

博士論文審査報告書

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

2016年2月

生物の遺伝情報は、ゲノム DNA として保持されている。真核生物の多くは、有性生殖を行うことによってゲノム DNA を組み合わせることで、新たな遺伝子セットを有する個体を形成する。この有性生殖によるゲノム DNA の再編により、進化の過程を経て生物はその多様性を獲得してきた。二倍体生物では、雌雄それぞれ由来の染色体セット（相同染色体）を保有しているが、減数分裂を経て一倍体細胞である配偶子を形成する。

相同染色体間では、基本的に DNA 配列はほぼ同じであるが同一ではない。一方で、DNA 複製によって形成された二分子の染色体は、姉妹染色分体と呼ばれ、同一の DNA 配列を有している。体細胞分裂では、DNA 複製後、姉妹染色分体がそれぞれ娘細胞へと分配される。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。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、相同組換え反応によって、相同染色体間を物理的に連結させるキアズマが形成される。キアズマは、正確な染色体分配に重要な役割を果たすことが、キアズマの形成不全による染色体の不均衡分配などの事実から明らかになった。このような染色体分配異常は、不妊症やダウン症の原因となることが知られている。このキアズマ形成による染色体の乗換えは、相同染色体間の物理的な連結形成と同時に、相同染色体間の DNA 配列情報の交換を引き起こすため、ゲノム DNA 配列の変動が引き起こされる。

相同組換えは、減数分裂期のみならず、体細胞においても重要な機能を有している。体細胞での相同組換えは、電離放射線や DNA 複製時のエラー等の内外的な要因によって生じる DNA 二重鎖切断損傷を修復する経路として働く。相同組換えにおいて、二重鎖切断部位に形成される単鎖 DNA が、相同な配列をもつ二重鎖 DNA との間でヘテロ二重鎖 DNA を形成する過程、すなわち相同的対合反応は重要である。真核生物において相同的対合反応は、相同組換え酵素 RAD51 および DMC1 によって触媒されることが、これまでに明らかにされている。興味深いことに、RAD51 は体細胞および減数分裂期の細胞の両方において発現しているのに対し、DMC1 は減数分裂期特異的に発現して機能する。このことは、減数分裂期組換えが、RAD51 と DMC1 の両者が協調して働くことで成し遂げられていることを示している。また、マウスを用いた遺伝学的解析から、*RAD51* 遺伝子の欠損は胎生致死を示すのに対して、*DMC1* 遺伝子の欠損は胎生致死には至らずに、キアズマ形成不全による不妊となる。これらの事実から、DMC1 は減数分裂期でのキアズマ形成に必須の因子であり、減数分裂期組換えに特化した重要な役割を担うことが明らかになっている。RAD51 は体細胞における相同組換え修復の中心的酵素であるが、DMC1 が存在する減数分裂期での相同組換えにおける機能と役割については未だ不明瞭な点が多い。したがって、RAD51 の減数分裂期組換えにおける機能を明らかにすることは、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と言える。

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、減数分裂期組換えの効率は野生型と同程度であることが報告された。このことは、*RAD51*-GFP は、*RAD51* の体細胞での DNA 組換え修復には機能欠損を示すが、その減数分裂期特異的な機能は保持していることを示唆した。これらの事実から、本論文では、*RAD51*-GFP の機能的な欠損を生化学的に明らかにすることで、*RAD51* の体細胞での機能と減数分裂期特異的な機能とを理解することができると考えた。本論文は 4 章から構成されており、以下に各章の概要と評価を記す。

第 1 章は、本論文の背景となる減数分裂期組換え機構の概要、*RAD51* と *DMC1* の機能に関するこれまでの研究の概要が記述されている。これまでの研究によって解明されていることや、今後の研究において明らかにすることが求められている問題について記載されており、本論文の当該分野における重要性と意義が議論されている。

第 2 章では、リコンビナントタンパク質の精製方法や、生化学的解析に用いた基質 DNA および試験管内での相同組換え反応解析系など、本論文において行われた実験を遂行するための手法について記述している。明確な手法の説明と解析のための基礎的な情報が記載されており、実験の原理や意図が理解できるように分かり易く説明されている。

第 3 章では、本論文によって得られた結果について記述されている。*RAD51*-GFP の生化学的解析を行うために、植物の *RAD51* の代表として、イネ (*Oryza sativa subsp. Japonica*) 由来の *RAD51* (*RAD51A1* および *RAD51A2* の 2 種類) に着目した。イネ *RAD51A1*、*RAD51A2*、*RAD51A1*-GFP、*RAD51A2*-GFP をそれぞれリコンビナントタンパク質として精製する系を確立し、大腸菌を用いた発現系によって高純度に精製することに成功している。そして、それらのタンパク質を材料として用いて、相同的対合反応を生化学的に解析している。シロイヌナズナを用いた先行研究において、*RAD51*-GFP は体細胞における相同組換え修復において機能しないことがわかっている。そこで、*RAD51*-GFP の相同的対合活性を評価したところ、その結果、イネ *RAD51*-GFP は、相同的対合活性において著しい低下を示すことが明らかになった。一方で、*RAD51*-GFP の DNA 結合活性および ATP 加水分解活性を評価したところ、野生型 *RAD51* 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ステップである、*RAD51*-単鎖 DNA-二重鎖 DNA の三者複合体形成能について評価した。その結果、*RAD51*-GFP の三者複合体形成能は、野生型 *RAD51* と比較して著しく低下していることを明らかにした。以上の実験結果より、*RAD51*-GFP は体細胞における相同組換え修復においては、相同的対合活性に欠損を示すため機能しないことを示すことができた。減数分裂期の細胞では、*RAD51* に加えて

DMC1 が存在している。そこで、減数分裂期組換えにおいては、RAD51 は DMC1 と共同的に働くと考え、相同組換え活性が顕著に低下した RAD51-GFP と DMC1 両者の存在下における相同的対合反応の解析を行った。その結果、RAD51-GFP は DMC1 依存的な相同的対合反応を促進することを見出した。この発見は、減数分裂期組換えにおいて、RAD51 は 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機能を有することを証明すると同時に、体細胞と減数分裂期の細胞では RAD51 の機能が異なっていることを明らかにしている。言い換えると、DMC1 依存的な相同的対合反応の促進には、RAD51 の組換え活性は必須でないことを示している。さらに、ヒト由来の RAD51 および DMC1 を用いて同様の解析を行い、RAD51 が有する DMC1 の補助因子としての機能は、ヒトにおいても保存されていることを明らかにした。以上の研究成果は、減数分裂期組換えにおける RAD51 の機能を生化学的に明らかにしたものであり、減数分裂期組換えの分子機構の理解に関して重要な知見を与えている。また、体細胞分裂期と減数分裂期の両細胞での、相同組換え機構の違いに新たな知見を与えている。したがって本章の研究成果は、当該分野の発展に多大な貢献をしていると判断できる。

第 4 章では、第 3 章で示した研究成果とこれまでに明らかにされている知見を総括し、減数分裂期組換えにおける RAD51 の機能と役割について考察している。出芽酵母 Rad51 の立体構造から構築した RAD51-GFP 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メカニズムについて議論されている。また、本論文によって得られた知見から、今後の研究についての更なる展開について言及されている。

以上より、本論文は RAD51 変異体を用いた解析により、体細胞分裂期と減数分裂期での相同組換えにおける RAD51 の機能の差異を明らかにし、特に減数分裂期組換えでの RAD51 と DMC1 との協同メカニズムを解明したものである。RAD51 と DMC1 は相同組換えの中心酵素であり、これらの機能解明は当該分野の中心課題であり、本論文の当該領域への貢献は大きいと考える。したがって、本論文は博士(理学)の学位論文として、十分価値のあるものであると判断できる。

2016 年 1 月

審査員

主査	早稲田大学教授	博士 (学術) 埼玉大学	胡桃坂 仁志
	早稲田大学教授	薬学博士 (九州大学)	柴田 重信
	理化学研究所名誉研究員	理学博士 (東京大学)	柴田 武彦