

論文 / 著書情報
 Article / Book Information

題目(和文)	相同組換えにおけるRad51依存的DNA鎖交換反応の分子機構の研究
Title(English)	
著者(和文)	伊藤健太郎
Author(English)	Kentarou Itou
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10735号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:岩崎 博史,一瀬 宏,村上 聡,久堀 徹,田口 英樹
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10735号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(論文博士)

論 文 要 旨 (和文2000字程度)

報告番号	乙 第 号	氏 名	伊藤 健太郎
<p>(要 旨)</p> <p>相同組換えの中心的な反応は相同なDNA間でのDNA鎖の交換である。この反応は進化的に良く保存されたATP 依存的RecAファミリーリコンビナーゼによって触媒される。一般に、相同組換え反応の初期段階では、DNA二重鎖切断末端が削り込みを受けて生じた単鎖DNA領域にリコンビナーゼが数珠状に結合した核酸・タンパク質フィラメントが形成される。この高次複合体が二重鎖DNAの相同配列の検索を行い、相同配列を見つけるとDNA鎖を交換することで相同組換えが進行する。真核生物においては、RecAファミリーリコンビナーゼであるRad51がDNA鎖交換反応を司るが、その活性は弱く、反応を効率良く進行させるには様々な補助因子を必要とすることが知られている。</p> <p>岩崎研究室ではRad51の補助因子として分裂酵母からSwi5-Sfr1複合体を同定した。Swi5-Sfr1複合体は酵母からヒトまで広く保存されており、この因子によるRad51活性制御機構は真核生物で普遍的に機能していると考えられる。鎖交換反応前に形成されるRad51-単鎖DNAフィラメントにおいて、Rad51はATPと結合した状態が活性型であり、ADPと結合した時は不活性型となり単鎖DNAに結合できない。生化学的解析から、Swi5-Sfr1複合体は、ATP結合型Rad51からなる単鎖DNAフィラメントを安定化することが示されている。ところが、Swi5-Sfr1複合体はRad51のATPase活性を促進する。このことは、Swi5-Sfr1複合体がRad51のATP型をADP型に誘導することになり、一見不利である。よって、Swi5-Sfr1複合体は、相同二重鎖対合前におこるRad51-単鎖DNAフィラメントの安定化以外にも、相同二重鎖対合後のDNA鎖交換反応の進行中になんらかの正の役割を果たしていることが予想される。しかし、従来の生化学的手法では、フィラメント形成以降の反応について詳細に解析することは困難であった。</p> <p>そこで本研究では、鎖交換反応のDNA基質を蛍光標識し蛍光共鳴エネルギー移動の原理を利用して反応中間体であるDNA 3本鎖中間体の形成と最終産物の生成をそれぞれリアルタイムで観察する実験系を確立して、鎖交換反応のキネティクス解析を試みた。その結果、Rad51によるDNA鎖交換反応は、1) 単鎖DNA と相同な二重鎖DNA との3本鎖中間体 (C1複合体) の形成、2) C1複合体から質的に異なる第二のDNA 3本鎖中間体 (C2) への遷移、3) C2 DNA 3本鎖中間体からの単鎖DNAの放出の3段階で進行することを明らかにした。また、はじめの反応中間体 (C1複合体) の形成にはRad51のATP結合が必須で、その後の反応ステップ、特に最終産物の生成にはRad51のATP加水分解が重要であることを示した。また、Swi5-Sfr1複合体はC1反応中間体の形成は促進しないが、Rad51のATP加水分解に依存して反応中間体の遷移と最終産物の生成を強く促進することを明らかにした。このことから、Swi5-Sfr1複合体はRad51の反応活性を直接変化させてDNA鎖交換反応促進するアクチベーターであると考えられる。</p> <p>Ca²⁺イオンもRad51によるDNA鎖交換反応を促進することが知られている。今までの解析からCa²⁺イオンはRad51のATP加水分解を阻害してRad51をATPと結合した活性型に維持することでDNA鎖交換反応を促進すると考えられてきた。しかし、単鎖DNA上のRad51をATP結合型に維持することと鎖交換反</p>			

応の活性化とが具体的にどのように関連するののかについては不明であった。また、Swi5-Sfr1複合体がRad51のATPase活性を促進するのに対して、Ca²⁺イオンはATPase活性を阻害するので、両者のRad51フィラメント活性化メカニズムについて合理的な説明がなされていなかった。

本研究では、Ca²⁺イオンによるDNA鎖交換反応の促進機構を上述のリアルタイム観察系を用い解析し、Swi5-Sfr1複合体の機能と比較した。その結果、Ca²⁺イオンはRad51のATP加水分解に依存せず反応中間体の遷移（C1→C2遷移）を強く促進することが分かった。しかし一方で、最終産物の生成は全く促進しなかった。このことから、最後のステップである C2 型 DNA 3本鎖中間体からの単鎖DNAの放出の段階には、Rad51によるATP加水分解が重要であることが明らかになった。

以上、本研究はRad51 依存的DNA鎖交換の素反応過程が3ステップから構成されることを明らかにするとともに、Swi5-Sfr1複合体、及び、Ca²⁺によるRad51 依存的DNA鎖交換の活性化機構を解明したものである。

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(論文博士)

論 文 要 旨 (英 文)

(300語程度)

(Summary)

報告番号	乙 第	号	氏 名	伊藤 健太郎
<p>(要 旨)</p> <p>Homologous recombination is an essential mechanism of maintaining genome integrity and generating genetic diversity. The DNA strand exchange reaction is a central step of homologous recombination, which is mediated by the Rad51 recombinase in eukaryotic cells. Rad51 forms a nucleoprotein filament with single-stranded DNA generated by nucleolytic processing of DNA double-strand break ends. The nucleoprotein filament searches for homology within intact duplex DNA. When the nucleoprotein filament finds homology, it initiates DNA strand exchange between homologous sequences. To elucidate the reaction kinetics of DNA strand exchange, I adapted a previously developed fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based real-time assay of DNA strand exchange catalyzed by Rad51 from the fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i>. I found that DNA strand exchange consists of three steps and proceeds via two distinct three-strand intermediates, C1 and C2. Both intermediates contain Rad51, but whereas the donor duplex remains intact in C1, the ssDNA strand is intertwined with the complementary strand of the donor duplex in C2. ATP binding by Rad51 is necessary and sufficient for C1 formation. In contrast, the C1-C2 transition and release of single-stranded DNA from C2 requires ATP hydrolysis by Rad51. Swi5-Sfr1, an evolutionarily conserved recombination activator, facilitates the C1-C2 transition and subsequent ssDNA release from C2 to complete strand exchange in an ATP-hydrolysis-dependent manner. In contrast, Ca^{2+}, which activates the Rad51 filament by curbing ATP hydrolysis, facilitates the C1-C2 transition but does not promote strand exchange completion. These results reveal that Swi5-Sfr1 and Ca^{2+} have different activation modes in the late synaptic phase, despite their common function in stabilizing the nucleoprotein filament in the presynaptic phase.</p>				

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).