD51-GFP フィラメントのモデル図

(A) RAD51-GFP 単体のモデル構造。それぞれ構造情報は、それぞれ出芽酵母 Rad51 (グレー, PDB ID; 3LDA)と EGFP (グリーン, PDB ID;2Y0G)を用いた。出芽酵母 Rad51 の secondary DNA binding site である、Arg188, Lys361, Lys371 の残基はそれぞれイエローで示した。また、Rad51 の N 末端ドメインをレッドで示している。白の破線はリンカー領域である、Pro-Val-Ala-Thr を表す。矢印はリンカーを介して付加された GFP の可動域を表す。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 7A より引用し、改変)

(B) RAD51-GFP フィラメントのモデル構造。白の垂線は、Rad51-GFP フィラメントの軸を示す。((Kobayashi *et al.*, 2014) Fig. 7B より引用し、改変)

端に付加された GFP は、DNA が RAD51 の secondary DNA binding site に近接するのを物理的に阻害し、RAD51 の相同組換え活性を阻害することが予想された。

## 4-2 減数分裂期組換えにおける RAD51 の機能

次に、減数分裂期組換えにおける RAD51 の機能について考察した。シロイヌナズナを用いた解析から、RAD51-GFP は相同組換え修復において機能しない一方で、減数分裂期組換え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ている (Da Ines *et al.*, 2013)。本研究の生化学的解析から、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見出した。したがって、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が考えられた。

本研究において、イネ RAD51 はイネ DMC1A 依存的な相同的対合反応を著しく促進することを明らかにした (図 9 A)。さらに、相同的対合活性が低下したイネ RAD51-GFP は、野生型と同様にイネ 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 (図 9 B)。これらのことから、DMC1 依存的な相同的対合反応の促進に RAD51 の相同組換え活性は必須ではないことが示唆された。また、RAD51 は相同的対合活性に加え、DMC1 依存的な相同的対合反応を促進する補助因子としての活性を有することが明らかになった。DMC1 依存的な相同的対合反応を促進する補助因子としての活性は、RAD51 の減数分裂特異的な機能であると考えられる。先行研究において、相同的対合活性が欠失した Rad51-II3A は Dmc1 依存的な相同的対合反応を促進することが示されている (Cloud *et al.*, 2012)。また、Rad51-II3A は単鎖 DNA に結合し、フィラメント構造を形成するが、三者複合体形成能および相同的対合活性は欠損していることが明らかになっている (Cloud *et al.*, 2012)。そのため、RAD51-GFP は、出芽酵母において報告され

た Rad51-II3A と機能的に類似していることがわかった。

RAD51 による DMC1 依存的な相同的対合反応の促進は、DMC1 濃度が suboptimal な条件において顕著にみられた (図 9, 図 12)。それに対して、DMC1 濃度が optimal な条件では RAD51 による活性化効率が低いことがわかっている (未発表データ)。DMC1 濃度が optimal な条件では、RAD51-DMC1 複合体形成よりも DMC1 複合体形成に平衡が偏るため、その活性化効率が低いのではないかと考えられる。

RAD51 および DMC1 は幅広い生物種間において高度に保存されている (Aboussekhra *et al.*, 1992; Basile *et al.*, 1992; Bishop *et al.*, 1992; Shinohara *et al.*, 1992, 1993; Habu *et al.*, 1996)。そこで、イネ RAD51 を用いて見出された DMC1 の補助因子としての活性が、ヒト RAD51 において保存されているかを調べた。解析の結果、ヒト RAD51 およびヒト RAD51-GFP は、ヒト DMC1 依存的な相同的対合反応を促進することが明らかになった (図 12 B)。これらの結果より、RAD51 が持つ DMC1 の補助因子として機能は、植物から哺乳類にまでわたる生物種間で保存されていることが示唆された。一方で、線虫やハエなどの一部の生物種においては DMC1 のオルソログが存在しない (Neale & Keeney, 2006)。そのため、これらの生物種における減数分裂期組換えは、DMC1 特異的な機能を要求しない RAD51 依存的な組換え反応であることが考えられる。出芽酵母やマウスの第一減数分裂期では、減数分裂期組換えの進行に伴い、減数分裂期特異的な染色体構造であるシナプトネマ複合体が形成される (Fraune *et al.*, 2012)。一方、DMC1 のオルソログが存在しない線虫やハエでは、シナプトネマ複合体が形成された後に減数分裂期組換えが行われる (Garcia-Muse & Boulton, 2007)。そのため、シナプトネマ複合体が先に形成されることが、DMC1 を要求しないことと繋がっているのかもしれない。今後の解析が期待される。

本研究において、DMC1 依存的な相同的対合反応の促進には、RAD51 の相同的対合活性は必須でないことが明らかになった (図 9, 12B)。したがって、RAD51 は相同的対合活性に加え、DMC1 依存的な相同的対合反応を促進する補助因子としての活性を有する。しかし、減数分裂期組換えにおいて、RAD51 がこれら二つの機能をどのように使い分けているかについては未だ不明である。出芽酵母における解析から、Rad51 依存的な組換え反応は Hed1、Mek1、Red1 によって抑制されており、これらの Rad51 依存的な組換え反応の抑制の解除は、相同染色体間での組換え効率の低下につながるということがわかっている (Busygina *et al.*, 2008, 2012; Niu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2014)。その中でも、Hed1 および Mek1 は Rad51 の補助因子である Rad54 との結合を阻害することで、Rad51 依存的な相同的対合活性を著しく低下させることが示されている (Busygina *et al.*, 2008, 2012; Niu *et al.*, 2009)。これらの RAD51 依存的な組換え反応の抑制機構により、RAD51 は相同組換え因子から DMC1 の補助因子へと切り替えられるのかもしれない。組換え活性が抑制された RAD51 は DMC1 の補助因子として機能し、その後の DMC1 を中心とした優先的な相同染色体間の組換えに関与することが考えられる。現在までに、Hed1 および Mek1 ホモログによる Rad51 依存的な組換え反応の抑制機構は、その他の生物種において見つかっていない。しかし、それと類似した機能を有するものがいくつか報告されている。シロイヌナズナでは、出芽酵母 Hop1 および Red1 のホモログである、ASY1 と ASY3 は DMC1 依存的な相同染色体間の組換え経路の選択に必須であることが報告されている (Sanchez-Moran *et al.*, 2007; Ferdous *et al.*, 2012)。また、マウスを用いた遺伝学的解析から、シナプトネマ複合体の構成因子である SYCP3 は、RAD51 依存的な姉妹染色体間での組換えを抑制することが示唆されている (Li *et al.*, 2011)。減数分裂期組換えの分子機構を理解する上で、RAD51 の抑制機構の解明は重要な課題である。

### 4-3 今後の展望

本研究では、RAD51 が DMC1 依存的な相同的対合反応を促進する補助因子としての活性を有することを生化学的手法により示した。これまでに、DMC1 依存的な組換え反応を活性化する補助因子 (RAD54B、HOP2-MND1 複合体、RAD51AP1、Swi5-Sfr1 複合体 Mei5-Sae3 複合体)が同定されており、その分子機構の解析がなされている (Hayase *et al.*, 2004; Tsubouchi *et al.*, 2004; Petukhova *et al.*, 2005; Enomoto *et al.*, 2006; Haruta *et al.*, 2006; Sarai *et al.*, 2006; Dray *et al.*, 2011; Murayama *et al.*, 2013)。これらの補助因子は DMC1 または RAD51 と直接相互作用し、それぞれの相同的対合反応および鎖交換反応を促進することが知られている。RAD54B は SWI/SNF2 ファミリーに属し、ATP 加水分解のエネルギーによって DNA にポジティブスーパーコイルを導入し、RAD51 および DMC1 の相同的対合反応および鎖交換反応を促進する (Sarai *et al.*, 2006)。HOP2-MND1 複合体、RAD51AP1、Swi5-Sfr1 複合体は DMC1 または RAD51 のフィラメント構造を安定化させることで、相同的対合反応および鎖交換反応を促進する (Petukhova *et al.*, 2005; Enomoto *et al.*, 2004, 2006; Haruta *et al.*, 2006; Dray *et al.*, 2011; Murayama *et al.*, 2013)。Mei5-Sae3 複合体は DMC1 の DNA 上への集積を促進することで、相同的対合反応および鎖交換反応を促進すると考えられている (Hayase *et al.*, 2004; Tsubouchi *et al.*, 2004)。しかし、RAD51 がどのようにして DMC1 依存的な相同的対合反応を促進するのか、その詳細なメカニズムについては不明である。減数分裂期組換えにおいて、RAD51 および DMC1 は DNA 二重鎖切断部位の近傍に局在し、両者が混在したフィラメントを形成することが考えられている (Bishop, 1994; Tarsounas *et al.*, 1999; Shinohara *et al.*, 2000)。さらに、RAD51 と DMC1 が相互作用するという報告もなされている (Masson *et al.*,

1999; Tarsounus *et al.*, 1999)。しかし、DNA 上で RAD51 および DMC1 がどのような複合体を形成するかについては明らかになっていない。RAD51-DMC1 複合体のモデルとして、RAD51 と DMC1 が混じり合ったヘテロのフィラメントを形成するモデルが考えられる。また、それぞれが独立したホモのフィラメントが特定の領域で形成するモデルが考えられる。今後、X 線結晶構造解析や一分子蛍光イメージングにより、これら RAD51-DMC1 複合体の詳細が明らかになることで、減数分裂期組換えの反応機構の詳細が明らかになると期待される。

本研究では、裸の DNA 上における RAD51 および DMC1 の生化学的解析を行った。しかし、真核生物のゲノム DNA はヌクレオソームを基本単位としたクロマチン構造を形成している。クロマチンは *in vitro* での RAD51 による相同的対合反応に対して阻害的である (Alexiadis and Kadonaga, 2002; Jaskelioff *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007; Sinha and Peterson, 2008)。クロマチンによる阻害効果は、クロマチンリモデリング因子である RAD54 やヒストンシャペロン Nap 1 によって解消されることが明らかにされている (Alexiadis and Kadonaga, 2002; Jaskelioff *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007; Sinha and Peterson, 2008; Machida *et al.*, 2014)。一方で、減数分裂期の細胞ではクロマチン構造に加え、シナプトネマ複合体と呼ばれる減数分裂期特異的な染色体構造が形成される (Fraune *et al.*, 2012)。生体内の減数分裂期組換えはシナプトネマ複合体上で行われるが、シナプトネマ複合体中で DMC1 および RAD51 がどのように相同組換え反応を触媒するのかについては全くわかっていない。したがって、減数分裂期組換えをより詳細に理解するためには、減数分裂期特異的なクロマチン構造を形成するシナプトネマ複合体上での、DMC1 および RAD51 が触媒する相同組換え反応のメカニズム解析が必要である。



## 引用文献

Aboussekhra, A., Chanet, R., Adjiri, A., and Fabre, F. (1992) Semidominant suppressors of Srs2 helicase mutations of *Saccharomyces cerevisiae* map in the RAD51 gene, whose sequence predicts a protein with similarities to procaryotic RecA proteins. *Mol. Cell Biol.* **12**, 3224-3234.

Aihara, H., Ito, Y., Kurumizaka, H., Yokoyama, S., and Shibata, T. (1999) The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA: structure and a DNA binding surface as revealed by NMR. *J. Mol. Biol.* **290**, 495–504.

Alexiadis V. and Kadonaga J.T. (2002). Strand pairing by Rad54 and Rad51 is enhanced by chromatin. *Genes Dev.* **16**, 2767–2771.

Allers T. and Lichten M. (2001) Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* **106**, 47–57.

Basile, G., Aker, M., and Mortimer, R.K. (1992) Nucleotide sequence and transcriptional regulation of the yeast recombinational repair gene RAD51. *Mol. Cell Biol.* **12**, 3235-3246.

Baumann, P., Benson, F.E., and West, S.C. (1996) Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell.* **87**, 757-766.

Benson, F.E., Stasiak, A., and West, S.C. (1994) Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA. *EMBO J.* **13**, 5764-5771.

Bishop, D.K., Park, D., Xu, L. and Kleckner, N. (1992) DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell.* **69**, 439-456.

Bishop, D.K. (1994) RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. *Cell.* **79**, 1081-92.

Bishop, D.K., and Zickler, D. (2004) Early decision; meiotic crossover interference prior to stable strand exchange and synapsis. *117*, 9-15.

Branzei, D. and Foiani, M. (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 297-308.

Bugreev, D.V., and Mazin, A.V. (2004) Ca<sup>2+</sup> activates human homologous recombination protein Rad51 by modulating its ATPase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 9988-9993.

Bugreev, D.V., Golub, E.I., Stasiak, A.Z, Stasiak, A., and Mazin, A.V. (2005). Activation of human meiosis-specific recombinase Dmc1 by Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem.* **280**, 26886-22695.

Bugreev, D.V., Pezza, R.J., Mazina, O.M., Voloshin, O.N., Camerini-Otero, R.D., and Mazin, A.V. (2011) The resistance of DMC1 D-loops to dissociation may account for the DMC1 requirement in meiosis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 56-60.

Busygina, V., Sehorn, M.G., Shi, I.Y., Tsubouchi, H., Roeder, G.S., and Sung, P. (2008) Hed1 regulates Rad51-mediated recombination via a novel mechanism. *Genes Dev.* **22**, 786-795.

Busygina, V., Saro, D., Williams, G., Leung, W.K., Say, AF, Sehorn, M.G., Sung, P., Tsubouchi, H. (2012) Novel attributes of Hed1 affect dynamics and activity of the Rad51 presynaptic filament during meiotic recombination. *J Biol Chem.* **287**, 1566-1575.

Chen, J., Villanueva, N., Rould, M.A., and Morrical, S.W. (2010) Insights into the mechanism of Rad51 recombinase from the structure and properties of a filament interface mutant. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4889-4906.

Chen, Z., Yang, H., Pavletich, N.P. (2008) Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature.* **453**, 489-494.

Cloud, V., Chan, Y.L., Grubb, J., Budke, B., Bishop, D.K. (2012) Rad51 is an accessory factor for Dmc1-mediated joint molecule formation during meiosis. *Science.* **337**, 1222-1225.

- Cole, F., Kauppi, L., Lange, J., Roig, I., Wang, R., Keeney, S., and Jasin, M. (2012) Homeostatic control of recombination is implemented progressively in mouse meiosis. *Nat. Cell Biol.* **4**, 424-430.
- Conway, A.B., Lynch, T.W., Zhang, Y., Fortin, G.S., Fung, C.W., Symington, L.S., and Rice, P.A. (2004) Crystal structure of a Rad51 filament. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 791-796.
- Da Ines, O., Degroote, F., Goubely, C., Amiard, S., Gallego, M.E., and White, C.I. (2013) Meiotic recombination in Arabidopsis is catalysed by DMC1, with RAD51 playing a supporting role. *PLoS Genet.* **9**, e1003787.
- Dray, E., Dunlop, M.H., Kauppi, L., San Filippo, J., Wiese, C., Tsai, M.S., Begovic, S., Schild, D., Jasin, M., Keeney, S., and Sung, P. (2011). Molecular basis for enhancement of the meiotic DMC1 recombinase by RAD51 associated protein 1 (RAD51AP1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **108**, 3560-3565.
- Enomoto, R., Kinebuchi, T., Sato, M., Yagi, H., Shibata, T., Kurumizaka, H., and Yokoyama S. (2004). Positive role of the mammalian TBPIP/HOP2 protein in DMC1-mediated homologous pairing. *J. Biol. Chem.* **279**, 35263–35272.
- Enomoto, R., Kinebuchi, T., Sato, M., Yagi, H., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S. (2006). Stimulation of DNA strand exchange by the human TBPIP/Hop2-Mnd1 complex. *J. Biol. Chem.* **281**, 5575–5581.
- Ferdous, M., Higgins, J.D., Osman, K., Lambing, C., Roitinger, E., Mechtler, K., Armstrong, S.J., Perry, R., Pradillo, M., Cuñado, N., and Franklin, F.C. (2012). Interhomolog crossing-over and synapsis in Arabidopsis meiosis are dependent on the chromosome axis protein AtASY3. *PLoS genetics* **8**, e1002507.
- Forget, A. L., Loftus, M. S., McGrew, D. A., Bennett, B. T., and Knight, K. L. (2007) The human Rad51 K133A mutant is functional for DNA double-strand break repair in human cells. *Biochemistry* **46**, 3566–3575.

Fraune J, Schramm S, Alsheimer M, and Benavente R. (2012) The mammalian synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Exp Cell Res.* **318**, 1340-1346.

Galkin, V. E., Wu, Y., Zhang, X-P., Qian, X., He, Y., Yu, X., Heyer, W.-D., Luo, Y., and Egelman, E. H. (2006) The Rad51/RadA N-terminal domain activates nucleoprotein filament ATPase activity. *Structure* **14**, 983–992.

Garcia-Muse, T. & Boulton, S.J. (2007) Meiotic recombination in *Caenorhabditis elegans*. *Chromosome Res.* **15**, 607-621.

Garner M.M., Revzin, A. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* **9**, 3047-3060.

Gibb, B., Ye, L.F., Kwon, Y., Niu, H., Sung, P., and Greene, E.C. (2014) Protein dynamics during presynaptic-complex assembly on individual single-stranded DNA molecules. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 893-900.

Gupta, R.C., Bazemore, L.R., Golub, E.I., and Radding, C.M. (1997) Activities of human recombination protein Rad51. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 463-468.

Habu, T., Taki, T., West, A., Nishimune, Y., and Morita, T. (1996) The mouse and human homologs of DMC1, the yeast meiosis-specific homologous recombination gene, have a common unique form of exon-skipped transcript in meiosis. *Nucleic Acids Res.* **24**, 470-477.

Haruta, N., Kurokawa, Y., Murayama, Y., Akamatsu, Y., Unzai, S., Tsutsui, Y., and Iwasaki H. (2006) The Swi5-Sfr1 complex stimulates Rhp51/Rad51- and Dmc1-mediated DNA strand exchange in vitro. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **9**, 823-830.

Hayase, A., Takagi, M., Miyazaki, T., Oshiumi, H., Shinohara, M., and Shinohara, A. (2004). A protein complex containing Mei5 and Sae3 promotes the assembly of the meiosis-specific RecA homolog Dmcl. *Cell.* **119**, 927–940.

Hikiba, J., Hirota, K., Kagawa, W., Ikawa, S., Kinebuchi, T., Sakane, I., Takizawa, Y., Yokoyama, S., Mandon-Pépin, B., Nicolas, A., Shibata, T., Ohta, K., Kurumizaka, H. (2008) Structural and functional analyses of the DMC1-M200V polymorphism found in the human population. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4181-4190.

Ishida, T., Takizawa, Y., Sakane, I. and Kurumizaka, H. (2008). The Lys313 residue of the human Rad51 protein negatively regulates the strand-exchange activity. *Genes Cells* **13**, 91–103.

Jaskelioff, M., Van Komen S., Krebs J.E., Sung P., and Peterson C.L. (2003). Rad54p is a chromatin remodeling enzyme required for heteroduplex DNA joint formation with chromatin. *J. Biol. Chem.* **278**, 9212–9218.

Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ikawa, S., Yokoyama, S. and Shibata, T. (2001). Homologous pairing promoted by the human Rad52 protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 35201–35208.

Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ishitani, R., Fukai, S., Nureki, O., Shibata, T., and Yokoyama, S. (2002) Crystal structure of the homologous-pairing domain from the human Rad52 recombinase in the undecameric form. *Mol Cell.* **10**, 359-371.

Kagawa, W., and Kurumizaka, H. (2010). From meiosis to postmeiotic events: uncovering the molecular roles of the meiosis-specific recombinase Dmc1. *FEBS J.* **277**, 590-598.

Keeney, S., Giroux, C.N., and Kleckner, N. (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell.* **88**, 375-384.

Keeney, S. (2008) Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. *Genome Dyn Stab.* **2**, 81-123.

Kinebuchi, T., Kagawa, W., Enomoto, R., Tanaka, K., Miyagawa, K., Shibata, T., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S. (2004) Structural basis for octameric ring formation and DNA interaction of the human homologous-pairing protein Dmc1. *Mol Cell.* **14**, 363-374.

- Kim, J.-S., Krasieva, T. B., Kurumizaka, H., Chen, D. J., Taylor, A. M. R., and Yokomori, K. (2005) Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **170**, 341–347.
- Kobayashi, W., Sekine, S., Machida, S., and Kurumizaka, H. (2014) Green fluorescent protein fused to the C terminus of RAD51 specifically interferes with secondary DNA binding by the RAD51-ssDNA complex. *Genes Genet Syst.* **89**, 169-179.
- Krejci L., Altmannova V., Spirek M. and Zhao X. (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.* **40**, 5795–5818.
- Kurumizaka, H., Aihara, H., Ikawa, S., Kashima, T., Bazemore, L. R., Kawasaki, K., Sarai, A., Radding, C. M., and Shibata, T. (1996) A possible role of the C-terminal domain of the RecA protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 33515–33524.
- Kurumizaka, H., Ikawa, S., Sarai, A., and Shibata, T. (1999) The mutant RecA proteins, RecAR243Q and RecAK245N, exhibit defective DNA binding in homologous pairing. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 83–91.
- Lee, J.Y., Terakawa, T., Qi, Z., Steinfeld, J.B., Redding, S., Kwon, Y., Gaines, W.A., Zhao, W., Sung, P., and Greene, E.C. (2015) Base triplet stepping by the Rad51/RecA family of recombinases. *Science.* **349**, 977-981.
- Li, X.C., Bolcun-Filas, E., and Schimenti, J.C. (2011). Genetic evidence that synaptonemal complex axial elements govern recombination pathway choice in mice. *Genetics.* **89**, 71-82.
- Lim, D.S., and Hasty, P.A. (1996) Mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol Cell Biol.* **16**, 7133-7143.
- Liu, Y., Gaines, W.A., Callender, T., Busygina, V., Oke, A., Sung, P., Fung, J.C., and Hollingsworth, N.M. (2014) Down-regulation of Rad51 activity during meiosis in yeast prevents competition with Dmc1 for repair of double-strand breaks. *PLoS Genet.* **10**, e1004005.

Machida S., Takaku M., Ikura M., Sun J., Suzuki H., Kobayashi W., Kinomura A., Osakabe A., Tachiwana H., Horikoshi Y., Fukuto A., Matsuda R., Ura K., Tashiro S., Ikura T. and Kurumizaka H. (2014) Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1. *Sci. Rep.* **4**, doi: 10.1038/srep04863.

Maeshima, K., Morimatsu, K., and Horii, T. (1996) Purification and characterization of XRad51.1 protein, *Xenopus* RAD51 homologue: recombinant XRad51.1 promotes strand exchange reaction. *Genes Cells.* **1**, 1057-1068

Mandon-Pépin, B., Derbois, C., Matsuda, F., Cotinot, C., Wolgemuth, D.J., Smith, K., McElreavey, K., Nicolas, A., and Fellous, M. (2002) Human infertility: meiotic genes as potential candidates. *Gynecol. Obstet. Fertil.*, **30**, 817–821.

Mandon-Pépin, B., Touraine, P., Kuttann, F., Derbois, C., Rouxel, A., Matsuda, F., Nicolas, A., Cotinot, C., and Fellous, M. (2008) Genetic investigation of four meiotic genes in women with premature ovarian failure. *European J. Endocrinol.*, **158**,107–115.

Martini, E., Diaz, R.L., Hunter, N., and Keeney, S. (2006) Crossover homeostasis in yeast meiosis. *Cell.* **126**, 285-295.

Masson, J.Y., Davies, A.A., Hajibagheri, N., Van Dyck, E., Benson, F.E., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., and West, S.C. (1999) The meiosis-specific recombinase hDmc1 forms ring structures and interacts with hRad51. *EMBO J.* **8**, 6552-6560.

Matsuo, Y., Sakane, I., Takizawa, Y., Takahashi, M., and Kurumizaka, H. (2006) Roles of the human Rad51 L1 and L2 loops in DNA binding. *FEBS J.* **273**, 3148-3159.

Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature.* **455**, 770-774.

Morozumi, Y., Ino, R., Ikawa, S., Mimida, N., Shimizu, T., Toki, S., Ichikawa, H., Shibata, T., and Kurumizaka, H. (2013) Homologous pairing activities of two rice RAD51 proteins,

RAD51A1 and RAD51A2. *PLoS One* **8**, e75451.

Murayama, Y., Kurokawa, Y., Tsutsui, Y., and Iwasaki, H. (2013). Dual regulation of Dmc1-driven DNA strand exchange by Swi5-Sfr1 activation and Rad22 inhibition. *Genes Dev.* **27**, 2299-2304.

Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W.R. and Gloor, G.B. (1994). Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Mol. Cell Biol.* **14**, 1613-1625.

Neale, M.J. & Keeney, S. (2006). Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. *Nature* **442**, 153-158.

Niu, H., Wan, L., Busygina, V., Kwon, Y., Allen, J.A., Li, X., Kunz, R.C., Kubota, K., Wang, B., Sung, P., Shokat, K.M., Gygi, S.P., and Hollingsworth, N.M. (2009) Regulation of meiotic recombination via Mek1-mediated Rad54 phosphorylation. *Mol Cell.* **36**, 393-404.

Ogawa, T., Yu, X., Shinohara, A., Egelman, E.H. (1993) Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. *Science.* **259**, 1896-1899.

Passy, S.I, Yu, X., Li, Z., Radding, C.M., Masson, J.Y., West, S.C., and Egelman, E.H. (1999) Human Dmc1 protein binds DNA as an octameric ring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 10684-10688.

Petronczki, M., Siomos, M.F., Nasmyth, K. (2003) Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell.* **112**, 423-40.

Petukhova, G.V., Pezza, R.J., Vanevski, F., Ploquin, M., Masson, J.Y., and Camerini-Otero, R.D. (2005) The Hop2 and Mnd1 proteins act in concert with Rad51 and Dmc1 in meiotic recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 449-453.

Pittman, D.L., Cobb, J., Schimenti, K.J., Wilson, L.A., Cooper, D.M., Brignull, E., Handel, M.A., and Schimenti, J.C. (1998) Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis



in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell.* **1**, 697-705.

Renkawitz, J., Lademann, C. A., and Jentsch, S. (2014) Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 369-383.

Reymer, A., Frykholm, K., Morimatsu, K., Takahashi, M., and Nordén, B. (2009) Structure of human Rad51 protein filament from molecular modeling and site-specific linear dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **106**, 13248-53.

Roeder, GS. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev.* **15**, 2600-2621 (1997).

Sakane, I., Kamataki, C., Takizawa Y, Nakashima M, Toki S, Ichikawa H, Ikawa S, Shibata T, Kurumizaka H. (2008). Filament formation and robust strand exchange activities of the rice DMC1A and DMC1B proteins. *Nucleic Acids Res.* **6**, 4266-4276.

Sanchez-Moran, E., Santos, J.L., Jones, G.H., and Franklin, F.C. (2007). ASY1 mediates AtDMC1-dependent interhomolog recombination during meiosis in Arabidopsis. *Genes & development.* **21**, 2220–2233.

San Filippo, J., Sung, P., and Klein, H. (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 229-257.

Sarai, N., Kagawa, W., Kinebuchi, T., Kagawa, A., Tanaka, K., Miyagawa, K., Ikawa, S., Shibata, T., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S. (2006). Stimulation of Dmc1-mediated DNA strand exchange by the human Rad54B protein. *Nucleic Acids Res.* **34**, 4429-4437.

Schwacha, A., and Kleckner, N. (1997) Interhomolog bias during meiotic recombination: meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway. *Cell.* **190**, 1123-1135.

Sehorn, M.G., Sigurdsson, S., Bussen, W., Unger, V.M., and Sung, P. (2004). Human meiotic recombinase Dmc1 promotes ATP-dependent homologous DNA strand exchange. *Nature.* **429**, 433-437.

Sinha M. and Peterson, C.L. (2008). A Rad51 presynaptic filament is sufficient to capture nucleosomal homology during recombinational repair of a DNA double-strand break. *Mol. Cell* **30**, 803–810.

Shibata, T., DasGupta, C., Cunningham, R.P., and Radding, C.M. (1979) Purified *Escherichia coli* recA protein catalyzes homologous pairing of superhelical DNA and single-stranded fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **76**, 1638-1642.

Shinohara, A., Ogawa, H. and Ogawa, T. (1992) Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell*. **69**, 457-470.

Shinohara, A., Ogawa, H., Matsuda, Y., Ushio, N., Ikeo, K., and Ogawa, T. (1993) Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nat. Genet.* **4**, 239-243.

Shinohara, M., Gasior, S.L., Bishop, D.K., and Shinohara, A. (2000) Tid1/Rdh54 promotes colocalization of rad51 and dmc1 during meiotic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 10814-10819.

Shinohara, M., Oh, S.D., Hunter, N., and Shinohara, A. (2008) Crossover assurance and crossover interference are distinctly regulated by the ZMM proteins during yeast meiosis. *Nat. Genet.* **40**, 299-309.

Sonoda, E., Sasaki, M.S., Buerstedde, J.M., Bezzubova, O., Shinohara, A., Ogawa, H., Takata, M., Yamaguchi-Iwai, Y., and Takeda S. (1998) Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J.* **17**, 598-608.

Sung, P. (1994) Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science*. **265**, 1241-1243

Sung, P. and Klein, H. (2006) Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 739-750.

Symington, L. S. (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 630–670.

Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., and Stahl, F.W. (1983) The double-strand-break repair model for recombination *Cell*. **33**, 25-35.

Tarsounas, M., Morita, T., Pearlman, R.E., and Moens, P.B. (1999) RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J. Cell Biol.* **147**, 207-220.

Tashiro, S., Walter, J., Shinohara, A., Kamada, N., and Cremer, T. (2000) Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin. *J. Cell Biol.* **150**, 283–291.

Tsubouchi, H., and Roeder, G.S. (2004). The budding yeast *mei5* and *sae3* proteins act together with *dmc1* during meiotic recombination. *Genetics*. **168**, 1219-1230.

Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., and Morita, T. (1996) Targeted disruption of the *Rad51* gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*. **93**, 6236-6240.

Uringa, E.J., Baldeyron, C., Odijk, H., Wassenaar, E., van Cappellen, W.A., Maas, A., Hoeijmakers, J.H., Baarends, W.M., Kanaar, R., and Essers, J. (2015) A *mRad51*-GFP antimorphic allele affects homologous recombination and DNA damage sensitivity. *DNA Repair (Amst)*. **25**, 27-40.

West, S.C. (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 435-445.

Yoshida, K., Kondoh, G., Matsuda, Y., Habu, T., Nishimune, Y., and Morita, T. (1998) The mouse *RecA*-like gene *Dmc1* is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell*. **1**, 707-718.

Yu, D. S., Sonoda, E., Takeda, S., Huang, C. L., Pellegrini, L., Blundell, T. L., and Venkitaraman, A. R. (2003) Dynamic control of Rad51 recombinase by self-association and interaction with BRCA2. *Mol. Cell* **12**, 1029–1041.

Yu, X., Jacobs, S. A., West, S. C., Ogawa, T., and Egelman, E. H. (2001) Domain structure and dynamics in the helical filaments formed by RecA and Rad51 on DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 8419–8424.

Zhang, Z., Fan H.-Y., Goldman J.A. and Kingston R.E. (2007). Homology-driven chromatin remodeling by human RAD54. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 397–405.

Zhou, Y., Caron, P., Legube, G., and Paull, T.T. (2014) Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells. *Nucleic Acids Res.* **42**, e19.

石田恭子 (2010). ヒト RAD51 バリエントの機能解析と RAD51 活性制御分子に関する研究. 早稲田大学

高久誉大 (2010) 早稲田大学, 新規相同組換え修復タンパク質ヒト EVL の機能解析. 早稲田大学

引場樹里 (2009). 減数分裂期組換えに関わる DMC1 タンパク質の構造・機能解析. 早稲田大学

## 謝辞

このような研究を行う機会を与えてくださり、研究全般のご指導ご鞭撻を賜りました、早稲田大学理工学術院教授 胡桃坂仁志先生に心より御礼申し上げます。

研究全般における基本的な操作のご指導をはじめ、ご助言や議論して頂きました、National Institute of Environmental Health Sciences 研究員 高久誉大博士、並びに早稲田大学理工学術院助教 町田晋一博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、様々な支援を頂きました胡桃坂研究室の皆様に心より感謝致します。

最後に研究生活を送る上で、常に多大なるサポートをしてくれた家族に感謝致します。

## 研究業績

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, Awaji, Hyogo, Japan.</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, Gotenba, Shizuoka, Japan</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, Asilomar, CA, USA.</p> <p>・国内学会発表</p> <p>○<u>小林航</u>、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>○<u>小林航</u>、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>

講演	<p>○<u>小林航</u>、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>○<u>小林航</u>、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>○<u>小林航</u>、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 Schölgerhofer 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>