

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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

(2000字程度)

報告番号	乙 第 号	学位申請者	伊藤健太郎	
	氏 名	職 名	氏 名	職 名
論文審査員	主査 岩崎 博史	教授	村上 聡	教授
	一瀬 宏	教授		
	田口 英樹	教授		
	久堀 徹	教授		

本論文は「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」と題し、6章より構成されている。

第一章「序論」では、相同組換えとその中心的な反応ステップである DNA 鎖交換反応について概説している。まず、相同組換え研究の歴史的な経緯を説明している。次に、RecA ファミリーリコンビナーゼが DNA 鎖交換を直接促進するタンパク質であることを述べて、その素過程を説明している。すなわち、一般に RecA ファミリーリコンビナーゼは、最初に単鎖 DNA 領域に結合してプレシナプティックフィラメントと称される核酸・タンパク質複合体を形成し、無傷の二重鎖 DNA を取り込んで相同 DNA 配列を検索し、相同配列が見つかるプレシナプティックフィラメント中の単鎖 DNA と二重鎖 DNA との間で DNA 鎖の交換を行い、その結果、ヘテロ二重鎖が形成される。真核生物においては Rad51 リコンビナーゼがその働きを担っているが、大腸菌 RecA に比べ DNA 鎖交換活性が弱く、様々な補助因子によってその活性が正負に制御される。そのなかでも所属研究室で同定された分裂酵母 Swi5-Sfr1 複合体は DNA 鎖交換反応を促進するユニークな因子であり、これまでの研究で明らかになった知見を簡潔に整理して説明している。また、Ca²⁺イオンも Rad51 の DNA 鎖交換反応を促進する因子であり、これまで明らかにされた Ca²⁺イオンによる活性化の分子機構を説明している。この章の最後には、DNA 鎖交換反応は相同 DNA 配列の検索以降の分子メカニズムが未だに不明であること、更に Rad51 補助因子の DNA 鎖交換反応の作用機構が明らかでないことを述べ、本研究の目的を明確にしている。

第二章「実験材料と方法」では、本研究で用いた実験材料と実験手法の詳細を述べ、他の研究者による追試実験を可能にしている。

第三章から第五章までは本研究で得られた結果について述べている。第三章「Rad51 による DNA 鎖交換反応のリアルタイム解析系の構築」では、DNA 基質を蛍光標識して FRET の原理を利用し DNA 鎖交換反応の反応中間体の形成と最終産物の生成をリアルタイムで観察する実験系を確立して、そのデータを反応速度論的に解析した結果について述べている。すなわち、DNA 鎖交換反応は、第一反応中間体 (C1) の形成、第一反応中間体 (C1) から第二反応中間体 (C2) への遷移、最後に、最終産物としてのヘテロ二重鎖生成と単鎖 DNA の放出の3段階で進行することを明らかにした。更に、第一反応中間体 (C1) の形成には Rad51 の ATP 結合のみが必須であること、そしてその後の2つのステップ、特に最後のステップである最終産物の生成過程には Rad51 による ATP 加水分解が重要であることを、非加水分解性の ATP アナログを用いた実験から明確に示している。

第四章「Swi5-Sfr1 複合体と Ca²⁺による DNA 鎖交換反応の活性化機構」では、Swi5-Sfr1 複合体と Ca²⁺イオンによる DNA 鎖交換反応の活性化機構について、本研究で確立したリアルタイム実験系を用いて解析した結果を述べている。すなわち、Swi5-Sfr1 複合体は、Rad51 の ATP 加水分解に依存して DNA 鎖交換反応の中間体の遷移 (C1→C2 遷移) と最終産物の生成を強く促進する。また、反応液に過剰量の Swi5-Sfr1 複合体を加えると、Swi5-Sfr1 複合体はプレシナプティックフィラメントによる二重鎖 DNA の捕捉を阻害する。一方、Ca²⁺イオンは Rad51 の ATP 加水分解に関係なく C1→C2 遷移を促進するが、最終産物の生成は促進しない。これらの結果から、Swi5-Sfr1 複合体と Ca²⁺イオンとは異なるメカニズムで Rad51 による DNA 鎖交換反応を促進することを示している。さらに、DNA 鎖交換反応を途中で強制停止させる実験を行って、基質または最終産物に変換される性質の異なる2種類の間接体が実際に存在することを明らかにしている。

第五章「Rad51 の二つの DNA 結合部位の DNA 鎖交換反応における機能」では、Rad51 の DNA 鎖交換反応についてさらに詳細な分子メカニズムを明らかにするために Rad51 の DNA 結合部位の変異体を作製して解析している。まず、これまでに報告されている様々な研究結果をもとに、Rad51 には単鎖 DNA と結合してプレシナプティックフィラメント形成に働く第1 DNA 結合部位と、ドナーの二重鎖 DNA を捕捉する第2 DNA 結合部位が予想されていたことを述べ、それぞれの部位の変異体を作製し解析する意義を明示している。そして、リアルタイムアッセイ系他様々な手法を用いて変異体の機能を解析し、第1 DNA 結合部位に存在する L2 モチーフが単にプレシナプティックフィラメント形成だけに働くのではなく、鎖交換反応その

ものにも重要な機能を果たしていることを明らかにしている。一方、Rad51 の第2 DNA 結合部位変異体では、予想に反して単鎖 DNA と二重鎖 DNA に対する結合速度定数が低下していることを示した。このことから、第2 DNA 結合部位は単鎖 DNA と二重鎖 DNA 両方の DNA に対して結合し、これらの DNA が第1 DNA 結合部位へ移動するまでの間つなぎ止めておく働きを担っていると提唱している。

第六章「総括」では第三章から第五章までの結果を総括し、且つ、考察を述べている。そのなかで、得られた結果をもとに、Rad51 による DNA 鎖交換反応機構のモデルを提唱している。また、本研究の成果が当該分野へ与えたインパクトについて述べるとともに、今後の展望について言及している。

以上を要するに、本論文はRad51リコンビナーゼによるDNA鎖交換反応の分子メカニズムを明らかにし、更に反応活性化因子であるSwi5-Sfr1複合体とCa²⁺によるRad51の活性制御機構について新しい重要な知見を提示したものであり理學上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士（理學）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」は、東工大リサーチポジトリ(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。