

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

Structural and functional analyses  
of the DMC1 protein in meiotic recombination

2009 年 2 月

早稲田大学大学院 理工学研究科  
電気・情報生命専攻 構造生物学研究

引場 樹里

目次	1
略語一覧	4
第 1 章 序論	
1-1. はじめに	5
1-2. 減数分裂	5
1-3. 減数分裂期組換え	9
1-4. 減数分裂期組換え酵素 DMC1	11
1-5. 一塩基多型 (SNP) と疾患	16
1-6. 卵子の形成と早期卵巣不全 (POF)	17
1-7. 本研究について	19
第 2 章 DMC1-M200V バリエントの構造・機能解析	
2-1. 背景	21
2-2. 材料および実験方法	
2-2-1. DNA	22
2-2-2. DMC1、DMC1-M200V の精製	25
2-2-3. RPA の精製	26
2-2-4. glutaraldehyde による架橋実験	27
2-2-5. ゲルシフトアッセイ法	28
2-2-6. D-loop アッセイ法	28
2-2-7. strand-exchange アッセイ法	29
2-2-8. ATP 加水分解活性	29
2-2-9. DMC1-M200V の結晶化	30

2-2-10.	X線回折データの収集	30
2-2-11.	円偏光二色性 (CD) スペクトル解析	31
2-3. 結果と考察		
2-3-1.	DMC1-M200V の精製	31
2-3-2.	glutaraldehyde による架橋実験	33
2-3-3.	DMC1-M200V の結晶化および結晶構造解析	33
2-3-4.	DMC1-M200V の熱安定性の解析	36
2-3-5.	DMC1-M200V の相同 DNA 対合活性	36
2-3-6.	DMC1-M200V による DNA 鎖交換活性	38
2-3-7.	DMC1-M249V 変異体の生化学的解析	40
2-3-8.	DMC1-R252G、DMC1-R252S 変異体の解析	44
第3章 DMC1-I37N バリエントの生化学的解析		
3-1.	背景	47
3-2.	材料および実験方法	
3-2-1.	DNA	48
3-2-2.	DMC1-I37N の精製	49
3-2-3.	ゲルシフトアッセイ法	49
3-2-4.	D-loop アッセイ法	49
3-2-5.	strand-exchange アッセイ法	49
3-2-6.	ATP 加水分解活性	50
3-2-7.	円偏光二色性 (CD) スペクトル解析	51

3-3. 結果と考察	
3-3-1. DMC1-I37N の精製	51
3-3-2. DMC1-I37N の CD スペクトル解析	51
3-3-3. DMC1-I37N の ATP 加水分解活性	53
3-3-4. DMC1-I37N による DNA 鎖交換活性	55
3-3-5. DMC1-WT、DMC1-I37N 共存下における DNA 鎖交換活性	57
3-3-6. DMC1-I37N の DNA 結合活性	57
第4章 総合討論	
4-1. DMC1 バリアントの相同 DNA 組換え活性	
4-1-1. DMC1-M200V の相同 DNA 組換え活性	62
4-1-2. DMC1-I37N の相同 DNA 組換え活性	67
4-2. 研究の展望	68
引用文献	71
謝辞	89
研究業績	91

## 略語一覽

ATP	adenosine 5'-triphosphate
bp	base pair
dsDNA	double-stranded deoxyribonucleic acid
CD	circular dichroism
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny] ethanesulfonic acid
HhH	Helix-hairpin-Helix
IPTG	isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside
JM	joint molecule
NC	nicked circular dsDNA
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
OD	optical density
pH	hydrogen ion concentration index
POF	premature ovarian failure
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SNP	single nucleotide polymorphism
ssDNA	single-stranded deoxyribonucleic acid
Tris	Tris hydroxymethyl aminomethane
VNTR	variable number of tandem repeat

## 第1章 序論

### 1-1. はじめに

ヒトをはじめとした多くの生物はDNAを担体として遺伝情報を保持している。生物は細胞を基本単位とし、その中にDNAを収納している。細胞分裂の際に、親細胞から娘細胞にゲノムDNAが受け継がれる。このゲノムDNAの配列が進化の過程で変動することにより、配列情報の差異が生じて、300万種を超える生物種が生ま出された。特に、真核生物は、減数分裂による配偶子の形成、受精によるゲノムの再編によって、種の多様性を生み出している。一方、ゲノムDNAは、紫外線や放射線などの外的要因、DNA複製時のエラーや活性酸素などの内的要因により、常に損傷を受けている。DNA損傷によりDNAに変異が蓄積すると、細胞死や癌化などを引き起こすことが知られている。生物は多様なDNA損傷を修復するためにDNA損傷修復機構を備え、ゲノムDNA配列の恒常性の維持に努めている。このように生物はゲノムDNAの安定維持と配列情報の流動化という、相反する機能を有して生命体を維持しているのである。

### 1-2. 減数分裂

胞子や卵子・精子などの配偶子ができる際の細胞分裂を減数分裂という。1883年にE. van Benedenらにより、線虫の一種*Ascaris*の配偶子の核には、2本の染色体のみが含まれ、受精によって4本の染色体を含む接合子を形成することが発見され、以降の研究に影響を与えた (Hamoir, 1992; Petronczki et al., 2003)。

有性生殖を行う多くの生物には、2本の染色体を一对とした常染色体と性別により保有数の異なる性染色体が含まれている。このような生物を二倍体生物と

よぶ。これら一対の常染色体は一方が父親由来、もう一方が母親由来であり、この2つの染色体のDNA配列情報は酷似しているが、同一ではないので相同染色体とよばれる。それに対して、同じ染色体から複製された2本の染色体を姉妹染色分体という。

体細胞分裂では、DNA複製後、姉妹染色分体がコヒーシンという分子の働きで付着した状態になっており、付着したままの姉妹染色分体の動原体が紡錘体の両極と結合し、その後、コヒーシンが壊れて姉妹染色分体間の結合が解離する。この結合の解離後、姉妹染色分体が紡錘体の両極へと分離されることで、均等に染色体が分配される (図 1B)。そのため、体細胞分裂で生じた娘細胞には、父親由来・母親由来の両方の染色体が含まれ、最終的には遺伝的に同一の娘細胞が2つできる (Alberts et al.,2002; Dej and Orr-Weaver, 2000) (図 1B)。

一方、減数分裂は1回のDNA複製後、2回の細胞分裂を行い、一倍体の配偶子(精子・卵子)を形成する。1回目の分裂(第一減数分裂)で、倍加した相同染色体どうしが対合して娘細胞に分配され、2回目の分裂(第二減数分裂)で姉妹染色分体が分離し、一倍体の配偶子を作り出す(図 1A)。このように細胞分裂により二倍体の細胞から一倍体の配偶子が形成され、染色体が半減することから、減数分裂(meiosis: 減少を意味するギリシャ語)と呼ばれる。DNA複製の完了後から減数分裂が開始されるまでの間には、長い減数分裂前期が存在する(図 1A ②-⑤)。倍加した相同染色体同士が対合し、4本の姉妹染色分体からなる二価染色体を形成する。対合した相同染色体では、父親由来の染色体の一部と母親由来の相同な染色体が部分的に交換される遺伝的組換えが起こり(図 1A③)、相同染色体間の物理的な連結であるキアズマが形成される(図 1A④)。中期には、2個の相同染色体が紡錘体に結合し(図 1A⑤)、その後、二価染色体が相同染色体に分離し、紡錘体の両側に移動して細胞は分裂する(図 1A⑥)。減数分裂の第二

分裂は、体細胞分裂とほぼ同じである。DNAの複製が起こらずに、2個の姉妹染色分体に結合する紡錘体が形成され、この紡錘体が体細胞分裂と同様に姉妹染色分体の動原体に結合する(図1A⑦)。それにより、姉妹染色分体間には紡錘体による張力が生じ、均等に分離される(Alberts et al.,2002; Dej and Orr-Weaver, 2000)(図1A⑧)。減数分裂において、交差によって生じたキアズマは(図1A④)、正確な染色体分離において重要な役割を果たしている。キアズマは、第一分裂期の後期に紡錘体により両極に引き離されるまで相同染色体間を一つにまとめている(Carpenter, 1994)。このキアズマが形成されないと、第一分裂の際に染色体が正しく並ぶことができず、染色体の不分離を引き起こす。すべての染色体間での乗換えは必須である。

減数分裂期の90%かそれ以上の時間は、第一減数分裂前期である。第一減数分裂前期は、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5段階に分けられる。まず、レプトテン期で、倍加した相同染色体が凝縮する。サイゴテン期では、相同染色体同士の対合が開始され、続いて、パキテン期では、シナプトネマ複合体と呼ばれる長いはしご状のタンパク質のコアを持つ特殊な構造が形成され始める。減数分裂期組換えは、このシナプトネマ複合体が形成される以前に行われると考えられている。対合の完了とともにパキテン期がはじまり、数日続き、ディプロテン期になると、相同染色体間の対合が解離しはじめ、キアズマが観察されるようになる。最後のディアキネシス期では、相同染色体同士が、キアズマで連結されたまま染色体分配装置である紡錘体の赤道面へ移動する。減数分裂期の各段階に要する時間は、種によっても、雄性配偶子か雌性配偶子かによっても異なる。しかし、減数分裂期の相同染色体の部分的交換により形成されるキアズマは、すべての生物種において必須である。



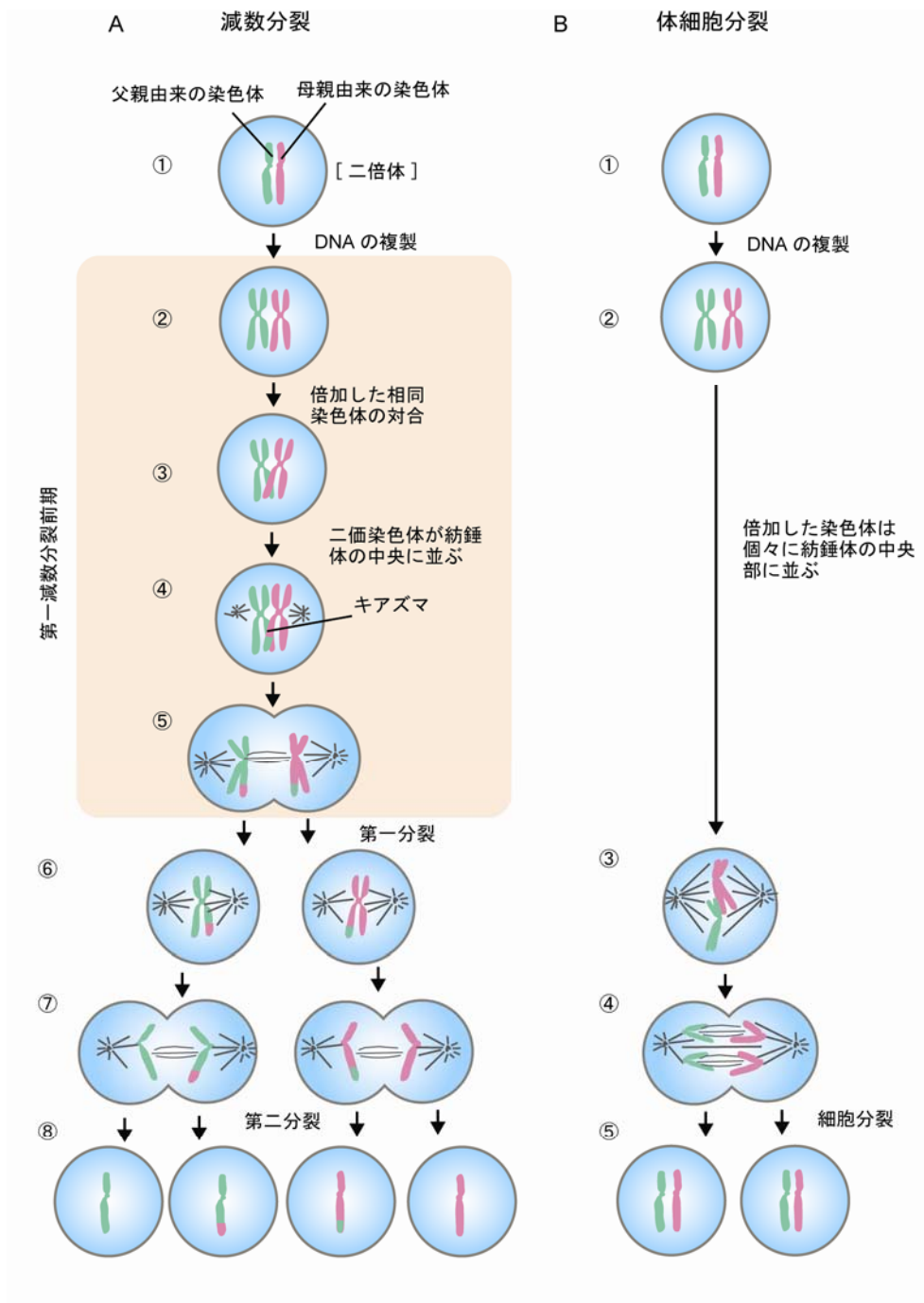


図1 減数分裂と体細胞分裂との比較

一对の相同染色体のみを示す。(A) 減数分裂では DNA 複製が行われた後、2 回の細胞分裂が起こることで、1 個の二倍体の細胞から 4 個の一倍体細胞が生じる。最初の核分裂の際に、相同染色体が対合し、組換えがおこることで、正しい染色体分配が保証され、遺伝的に異なる配偶子が形成される。(B) 体細胞分裂では、1 個の二倍体細胞から遺伝的に同一な 2 個の二倍体細胞が生じる。

### 1-3. 減数分裂期組換え

相同 DNA 組換えは、減数分裂期、体細胞分裂期の両方に機能している。減数分裂期の第一分裂期に引き起こされる減数分裂期組換えは、染色体の分離と DNA 配列の変動に依存した生物進化において重要な役割を担っている。一方、体細胞分裂期における相同 DNA 組換えは、紫外線や放射線、DNA 複製時のエラーなどにより引き起こされる DNA 二重鎖切断損傷を修復する際に重要な役割を果たす。

減数分裂期組換えでは、位置的、時間的に制御された DNA 二重鎖切断が導入されることで相同 DNA 組換えが開始される。DNA 二重鎖切断は、相同染色体の一方に Spo11 とよばれる減数分裂期特異的なエンドヌクレアーゼにより導入される (Keeney et al., 1997; Neale et al., 2005) (図 2①)。次に、二重鎖切断部位がエキソヌクレアーゼでプロセッシングされることにより、3' 突出型の単鎖 DNA 領域が形成される (Keeney et al., 1997; Bergerat et al., 1997; Neale et al., 2005; Neale and Keeney, 2006) (図 2②)。相同染色体間において、形成された単鎖 DNA と相同配列を持つ二重鎖 DNA が検索され、ヘテロ二重鎖とよばれる中間体を形成する (図 2③)。この過程を相同 DNA 対合反応という。相同 DNA 対合反応がおこると、ヘテロ二重鎖領域が拡大し、単鎖 DNA と二重鎖 DNA により形成された分岐点が移動する。これを DNA 鎖交換反応という (Neale and Keeney, 2006; Bishop, 2006) (図 2④)。その後、相同な二本鎖に入り込んだ一本鎖 DNA の 3' 末端をプライマーとして新たに DNA が合成されて (図 2⑤)、ヘテロ二重鎖領域が更に広げられる。切断された DNA と相手方の DNA が結合し、Holliday 構造という組換え中間体が形成される (図 2⑥)。Holliday 構造がヌクレアーゼにより解離され、減数分裂期組換えは終了する (図 2⑦)。Holliday 構造の解離の仕方によって、交差型組換え体または非交差型である遺伝子変換型組換え体が生じる。

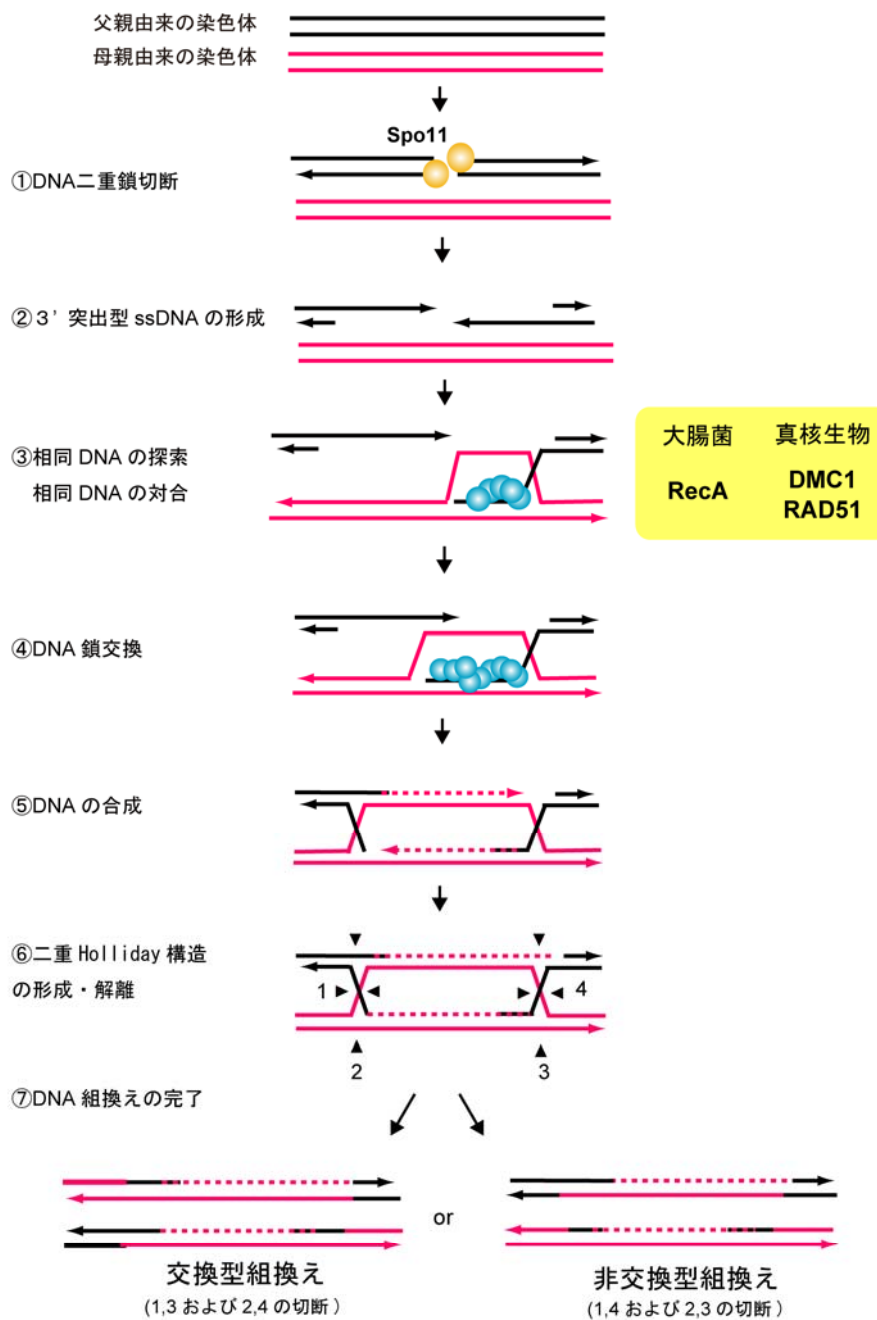


図2 減数分裂期組換えのモデル

Spo11 により、片側の DNA が切断される。二重鎖切断部位がエキソヌクレアーゼでプロセッシングされることにより、3' 突出型の単鎖 DNA 領域が形成される。形成された 3' 突出型の単鎖 DNA 領域に DMC1 および RAD51 が結合し、相同 DNA 対合反応・鎖交換反応がおこる。その後、相同な二本鎖に入り込んだ一本鎖 DNA の 3' 末端をプライマーとして新たに DNA が合成され、Holliday 構造が形成される。Holliday 構造がヌクレアーゼにより解離され、反応が完了する。

相同 DNA 組換え機構反応の要は、相同 DNA 対合反応および DNA 鎖交換反応である。この反応は、大腸菌の RecA により触媒される (Shibata et al., 1979; McEntee et al., 1979; Cox et al., 1981; Kahn et al., 1981; Shibata et al., 1982)。RecA は ATP を補因子として、単鎖 DNA と相同配列をもつ二重鎖 DNA の間でヘテロ二重鎖を形成する。そして、ATP の加水分解に伴い単鎖 DNA の 5' から 3' 方向にヘテロ二重鎖を伸長させ (分岐点移動)、DNA 鎖交換を行う (Cox et al., 1981; Kahn et al., 1981)。RecA は ATP 結合に依存して、相同鎖を検索していると考えられている (Shibata et al., 1979; McEntee et al., 1979; Cox et al., 1981; Kahn et al., 1981)。真核生物においては、大腸菌の RecA のホモログとして RAD51 と DMC1 が発見されている (Bishop et al., 1992; Shinohara et al., 1992)。RAD51 が体細胞分裂および減数分裂の両過程において働くのに対して DMC1 は減数分裂期のみ働いている。

#### 1-4. 減数分裂期組換え酵素 DMC1

DMC1 は、出芽酵母の減数分裂期組換え欠損株から減数分裂特異的な遺伝子として発見された (Bishop et al., 1992)。この DMC1 は大腸菌の RecA のホモログであり、酵母から植物、ヒトに至るまで幅広く保存されている (Habu et al., 1996)。真核生物における RecA のもうひとつのホモログとして、RAD51 が発見されている (Aboussekhra et al., 1992; Basile et al., 1992; Shinohara et al., 1992; Shinohara et al., 1993; Morita et al., 1993; Yoshimura et al., 1993)。DMC1 が減数分裂期特異的に働くのに対して (Bishop et al., 1992; Habu et al., 1996)、RAD51 は体細胞分裂期、減数分裂期の両方に働く (Shinohara et al., 1992; Shinohara et al., 1993)。Rad51 ノックアウトマウスは初期胎生致死になることが報告されている (Lim and Hasty, 1996; Tsuzuki et al., 1996)。Rad51 欠損ニワトリ DT40 細胞では、自発的な染色体

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)。一方、*Dmc1* ノックアウトマウスでは、胎生致死にはならず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 (Pittman et al., 1998; Yoshida et al., 1998)。また、*dmc1* 遺伝子を欠損させた酵母では、組換え中間体である二重鎖切断が蓄積し、シナプトネマ複合体の形成異常が観察され、減数分裂期組換えが抑制される (Bishop et al., 1992)。

RecA や RAD51 は DNA 依存的な ATP 加水分解能をもち、単鎖 DNA および二重鎖 DNA 結合能をもつ。RAD51 は単鎖 DNA に結合して、らせん状フィラメント構造を形成する。そして RAD51 のらせん状フィラメントが ATP 依存的に相同 DNA 対合反応と DNA 鎖交換反応を行う (Baumann et al., 1996; Sung, 1994)。減数分裂期特異的なホモログである DMC1 も、RAD51 と同様に DNA 依存的な ATP 加水分解能、単鎖 DNA および二重鎖 DNA 結合能を有し、ATP 依存的に相同 DNA 対合反応、DNA 鎖交換反応を行う (Li Z et al., 1997; Hong et al., 2001; Sehorn et al., 2004; Bugreev et al., 2005)。出芽酵母の解析により、DMC1 は姉妹染色体間ではなく相同染色体間の相同 DNA 組換えに優位に働くことが明らかにされた (Schwacha and Kleckner, 1997)。このことは、DMC1 は、減数分裂期にのみみられる過程、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。

DMC1 と RAD51 は互いに 50%以上のアミノ酸相同性を有しており、単量体の立体構造は非常に類似している (図 3D, E)。それにもかかわらず、異なった会合状態を示す。DMC1 は、DNA に 8 量体リング構造で結合するとの報告がなされており、X 線結晶構造解析の結果においても DMC1 は 8 量体リング構造を形成することが明らかにされた (Masson et al., 1999; Passy et al., 1999; Kinebuchi et al., 2004) (図 4A)。しかし、近年、電子顕微鏡観察により、DMC1 は単鎖 DNA 上で RAD51 と類似したらせん状フィラメント構造をも形成することが報告された

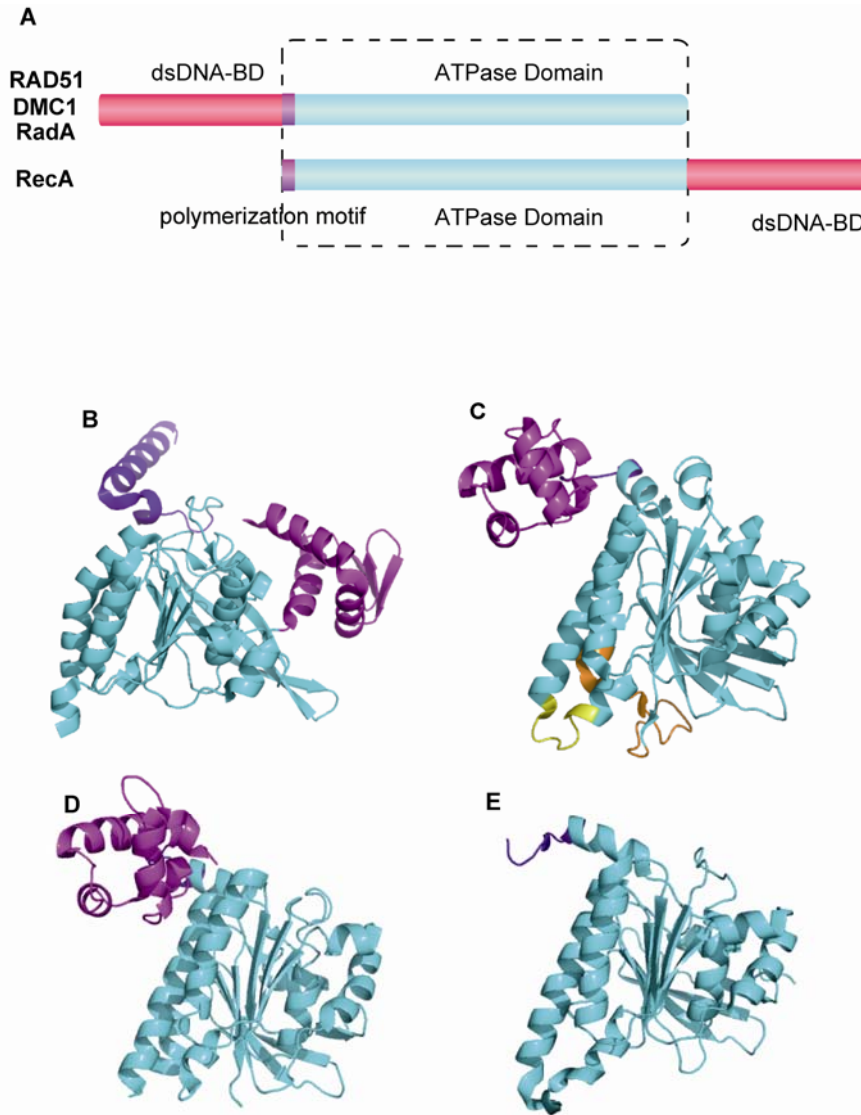


図3 RecA 類縁タンパク質の比較。(A) RecA 類縁タンパク質の domain 比較。RecA 類縁タンパク質間には保存されている ATPase domain を有する。(B) *Escherichia coli* RecA の立体構造 (PDB ID: 2REB)。polymerization motif (パープル)、C-terminal domain (マゼンタ)、ATPase domain (シアン) を示した。(C) *Methanococcus voltae* RadA の立体構造 (PDB ID: 1XU4)。N-terminal domain (マゼンタ)、polymerization motif (パープル)、ATPase domain (シアン)、L1-loop (イエロー)、L2-loop (オレンジ) を示した。(D) *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 の立体構造 (PDB ID: 1SZP)。N-terminal domain (マゼンタ)、polymerization motif (パープル)、ATPase domain (シアン) を示した。(E) *Homo sapiens* DMC1 の立体構造 (PDB ID: 1V5W)。polymerization motif (パープル)、ATPase domain (シアン) を示した。

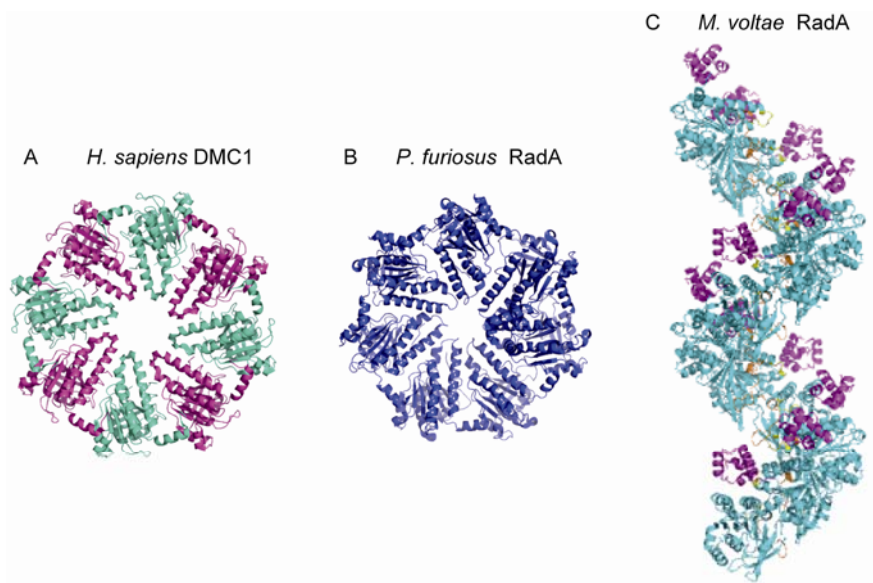


図 4 DMC1 および RadA タンパク質の立体構造。(A) DMC1 の 8 量体リング構造 (PDB ID: 1V5W)。(B) RadA の 7 量体リング構造 (PDB ID: 1PZN)。(C) RadA の filament 構造 (PDB ID: 1XU4)。N-terminal domain (マゼンタ)、ATPase domain (シアン)、L1-loop (イエロー)、L2-loop (オレンジ) を示した。

(Sehorn et al., 2004; Bugreev et al, 2005) (図 5)。

DMC1 の 8 量体リング構造のプロトマー間では、258 番目のグルタミン酸 (Glu: E) が、隣接した DMC1 のプロトマーのチロシン 194 (Tyr: Y)、アルギニン 192 (Arg: R)、アスパラギン 163 (Asn: N) の 3 つのアミノ酸と水素結合を形成し

ている (Kinebuchi et al., 2004)。この Glu258 は、RAD51 では保存されていないため、RAD51 と DMC1 の会合状態の差異の原因になると考えられる。8 量体リング構造である DMC1 は、これらの水素結合のため、DMC1–DMC1 間に位置する ATP 結合部位がタイトであり、リング構造には ATP が結合できないことが推測されている。そのため、DMC1 の 8 量体リング構造は不活性型であると考えられているが、相同 DNA 組換え反応における、らせん状フィラメント構造、8 量体リング構造、それぞれの機能については、未だ不明である。RAD51 や古細菌の RecA のホモログである RadA においても、らせん状フィラメント構造、7 量体リング構造の両方の立体構造解析が行われている (Conway et al., 2007; Wu et al., 2005; Shin et al., 2003) (図 4B, C)。

RecA においては、約 6.2 分子でらせんを 1 周するフィラメント構造が複数報告されている。その構造を比較すると、様々ならせんのピッチをもっていることが明らかになっている。らせんのピッチの幅は、72–97 Å とらせんによって異なり、RecA フィラメントの柔軟性を示唆している (Chen et al., 2008; VanLoock et al., 2003; Yu et al., 2001; Bell, 2005)。

DMC1 と RecA 類縁タンパク質群 (RAD51 や RadA) の一次配列を比較すると ATPase ドメインは高い相同性を示す (図 3A)。フィラメント構造において、フィラメントの内側に L1、L2 と呼ばれる DNA 結合ループが存在し(図 4C)、これ

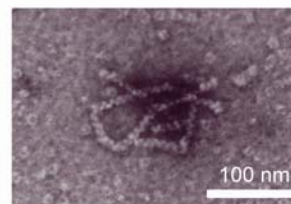


図 5 電子顕微鏡による DMC1 の観察像  
本学 胡桃坂研究室 滝沢由政氏より提供



らが相同 DNA 対合の活性中心であると考えられている (Matsuo et al., 2006; Chen et al., 2008)。一方、相同性を示さない領域、RecA の C 末端ドメインと DMC1、RAD51 および RadA の N 末端ドメインも存在する (図 3A)。RecA の C 末端ドメインと、RAD51 および RadA の N 末端ドメインは、立体構造上の相同性はみられなかったが (図 3B, C)、フィラメントの立体構造ではどちらも同じ位置に存在して溶媒に露出しており、これらのドメインが、DNA 結合能を有することが報告されている (Kurumizaka et al., 1996; Aihara et al., 1999; Aihara et al., 1997)。RecA の C 末端ドメイン、RAD51 の N 末端ドメインは、対合の活性中心と思われる L1 および L2 ループへのゲートウェイとして機能するというゲートウェイ仮説が提唱されている。DMC1 では、N 末端ドメインの立体構造が明らかになっていないが、N 末端ドメイン欠失変異体の解析から、DMC1 の N 末端領域も DNA 結合に重要であると考えられている (Kinebuchi et al., 2004; Kinebuchi et al., 2005)。フィラメント構造を形成した際には、他の RecA 同様、N 末端ドメインは、DNA をフィラメント内部へ誘導する役割を果たしている。

## 1-5. 一塩基多型 (SNP) と疾患

遺伝情報を担うゲノムDNAは、任意に選んだ 2 人の間では約 99.9%が同じ配列であるが、0.1%の配列に差異が存在する (International SNP Map Working Group, 2001; International HapMap Consortium, 2005)。このDNA配列の差異を遺伝子多型と呼ぶ。遺伝子多型には一から数十塩基の挿入や欠失、数塩基から数十塩基配列を 1 単位とする繰返し配列の回数が個人間で異なるもの (Variable Number of Tandem Repeat: VNTR) など様々な種類が存在する。遺伝子多型のうち一塩基が他の塩基に置換されているものを一塩基遺伝子多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) と呼ぶ。これらの一塩基多型は転写活性の違いやmRNAの

安定性の違いから、タンパク質の発現量に影響を与える場合がある。また、タンパク質のアミノ酸置換が引き起こされ、タンパク質の活性や構造などタンパク質の性質に影響を与える場合が考えられる。近年、SNP解析により、疾患関連遺伝子や特定薬剤反応性の個体差が急速に明らかになりつつある。既に、癌、心筋梗塞、糖尿病などをはじめとした数多くの疾患に関連する遺伝子が特定されている (Unoki et al., 2008; Shen et al., 2007; Ovarian Cancer Association Consortium, 2008)。DMC1にも多くの遺伝子多型が見つまっている。DMC1の遺伝子欠損株やマウスでは配偶子の形成異常を引き起こすことが知られており、DMC1遺伝子多型と不妊症との関連性が示唆されている。

## 1-6. 卵子の形成と早期卵巣不全 (POF)

卵母細胞は、始原生殖細胞が着床前期の発生初期から減数分裂期に入ることによって形成される。まず、始原生殖細胞が形成途中の生殖腺に移動し、レプトテン期、サイゴテン期、パキテン期を経て卵母細胞となり、第一減数分裂前期の最後のステージで停止する。その後、停止していた卵母細胞は、出生時にディプロテン期、ディアキネシス期へと進行し、決まった数の卵母細胞を卵巣に保持して出生すると考えられている (Telfer et al., 2005; Skaznik-Wikiel et al., 2007)。出生時に正常な卵母細胞が卵巣内に貯蓄されていることが、その後の卵子の成熟および排卵に重要である。

早期卵巣不全 (Premature Ovarian Failure: POF) は、40歳未満の女性における卵巣機能不全で不妊の原因の一つである (Nelson et al., 2005)。POFは、6ヵ月以上の月経の停止 (無月経) で、血中の卵胞刺激ホルモン (Follicle Stimulating Hormone: FSH) 値が40 IU/l 以上を呈する症例である (Coulam, 1982; Vegetti et al., 2000)。POFによる不妊症は比較的一般的な疾患であり、女性の約1%が発症

すると推定される (Chatterjee et al., 2007; Mandon-Pépin et al., 2008)。POFの発症は多くの場合原因不明であるが、自己免疫疾患、ウイルス感染、X線照射などにより発症すると考えられている。また、POF患者の家系調査やPOFとX染色体異常との関連性などから、遺伝的要素が重要な役割を果たしていることが示唆されている (Davison et al., 2000; Marozzi et al., 2000; Rizzolio et al., 2006; Portnoi et al., 2006)。X染色体上のいくつかの遺伝子 (Bone Morphogenetic Protein-15: *BMP15* や Kit Ligand: *KITLG*など) は、POFの原因遺伝子としてヘテロ接合体のバリエーションが報告されている (Di Pasquale et al., 2006; Hui et al., 2006)。近年、突然変異によりPOFを引き起こす常染色体遺伝子が同定された。*FOXL2*遺伝子はその一つで、変異があると頭蓋顔面異常、眼瞼異常に加えて、卵巣不全による不妊を引き起こす (Cao et al., 2001; Chatterjee et al., 2007)。また、*TGF-β RIII* (Transforming Growth Factor-β type III Receptor)、*GDF9* (Growth Differentiating Factor-9)、*GALT1* (Galactose-1-phosphate uridylyltransferase) などもPOFの原因として報告されている (Chand et al., 2007; Kovanci et al., 2007; Mlinar et al., 2005)。いくつかの遺伝的メカニズムは明らかになったものの、多くのケースにおいて、POF発症の原因は未だに不明な点が多い。

減数分裂特異的に働く遺伝子のノックアウトマウスの解析から、これらの遺伝子不全がPOFに類似した表現型を示すことが報告されており、疾患との関連性の解明が期待されている。近年、不妊症の患者から、DMC1の200番目のメチオニン (Met, M) がバリン (Val, V) に置換されている*DMC1-M200V*ホモ接合体が発見された。この患者は、15歳から21歳までは正常な月経周期を示していたが、28歳で無月経状態に陥り、POFと類似の症状を呈した (Mandon-Pépin et al., 2008; Mandon-Pépin et al., 2002)。このことから、*DMC1-M200V*ホモ接合体とPOFとの関連性が疑われる。

## 1-7. 本研究について

減数分裂期において相同 DNA 組換えは、染色体の正確な分離と生物の多様性の獲得において重要な生体反応である。この反応の要は、相同 DNA 対合・鎖交換反応である。減数分裂期組換え欠損は、染色体の不分離を引き起こし、染色体異常や不妊症を引き起こす。従って、減数分裂期組換え機構を解明することは非常に重要である。減数分裂期組換えのメカニズムが明らかになれば、不妊症の原因解明にも繋がるのが期待できる。また、相同 DNA 組換えについての研究は、遺伝子治療や、農作物の品種改良などの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中心的ステップである相同 DNA 対合・鎖交換反応を触媒する DMC1<sup>注1)</sup> に着目した。近年のゲノム解析の結果により、DMC1 に多くの一塩基多型が発見され、NCBI のデータベースに登録されている。そのうち、DMC1 のコーディング領域には 3 つの一塩基多型 (*DMC1-M200V*, *DMC1-G150D*, *DMC1-I37N*) が存在する (NCBI refSNP ID: rs2227914, rs58396845, rs1129426) (図 6)。本研究では、*DMC1-M200V* と *DMC1-I37N* バリエントに注目した。*DMC1-M200V* バリエントはヘテロ接合体の平均遺伝子頻度が 0.204 であり、ホモ接合体はほとんど報告されていなかったが (NCBI refSNP ID: rs2227914)、前記した様に、*DMC1-M200V* ホモ接合体を有する不妊の女性が発見された (Mandon-Pépin et al., 2008; Mandon-Pépin et al., 2002)。これは一症例のみの報告であったが、*DMC1-M200V* バリエントと POF による不妊症との関連性が推測される。一方、37 番目のイソロイシン (Ile, I) がアスパラギン (Asn, N) に置換されている *DMC1-I37N* バリエント<sup>注2)</sup> (NCBI refSNP ID: rs1129426) は、遺伝子頻度および疾患との関連性を示唆するような報告はない。Ile37 は DMC1 の N 末端ドメインに位置する (図 6)。DMC1 は ATPase ドメインの構造が明らかになっている

が、N末端ドメインの構造は未だに明らかになっていない (Kinebuchi et al., 2004)。DMC1 のホモログである RadA や RAD51 の N 末端ドメインは二重鎖 DNA と結合することが報告されている (Chen et al., 2007; Aihara et al., 1999)。また、RadA や RAD51 と同様に、DMC1 の N 末端ドメインは、二重鎖 DNA 結合および 8 量体リング構造の形成において重要であると考えられている (Kinebuchi et al., 2005)。これらの事実により、DMC1-I37N バリエントは、Ile37 が Asn に置換されることで、DMC1 の N 末端ドメインの構造変化を引き起こし、二重鎖結合および組換え活性に影響を及ぼすと考えられる。DMC1 の組換え活性の低下は、減数分裂期組換え欠損を引き起こし、不妊になることが推測される。

本研究では、DMC1 一塩基多型が DMC1 の相同 DNA 組換え活性に及ぼす影響と不妊症との関連性を解明することを目的とした。生化学的・構造生物学的手法により、DMC1 遺伝子多型が、DMC1 の相同 DNA 組換え活性の低下を引き起こすことを示した。更に、DMC1 遺伝子多型が及ぼす DMC1 の機能への影響と不妊症との関連性を議論した。

注 1) 本論文ではヒト DMC1 を DMC1 と表記し、その他の生物種については、その都度、生物種を表記した。

注 2) 現時点では、DMC1-I37N は遺伝子多型か変異 (レアバリエント) か定かではないが、本論文では DMC1-I37N バリエントと統一表記を用いることにした。

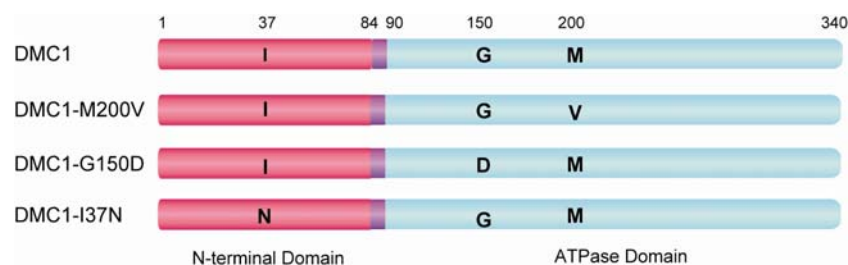


図 6 DMC1 の一塩基多型

## 第2章 DMC1-M200V バリエントの構造・機能解析

### 2-1. 背景

DMC1は、相同DNA対合・鎖交換反応を触媒する減数分裂期組換えにおいて不可欠なタンパク質である。*Dmc1*のノックアウトマウスやA272Pという変異をもつ*Dmc1*<sup>Mei1</sup>/+マウスでは、配偶子の形成が異常になり不妊になることが報告されている (Pittman et al., 1998; Yoshida et al., 1998; Bannister et al., 2007)。DMC1による減数分裂期組換えは正常な配偶子の形成に重要である。更に、近年、不妊症の患者の遺伝子解析から、DMC1のエクソン10に位置する33551番目のアデニンがグアニン (sequence AY520538 in Genbank) にホモ接合置換されている一塩基多型が発見された (Mandon-Pépin et al., 2002; Mandon-Pépin et al., 2008)。この一塩基多型がMet200からValへのアミノ酸置換を引き起こし、それにより、DMC1-M200Vホモ接合体が不妊症の原因になる可能性が示唆された。しかし、この遺伝子多型がDMC1の組換え活性に及ぼす影響は明らかになっていない。本章では、生化学的・構造生物学的解析により、DMC1-M200VバリエントがDMC1の機能に及ぼす影響およびその意義について解明を試みた。

はじめに、DMC1-M200Vバリエントの8量体リング構造を決定した。DMC1-M200Vバリエントでは、 $\alpha$ -11ヘリックス上のMet200と $\alpha$ -13ヘリックス上のMet249との疎水的相互作用が低下すること、そのために構造の安定性の低下を引き起こすことを明らかにした。更に、*in vitro*における相同DNA組換え活性が低下することを発見し、DMC1-M200Vバリエントが不妊症の原因のひとつになりうることを示した。そして、Met200残基の近傍の変異体の解析から、DMC1の構造におけるMet200の役割について考察した。加えて、Arg252の変異体の解

析により、DMC1の新たなDNA結合部位をも明らかにした。

## 2-2. 材料および実験方法

### 2-2-1. DNA

本実験で使用した DNA は、下記の通りである。濃度は全てヌクレオチドあたりのモル濃度を表記している。

- ΦX174 RF I DNA (New England BioLabs)

- ΦX174 Viron DNA (New England BioLabs)

- pET-15b-DMC1

pET-15b (Novagen) プラスミドの *NdeI*-*Bam*HI サイトに *DMC1* 遺伝子が挿入されているプラスミド。このプラスミドは東京大学の宮川清博士より供与を受けた。

- pET-15b-DMC1-M200V

pET15b-DMC1 を用いて部位特異的変異法により ATG (Met200) を GTG (Val) に置換した。pET15b-DMC1 を鋳型として、QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) と下記のプライマー1、2 を用いて PCR 法により DNA 断片を増幅した。その後、*DpnI* により 37°C で 1 時間処理することで鋳型 DNA を消化して、増幅した pET-15b-DMC1-M200V の DNA を得た。

1: 5'-CTA GTG AAC ATC AGG TGG AGC TAC TTG ATT ATG TAG C-3'

2: 5'-GCT ACA TAA TCA AGT AGC TCC ACC TGA TGT TCA CTA G-3'

• pET-15b-DMC1-M249V

pET15b-DMC1 を用いて pET-15b-DMC1-M200V と同様の方法により Met249 を Val に置換して作製した。プライマー3、4を使用した。

3: 5'-GCA AAA ATT GGC CCA GGT GTT GTC ACG ACT C-3'

4: 5'-GAG TCG TGA CAA CAC CTG GGC CAA TTT TTG C-3'

• pET-15b-DMC1-R252G

pET15b-DMC1 を用いて pET-15b-DMC1-M200V と同様の方法により Arg を Gly252 に置換して作製したプラスミド。プライマー5、6を使用した。

5: 5'-GCC CAGATG TTG TCA GGC CTC CAA AAA ATC-3'

6: 5'-GAT TTT TTG GAG GCC TGA CAA CAT CTG GGC-3'

• pET-15b-DMC1-R252S

pET15b-DMC1 を用いて pET-15b-DMC1-M200V と同様の方法により Arg252 を Ser に置換して作製したプラスミド。プライマー7、8を使用した。

7: 5'-GAT TTT TTG GAG GCT TGA CAA CAT CTG GGC-3'

8: 5'-GCC CAG ATG TTG TCA AGC CTC CAA AAA ATC-3'

• p11d-tRPA

このプラスミドはアイオワ大学 Marc Wold 博士より供与を受けた。

• pGsat4

pGEM-T-easy (Promega) に 198 bp のヒト  $\alpha$ -サテライト配列を挿入したプラスミド。



・ D-loop アッセイ用基質

HPLC 精製した 50-mer SAT-1 オリゴヌクレオチド及びスーパーコイル状の pGsat4 (3218bp) を基質として用いた。SAT-1 の単鎖 DNA 配列は 5' -ATT TCA TGC TAG ACA GAA GAA TTC TCA GTA ACT TCT TTG TGC TGT GTG TA-3' である。10 mM SAT-1 を 20 ユニット T4 polynucleotide kinase (New England BioLabs) と 20  $\mu$ Ci ( $\gamma$ - $^{32}$ P) ATP を含む 50  $\mu$ l 反応溶液中で 37°Cにおいて 30 分間反応させ、SAT-1 の 5' 末端を  $^{32}$ P にて標識した。その後、illustra™ ProbeQuant G-50 Micro Column スピンカラム (GE Healthcare Bioscience) を用いて、8,000 $\times$ g で 2 分間、遠心を 2 回行うことにより、余分な ATP を除去した。

スーパーコイル状のプラスミドを得るために以下の調製法を用いた。まず、pGsat4 を大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (TOYOBO) に導入し、100  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む LB 培地 5 ml で 37 °C、8 時間前培養した。その培養液 1 ml を 100  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む 500 ml の LB 培地に植菌し、16 時間培養した。6,000 $\times$ g、4°Cで 15 分間遠心することにより集菌し、50 ml M9 バッファー [1 mg/ml NH<sub>4</sub>Cl, 3 mg/ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 mg/ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>] で洗浄後、再度 6,000 $\times$ g、4°Cで遠心した。遠心により得られた沈殿物を 20 ml の TES バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 10% sucrose] で溶解した。2 ml の lysozyme 溶液 (5 mg/ml) を添加し、ゆるやかに混合し、氷上で 10 分間静置した。最終濃度が 0.1%になるように N-lauroyl-sarcosine 溶液を加え、ゆっくりと混ぜた後、92,560 $\times$ g、4°Cで 1 時間遠心した。その上清をフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿することにより、プラスミドを回収した。そして、1 ml TE バッファー [0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] に溶解し、10 mg/ml RNaseA (80  $\mu$ l) を加えて 37°Cで 30 分間インキュベーションした。27,000 $\times$ g で 5 分間遠心して不純物を取り除いた後、5-20%ショ糖密度勾配溶液 (30 ml) の上に重層し、98,600 $\times$ g、20°Cで 15 時間遠

心した。遠心後、フラクションコレクターを用いて溶液を分取し、0.8%アガロースゲルを用いてスーパーコイル状の DNA を含む画分を確認して回収した。得られたスーパーコイル状の DNA を 1 L の TE<sub>0.1</sub> バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA] に対して 24 時間透析した。

## 2-2-2. DMC1、DMC1-M200V の精製

pET15b-DMC1 および pET15b-DMC1-M200V バリエーションは、His<sub>6</sub>-tag 融合タンパク質として発現される。DMC1 タンパク質は、Kinebuchi らの方法で精製を行った (Kinebuchi et al., 2004)。

pET-15b-DMC1 プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) codon plus-RIL 株に導入し、LB プレート (100 µg/ml アンピシリン、35 µg/ml クロラムフェニコール) に塗布して 37°C で一晩培養した。LB プレート上のコロニーをかき集めて 100 µg/ml アンピシリン 35 µg/ml クロラムフェニコールを含む LB 培地 5 L に植菌し、30°C で OD<sub>600</sub> が 0.6 になるまで振盪培養した。OD<sub>600</sub> が 0.6 に達したら、IPTG (終濃度 1 mM) を添加し、更に、30°C で一晩培養した。11,000×g、4°C で 5 分間遠心して大腸菌を集菌し、50 ml のバッファー A [50 mM Tris-HCL buffer (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 10% glycerol, 5 mM imidazole, 2 mM 2-mercaptoethanol] に懸濁した。超音波破碎機を用いて懸濁した大腸菌を破碎した。27,000×g、4°C で 20 分間遠心し、その上清を 4 ml の Ni-NTA アガロース (Qiagen) と混合し、4°C で 1 時間バッチ法により His<sub>6</sub> タグ融合 DMC1 と Ni-NTA アガロースビーズを結合させた。そのアガロースビーズをエコノカラム (Bio-Rad) に充填した。ビーズを 150 ml のバッファー A で洗浄し、5 mM から 500 mM imidazole の直線的な濃度勾配にて溶出した。DMC1 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 Bioscience) を添加し、2 L のバッファー B [20 mM

Tris-HCL buffer (pH 8.0), 0.2 M KCl, 10% glycerol, 0.25 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol] に対して一晩透析しながら、His<sub>6</sub> タグを切断した。なお、透析バッファーは途中で一回交換した。His<sub>6</sub> タグが除去されたことを SDS-PAGE により確認した。タンパク質溶液を 4 ml の Heparin-Sepharose (GE Healthcare Bioscience) カラムに添加し、100 ml のバッファーB で洗浄した。その後、0.2 M から 1.0 M KCl の直線的な濃度勾配にて DMC1 を溶出した。濃度の濃いフラクションを回収し、最終精製物とした。その最終精製物を Amicon Ultra Ultraset-30K (MILLIPORE) フィルターカートリッジに加え、4,000×g、20 分間遠心することにより限外濾過濃縮した。濃縮後の溶液は、10 倍量のバッファーC [20 mM HEPES-KOH buffer (pH 7.5), 0.5 M KCl, 10% glycerol, 0.25 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol] を加えて再び濃縮するという作業を 2 回繰り返し、バッファー置換を行った。DMC1-M249V、DMC1-R252G および DMC1-R252S 変異体についても DMC1-M200V バリエーションと同様の方法で精製した。

### 2-2-3. RPA の精製

RPA タンパク質の精製は Henricksen らの方法に基づいておこなった (Henricksen et al., 1994)。p11d-tRPA プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) codon plus-RIL 株 (Stratagene) に導入し、LB プレート (100 µg/ml アンピシリン、35µg/ml クロラムフェニコール) に塗布して 37°C で一晩培養した。100 µg/ml アンピシリン、35 µg/ml クロラムフェニコールを含む 2.5 L の TB 培地 (Tryptone 25g, NaCl 12.5g) にシングルコロニーを植菌し、37°C で一晩静置培養した。その後、OD<sub>600</sub> が 0.6 になるまで振盪培養を行い、IPTG (終濃度 400 mM) を添加し、更に、37°C で 2 時間振盪培養した。11,000×g、4°C で 5 分間遠心して集菌した大腸菌を 50 ml のバッファーD [30 mM HEPES-KOH buffer (pH 7.8), 10% glycerol,

0.25 mM EDTA, 0.25% inositol, 0.01% NP-40, 1 mM DTT] に懸濁し、超音波破碎機を用いて破碎した。得られた細胞破碎液を 27,700×g、4°Cで 20 分間遠心し、その上清をバッファードで平衡化した Affi-Gel Blue (Bio-Rad) カラムに負荷し、50 mM KCl、0.8 M KCl、0.5 M NaSCN をそれぞれ 100、100、150 ml 含むバッファードでそれぞれ洗浄した。そして、1.5M NaSCN を含むバッファード (80 ml) によりタンパク質を溶出させた。得られたタンパク質を 2 L のバッファードE [25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 50 mM KCl, 10% glycerol, 0.01% TritonX-100, 1 mM DTT] に対して一晩透析後、17,300×g、4°Cで 15 分間遠心することにより、析出した沈殿を除いた。上清をバッファードEで平衡化した 10 ml の hydroxyapatite (Bio-Rad) カラムに注入し、100 ml のバッファードF [20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 10% glycerol, 0.01% TritonX-100, 1 mM DTT] で洗浄後、20 mM から 300 mM リン酸バッファードの直線的な濃度勾配によりタンパク質を溶出させた。得られたタンパク質溶液を 2 L のバッファードE に対して一晩透析した。バッファードEで平衡化した MonoQ (GE Healthcare Biosciences) カラムに透析後のタンパク質溶液を負荷し、10 ml のバッファードG [25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 50 mM KCl, 10% glycerol, 1 mM DTT] で洗浄した。50 mM から 400 mM KCl の直線的濃度勾配により RPA を溶出させた。最終精製物を 1 L バッファードG に対して透析した。

#### 2-2-4. glutaraldehyde による架橋実験

DMC1-WT (4.5 µg) および DMC1-M200V バリエント (4.5 µg) を反応溶液 5 µl [20 mM Hepes-KOH buffer (pH 7.5), 450 mM KCl, 0.25 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.025% glutaraldehyde] 中で 5 分間、室温でインキュベートした。2.5 µl の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) で反応を停止させた。反応を停止後、2.5 µl SDS バッファード [4% SDS, 10 mM DTT and 20% glycerol] を加えた。

2-15%のアクリルアミドグラジエントゲルにより 2 時間電気泳動し、Coomassie Brilliant Blue により染色し、バンドを検出した。

#### 2-2-5. ゲルシフトアッセイ法

ΦX174 スーパーコイル状二重鎖 DNA (5386 bp, 10 μM) (New England BioLabs) および ΦX174 環状単鎖 DNA (5386 bases, 20 μM) (New England BioLabs) を基質として用いて、各タンパク質の DNA 結合活性を調べた。DMC1 とそれぞれの DNA を 10 μl の反応溶液 [20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 0.25 or 0.3 M KCl, 1 mM ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT] 中で 37°C、10 分間反応させた。反応に用いたタンパク質濃度は、3.75、7.5、15 μM である。0.8%アガロースゲル、1×TAE (40 mM Tris acetate, 1mM EDTA) を用いて 3.3 V/cm の条件下で 2 時間半泳動し、0.5 μg/ml エチジウムブロマイドで染色し、FAS-III (TOYOBO) で撮影した。

#### 2-2-6. D-loop アッセイ法

DMC1-WT、DMC1-M200V バリエーションおよび DMC1-M249V 変異体と 1 μM <sup>32</sup>P 標識 SAT-1 (50-mer) を 10 μl の反応溶液 [20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 1 mM ATP, (1-5 mM) MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT, 20 mM creatine phosphate, 75 μg/ml creatine kinase] 中で、37°C、5 分間インキュベーションし、その後、30 μM pGsat4 を加え反応を開始させた。反応の停止は、1% SDS、1.7 mg/ml proteinase K (Roche Applied Science)、37°Cで 15 分間インキュベーションすることにより行った。1% アガロースゲル、0.5×TBE (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA) を用いて 3.3 V/cm の条件下で 3 時間泳動し、ゲルを乾燥させ、イメージングプレートに感光させた。BAS-2500 イメージングアナライザー (Fujifilm) によりバンドを検出し、

Image Gauge ソフトウェアにより定量した。

#### 2-2-7. strand-exchange アッセイ法

DMC1-WT、DMC1-M200V バリエーションおよび DMC1-M249V 変異体を、20  $\mu$ M  $\Phi$ X174 環状単鎖 DNA (New England BioLabs) と混合し、10  $\mu$ l の反応溶液 [20 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 0.25 or 0.2 M KCl, 1 mM ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT 20 mM creatine phosphate 75 $\mu$ g/ml creatine kinase] 中で、37°C、10 分間反応させた。その後、RPA (終濃度 2  $\mu$ M) を加え、更に 37°C で 10 分間反応させた。*Pst*I (TOYOBO) 制限酵素処理により線状化した 20  $\mu$ M  $\Phi$ X174 二重鎖 DNA を加え、60 分間反応させた。反応の停止は、1% SDS、1.7 mg/ml proteinase K (Roche Applied Science) を添加し、37°C で 20 分間インキュベーションすることで行った。タンパク質の除去をしたサンプルを 1%アガロースゲル、1×TAE (40mM Tris acetate, 1mM EDTA) を用いて 3.3 V/cm の条件下で 3 時間泳動することで分離し、SYBER Gold (Invitrogen) により染色してバンドを検出した。

#### 2-2-8. ATP 加水分解活性

DMC1-WT、DMC1-M200V バリエーションおよび DMC1-M249V 変異体を 1.5 M NaCl 存在下で、100  $\mu$ l の反応溶液 [20 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 125 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT] 中で混合し、37°C で 10 分間インキュベーションした後、1 mM ATP (Roche, ATP sodium salt) を加え、37、42、47°C で 60 分間インキュベーションした。100  $\mu$ l の反応溶液のうちの 20  $\mu$ l に 100 mM EDTA を 30  $\mu$ l に添加し、反応を停止した。50  $\mu$ l のサンプル (20  $\mu$ l 反応溶液+30  $\mu$ l EDTA) に 500  $\mu$ l のリン酸化定量液を加えよく混ぜ、34% (w/v) tri-sodium citrate dehydrate を 50  $\mu$ l を加え、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) にて 600 nm の

波長において吸光度を測定した。なお、リン酸定量液とは、0.0045% (w/v) malachite green oxalate と 4.2%(w/v) hexaammonium heptamolybdate tetrahydrate を 3 : 1 で混合し、その後を 100 分の 1 量の 10% (w/v) polyvinyl alcohol を加えて混合したものである。

#### 2-2-9. DMC1-M200V の結晶化

DMC1-M200V バリエーションの最終精製試料を 500 ml の緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 0.25 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol] に対して一晩透析した。8 mg/ml DMC1-M200V バリエーションタンパク質溶液 1  $\mu$ l とリザーバー溶液 [0.1 M sodium citrate buffer (pH 5.5), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 9% PEG 2000 MME] 1  $\mu$ l をカバーガラス上で混合しドロップ溶液を作製し、密閉空間でそのドロップを 500  $\mu$ l リザーバー溶液に対して 20°C で平衡化させた。約 1 週間インキュベートし、0.5 mm  $\times$  0.5 mm  $\times$  0.05 mm の結晶が得られた。

#### 2-2-10. X 線回折データの収集

結晶をクライオプロテクト溶液 [0.1 M sodium citrate buffer (pH 5.5), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 9% PEG 2000 MME, 30% PEG400] に浸し、N<sub>2</sub> 気流下で急速冷却し、100 K の低温条件下で回折データを収集した。回折データは SPring-8 放射光施設のビームライン BL26B2 を用いて収集した。測定したデータは DENZO (Otwinowski and Minor, 1997) を用いて処理し、SCALEPACK (Otwinowski and Minor, 1997) を用いてスケーリングを行った。MOLREP プログラムを用いて、分子置換法より DMC1-M200V バリエーションの構造を決定した (CCP4, 1994)。本解析で用いた結晶は空間群 (正方晶、体心格子) I422 に属し、結晶の格子定数は a=b=124.09 Å、c=217.87 Å である。

サーチモデルとして、DMC1の立体構造 (Protein Data Bank accession number 1V5W) の座標軸をB-factorsの再設定を行わずに用いた。モデルの精密化は、CNSプログラムを用いて行った (Brunger et al.,1998) 。全ての図はPyMOLプログラムにより作製した (DeLano, 2002)。構造の座標データはProtein Data Bank: PDBへ登録した。PDB IDコードは2ZJBである。

## 2-2-11. 円偏光二色性 (CD) スペクトル解析

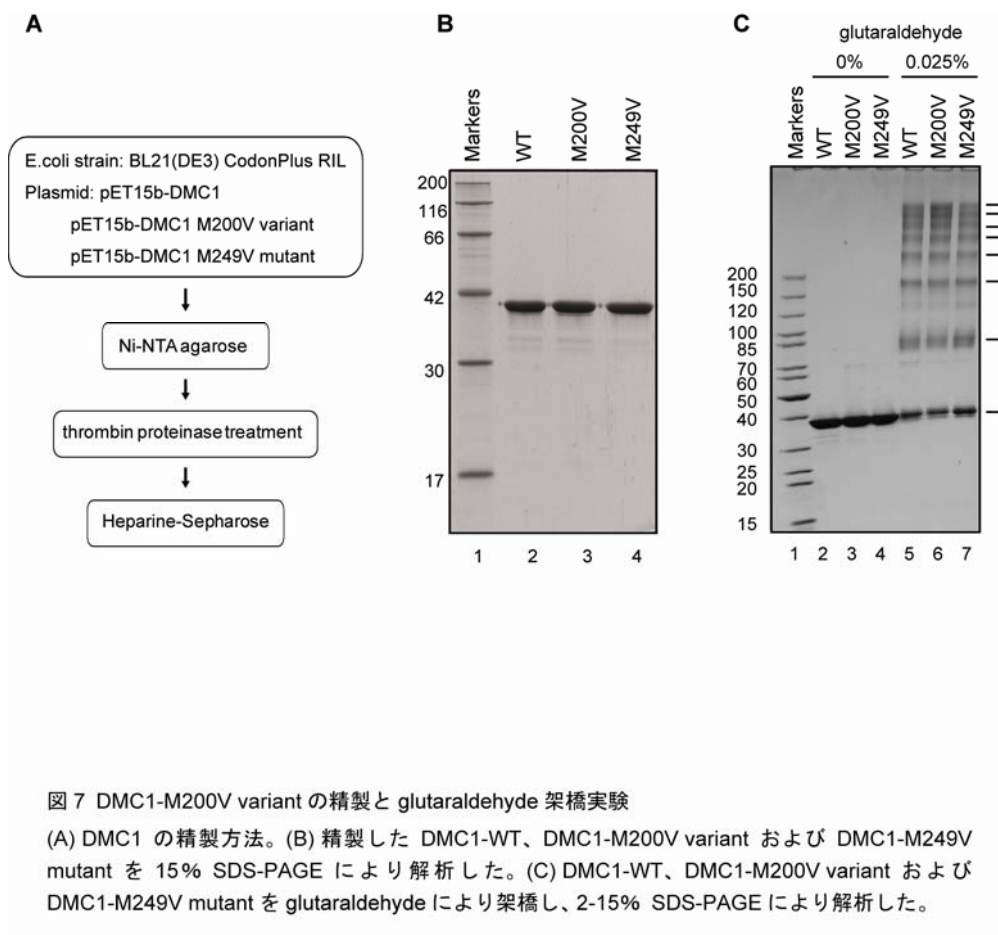
DMC1 (2  $\mu$ M)、DMC1 変異体 (2  $\mu$ M) を 1 cm 石英セルを用いて JASCO J-820 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic Co., Ltd) にて測定した。全てのサンプルは 20 mM potassium phosphate (pH 7.0)、50 mM KCl の存在下で測定した。

## 2-3. 結果と考察

### 2-3-1. DMC1-M200V の精製

DMC1 の一アミノ酸置換である DMC1-M200V バリエントが DMC1 の構造に及ぼす影響を解析するために、DMC1-M200V バリエントをリコンビナントタンパク質として精製し、構造生物学的・生化学的解析を行った。まず、pET15b-DMC1 を用いて部位特異的変異法により pET15b-DMC1-M200V プラスミドベクターを作製した。このプラスミドベクターを用いて、DMC1-M200V バリエントを N 末端に His<sub>6</sub> タグを融合させたリコンビナントタンパク質として大腸菌内で発現させた。Ni-NTA (Qiagen) カラムで粗精製後、thrombin protease (GE Healthcare Biosciences) で処理することにより His<sub>6</sub> タグを除去し、Heparin-Sepharose (GE Healthcare Biosciences) カラムを用いて精製した (図 7A)。15% SDS-PAGE による分析の結果、DMC1-M200V バリエントの最終精製物には不純物がほとんど含まれておらず、DMC1-WT とほぼ同じ精製度で精製できることを確認した (図 7B)。





また、DMC1-M249V 変異体も DMC1-M200V バリエントと同様に精製し、DMC1-WT とほぼ同じ精製度で精製できた (図 7B)。

### 2-3-2. glutaraldehyde による架橋実験

精製した DMC1-WT、DMC1-M200V バリエントを用いて glutaraldehyde による架橋実験を行い、その会合能を解析した。その結果、DMC1-M200V バリエントは、DMC1-WT と同様に 8 量体形成能があることが明らかになった (図 7C)。

### 2-3-3. DMC1-M200V の結晶化および結晶構造解析

得られた精製 DMC1-M200V バリエントを用いて結晶化を行った。最終精製試料 8 mg/ml タンパク質溶液とリザーバー溶液 [0.1 M sodium citrate buffer (pH 5.5), 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 9% PEG 2000 MME] を用いて、ハンギングドロップ法により、20°C で 1 週間インキュベーションし、DMC1-M200V バリエントの単結晶を得た。

分子置換法により 3.5 Å の分解能で DMC1-M200V バリエントの ATPase ドメインの構造を決定した (表 1)。その構造を図 8 に示す。DMC1-M200V バリエントは、DMC1-WT と同様に 8 量体リング構造を形成していた (図 8A)。DMC1-M200V バリエントにおいては、Met200 は Val に置換されており、 $\alpha$ -11 ヘリックスの中央付近に位置している (図 8B)。図に示すように Val200 の側鎖は Met249 の残基により形成される疎水性コアに面しており、Met249 残基の側鎖との距離は約 4 Å であった (図 8C, D)。従って、DMC1-WT と同様にこの 2 つの残基間の疎水性相互作用は存在しているが、DMC1-M200V バリエントでは  $\alpha$ -11 と  $\alpha$ -13 ヘリックスの疎水性相互作用が DMC1-WT よりも低下していると考えられた。そのため  $\alpha$ -11 と  $\alpha$ -13 ヘリックス運動性が高くなり、DMC1 の立体構造が不

表 1 データコレクションとリファinement値

Data collection	
Space group	I422
Cell dimensions	
a, b, c (Å)	124.09, 124.09, 217.87
Resolution (Å)	50.0-3.5 (3.633.5) <sup>a</sup>
R <sub>sym</sub> (%)	8.5 (46.4)
I / σI	9.4 (6.0)
Completeness (%)	100 (100)
Redundancy	13.1 (13.8)
Refinement	
Resolution (Å)	20.0 (3.5)
Number of reflections	11,034 (1,138) <sup>b</sup>
R <sub>work</sub> / R <sub>free</sub> (%)	29.4 / 35.1
R. m. s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.008
Bond angles (°)	1.32

<sup>a</sup>Highest resolution shell shown in parentheses<sup>b</sup>Number of test reflections shown in parentheses.

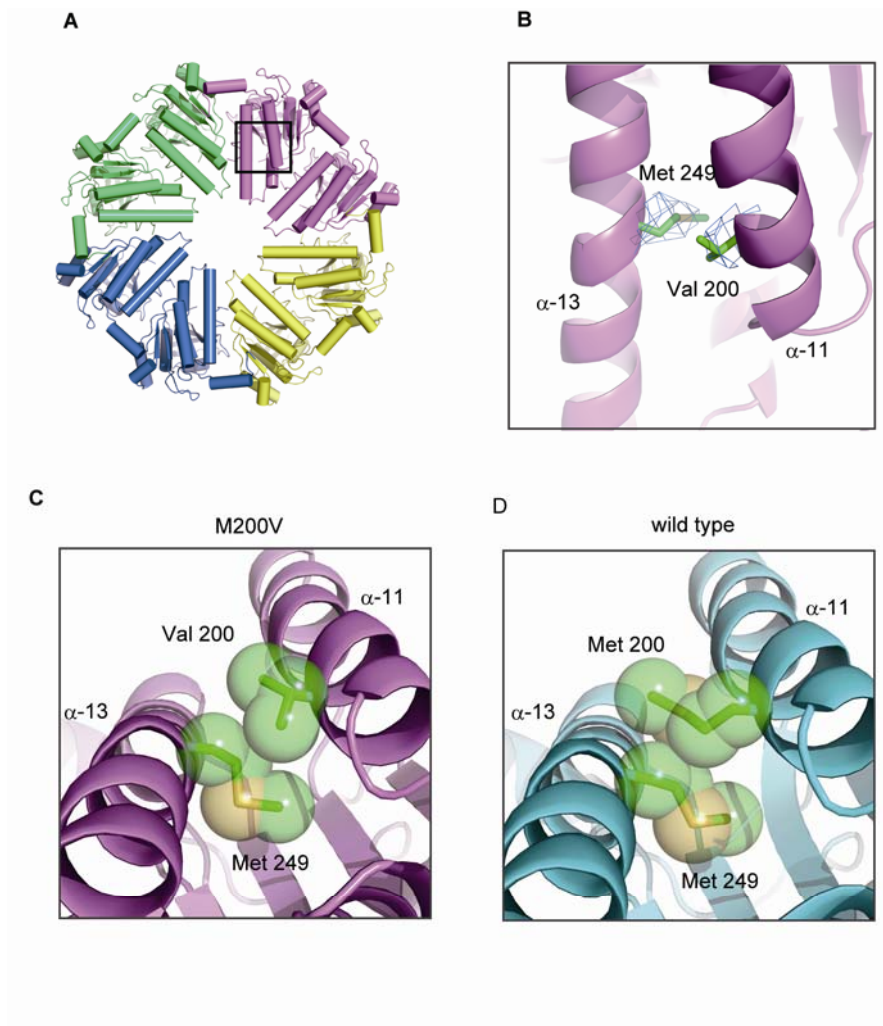


図 8 DMC1-M200V variant の結晶構造

(A) DMC1-M200V variant の 8 量体リング構造。それぞれの色は、アシメトリックユニットを示している。(B) (A) の図の四角で囲った領域のクローズアップ図。Val200 と Met249 はそれぞれ  $\alpha$ -11 と  $\alpha$ -13 ヘリックス上に位置している。Val200 と Met249 座標軸を用いずに計算したシミュレーテッド・アニーリング 2Fo - Fc の電子密度マップを青色で示している。電子密度マップは  $1.0 \sigma$  で表示している。(C) DMC1-M200V variant の 200 番目と 249 番目の残基の側鎖の原子を丸で示している。(D) DMC1-WT の 200 番目と 249 番目の残基の側鎖をファンデルワールスモデルで表示している。

安定になると予想した。

#### 2-3-4. DMC1-M200V の熱安定性の解析

X線結晶構造解析の結果から、DMC1-M200V バリエントは、DMC1-WT と比較して立体構造が不安定であると予想された。DMC1 は、1.5 M NaCl 存在下で ATP 加水分解活性を有する (図 9A)。それぞれの構造安定性を明らかにするために、ATP 加水分解活性を指標に DMC1 の熱安定性を解析した。

まず、1.5 M NaCl 存在下、37°C の条件において ATP 加水分解活性を測定した。その結果、DMC1-M200V バリエントは DMC1-WT と同じ程度の ATP 加水分解活性を示した (図 9A) 次に、DMC1 の ATP 加水分解活性の温度依存性を解析するため、37、42、47、52°C の温度条件で 60 分間反応させた時のリン酸量を測定した。DMC1-WT は、42°C で ATP 加水分解活性が上昇したが、DMC1-M200V バリエントでは、そのような ATP 加水分解活性の上昇は認められなかった (図 9B)。更に、47°C では、DMC1-M200V バリエントは DMC1-WT よりも ATP 加水分解活性が顕著に低下した。これらの結果は、DMC1-WT よりも DMC1-M200V バリエントは、熱的安定性が低下していることを示している。

#### 2-3-5. DMC1-M200V の相同 DNA 対合活性

DMC1 の相同 DNA 対合活性を生化学的解析により調べた。本実験では、相同 DNA 対合反応の *in vitro* 実験系である、D-loop アッセイ法を用いた。D-loop アッセイ法は、単鎖オリゴヌクレオチドと相同な塩基配列を含むスーパーコイル状の二重鎖 DNA とを基質として用いることで、相同 DNA 対合反応を D-loop と呼ばれる反応生成物として検出する実験系である (図 10A)。この方法は、ヒトおよび酵母 DMC1 の相同 DNA 対合活性を解析するために用いられている (Li et

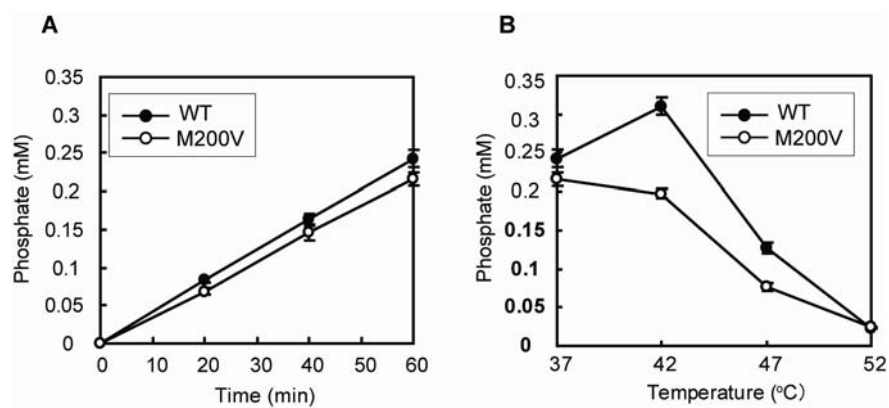


図9 DMC1-M200V variant の ATP 加水分解活性

(A) 高濃度の塩の存在下における DMC1-WT および DMC1-M200V variant の ATP 加水分解活性。37°C の条件における ATP 加水分解活性の経時変化のグラフ。(B) 温度依存性 ATP 加水分解活性。37、42、47、52°C で 60 分間反応させた時の ATP 加水分解活性のグラフ。黒丸は DMC1-WT、白丸は DMC1-M200V variant の結果を示している。

al., 1997; Hong et al., 2001)。

本実験では、基質として  $^{32}\text{P}$  で標識した 50-mer の SAT-1 単鎖オリゴヌクレオチドとスーパーコイル状の pGsat4 (3218bp) 二重鎖 DNA を用いた。DMC1-M200V バリエントを用いて、D-loop アッセイ法による解析を行った。その結果、1~3 mM  $\text{Mg}^{2+}$  の存在下では、DMC1-WT と比較して、D-loop 形成能が低下していた (図 10B lane 2-7)。生理条件よりも高い 4~5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  存在下では、D-loop 形成能の低下は認められなかった。低い  $\text{Mg}^{2+}$  濃度における DMC1-M200V バリエントの相同 DNA 対合活性の欠損を確かめるために、3 mM  $\text{Mg}^{2+}$  存在下で、様々な濃度の DMC1-M200V バリエントを用いて相同 DNA 対合活性を解析した。いずれの濃度においても、DMC1-M200V バリエントでは DMC1-WT の約半分ほどの相同 DNA 対合活性しか示さなかった (図 10C)。このことから、DMC1-M200V バリエントは相同 DNA 対合活性が中程度低下していることが明らかになった。更に、反応時間を 0 分間から 60 分間まで変えて、DMC1 による D-loop 形成を経時的に解析した。DMC1 により形成される D-loop の量は反応時間 5~10 分で最大になった (図 10D)。その時の DMC1-M200V バリエントによる D-loop 形成量は、DMC1-WT の約 2/3 ほどであった。反応時間 10 分以降では、DMC1 により形成された D-loop 量が徐々に減少した(図 10D)。DMC1-M200V バリエントでは、D-loop 形成に中程度の欠損を示すが、D-loop の解離は WT と同様に起こることことを示している。

#### 2-3-6. DMC1-M200V による DNA 鎖交換活性

相同 DNA 組換え機構においては、相同 DNA 対合反応に引き続いて DNA 鎖交換反応が行われる (Shibata et al., 1982; Wu et al., 1982)。D-loop の解離は DNA 鎖交換反応の結果としておこる。DMC1-M200V バリエントでは、D-loop の解離

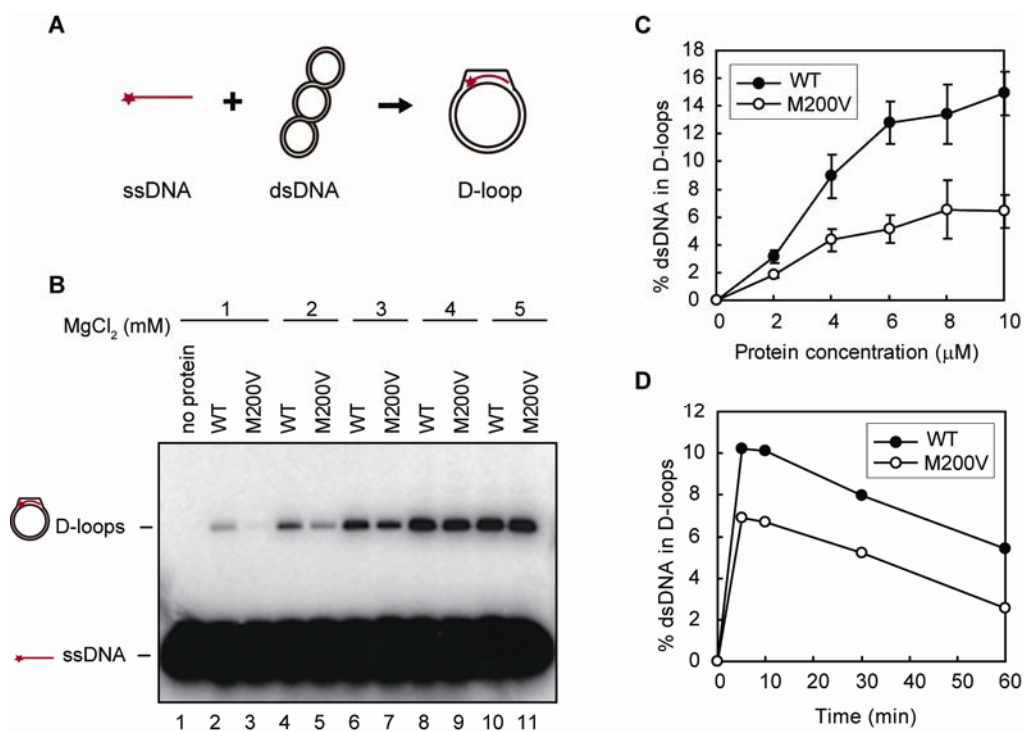


図 10 DMC1-M200V variant の相同 DNA 対合活性

(A) D-loop アッセイ法の模式図。星印は <sup>32</sup>P で標識した 50-mer ssDNA を示している。(B) D-loop 形成における MgCl<sub>2</sub> 濃度の影響。DMC1-WT (4 μM)、DMC1-M200V variant (4 μM) と ssDNA (1 μM) を図に示した MgCl<sub>2</sub> 濃度存在下で 37°C で 5 分間インキュベーションした。その後、supercoiled dsDNA (30 μM) を加え 10 分間反応させた。(C) DMC1 濃度依存的 D-loop 形成活性のグラフ。3 mM MgCl<sub>2</sub> 存在下で各濃度の DMC1、DMC1-M200V variant で 10 分間反応させた。(D) D-loop 形成経時変化のグラフ。3 mM MgCl<sub>2</sub> 条件下で、DMC1-WT (4 μM)、DMC1-M200V variant (4 μM) で図示された時間インキュベートした。形成された D-loop の割合 (%) をグラフ化した。



反応に欠損を示さなかったことから、DNA 鎖交換反応は DMC1-WT と同様におこることが予想された。この可能性を解析するために、DNA 鎖交換反応の *in vitro* 実験系として strand-exchange アッセイ法を用いた。strand-exchange アッセイ法は、相同 DNA 対合反応により短いヘテロ二重鎖領域ができ、続いて鎖交換反応が起きる過程で形成される反応生成物 (JM と NC) を検出する実験系である (図 11A)。

本実験では、基質として  $\Phi$ X174 環状単鎖 DNA (NEW England BioLabs) と線状化した  $\Phi$ X174 二重鎖 (NEW England BioLabs) を用いた。200 mM KCl、37°C の条件下で strand-exchange アッセイを行ったところ、DMC1-M200V バリエントでは DMC1-WT とほぼ同じ DNA 鎖交換活性を示した (図 11B lane 2-7)。DMC1-WT ATP 加水分解活性で 42°C の温度条件下でも、同じ結果が得られた (図 11B lane 9-14)。これらの結果から、DMC1-M200V バリエントは、相同 DNA 対合活性がやや減弱しているにもかかわらず、DNA 鎖交換活性には影響を与えないことが明らかになった。

次に、47°C の高温条件下における DNA 鎖交換活性を解析したところ、15  $\mu$ M DMC1-WT においては残存活性がみられたが (図 11B lane 18)、DMC1-M200V バリエントでは残存活性がみられなかった (図 11B lane 21)。この結果は、DMC1-M200V バリエントの 47°C における ATP 加水分解活性の結果と一致していた (図 9B)。以上の結果は、DMC1-M200V バリエントの構造の安定性低下が DNA 組換え活性の欠損を引き起こすことを示唆している。

### 2-3-7. DMC1-M249V 変異体の生化学的解析

X 線結晶構造解析において、DMC1 の Met200 残基は、疎水性コア内に接触している Met249 残基と直接疎水性相互作用をしていた (図 8 C)。このアミノ酸残

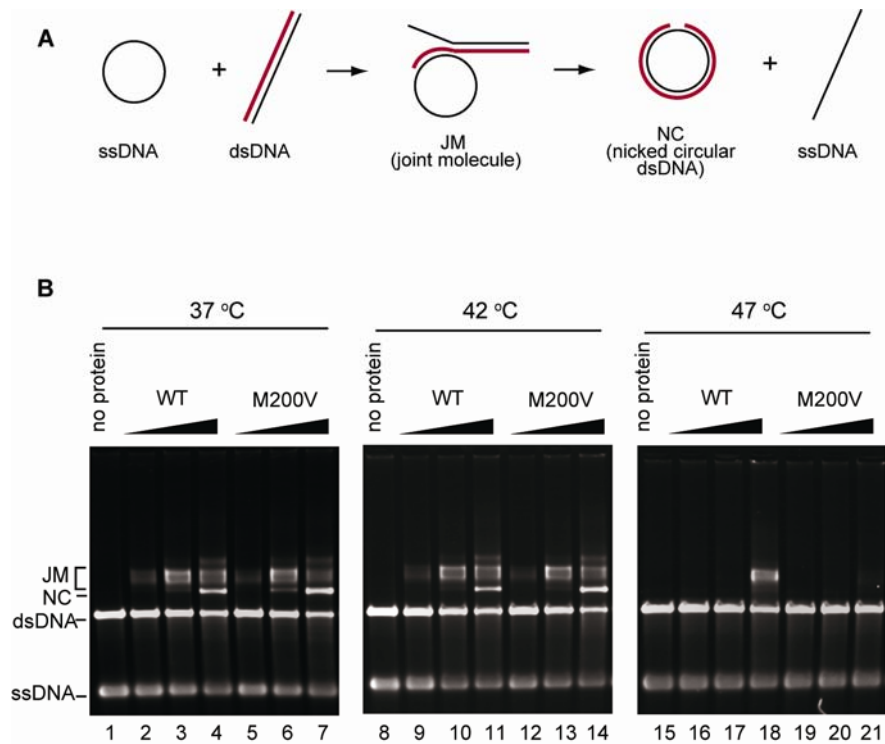


図 11 DMC1-M200V variant による DNA 鎖交換活性

(A) strand-exchange アッセイ法の模式図。(B) 温度依存性 strand-exchange 活性。DMC1 (3.75, 7.5, 15  $\mu$ M) あるいは DMC1-M200V variant と  $\phi$ X174 circular ssDNA (20  $\mu$ M) を 200 mM KCl 存在下で 37°C (lanes 1–7)、42 °C (lanes 8–14)、47 °C (lanes 15–21) で 10 分間インキュベーションし、RPA (2  $\mu$ M) を加え、更に 10 分間インキュベートした。その後、 $\phi$ X174 linearized dsDNA (20  $\mu$ M) 加え 60 分間反応させた。

基は、出芽酵母においては保存されていないものの分裂酵母からヒトの DMC1 においては保存されている (図 12A)。DMC1-M200V バリエントは Met が Val に置換されていることで、 $\alpha$ -13 ヘリックス上の Met249 残基との疎水性相互作用が低下した。 $\alpha$ -11 と  $\alpha$ -13 ヘリックス間での可動性が大きくなるため、DMC1 の立体構造が不安定になると考えられた。Met200 が相互作用する Met249 残基を Val に置換した変異体は、DMC1-M200V バリエントと同様に構造が不安定になり、相同 DNA 対合活性が低下することが予想される。

そこで、部位特異的変異法を用いて DMC1-M249V 変異体を作製した。まず、DMC1-M249V 変異体をリコンビナントタンパク質として精製した (図 7B)。精製した DMC1-M249V 変異体を用いて、glutaraldehyde による架橋実験を行い、その会合能を解析した。その結果、DMC1-M249V 変異体は、DMC1-WT と同様に 8 量体形成能を有していた (図 7C)。DMC1-M249V 変異体は、DMC1 の会合状態に影響を与えないことが明らかになった。次に、相同 DNA 対合活性および DNA 鎖交換活性を解析した。その結果、DMC1-M249V 変異体は、相同 DNA 対合活性と DNA 鎖交換活性のどちらの活性においても顕著な低下を示した (図 12B, C)。DMC1-M200V バリエントと DMC1-M249V 変異体の相同 DNA 対合・鎖交換活性を比較すると、DMC1-M249V 変異体に、著しい活性の低下が認められた。これは、Met249 残基が疎水性コア内に接触するアミノ酸残基であるため、Met200 残基だけでなく他のアミノ酸残基とも相互作用していることが考えられる。そのため、M249V 変異体が及ぼす DMC1 の立体構造および相同 DNA 組換え活性への影響は大きいと考えられる。Met200 の相互作用する Met249 残基においても相同 DNA 対合・鎖交換活性が低下していることから、Met200 と Met249 残基の相互作用は、DMC1 の相同 DNA 組換え活性に重要性であることが強く示唆された。

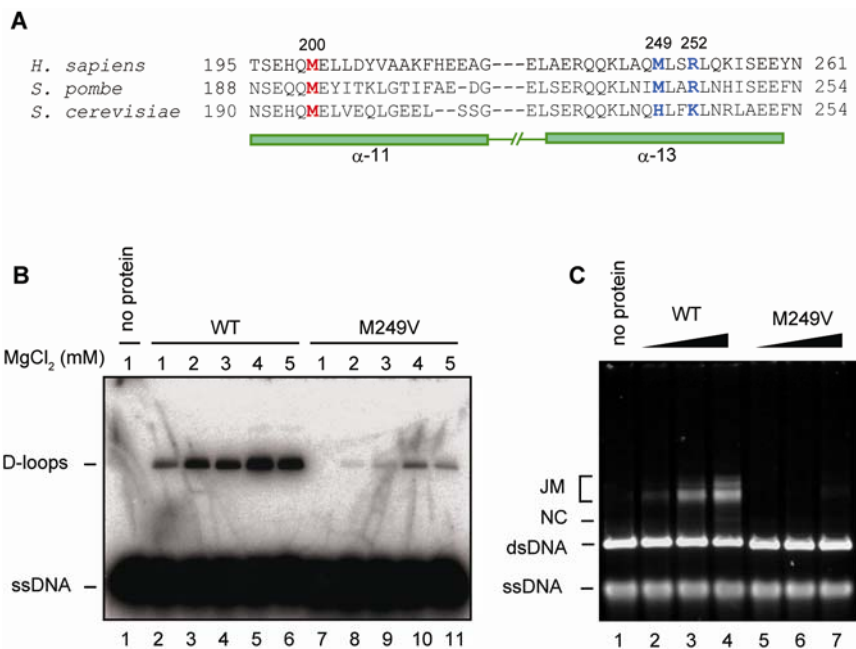


図 12 DMC1-M249V mutant の生化学的解析

(A) DMC1 のアミノ酸配列の比較。DMC1 の Met200、Met249 および Arg252 に相当する *S. pombe dmc1*、*S. cerevisiae dmc1* の配列を示した。(B) D-loop 形成における MgCl<sub>2</sub> 濃度の影響。DMC1-WT (4 μM)、DMC1-M249V mutant (4 μM) と ssDNA (1 μM) を図に示した MgCl<sub>2</sub> 濃度存在下で 37°C で 5 分間インキュベーションした。その後、supercoiled dsDNA (30 μM) を加え 10 分間反応させた。(C) DMC1-M249V mutant による DNA 鎖交換活性。200 mM KCl 存在下で DMC1 (3.75 μM, 7.5 μM, 15 μM) DMC1-M249V mutant と ϕX174 circular ssDNA (20 μM) を 37°C で 10 分間インキュベーションし、RPA (2 μM) を加え、更に 10 分間インキュベートした。その後、ϕX174 linearized dsDNA (20 μM) 加え 60 分間反応させた。

## 2-3-8. DMC1-R252G、DMC1-R252S 変異体の解析

DMC1 の立体構造から、Met200 から Val に置換されることにより影響を受ける可能性があるアミノ酸残基を調べたところ、Arg252 残基が考えられた。Arg252 残基は  $\beta$ -CH<sub>2</sub>、 $\gamma$ -CH<sub>2</sub> が Met200 残基と疎水結合する距離に存在する。そこで、Arg252 残基が Met200 残基との相互作用ができないと考えられる DMC1-R252G、DMC1-R252S 変異体を作製した。DMC1-R252G 変異体は Arg252 を Gly に、DMC1-R252S 変異体は Ser に置換した変異体である。Gly は  $\beta$ -CH<sub>2</sub>、 $\gamma$ -CH<sub>2</sub> をもたず、Ser は  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> に親水基があるため、疎水性相互作用が形成できないと考えられる。この様に DMC1-R252G、DMC1-R252S 変異体は、側鎖が DMC1-WT とは大きく異なるため、その二次構造に影響を及ぼすことが考えられた。そのため、リコンビナントタンパク質としてこれらの変異体を精製し、CD スペクトル解析を行った。DMC1-R252S、DMC1-R252G 変異体は、WT と同じ CD スペクトルを示し、DMC1-R252S、DMC1-R252G 変異体は DMC1 の二次構造には影響を及ぼさないことを確認した (図 13A)。次に、DMC1-R252S、DMC1-R252G 変異体の DNA 鎖交換活性を解析したところ、どの濃度でも反応生成物が検出されなかった (図 13B)。この結果から、DMC1-R252S、DMC1-R252G 変異体には DNA 鎖交換活性はないか、もしくは著しく低下していることがわかった。

そこで、これらの変異体の DNA の結合活性が欠損しているのではないかと考え、ゲルシフトアッセイにより DNA 結合活性を調べた。その結果、予想に反して、単鎖 DNA 結合活性は、DMC1-R252G では WT とほぼ同じ程度の活性を示した (図 13C lane 10-12)。また、DMC1-R252S 変異体では、若干の単鎖 DNA 結合活性の低下を示した (図 13C lane 6-8)。それに対し、二重鎖 DNA 結合活性は、どちらの変異体においても顕著な欠損を示した (図 13D lane 6-8, lane 10-12)。DMC1-R252S および DMC1-R252G 変異体の DNA 鎖交換反応の欠損は、二重鎖

DNA 結合の顕著な低下に起因していると考えられる。Arg 252 残基は、DMC1 の表面に露出しているため、二重鎖 DNA 特異的な DNA 結合残基として働いていることが示唆される。

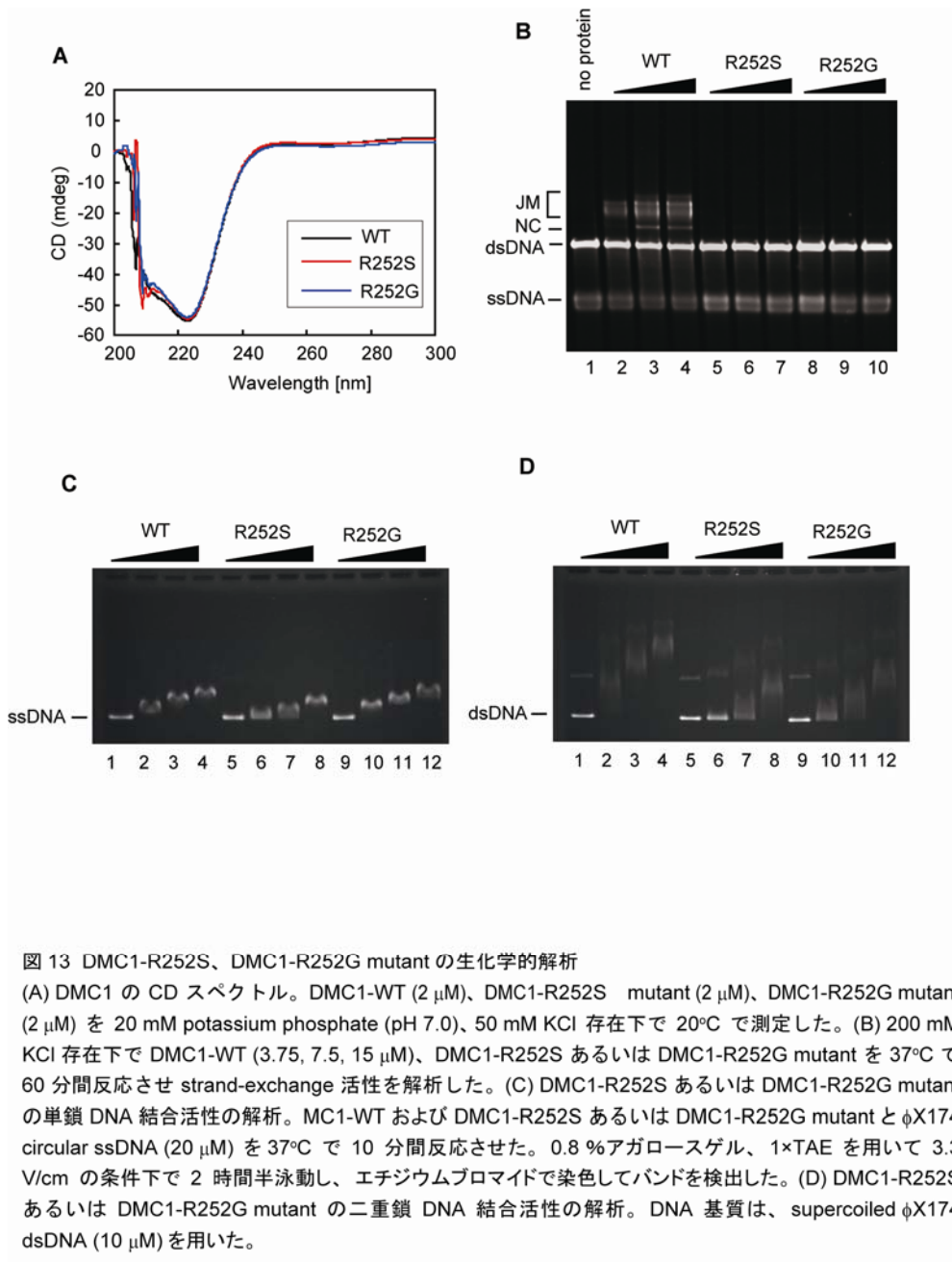


図 13 DMC1-R252S、DMC1-R252G mutant の生化学的解析

(A) DMC1 の CD スペクトル。DMC1-WT (2  $\mu$ M)、DMC1-R252S mutant (2  $\mu$ M)、DMC1-R252G mutant (2  $\mu$ M) を 20 mM potassium phosphate (pH 7.0)、50 mM KCl 存在下で 20°C で測定した。(B) 200 mM KCl 存在下で DMC1-WT (3.75, 7.5, 15  $\mu$ M)、DMC1-R252S あるいは DMC1-R252G mutant を 37°C で 60 分間反応させ strand-exchange 活性を解析した。(C) DMC1-R252S あるいは DMC1-R252G mutant の単鎖 DNA 結合活性の解析。MC1-WT および DMC1-R252S あるいは DMC1-R252G mutant と  $\phi$ X174 circular ssDNA (20  $\mu$ M) を 37°C で 10 分間反応させた。0.8 %アガロースゲル、1 $\times$ TAE を用いて 3.3 V/cm の条件下で 2 時間半泳動し、エチジウムブロマイドで染色してバンドを検出した。(D) DMC1-R252S あるいは DMC1-R252G mutant の二重鎖 DNA 結合活性の解析。DNA 基質は、supercoiled  $\phi$ X174 dsDNA (10  $\mu$ M) を用いた。

## 第3章 DMC1-I37N バリエントの生化学的解析

### 3-1. 背景

DMC1 は、減数分裂期に必須の相同 DNA 組換え酵素である。近年、マウスにおいて Ala272 が Pro に置換された *Dmc1-A272P* 変異 (*Dmc1<sup>Meil1</sup>*) が不妊を引き起こすことが示された (Bannister et al., 2007)。この Ala272 は、DNA 結合サイトである L2 ループに位置する。*Dmc1-A272P* では、DNA 結合および相同 DNA 対合活性の低下がみられる。更に、*DMC1* 遺伝子多型の一つ *DMC1-M200V* ホモ接合体の女性が不妊になるという報告がなされている (Mandon-Pépin et al., 2002; Mandon-Pépin et al., 2008)。この *DMC1-M200V* バリエントについては、第2章で記載したように、相同 DNA 組換え活性が低下することを示した。これらの事実は、相同 DNA 組換え活性に影響を及ぼす *DMC1* のアミノ酸置換が不妊症の原因になる可能性を示唆している。

本解析では、N 末端ドメインの *DMC1* バリエントである Ile37 が Asn に置換されている *DMC1-I37N* バリエントに着目した。*DMC1* のホモログである RadA や Rad51 の N 末端ドメインは二重鎖 DNA と結合することが報告されており (Chen et al., 2007; Aihara et al., 1999)、*DMC1* の N 末端ドメインも同様な働きをすることが予想されている。*DMC1* の N 末端ドメインの構造は決定されていないが、*DMC1* の N 末端ドメイン欠失変異体の解析により DNA 結合および相同 DNA 対合活性が欠損することが明らかにされている (Kinebuchi et al., 2005)。また、N 末端ドメイン欠失変異体では、8 量体リング構造ではなく 7 量体リング構造をとることが示されている (Kinebuchi et al., 2005)。このことから、*DMC1* の N 末端領域は *DMC1* の構造安定性においても重要な役割を果たしていることが予想さ



れる。Ile37 が Asn に置換されることにより、DMC1-I37N バリエントは、DMC1 の N 末端ドメインの構造を変化させることが推測され、DMC1 の二重鎖結合および DMC1 の組換え活性に影響を及ぼすことが考えられる。

本解析では、DMC1-I37N バリエントが DMC1 の組換え活性に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。DMC1-I37N バリエント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ところ、二重鎖 DNA 結合が低下することを発見した。また、DMC1-I37N バリエントは高い  $\text{Ca}^{2+}$  濃度においては相同 DNA 対合・鎖交換活性を有するが、通常 DMC1 の相同 DNA 対合・鎖交換活性が検出される条件では全く活性を示さないことを明らかにした。これらのことから DMC1 と DMC1-I37N バリエントの間には大きな生化学的性質の違いがあることを見出した。

## 3-2. 材料および実験方法

### 3-2-1. DNA

本実験で使用した DNA は、下記の通りである。濃度は全てヌクレオチドあたりのモル濃度を表記している。

#### ・ pET-15b-DMC1-I37N

pET15b-DMC1 を用いて pET-15b-DMC1-M200V と同様の方法により Ile37 を Asn37 に置換して作製したプラスミド。プライマー9、10を使用した。

9: 5'-AAC GTG GCT GAC AAT AAG AAA CTG AAA-3'

10: 5'-TTT CAG TTT CTT ATT GTC AGC CAC GTT-3'

その他に用いた DNA は、第2章の2-2-1. DNA の項に記載した。

### 3-2-2. DMC1-I37N の精製

DMC1-I37N タンパク質の精製方法は、第2章の2-2-2. DMC1、DMC1-M200V の精製の通り行った。

### 3-2-3. ゲルシフトアッセイ法

2章の2-2-5. ゲルシフトアッセイ法の項に記載した。

### 3-2-4. D-loop アッセイ法

DMC1 タンパク質あるいは DMC1-I37N バリエントと 1  $\mu$ M  $^{32}$ P 標識 SAT-1 (50-mer) を 10  $\mu$ l の反応溶液 [20 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 50 mM KCl, 1 mM ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT, 20 mM creatine phosphate, 75  $\mu$ g/ml creatine kinase] 中にそれぞれ 1、2、4、8 mM CaCl<sub>2</sub> を添加し、37°C で 5 分間インキュベーションし、その後、30  $\mu$ M pGsat4 を加え反応を開始させた。反応の停止は、1% SDS、1.7 mg/ml proteinase K (Roche Applied Science)、37°C で 15 分間インキュベーションすることにより行った。1%アガロースゲル、1×TAE (40 mM Tris acetate, 1mM EDTA) を用いて 3.3 V/cm の条件下で 3 時間泳動し、ゲルを乾燥させ、イメージングプレートに感光させた。BAS-2500 イメージングアナライザー (Fujifilm) によりバンドを検出し、Image Gauge ソフトウェアにより定量した。

### 3-2-5. strand-exchange アッセイ法

DMC1 タンパク質あるいは DMC1-I37N バリエントを、20  $\mu$ M  $\Phi$ X174 環状単鎖 DNA (New England BioLabs) と混合し、10  $\mu$ l の反応溶液 [20 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 0.25 or 50 mM KCl, 1 mM ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT 20

mM creatine phosphate 75 µg/ml creatine kinase] 中に、それぞれ 1、2、4、8 mM CaCl<sub>2</sub> を添加し、37°Cで 10 分間反応させた。その後、RPA (終濃度) を加え、更に 37°C で 10 分間反応させた。*Pst*I (TOYOBO) 制限酵素処理により線状化した 20 µM ΦX174 二重鎖 DNA を加え、60 分間反応させた。反応の停止は、1% SDS、1.7 mg/ml proteinase K (Roche Applied Science) を添加し、37°Cで 20 分間インキュベーションすることで行った。タンパク質の除去をしたサンプルを 1%アガロースゲル、1×TAE (40 mM Tris acetate, 1mM EDTA) を用いて 3.3 V/cm の条件下で 3 時間泳動することで分離し、SYBER Gold (Invitrogen) により染色してバンドを検出した。

### 3-2-6. ATP 加水分解活性

DMC1 タンパク質あるいは DMC1-I37N バリエーションは反応溶液 [20 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 125 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT] 中で混合し、単鎖 DNA 存在下および非存在下で ATP 加水分解活性を測定した。DNaseI 処理の実験においては、1 ユニットの DNaseI (Roche Applied Science) を反応溶液に添加し、37°Cで 30 分間インキュベーションした。1 mM ATP (Roche, ATP sodium salt) を加え、37°Cで 60 分間インキュベーションした。20 µl の反応溶液に 100 mM EDTA を 30 µl 添加し反応を停止させた。50 µl のサンプル (20 µl 反応溶液+30 µl EDTA) に 500 µl のリン酸化定量液を加えよく混ぜ、34% (w/v) tri-sodium citrate dehydrate を 50 µl を加え、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) にて 600 nm の波長を測定した。なお、リン酸化定量液とは、0.0045% (w/v) malachite green oxalate と 4.2% (w/v) hexaammonium heptamolybdate tetrahydrate を 3 : 1 で混合し、その後、100 分の 1 量の 10% (w/v) polyvinyl alcohol を加えて混合したものである。

### 3-2-7. 円偏光二色性 (CD) スペクトル解析

DMC1 (2  $\mu$ M)、DMC1-I37N バリエント (2  $\mu$ M) を 1 cm 石英セルを用いて JASCO J-820 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic Co., Ltd) にて測定した。全てのサンプルは 20 mM potassium phosphate (pH 7.0)、50 mM KCl の条件下で 222 nm の波長を測定した。1°C/min で 20°C から 98°C まで温度を上昇させた。

## 3-3. 結果と考察

### 3-3-1. DMC1-I37N の精製

DMC1 の一アミノ酸置換体である DMC1-I37N バリエントが DMC1 の構造に及ぼす影響を解析するために、DMC1-I37N バリエント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。まず、N 末端に His<sub>6</sub> タグを融合させたリコンビナントタンパク質として DMC1-I37N を大腸菌内で発現させ、Ni-NTA (Qiagen) カラムで粗精製後、thrombin protease (GE Healthcare Biosciences) 処理し、His<sub>6</sub> タグを除去し、Heparin-Sepharose (GE Healthcare Biosciences) カラムを用いて精製した。15% SDS-PAGE による分析の結果、DMC1-I37N バリエントの最終精製物はいくつかの分解物が混在していることがわかった (図 14A)。そのため、DMC1-I37N バリエントでは、WT と比較して安定性が低下することが示唆された。

### 3-3-2. DMC1-I37N の CD スペクトル解析

DMC1-I37N バリエントはリコンビナントタンパク質として精製できたが、WT よりも分解物が多かったことから、DMC1-I37N バリエントは分解されやすく不安定であることが予想された。そこで、構造安定性を解析するため、CD スペクトル解析を行った。20°C から 98°C まで 1°C ずつ温度を上昇させ、DMC1-WT、

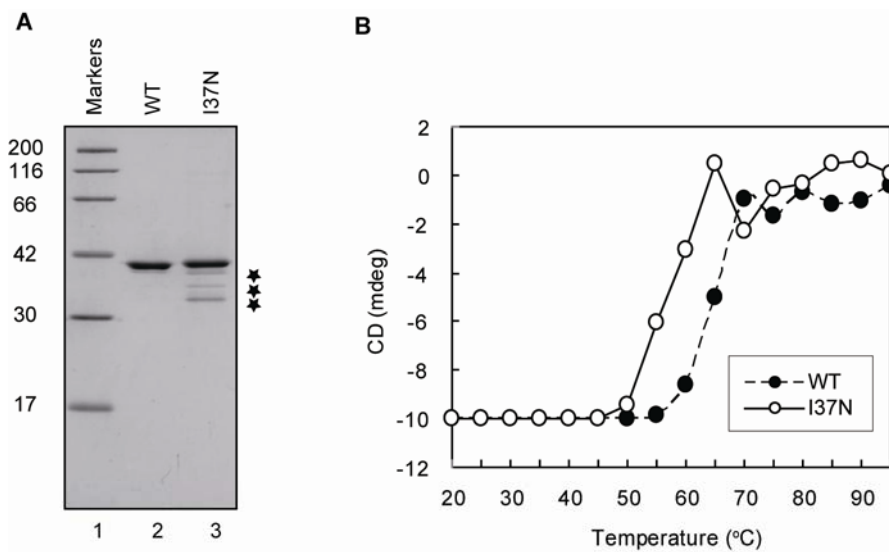


図 14 DMC1-I37N variant の精製

(A) 精製した DMC1 タンパク質。DMC1-WT (lane 2)、DMC1-I37N variant (lane 3) を 15% SDS-PAGE により解析した。lane 1 は分子量マーカー。星印は分解物を示している。  
 (B) DMC1-I37N variant の熱安定性の解析。20 °C から 98 °C まで温度を変化させて、222 nm の波長で DMC1-WT および DMC1-I37N variant の CD スペクトルを測定した。

DMC1-I37N バリアントの 222 nm の波長での CD 値を測定した。その結果、DMC1-WT の  $T_m$  値は 65°C、DMC-I37N バリアントの  $T_m$  値は 57°Cであり、DMC1-I37N バリアントは DMC1-WT よりも低い温度で変性する。これより、DMC1-I37N バリアントの熱安定性は DMC1-WT と比較して低下していると結論した (図 14B)。

### 3-3-3. DMC1-I37N の ATP 加水分解活性

DMC1-I37N バリアントの ATP 加水分解活性を解析した。DMC1-WT は、単鎖 DNA 存在下で ATP 加水分解活性を示す (図 15A)。しかし、125 mM KCl、単鎖 DNA 非存在下においては、DMC1-WT の ATP 加水分解活性を検出することはできない (図 15A)。一方、DMC1-I37N バリアントは、単鎖 DNA 存在下および単鎖 DNA 非存在下どちらにおいても ATP 加水分解活性を示した (図 15B)。DMC1-WT は、DNA 非存在下で ATP 加水分解活性を示さない。そのため、単鎖 DNA 非存在下における DMC1-I37N バリアントの ATP 加水分解活性は、精製した DMC1-I37N バリアントへの DNA の混入による可能性が疑われる。そこで、精製した DMC1-I37N バリアントの 260 および 280 nm の波長における吸光度を測定した。 $A_{280}/A_{260}$  比は 1.29 であり、ほぼ DMC1-WT と同じであった。従って、DMC1-I37N バリアントへのヌクレオチドの混入は、DMC1-WT と同程度であることがわかった。また、ATP 加水分解活性の解析に用いた DMC1-I37N タンパク質溶液について 0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動し、DNA の有無を解析した。その結果、精製した DMC1-I37N バリアントタンパク質には、DNA が検出されなかった。これらの結果は、精製した DMC1-I37N タンパク質には、DNA の混入はないということを示している。更に、DNaseI で処理することにより、DMC1-I37N バリアントの ATP 加水分解活性に及ぼすか影響を解析した。DNaseI

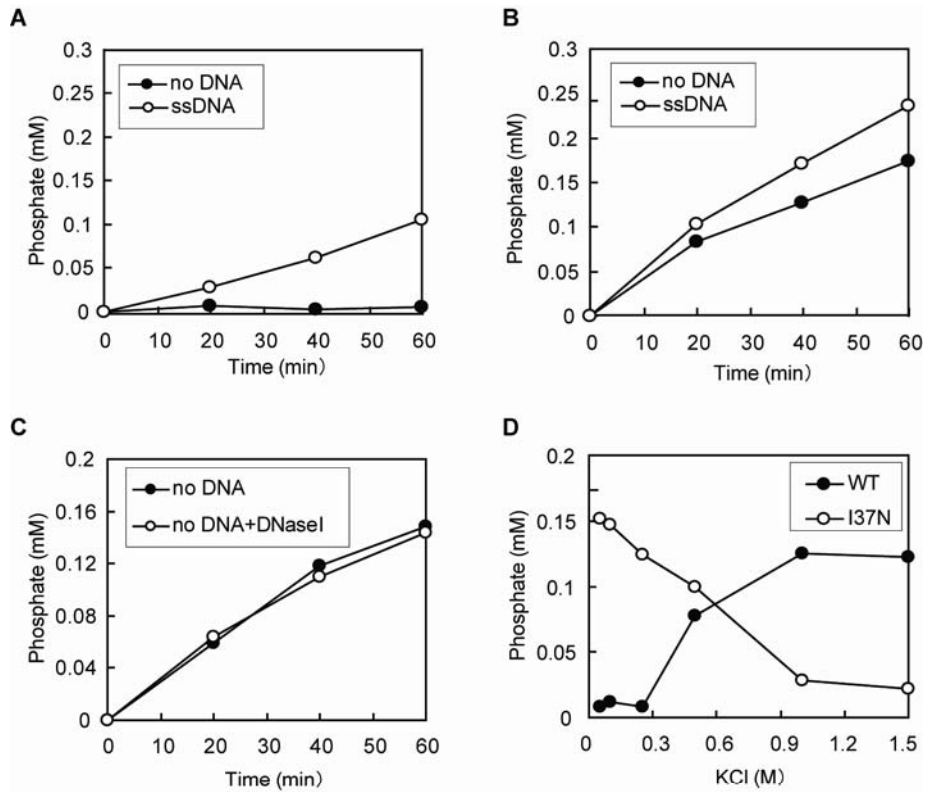


図 15 DMC1-I37N variant の ATP 加水分解活性の解析

(A) DMC1-WT の ATP 加水分解活性の経時変化のグラフ。(B) DMC1-I37N variant の ATP 加水分解活性の経時変化のグラフ。黒丸は DNA 非存在下、白丸は ssDNA 存在下における ATP 加水分解活性を解析した。(C) DNaseI 処理後の DMC1-I37N variant の ATP 加水分解活性を測定した。黒丸は DNaseI 処理無し、白丸は DNaseI 処理の有りを示している。(D) ATP 加水分解活性における KCl 濃度の影響。DNA 非存在下、0.05-1.5 M KCl における DMC1-WT および DMC1-I37N variant の ATPase 活性を測定した。

処理の有無により、DMC1-I37N バリエントの ATP 加水分解活性が影響されることはなかった (図 15C)。以上の結果から、DMC1-I37N バリエントの DNA 非依存的な ATP 加水分解活性は、DNA の混入によるものではないと結論した。DNA 非存在下の高い塩濃度条件 (1.5 M NaCl) において、DMC1-WT は ATP 加水分解活性を示す。DNA 非存在下において、DMC1-WT は低い塩濃度条件 (0 - 0.3 M KCl) では ATP 加水分解活性を示さないが、高い塩濃度条件 (> 0.5 M KCl) において ATP 加水分解活性を示した (図 15D)。反対に、DMC1-I37N バリエントは、DNA 非存在下、低い塩濃度 (< 0.5 M KCl) においては、ATP 加水分解活性を示すが、高い塩濃度 (> 1.0 M KCl) においては、ATP 加水分解活性を示さなかった。これらの結果は、DMC1-I37N は DMC1-WT とは異なる条件において ATP 加水分解活性を有することを示している。

#### 3-3-4. DMC1-I37N による DNA 鎖交換活性

次に、DMC1-I37N バリエントの DNA 鎖交換反応について調べた。DNA 鎖交換反応の *in vitro* 実験系として strand-exchange アッセイ法を用いた。このアッセイ法では、ΦX174 ファージ環状単鎖 DNA (5386 塩基) と *Pst*I 処理することにより線状化した ΦX174 二重鎖 DNA (5386 塩基) を基質として用いた。

まず、200 mM KCl 存在下で DMC1 の DNA 鎖交換活性を解析した。その結果、DMC1-I37N バリエントは、DNA 鎖交換活性が著しく低下していることが明らかになった (図 16B)。DMC1 の DNA 鎖交換活性は、Ca<sup>2+</sup>により活性化される (Bugreev et al., 2005)。Ca<sup>2+</sup>存在下における DMC1-WT、DMC1-I37N バリエントの DNA 鎖交換活性について調べた。DMC1-WT において、0、1、2 mM の低い Ca<sup>2+</sup>濃度では DNA 鎖交換活性の上昇がみられたが (図 16C lane 2, 4, 6)、4、8 mM の高い Ca<sup>2+</sup>濃度では活性化せずむしろ抑制された (図 16C lane 8, 10)。一



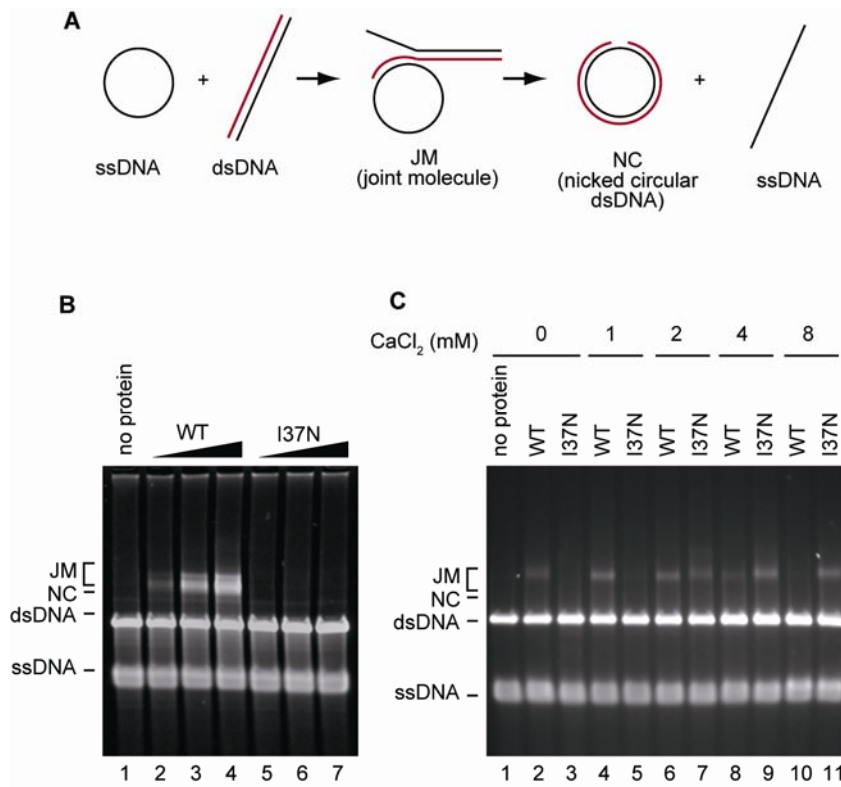


図 16 DMC1-I37N variant による DNA 鎖交換活性の解析  
 (A) strand-exchange アッセイ法の模式図。(B) DMC1-I37N variant の strand-exchange 活性の解析。DMC1-WT および DMC1-I37N variant を circular ssDNA (20  $\mu$ M) を 200 mM KCl 存在下で 37°C で 10 分間反応させ、RPA (2  $\mu$ M) を加え 10 分間反応させた。linearized dsDNA (20  $\mu$ M) 加え、60 分間反応させた。(C) strand-exchange 活性における  $\text{CaCl}_2$  濃度の影響。50 mM KCl、図示された  $\text{CaCl}_2$  条件下における DMC1-WT および DMC1-I37N variant の strand-exchange 活性を解析した。

方、DMC1-I37N バリエントにおいては、0、1、2 mM の低い  $\text{Ca}^{2+}$  濃度では DNA 鎖交換活性を示さず (図 16C lane 3, 5, 7)、4、8 mM の高い  $\text{Ca}^{2+}$  濃度では活性を示した (図 16C lane 9, 11)。更に、DMC1-I37N バリエントの相同 DNA 対合活性についても解析したところ、低い  $\text{Ca}^{2+}$  濃度では活性を示さず、高い  $\text{Ca}^{2+}$  濃度で活性化し (図 17B lane 9, 11)、DNA 鎖交換活性が活性化する条件と一致した。これらの結果は、DMC1-WT と DMC1-I37N バリエントは、相同 DNA 対合活性および DNA 鎖交換活性の至適条件が大きく異なることを示している。

### 3-3-5. DMC1-WT、DMC1-I37N 共存下における DNA 鎖交換活性

ヘテロ接合体 *DMC1-WT/DMC1-I37N* の状態を模倣するために、DMC1-WT と DMC1-I37N バリエント共存下における DNA 鎖交換活性を解析した。DMC1-WT による DNA 鎖交換が活性化される条件 (200 mM KCl) で、DMC1-WT と DMC1-I37N バリエントを様々な混合比にし、DNA 鎖交換活性を調べた。その結果、DMC1-WT の至適条件下では DMC1-WT の濃度に依存した活性を示し、DMC1-I37N バリエントの影響は確認できなかった。逆に、DMC1-I37N バリエントの活性化が検出できる条件 (8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) では、DMC1-I37N バリエントの濃度に依存した活性を示し、DMC1-WT の影響は確認できなかった (図 18 lane 9, 11)。これらの結果から、DMC1-WT、DMC1-I37N バリエントは、共存下において互いの活性に影響を及ぼさないことが明らかになった。

### 3-3-6. DMC1-I37N の DNA 結合活性

Ile37 は DMC1 の N 末端ドメインに位置しているアミノ酸残基である。RAD51 タンパク質の N 末端領域は、直接 DNA に結合することが示唆されている (Aihara et al., 1999)。そこで、DMC1-I37N の DNA 結合活性を解析した。

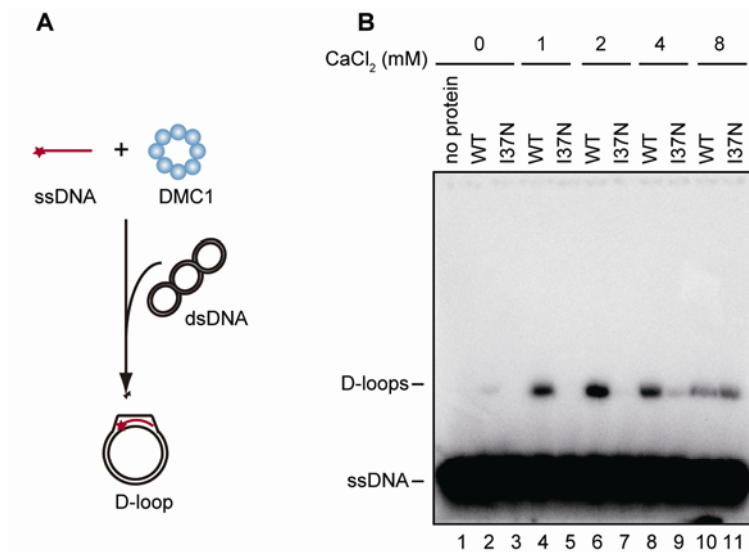


図 17 DMC1-I37N variant による相同 DNA 対合活性

(A) D-loop アッセイ法の模式図。星印は <sup>32</sup>P で標識した 50-mer ssDNA を示している。(B) D-loop 形成における CaCl<sub>2</sub> 濃度の影響。DMC1 (4 μM), DMC1-I37N variant (4 μM) と ssDNA (1 μM) を図に示した CaCl<sub>2</sub> 濃度存在下で 37°C で 5 分間インキュベーションした。その後、supercoiled dsDNA (30 μM) を加え 10 分間反応させた。

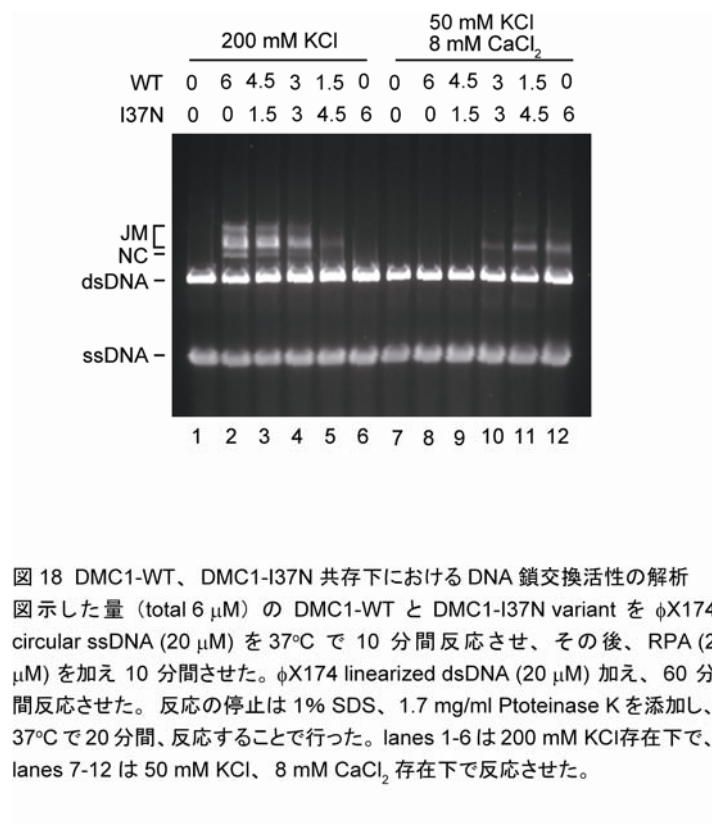


図 18 DMC1-WT、DMC1-I37N 共存下における DNA 鎖交換活性の解析  
 図示した量 (total 6  $\mu$ M) の DMC1-WT と DMC1-I37N variant を  $\phi$ X174  
 circular ssDNA (20  $\mu$ M) を 37°C で 10 分間反応させ、その後、RPA (2  
 $\mu$ M) を加え 10 分間させた。 $\phi$ X174 linearized dsDNA (20  $\mu$ M) 加え、60 分  
 間反応させた。反応の停止は 1% SDS、1.7 mg/ml Proteinase K を添加し、  
 37°C で 20 分間、反応することで行った。lanes 1-6 は 200 mM KCl 存在下で、  
 lanes 7-12 は 50 mM KCl、8 mM CaCl<sub>2</sub> 存在下で反応させた。

DMC1-I37N バリエントでは、ほぼ WT と同じ単鎖 DNA 結合活性を示した (図 19A)。しかし、DMC1-I37N バリエントの二重鎖 DNA 結合活性は、顕著に減少した (図 19B)。これらの結果は、DMC1 タンパク質の N 末端ドメインは、二重鎖 DNA 結合活性に重要であることを示している。これらの結果より、DMC1-I37N の相同 DNA 対合・鎖交換活性の欠損は、二重鎖 DNA 結合能の低下に起因していると考えられた。

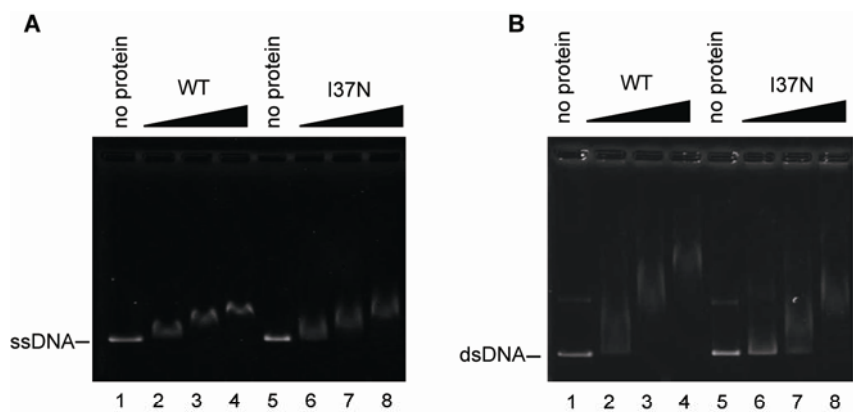


図 19 DMC1-I37N バリエントの DNA 結合活性

(A) DMC1-I37N variant の単鎖 DNA 結合活性の解析。DMC1-WT および DMC1-I37N variant と  $\phi$ X174 circular ssDNA (20  $\mu$ M) を 37°C で 10 分間反応させた。0.8 %アガロースゲル、1 $\times$ TAE を用いて 3.3 V/cm の条件下で 2 時間半泳動し、0.5  $\mu$ g/ml エチジウムブロマイドで染色し、バンドを検出した。(B) DMC1-I37N variant の二重鎖 DNA 結合活性の解析。DNA 基質は、supercoiled  $\phi$ X174 dsDNA (10  $\mu$ M) を用いた。

## 第4章 総合討論

### 4-1. DMC1 バリエントの相同 DNA 組換え活性

#### 4-1-1. DMC1-M200V の相同 DNA 組換え活性

本研究では、不妊症との関連性が示唆されている DMC1 の一塩基多型、DMC1-M200V バリエントの構造生物学的・生化学的解析を行った。

DMC1-M200V ヘテロ接合体 (*DMC1-M200V/DMC1*) の平均遺伝子頻度は0.204で、ホモ接合体はほとんど検出されていない。近年、不妊症の患者から *DMC1-M200V* ホモ接合体が発見され (Mandon-Pépin et al., 2008; Mandon-Pépin et al., 2002)、この一塩基多型が、DMC1 タンパク質の構造や機能に影響を及ぼすことにより、不妊症の遺伝的原因の一つになることが予想された。この可能性を明らかにするために、DMC1-M200V バリエントをリコンビナントタンパク質として精製し、結晶化を行った。X線結晶構造解析の結果、DMC1-M200V バリエントは、8量体リング構造を形成し、DMC1-WT との大きな構造上の違いは見出されなかった (図 8A)。しかし、DMC1-M200V バリエントでは  $\alpha$ -11 と  $\alpha$ -13 ヘリックスの疎水性相互作用が DMC1-WT よりも低下していることを構造生物学的に示した。生化学的解析の結果、DMC1-M200V バリエントは DMC1-WT よりも安定性が低下していることが明らかになった (図 8C, D)。興味深いことに、DMC1-M200V バリエントでは *in vitro* における減数分裂期組換えが中程度の欠損を示した (図 10B, C)。また、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) を用いて行った *in vivo* 解析において、*DMC1-M200V* に対応する変異 (*dmc1-M194V*) を導入した変異株も減数分裂期組換えの中程度の欠損を示した (Hikiba et al., 2008)。以上の構造生物学・生化学・遺伝学的解析の結果は、DMC1-M200V バリエント

では、減数分裂期における DMC1 の機能が部分的に欠損することを強く示唆している。

DNA 結合ループである L2 の A272P に変異がある *Dmcl<sup>Mei1</sup>/+* では、オス特異的に不妊になることが示されている (Bannister et al., 2007)。若いメスの *Dmcl<sup>Mei1</sup>/+* においては、受精は正常に行われるが、始原卵胞細胞の数が減少する。そのため、加齢に伴い不妊になることが予想されている。A272P は相同 DNA 対合活性を示さないことから、ヘテロ接合体である *Dmcl<sup>Mei1</sup>/+* では、DMC1 の組換え活性が正常の半分程度欠失していると推測される。*DMC1-M200V* バリエントのホモ接合体は不妊症の女性から見出された。この女性も加齢に伴い POF を発症したことから、始原卵胞細胞の数が少なかった可能性が考えられる。これらのことから、DMC1 の組換え活性は出生時の始原卵胞細胞数に影響を与えることが考えられる。本解析において *DMC1-M200V* バリエントでは、DMC1 の組換え活性が部分的に欠損を示した。このことは、*DMC1-M200V* バリエントが、POF の遺伝的原因の一つになりうることを強く示唆している。*DMC1-M200V* ホモ接合体が POF による不妊症の原因になりうるということを更に解析するためには、*DMC1-M200V* をノックインしたマウスの不妊発症率の解析や、不妊症患者の *DMC1* 遺伝子多型の解析が必要であり、現在進行中である。

DMC1 は 8 量体リング構造とらせん状のフィラメント構造を形成することが知られており (Kinebuchi et al., 2004; Passy et al., 1999; Masson et al., 1999; Sehorn et al., 2004; Sauvageau et al., 2005)、らせん状フィラメント構造が、相同 DNA 対合・鎖交換反応の活性型であると考えられている (Bugreev et al., 2005; Pittman et al., 1998)。しかし、DMC1 のらせん状フィラメント構造の X 線結晶構造は未だに明らかになっていない。X 線結晶構造解析の結果、古細菌 RadA や酵母の Rad51 ではフィラメント構造が明らかにされている (Wu et al., 2004; Wu et al., 2005;



Conway et al., 2004; Chen et al., 2007)。古細菌の RadA の X 線結晶構造では、 $Mg^{2+}$  に結合するアミノ酸残基である Asp246 残基が、DMC1 の  $\alpha$ -13 ヘリックスに相当する  $\alpha$ -ヘリックス上に位置している (Qian et al., 2007)。そのため、DMC1 の  $\alpha$ -13 ヘリックスは  $Mg^{2+}$  結合サイトであると推測され、この  $\alpha$ -ヘリックスを形成するアミノ酸残基の変異は、金属イオン結合サイトの構造を変化させることが予想された。DMC1 の Met200 残基は、 $\alpha$ -13 ヘリックス上に位置する Met249 残基と直接、疎水結合を形成しているため、DMC1-M200V バリエントは  $Mg^{2+}$  イオンの結合に影響を与えるのではないかと考えられる。本解析から DMC1-M200V バリエントでは、1~3 mM の  $Mg^{2+}$  濃度における相同 DNA 対合活性の低下を示したが、4~5 mM の  $Mg^{2+}$  濃度においては、WT とほぼ同程度の活性を示した (図 10B)。このことは、DMC1-WT と DMC1-M200V バリエントでは  $Mg^{2+}$  イオンの感受性が異なることを示している。ヒトの細胞内において、遊離の  $Mg^{2+}$  イオンは、0.5~1.0 mM 濃度で存在すると考えられており (Romani and Scarpa, 2000; Schmitz et al., 2003)、DMC1-M200V バリエントが 1~3 mM の  $Mg^{2+}$  濃度で示す相同 DNA 対合活性の低下は、生体内でも同様に起こると考えられた。DMC1 において、 $Mg^{2+}$  イオンの結合は 8 量体リング構造から活性型フィラメントへ誘起していると考えられており、そのため、 $Mg^{2+}$  イオン依存的な活性型フィラメント構造形成に部分的欠損を示すのかもしれない。実際、DMC1-M200V バリエントでは構造安定性の低下が検出されている (図 9D, 11B)。興味深いことに、RadA の Asp246 残基に相当する DMC1 のアミノ酸残基は Glu258 であり、隣接した DMC1 のプロトマー間において 3 つのアミノ酸と水素結合を形成し、構造の安定化に寄与している (Kinebuchi et al., 2004)。 $Mg^{2+}$  イオンの結合によって、Glu258 残基が形成している 3 つの水素結合が失われ、8 量体リング構造の解離が起こり、らせん状フィラメント構造へのスイッチングが行われるのかもしれない。

以前の研究で、RAD51 およびRadAのN末端ドメインは、DNA結合モチーフ (Helix-hairpin-Helix: HhH) であることが明らかにされている (Chen et al., 2007; Aihara et al., 1999; Wu et al., 2004)。RAD51 のN末端ドメインはDNAと結合し、結合したDNAをフィラメント内部に存在するDNA結合ループ (L1 およびL2) へと導く働きをしていると推測されている (ゲートウェイ仮説)。DMC1 においても、N末端ドメインはDNA結合部位として機能し (Kinebuchi et al., 2005)、同様な働きをしていることが考えられる。DMC1 がフィラメント構造をとったと仮定した場合の $\alpha$ -11、 $\alpha$ -13 ヘリックス、Met200 およびArg252 の位置を、RadAフィラメント構造モデル (PDB ID: 1XU4) 上に示した (図 20)。その結果、DMC1 の $\alpha$ -11 ヘリックスに位置するMet200、 $\alpha$ -13 ヘリックスに位置するMet249、Arg252 残基は、溶媒に露出しており、DNA結合サイトとして機能しうる位置に存在することが明らかになった。DMC1-R252GおよびDMC1-R252S変異体を作製し、生化学的解析を行ったところ、これらの変異体は、DNA二重鎖結合とDNA鎖交換反応に顕著な欠損を示した (図 11B, D)。これらの結果は、図 20 で示した構造モデルと一致しており、 $\alpha$ -13 ヘリックス上に位置するArg252 残基は、二重鎖DNA特異的なDNA結合残基として働いていることを示唆している。これは、ゲートウェイ仮説を支持するものであった。これらのことから、DMC1-M200VバリエーションはDMC1 の組換え活性に影響を与えると結論された。DMC1 フィラメントとDNAとの共結晶構造解析により、Met200 の役割が明らかになるだろう。

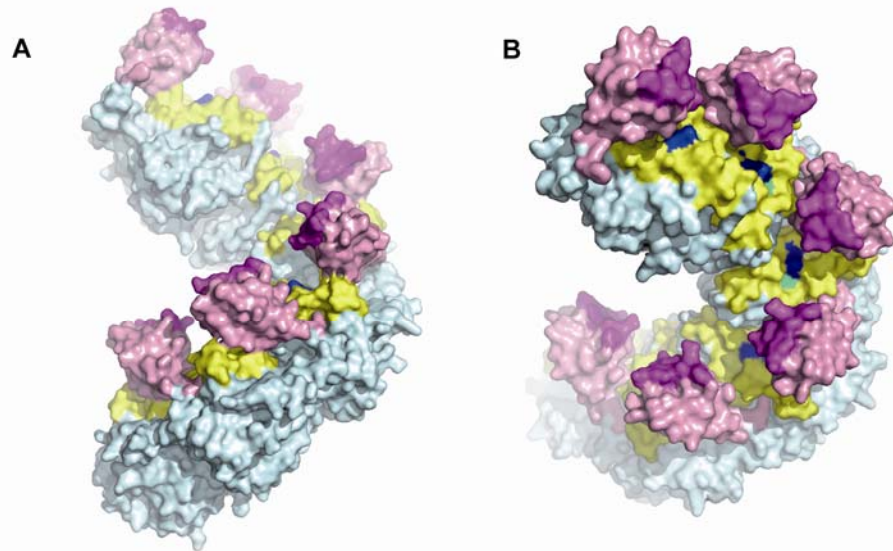


図 20 DMC1-M200V、DMC1-Arg252 残基に相当する位置を RadA フィラメントモデル上に示した。1 らせん回転分の RadA フィラメント構造 (PDB ID: 1XU4) のサイド図 (A) とトップ図 (B)。N-terminal domain( ピンク)、DNA-binding HhH motif ( マゼンタ)、 $\alpha$ -11、 $\alpha$ -13 ヘリックス ( イエロー) で示した。 *Methanococcus voltae* RadA においてヒト DMC1-Met200 と DMC1-Arg252 に相当するアミノ酸残基は、Met189 と Thr240 である。Thr240 残基は Arg に PyMOL プログラムを用いて置換した。Met189 と Arg240 はグリーンとブルーで示した。

#### 4-1-2. DMC1-I37N の相同 DNA 組換え活性

近年のゲノム解析の結果、DMC1にも多くの一塩基多型が発見され、そのうち DMC1 のコーディング領域に 3 種類の一塩基多型が存在することが明らかになった。そのうちの一つである DMC1-M200V バリエントは、*in vitro* における組換え活性が中程度に欠損することにより、不妊症の原因になりうることを第 2 章において示した。DMC1-I37N バリエントも、DMC1 のコーディング領域のアミノ酸が置換されたレアバリエントである。この DMC1-I37N バリエントは、ヒトにおける保有頻度は未だに明らかにされていない。本研究では、DMC1-I37N の生化学的性質を解析し DMC1-WT との比較を行った。

DMC1-I37N バリエントでは、DMC1-WT が有する単鎖 DNA 依存的 ATP 加水分解活性、高塩濃度誘導性の ATP 加水分解活性を示さず、低い塩濃度における DNA 非依存性の ATP 加水分解活性を示した (図 15)。また、相同 DNA 対合・鎖交換活性においても DMC1-WT において活性を示さない高い  $\text{Ca}^{2+}$  濃度において活性を示した (図 14, 15)。これらの結果は、DMC1-I37N バリエントにおいては、DMC1-WT と生化学的性質が大きく異なることを意味する。そこで、これら DMC1-WT、DMC1-I37N バリエントのどちらの至適条件が、減数分裂期組換えに近い状況であるのかという疑問が生じる。哺乳類におけるパキテン期の精母細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は、30-40 nM であるという報告がある (Herrera et al., 2001)。そのため、4 mM から 8 mM の高い  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を要求する DMC1-I37N バリエントは、減数分裂期組換え時においては、不活性型であることが推測される。DMC1-WT と DMC1-I37N バリエントの混在下において、DNA 鎖交換活性を解析したところ、DMC1-I37N バリエントは DMC1-WT の活性化および不活性化のどちらも示さなかった (図 18)。このことは、ヘテロ接合体 (DMC1/DMC1-I37N) においては野生型のみが働き、DMC1 ホモ接合体の活性の半分程度になっていると考えられる。そのため、DMC1-I37N バリエント単独での *in vitro* 解析の結果のような

劇的な相同 DNA 組換え欠損は示さず、中程度の欠損を引き起こすことが予想される。また、DMC1-I37N バリエントは二重鎖 DNA 結合活性の低下を示した (図 17)。この結果は、DMC1 の N 末端ドメインが DNA 結合サイトであることを示唆しており、DNA を DMC1 フィラメント内部へ導く働きをしているという仮説を支持するものである。これらのことから、DMC1-I37N バリエントは、DMC1-M200V 同様に不妊症の原因の一つになりうる可能性が考えられる。更なる DMC1 のゲノム解析が期待される。

#### 4-2. 展望

本研究では、構造生物学的・生化学的解析により、DMC1 バリエントが DMC1 の組換え活性に及ぼす影響について明らかにした。減数分裂期組換えの中心的ステップである相同 DNA 対合反応と DNA 鎖交換反応において、DMC1 は重要な役割を果たしており、本研究で明らかにした DMC1 バリエントは、これらの活性を中程度に欠損していた。DMC1 は減数分裂期組換えに必須の因子であるため、重篤な欠損は淘汰されると考えられる。そのため、DMC1 の中程度の欠損は、POF の原因の一つになる可能性がある。今後、不妊症患者のゲノムワイドシーケンス解析や、*DMC1* バリエントをノックインしたマウスを作製し、不妊症の発症頻度の解析をすることにより、DMC1 バリエントと不妊症の関連性が明らかになることが期待される。*DMC1-M200V* あるいは *DMC1-I37N* ノックインマウスが不妊症を引き起こす場合には、不妊症のモデル生物として発症メカニズムの詳細な解析と薬剤スクリーニングをはじめとした治療法の検討を行うことが可能であり、不妊症治療への応用が期待できる。

DMC1 の活性化因子として、現在までに、RAD54B、分裂酵母 Swi5-Sfr1、出芽酵母 Mei5-Sae3、TBPIP/HOP2-Mnd1 などが報告されている。RAD54B は DMC1

と直接相互作用し、ATP加水分解エネルギーを用いてDNAを巻き戻し、DMC1およびRAD51の相同DNA対合反応を促進する (Sarai et al., 2006; Tanaka et al., 2002)。Swi5-Sfr1複合体も同様に、DMC1およびRAD51の相同鎖対合反応を促進する (Haruta et al., 2006)。Mei5-Sae3複合体は、DMC1と三者複合体を形成し、DMC1の組換え部位へのassemblyを促進すると考えられている (Hayase et al., 2004; Tsubouchi et al., 2004)。更に、TBPIP/HOP2-Mnd1複合体が、DMC1およびRAD51によるDNA鎖交換反応を促進することが明らかになっている (Enomoto et al., 2006; Petukhova et al., 2005; Enomoto et al., 2004)。減数分裂期組換えは、時・空間的に精密に制御された機構である。そのため、これらの報告された活性化因子以外にも、減数分裂期特異的にDMC1と協調して働く因子の存在が考えられている。減数分裂期組換えの分子機構を解明するためには、DMC1と相互作用する新規タンパク質の同定・網羅的解析が必要である。

DMC1の活性調節には、翻訳後修飾に関わる可能性も考えられる。RAD51においては、リン酸化やSUMO化など翻訳後に修飾されることが報告されている (Conilleau et al., 2004; Yuan et al., 1998; Li et al., 2000)。白血病細胞において、RAD51は、恒常的にリン酸化される。このRAD51の恒常的リン酸化部位は、RAD51のフィラメント形成の際の単量体同士のインターフェイスに位置することが、生化学的および分光学的解析により明らかになっている (Conilleau et al., 2004)。このRAD51のリン酸化部位は、単鎖DNAとの結合にも重要な部位であり、リン酸化されることにより、RAD51の構造・機能に影響を及ぼすと考えられる。本学、胡桃坂研究室において、質量分析をもちいたプロテオミクス解析により、DMC1と相互作用する新規因子群を探索した結果、セリンスレオニンキナーゼが発見された (未発表)。RAD51と同様にDMC1もリン酸化を受けることにより、構造・機能が影響されるのかもしれない。DMC1の翻訳後修飾とそれに伴う構

造・機能変化の解析は、活性化因子の解明と共にDMC1が制御する減数分裂期組換え機構を解明する上で重要である。

哺乳類において、精子は出生後の第二次性徴期に減数分裂が開始されることにより形成される。一方、卵子は胎生期に減数分裂が行われ、出生前までに減数分裂前期のパキテン期までを完了する。そのため、哺乳類では *in vivo* における卵子形成時の減数分裂期組換えについて詳細な解析は行われていない。*in vitro* において、減数分裂期組換えを細胞株に誘導する系を確立することが、今後の減数分裂期組換えの研究において必要である。また、ヌクレオソーム構造を形成している DNA を基質に用いた *in vitro* 組換え系の構築が、より生体内に近い減数分裂期組換えの解析をする上で重要であろう。

## 引用文献

Aboussekhra,A., Chanet,R., Adjiri,A., 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., 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.

Aihara,H., Ito,Y., Kurumizaka,H., Terada,T., Yokoyama,S. and Shibata,T. (1997) An interaction between a specified surface of the C-terminal domain of RecA protein and double-stranded DNA for homologous pairing. *J. Mol. Biol.*, **274**, 213–221.

Alberts,B., Johnson,A., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., Walter,P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. Garland Science, New York

Bannister,A.A., Pezza,R.J., Donaldson,J.R., de Rooij,D.G., Schimenti,K.J., Camerini-Otero,R.D. and Schimenti,J.C. (2007) A dominant, recombination-defective allele of Dmc1 causing male-specific sterility. *PLoS Biol.*, **5**, 1–10.

Basile,G., Aker,M. and Mortimer,RK. (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.

Bell,C.E. (2005) Structure and mechanism of Escherichia coli RecA ATPase. *Mol. Microbiol.*, **58**, 358–366.

Bergerat,A., de Massy,B., Gabelle,D., Varoutas,P.C., Nicolas,A. and Forterre,P. (1997) An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination. *Nature*, **386**, 414–417.

Bishop,D.K., Park,D., Xu,L. and Kleckner,N. (1992) DMCI: 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. and Zickler,D. (2004) Early decision: meiotic crossover interference prior to stable strand exchange and synapsis. *Cell*, **117**, 9–15.

Bishop,D.K. (2006) Multiple mechanisms of meiotic recombination. *Cell*, **127**, 1095–1097.

Brunger,A.T., Adams,P.D., Clore,G.M., DeLano,W.L., Gros,P., Grosse-Kunstleve,R.W., Jiang,J.-S., Kuszewski,J., Nilges,M. and Pannu,N.S. (1998) Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D*, **54**, 904–925.

Bugreev,DV., Golub,EI., Stasiak,AZ., Stasiak,A. and Mazin,AV. (2005) Activation of human meiosis-specific recombinase Dmc1 by  $Ca^{2+}$ . *J. Biol. Chem.*, **280**, 26886–26895.

Cao,A. and Pilia,G. (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature Genetics*, **27**, 159–166.

Carpenter,A.T., (1994) Chiasma function. *Cell*, **7**, 957-962

CCP4 (1994) The CCP4 (Collaborative Computing Project 4) suite: programs for X-ray crystallography. *Acta. Crystallogr. D*, **50**, 760–763.

Chand,AL., Robertson,DM., Shelling,AN. and Harrison,CA. (2007) Mutational analysis of betaglycan/TGF-betaRIII in premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*, **87**, 210–212.

Chen,L.T., Ko,T.P., Chang,Y.W., Lin,K.A., Wang,A.H., Wang,T.F. (2007) Structural and functional analyses of five conserved positively charged residues in the L1 and N-terminal DNA binding motifs of archaeal RADA protein. *PLoS ONE*, **2**, e858.

Chatterjee,S., Modi,D. and Maitra A. (2007) Screening for FOXL2 gene mutations in women with premature ovarian failure: an Indian experience. *Reprod. Biomed. Online*, **15**, 554–560.

Chen,L.-T., Ko,T.-P., Chang,Y.-C., Lin,K.-A., Chang,C.-S., Wang,A.H.-J. and

Wang,T.-F. (2007) Crystal structure of the left-handed archaeal RadA helical filament: identification of a functional motif for controlling quaternary structures and enzymatic functions of RecA family proteins. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 1787–1801.

Chen,Z., Yang,H. and Pavletich,NP. (2008) Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature*, **453**, 473–476.

Conilleau,S., Takizawa,Y., Tachiwana,H., Fleury,F., Kurumizaka,H. and Takahashi,M. (2004) Location of tyrosine 315, a target for phosphorylation by cAbl tyrosine kinase, at the edge of the subunit-subunit interface of the human Rad51 filament. *J. Mol. Biol.*, **339**, 797–804.

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.

Coulam,CB. (1982) Premature gonadal failure. *Fertility and Sterility*, **38**, 645–655.

Cox,M.M. and Lehman,I.R. (1981) Directionality and polarity in recA protein-promoted branch migration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **78**, 6018–6022.

Davison,R.M., Fox,M. and Conway, G.S., (2000) Mapping of the POF1 locus and identification of putative genes for premature ovarian failure.*Molecular Human Reproduction*, **6**, 314–318.

Dej,K.J., Orr-Weaver,T.L. (2000) Separation anxiety at the centromere. *Trends Cell Biol.* , **10**, 392-9

DeLano,W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.

Di Pasquale,E., Rossetti,R., Marozzi,A., Bodega,B., Borgato,S.,Cavallo,L., Einaudi,S., Radetti,G., Russo,G., Sacco,M., Wasniewska,M., Cole,T., Beck-Peccoz,P., Nelson,LM. and Persani,L. (2006) Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **91**, 1976–1979.

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.

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

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.

Hamoir,G. (1992) The discovery of meiosis by E. Van Beneden, a breakthrough in the morphological phase of heredity. *Int. J. Dev. Biol.*, **36**, 9–15.

Haruta,N., Kurokawa,Y., Murayama,Y., Akamatsu,Y., Unzai,S., Tsutsui,Y., 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 Dmc1. *Cell*, **119**, 927–940.

Henricksen,L.A., Umbricht,C.B., Wold,M.S. (2004) Recombinant replication protein A: expression, complex formation, and functional characterization. *J Biol Chem.* , 269, 11121-11132.

Herrera,E., Salas,K., Lagos,N., Benos,DJ. and Reyes,G. (2001) Temperature dependence of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis in rat meiotic and postmeiotic spermatogenic cells. *Reproduction*, **122**, 545–551.

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.

Hui,ES., Udofa,EA., Soto,J., Vanderhoof,VH., Zachman,K., Tong,ZB. and Nelson,LM. (2006) Investigation of the human stem cell factor KIT ligand gene, KITLG, in women with 46, XX spontaneous premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*, **85**, 1502–1507.

Hong,EL., Shinohara,A. and Bishop,DK. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* Dmc1 protein promotes renaturation of single-strand DNA (ssDNA) and assimilation of ssDNA into homologous super-coiled duplex DNA. *J. Biol. Chem.*, **276**, 41906–41912.

International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature*, **437**, 1299–1320.

International SNP Map Working Group (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, **409**, 928–933.

Iwabata,K., Koshiyama,A., Yamaguchi,T., Sugawara,H., Hamada,FN., Namekawa,SH., Ishii,S., Ishizaki,T., Chiku,H., Nara,T. et al. (2005) DNA topoisomerase II interacts with Lim15/Dmc1 in meiosis. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5809–5818.

Kahn,R., Cunningham,R.P., DasGupta,C. and Radding,C.M. (1981) Polarity of heteroduplex formation promoted by *Escherichia coli* recA protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **78**, 4786–4790.

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.

Kinebuchi,T., Kagawa,W., Kurumizaka,H., Yokoyama,S. (2005) Role of the N-terminal Domain of the Human DMC1 Protein in Octamer Formation and DNA Binding. *J. Biol. Chem.*, **280**, 28382-28387.

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.

Kovanci,E., Rohozinski,J., Simpson,JL., Heard,MJ., Bishop,CE. and Carson,SA. (2007) Growth differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*, **87**, 143–146.

Kurumizaka,H., Aihara,H., Ikawa,S., Kashima,T., Bazemore,LR., Kawasaki,K., Sarai,A., Radding,CM. and Shibata,T. (1996) A possible role of the C-terminal domain of the RecA protein. A gateway model for double-stranded DNA binding. *J. Biol. Chem.*, **271**, 33515–33524.

Li,Z., Golub,EI., Gupta,R. and Radding,CM. (1997) Recombination activities of

HsDmc1 protein, the meiotic human homolog of RecA protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 11221–11226.

Li,W., Hesabi,B., Babbo,A., Pacione,C., Liu,J., Chen,DJ., Nickoloff,JA. and Shen,Z. (2000) Regulation of doublestrand break-induced mammalian homologous recombination by UBL1, a RAD51-interacting protein. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1145–1153.

Lim,DS. and Hasty,P. (1996) A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 7133–7143.

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.

Marozzi,A., Manfredini,E., Tibiletti,M.G., Furlan,D., Villa, N., Vegetti,W., Crosignani, P.G., Ginelli,E., Meneveri,R. and Dalpra,L. Molecular definition of Xq common-deleted region in patients affected by premature ovarian failure. *Human Genetics*, **107**, 304–311.

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.*, **18**, 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.

McEntee,K., Weinstock,G.M. and Lehman,I.R. (1979) Initiation of general recombination catalyzed in vitro by the recA protein of Escherichia coli. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **76**, 2615–2619.

Mlinar,B., Gersak,K., Karas,N., Zitnik,IP., Battelino,T. and Lukac-Bajalo,J. (2005) Galactose-1-phosphate uridyl transferase gene mutations in women with premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*, **84**, 253–255.

Morita,T., Yoshimura,Y., Yamamoto,A., Murata,K., Mori,M., Yamamoto,H. and Matsushiro,A. (1993) A mouse homolog of the Escherichia coli recA and Saccharomyces cerevisiae RAD51 genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 6577–6580.

Neale,M.J., Pan,J. and Keeney,S. (2005) Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature*, **436**, 1053–1057.

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

Nelson,LM., Covington,SN. and Rebar,RW. (2005) An update: spontaneous premature

ovarian failure is not an early menopause. *Fertility and Sterility*, **83**, 1327–1332.

Otwinowski,Z. and Minor,W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.*, **276**, 307–326.

Ovarian Cancer Association Consortium (2008) Consortium analysis of 7 candidate SNPs for ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, **123**, 380–388.

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. and Nasmyth,K. (2003) Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell*, **112**, 423–440.

Petukhova,GV., Pezza,RJ., Vanevski,F., Ploquin,M., Masson,JY. and Camerini-Otero,RD. (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.

Portnoi,M.F., Aboura,A., Tachdjian,G., Bouchard,P., Dewailly,D., Bourcigaux,N.,

Frydman,R., Reyss,A.C., Brisset,S. and Christin-Maitre,S. (2006) Molecular cytogenetic studies of Xq critical regions in prematureovarian failure patients. *Human Reproduction*, **21**, 2329–2334.

Qian,X., He,Y. and Luo,Y. (2007) Binding of a second magnesium is required for ATPase activity of RadA from *Methanococcus voltae*. *Biochemistry*, **46**, 5855–5863.

Rizzolio,F., Bione,S., Sala,C., Goegan,M., Gentile,M., Gregato,G., Rossi,E., Pramparo,T., Zuffardi,O. and Toniolo,D. (2006) Chromosomal rearrangements in Xq and premature ovarian failure: mapping of 25 new cases and review of the literature. *Human Reproduction*, **21**, 1477–1483.

Romani,A. M. and Scarpa,A. (2000) A magnificent story in the making... *Front. Biosci.*, **5**, D720–D734.

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.

Sauvageau,S., Stasiak,S.Z., Banville,I., Ploquin,M., Stasiak,A. and Masson,J.-Y. (2005) Fission Yeast Rad51 and Dmc1, two efficient DNA recombinases forming helical nucleoprotein filaments. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 4377–4387.

Schmitz,C., Perraud,A.L., Johnson,C. O., Inabe,K., Smith,M.K., Penner,R.,

Kurosaki,T., Fleig,A., and Scharenberg,A. M. (2003) Regulation of vertebrate cellular Mg<sup>2+</sup> homeostasis by TRPM7. *Cell*, **114**, 191–200.

Schwacha,A. and Kleckner,N. (1997) Interhomolog bias during meiotic recombination: meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway. *Cell*, **90**, 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.

Shen,G.-Q., Li,L., Girelli,D., Seidelmann,S.B., Rao,S., Fan,C., Park,J.E., Xi,Q., Li,J., Hu,Y., Olivieri,O., Marchant,K. and 9 others (2007) An LRP8 variant associated with familial and premature coronary artery disease and myocardial infarction. *Am. J. Hum. Genet.*, **81**, 780–791.

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. USA*, **76**, 1638–1642.

Shibata,T., Ohtani,T., Iwabuchi,M. and Ando,T. (1982) D-loop cycle. A circular reaction sequence which comprises formation and dissociation of D-loops and inactivation and reactivation of superhelical closed circular DNA promoted by recA protein of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, **257**, 13981–13986.

Shin,D.S., Pellegrini,L., Daniels,D.S., Yelent,B., Craig,L., Bates,D., Yu,D.S., Shivji,M.K., Hitomi,C., Arvai,A.S., Volkmann,N., Tsuruta,H., Blundell,T.L., Venkitaraman,A.R. and Tainer,J.A. (2003) Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. *EMBO J.*, **22**, 4566–4576.

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.

Skaznik-Wikiel,M., Tilly,J.C., Lee,H.J., Niikura,Y., Kaneko-Tarui,T., Johnson,J. and Tilly,J.L. Serious doubts over ‘Eggs forever?’ (2007) *Differentiation*, **75**, 93–99.

Sonoda,E., Sasaki,MS., Buerstedde,JM., 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.

Tanaka,K., Kagawa,W., Kinebuchi,T., Kurumizaka,H. and Miyagawa,K. (2002) Human

Rad54B is a double-stranded DNA-dependent ATPase and has biochemical properties different from its structural homolog in yeast, Tid1/Rdh54. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1346–1353.

Telfer,E.E., Gosden,R.G., Byskov,A.G., Spears,N., Albertini,D., Andersen,C.Y., Anderson,R., Braw-Tal,R., Clarke,H., Gougeon,A., McLaughlin,E., McLaren,A., McNatty,K., Schatten,G., Silber,S. and Tsafiriri,A., (2005) On regenerating the ovary and generating controversy. *Cell*, **122**, 821–822.

Tsubouchi,H. and Roeder,GS. (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. USA*, **93**, 6236–6240.

Unoki,H., Takahashi,A., Kawaguchi,T., Hara,K., Horikoshi,M., Andersen,G., Ng,DP., Holmkvist,J., Borch-Johnsen,K., Jørgensen,T., Sandbæk,A., Lauritzen,T., Hansen,T., Maeda,S. and 16 others (2008) SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nature Genetics*, **40**, 1098–1102

VanLoock,MS., Yu,X., Yang,S., Lai,AL., Low,C., Campbell,MJ. and Egelman,EH. (2003) ATP-mediated conformational changes in the RecA filament. *Structure*, **11**,

187–196.

Vegetti,W., Marozzi,A., Manfredini,E., Testa,G., Alagna,F., Nicolosi,A., Caliar,I., Taborelli,M., Tibiletti,M.G., Dalpra,L. and Crosignani,P.G. (2000) Premature ovarian failure. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **161**, 53–57.

Wu,A.M., Kahn,R., DasGupta,C. and Radding,C.M. (1982) Formation of nascent heteroduplex structures by RecA protein and DNA. *Cell*, **30**, 37–44

Wu,Y., He,Y., Moya,I.A., Qian,X. and Luo,Y. (2004) Crystal structure of archaeal recombinase RadA: a snapshot of its extended conformation. *Mol. Cell*, **15**, 423–435.

Wu,Y., Qian,X., He,Y.,Moya,I.A. and Luo,Y. (2005) Crystal structure of an ATPase-active form of Rad51 homolog from *Methanococcus voltae*. *J. Biol. Chem.*, **280**, 722–728.

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

Yoshimura,Y., Morita,T., Yamamoto,A. and Matsushiro,A. (1993) Cloning and sequence of the human RecA-like gene cDNA. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1665.

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.

Yuan,ZM., Huang,Y., Ishiko,T., Nakada,S., Utsugisawa,T., Kharbanda,S., Wang,R., Sung,P., Shinohara,A., Weichselbaum,R. and Kufe,D. (1998) Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.*, **273**, 3799–3802.





## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心な御指導、御鞭撻を賜り、また論文を作製するにあたり貴重な御助言を賜りました早稲田大学 先進理工学術院 電気・情報生命工学科 胡桃坂仁志教授に厚く御礼申し上げます。

本研究において、多くの御指導、御助言、御協力を賜りました理化学研究所 香川亘研究員、井川淑子研究員、柴田武彦上席研究員、杵渕隆研究員に深く感謝致します。

酵母の遺伝学の研究においては多大なるお力添えくださいました京都大学大学院 医学研究科 遺伝医学講座 放射線遺伝学分野 助教 廣田耕志氏に感謝の意を表します。

早稲田大学 先進理工学術院 助教 滝沢由政氏をはじめとした胡桃坂研究室の皆様にあわせて深く感謝致します。

最後に、研究生活を送る上でいつも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

### 1. 論文

Hikiba,J., Takizawa,Y., Ikawa,S., Shibata,T. and Kurumizaka,H. (2009)

Biochemical analysis of the human DMC1-I37N polymorphism.

*FEBS J.*, **276**, 457-465.

Sarai,N., Kagawa,W., Fujikawa,N., Saito,K., Hikiba,J., Tanaka,K., Miyagawa,K., Kurumizaka,H., Yokoyama,S. (2008)

Biochemical analysis of the N-terminal domain of human RAD54B.

*Nucleic Acids Res.*, **36**, 5441–5450

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

胡桃坂仁志, 美川務, 引場樹里, 柴田武彦

構造から理解する相同 DNA 組換え機構

生化学 第 80 卷 第 6 号 511-520 (2008).

## 2. 学会発表

### ・国際学会

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.

ANALYSES OF THE POLYMORPHIC DMC1-M200V VARIANT.

33<sup>rd</sup> FEBS Congress & 11<sup>th</sup> IUBMB Conference, 2008, 06, Athens, Greece

### ・国内学会

引場 樹里, 廣田 耕志, 井川 肅子, 杵渕 隆, 坂根 勲, 滝沢 由政, 横山 茂之,  
Béatrice Mandon-Pépin, Alain Nicolas, 柴田 武彦, 太田 邦史, 胡桃坂 仁志

ヒト不妊症で検出された *Dmc1* 遺伝子多型の機能解析

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 2007, 12

引場 樹里, 廣田 耕志, 香川 亘, 井川 肅子, 杵渕 隆, 坂根 勲, 滝沢 由政, 横  
山 茂之, Alain Nicolas, 柴田 武彦, 太田 邦史, 胡桃坂 仁志

ヒト DMC1 タンパク質および DMC1 バリエントの機能・構造解析

第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 2008, 12

### ・国内ワークショップ

引場 樹里, 井川 肅子, 香川 亘, 坂根 勲, 滝沢 由政, 横山 茂之, 柴田 武彦,  
胡桃坂 仁志

ヒト *Dmc1* バリエントの機能解析

2007 年度組換え・染色体再編ワークショップ&第 19 回 DNA 複製・分配ワーク  
ショップ 合同ワークショップ, 2008, 03