T2R2 東京工業大学リサーチリポジトリ
Tokyo Tech Research Repository

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:岩﨑 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)	要約
Type(English)	Outline

Powered by T2R2 (Tokyo Institute Research Repository)

相同組換えの中心的な反応は相同な DNA 間での鎖交換である。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。そして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。

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、従来の生化学的な手法では、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。

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が明らかになった。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

要であることが明らかになった。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。

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応の活性化とが具体的にどのように関連する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。