

論文内容の要旨

論文題目 Functional Analysis of the Human DNA Recombination Protein Rad54B
(ヒト DNA 組換えタンパク質 Rad54B の機能解析)

氏名 皿井 直敬

細胞は紫外線や細胞内代謝によって生じる活性酸素などにより、絶えず損傷を受けている。その結果、染色体の二重鎖切断が起きることが知られている。染色体の切断が正常に修復されなければ、ゲノム不安定化が引き起こされ、癌細胞へと変異してしまう危険がある。相同組換え修復は、染色体の二重鎖切断を修復する重要な機構の一つである。相同組換え修復は、損傷を受けていない姉妹染色分体を鋳型として用いることで遺伝情報を損なうことなく染色体の二重鎖切断を修復できるという特徴を持っている。そのため、染色体の安定維持に大変重要な役割を担っている。一方減数分裂細胞では、染色体の二重鎖切断が能動的に生じており、相同染色体間での相同組み換えによってそれらの修復が行われている。その結果、遺伝情報の交換が生じ、有性生殖を行う真核生物において遺伝的多様性の獲得に大きな役割を果たしている。

染色体の二重鎖切断が生じると、その末端は5'側から exonuclease によって消化され、3'側に突出した単鎖 DNA 領域が作られる。この単鎖 DNA に相同組換え修復に関わるタンパク質が結合することで、右巻きの螺旋構造を持つ nucleoprotein filament と呼ばれる DNA-タンパク質複合体が形成される。この nucleoprotein filament が、鋳型となる染色体の相同領域の検索、対合を行うことで相同的対合反応及び鎖交換反応を触媒する。その後、3'末端から DNA ポリメラーゼによって DNA 合成反応が進行し、損傷を受けた染色体と鋳型となる

染色体の、計 4 本の DNA 鎖からなる Holliday junction と呼ばれる中間体が形成される。Holliday junction が移動し解離することで相同組換えは完了する (図 1)。相同組換えにおいて、二重差切断が生じてから nucleoprotein filament が形成されるまでの過程を pre-synapsis、相同的対合反応及び鎖交換反応が行われる過程を synapsis、そして DNA 合成反応以降の過程を post-synapsis と呼ばれている。

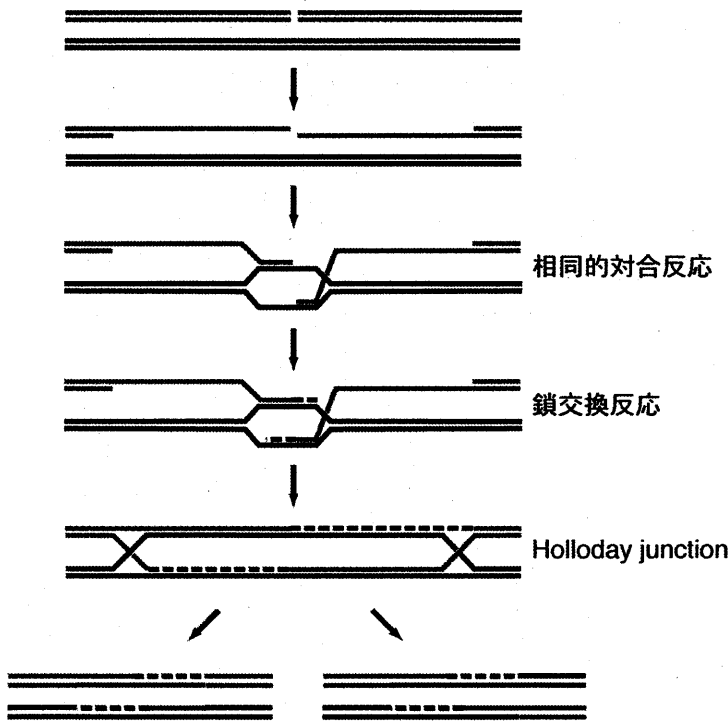


図 1. 相同組換え修復

原核生物では、RecA タンパク質が DNA と nucleoprotein filament を形成し、相同的対合反応及び鎖交換反応を触媒することが知られている。ヒトを含む高等真核生物では、RecA タンパク質の構造及び機能的なホモログである Rad51 タンパク質及び Dmc1 タンパク質が存在する。Rad51 は体細胞分裂期及び減数分裂期で発現しているのに対し、Dmc1 は減数分裂期特異的に発現しているタンパク質である。Rad51 は DNA と nucleoprotein filament を形成することが明らかにされており、相同組換え修復において中心的な役割を担っていると考えられている。Dmc1 は 8 量体の環状構造をしたタンパク質であり、ATP 非存在下ではその環の中心を通る形で DNA が結合することが知られている。一方、ATP 存在下においては螺旋状 nucleoprotein filament を形成することが示唆されており、この螺旋状の nucleoprotein filament の状態で相同的対合反応を触媒すると考えられている。しかし、これらのタンパク質の *in vitro* における相同的対合活性及び鎖交換活性は、RecA のそれと比較すると非常に弱いものであり、ヒトにおいて巨大なゲノム DNA を修復するためには不十分であると考えられる。このことは、Rad51 及び Dmc1 が生体内で機能するうえで、活性化因子との相互作用が必要不可欠であることを示唆している。

近年、Rad51 及び Dmc1 の相互作用因子が数多く同定されている。Rad51 と相互作用する因子として Rad54 が存在する。Rad54 はクロマチンの再編成を行う SWI2/ SNF2 ファミリーと高い相同性を示すタンパク質である。Rad54 は DNA に supercoil を導入する活性や、Holliday junction を動かす branch migration 活性を有することが知られている。また、Rad54

は Rad51 と直接相互作用することで相対的対合反応を活性化することが明らかとなっており、相同組換え修復に深く関わっていると考えられている。一方、Dmc1 はヒトにおいて、Rad54 のホモログである Rad54B タンパク質と相互作用することが示唆されている。しかし Rad54B タンパク質は、その精製が困難なことから、*in vitro* での研究はほとんど行われておらず、詳細は明らかになっていなかった。そこで、本研究では生化学的手法を用いて、ヒト Rad54B タンパク質の相同組換え修復における役割を明らかにすることを旨とした。

Rad54B を昆虫細胞において大量発現させ、5 種類のクロマトグラフィーを用いて単一のタンパク質として高純度に精製する系を確立した。そのタンパク質を用いて、Rad54B の Rad51 及び Dmc1 に対する結合活性を検討した。その結果、Rad54B は Rad51 及び Dmc1 の両方と結合することが明らかになった。また、Rad54B は Dmc1 の活性中心を含んだ領域との結合も確認された。これらの相互作用が相同組換えにおいて、どのように作用しているかを調べるために、Rad54B 存在下での Dmc1 の鎖交換反応を検討した。その結果、Dmc1 は Rad54B 存在下では非存在下と比較して高い活性を示すことが明らかになった (図 2)。これらの活性は、Rad54B の濃度が Dmc1 のそれに対して 20 分の 1 程度で十分に観察することができた。

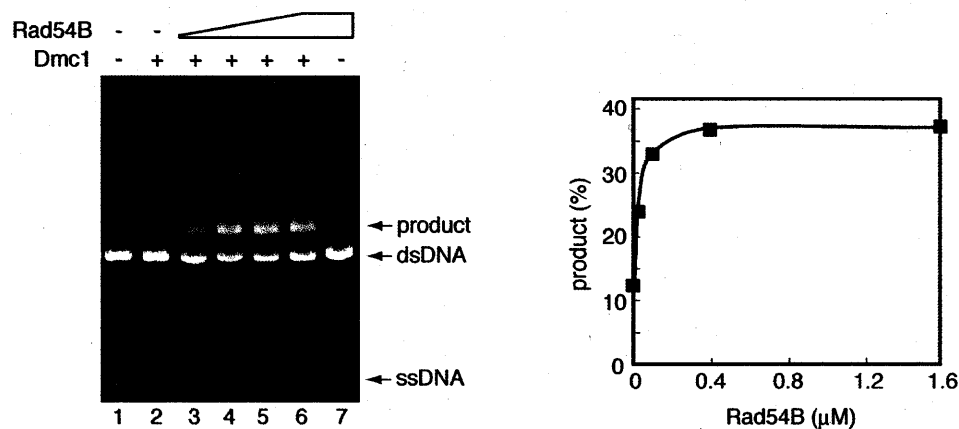


図 2. Rad54BによるDmc1の鎖交換反応の活性化

さらに Rad54B は、DNA 鎖交換反応の要である Dmc1 と単鎖 DNA からなる複合体を安定化させることが明らかとなった。この安定化は、Rad54B が Dmc1 と単鎖 DNA からなる複合体のコンフォメーションの変化を促進していることに寄与している可能性が考えられる。Rad54B による安定化のメカニズムをさらに解明するため、単鎖 DNA 存在下における Rad54B と Dmc1 の結合の様子を電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、Dmc1 と単鎖 DNA によって形成された nucleoprotein filament の末端に Rad54B が結合している様子が観察された。これらの結果より、Rad54B は Dmc1 と単鎖 DNA からなる複合体の末端に結合するこ

とで Dmc1 の環状構造を解離させ、nucleoprotein filament の形成を促進しており、このことが Dmc1 と単鎖 DNA からなる複合体の安定化に寄与している可能性が推測された。

次に Rad54B のさらなる機能を解明するために、Rad54B の branch migration 活性を検討した結果、Rad54B の濃度依存的に反応生成物である 5'末端突出 DNA の増加が確認され、Rad54B は Rad54 と同様に branch migration 活性を持つことが分かった (図 3)。

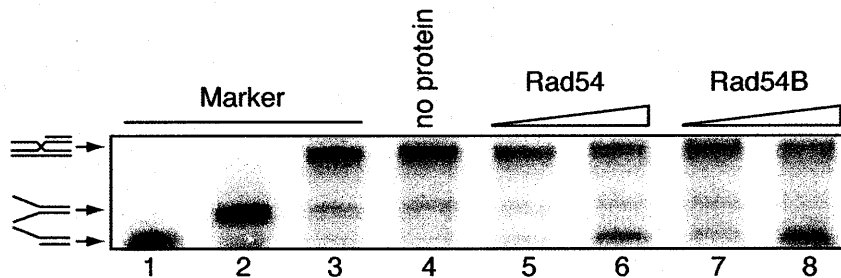


図 3. Rad54B による branch migration 活性

次に、Rad54 と相同性が少ない領域である Rad54B の N 末端領域の生化学的解析を行った。Rad54B の N 末端領域において、安定である 26 番目から 225 番目までの 200 アミノ酸 (Rad54B₂₆₋₂₂₅) を大腸菌において大量発現させ、4 種類のクロマトグラフィーを用いて単一のタンパク質として高純度に精製する系を確立した。Rad54B₂₆₋₂₂₅ の Rad51 及び Dmc1 に対する結合活性を検討した結果、Rad54B₂₆₋₂₂₅ は両者とも結合することが分かった。このことから、Rad54B の N 末端領域が Rad51 及び Dmc1 との結合領域であることが明らかになった。また、Rad54B₂₆₋₂₂₅ 存在下及び非存在下における、Dmc1 が結合した状態の DNA の様子をゲルシフトアッセイを用いて検討した。その結果、Rad54B₂₆₋₂₂₅ 存在下では非存在下と比較して単鎖及び二重鎖 DNA の移動度が減少することが観察された。このことから、Rad54B₂₆₋₂₂₅ は DNA と結合した状態の Dmc1 と結合することが分かった。

以上の結果から、相同組換えにおいて pre-synapsis では、Rad54B の N 末端領域が Dmc1 と単鎖 DNA からなる複合体の末端に結合することで nucleoprotein filament の形成を促進させ、synapsis における Dmc1 の鎖交換反応を活性化していると考えられる。さらに Rad54B は branch migration 活性を有していることから、post-synapsis において Rad54B は Holliday junction のプロセッシングに関与していると推測できる。従って、本研究において Rad54B は pre-synapsis から post-synapsis まで、相同組換え全般において様々な機能を果たしている可能性が示唆された。