

みにれびゅう

出芽酵母 Rad52 の相同組換えにおける分子メカニズム

新井 直人¹, 香川 亘²

1. はじめに

生物はさまざまな化学的, 物理的要因により日常的に DNA に傷害を受けている. しかしその傷害は, DNA 修復機構によって克服されている. 傷害が二本鎖 DNA の片方の鎖に起こった場合, その傷害部位を取り除き, もう片方の正常な相補鎖を鋳型にして DNA 複製により修復することができる. しかし, 強い電離放射線等により二本鎖 DNA が切断され, その近傍の DNA 領域が欠失する傷害が起こったときは, 相補鎖を鋳型に DNA 複製するという手法が使えない. そこで, 相同染色体あるいは DNA 複製後の姉妹染色分体から塩基配列の相同な部位を探し出し, その遺伝情報をコピーすることにより修復する. この修復方法が相同組換えである. 相同組換えのほかに, 切断部位を直接つなく非相同末端結合という修復方法もあり, 高等生物になるほどその頻度は高くなる. しかし, 非相同末端結合では欠失した塩基情報を復元することはできない. 相同組換えは, DNA 修復だけでなく, 減数分裂期にも高頻度で観察され, 均等な染色体分配に重要である. 減数分裂期の相同組換えは, 生物自ら二本鎖 DNA を切断することにより開始され, DNA 修復と同様な機構により DNA 切断部位の修復と再編を行う. またそこに関与する酵素群にも共通性がある. 相同組換えにおいて最も重要とされるのは, 切断された DNA と無傷の DNA が, 塩基配列の相同な部位で対合する過程である. この過程を相同対合という (図 1A). 相同対合では, 二本鎖切断 [図 1A(1)] の末端

にヌクレアーゼによって生じた数百塩基の一本鎖 DNA 部分 [図 1A(2)] と塩基配列の相同な部位が, 無傷の二本鎖 DNA から探し出される. そして一本鎖 DNA が二本鎖 DNA に侵入し, 相補鎖と塩基対を形成する. このとき "D-loop" (displacement loop) と呼ばれる構造体が形成される [図 1A(3)]. この相同対合には複数のタンパク質が関与しているが, 出芽酵母において中核の一つをなしているのが Rad52 である. Rad52 は出芽酵母の相同組換えにおいて必須なタンパク質である. *RAD52* 遺伝子の欠失は相同組換えに関与する *RAD52* エピスタシスグループ (*RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*) のほかの遺伝子の欠失に比べ, 最も重篤な組換え欠損を引き起こすことが知られている. そのため, Rad52 は相同組換えにおいてきわめて重要な役割を担っていると考えられている. 本稿では近年明らかになった相同組換えにおける Rad52 の分子メカニズムを概説したい.

2. Rad52 の構造

出芽酵母の Rad52 は約 52 kDa の単一ポリペプチドからなる (図 1B). 当初, 塩基配列の解析から遺伝子プロモーターに最も近い ATG 翻訳開始コドンからアミノ酸配列の番号が数えられ 504 残基とされていたが, 後の研究で 3 番目の ATG コドンから翻訳が始まっていることが明らかになった¹⁾. しかし慣例として, Rad52 のアミノ酸番号は 1 番目の ATG コドンから数えられ, Rad52 の研究には 3 番目の ATG コドンから発現させたタンパク質 (34~504 アミノ酸) が用いられている.

Rad52 は, その機能と構造の違いから N 末端側半分と C 末端側半分の領域に大別できる (図 1B). Rad52 の N 末端側半分は酵母からヒトまで高度に保存されており, 多量体リング構造の形成と DNA 結合に重要である. 著者 (香川) らはヒト Rad52 の N 末端側半分の立体構造 (図 1C) を明らかにした²⁾. その構造は出芽酵母をはじめとするほかの生物種でも保存されていると考えられている. さらにヒト Rad52 については点変異体解析により DNA 結合に関与するアミノ酸残基を同定している. それらの構造上の位置から, DNA はリング構造の外側に沿って結合すると考えている (図 1C)³⁾. 真核生物以外の生物種においても Rad52

¹ 日本大学生物資源科学部応用生物科学科 (〒252-0880 神奈川県藤沢市亀井野 1866)

² 明星大学理工学部総合理工学科生命科学・化学系 (〒191-8506 東京都日野市程久保 2-1-1)

Molecular mechanisms of homologous recombination promoted by budding yeast Rad52

Naoto Arai¹ and Wataru Kagawa² (¹Department of Applied Biological Science, Nihon University College of Bioresource Sciences, 1866 Kameino, Fujisawa, 252-0880, Japan; ²Program in Chemistry and Life Science, Department of Interdisciplinary Science and Engineering, School of Science and Engineering, Meisei University, 2-1-1 Hodokubo, Hino, Tokyo 191-8506, Japan)

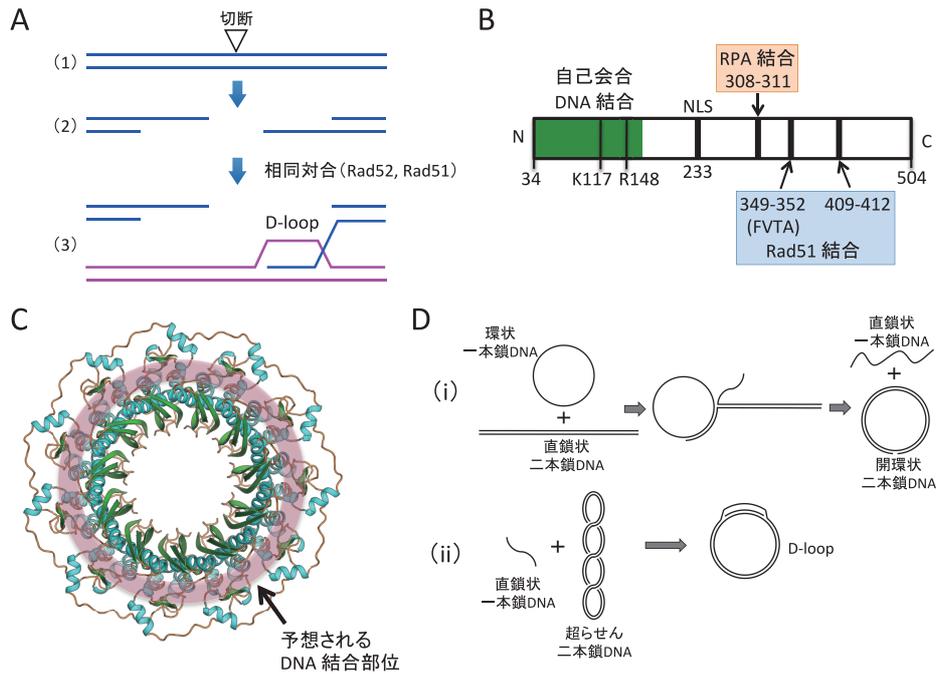


図1 相同組換えの初期過程, Rad52の構造, および試験管内組換え反応系

(A) 相同組換えの初期過程. 相同組換えは二本鎖 DNA 切断によって開始され (1), 切断末端に一本鎖 DNA が生じ (2), その一本鎖 DNA と塩基配列の相同な部位が相同染色体または姉妹染色体 (マゼンタ色) から探し出され相同対合する (3). このときに一本鎖 DNA は二本鎖 DNA に侵入し, 相補鎖と水素結合を形成し「D-loop」を形成する. (B) Rad52 の一次構造. 緑色の領域は Rad52 オースログ間で高度に保存されている. N 末端側に DNA 結合と自己会合領域, C 末端側に Rad51 および RPA との相互作用領域がある. NLS は核移行シグナルである. (C) ヒト Rad52 N 末端側半分の立体構造 (PDB ID: 1KN0). 予想される DNA 結合部位を淡い赤色で示した. (D) 試験管内で相同対合を解析する反応系. (i) 鎖交換反応, 相同性のある環状一本鎖 DNA と直鎖状二本鎖 DNA の間で, 環状一本鎖 DNA が直鎖状二本鎖 DNA の相補鎖の末端で対合 (水素結合) し, その対合領域が伸長し, 最終産物として開環状二本鎖 DNA と直鎖状一本鎖 DNA が形成される. (ii) D-loop 形成, 相同性のある直鎖状一本鎖 DNA と右巻き超らせんをもつ閉環状二本鎖 DNA (超らせん二本鎖 DNA) の間で, 直鎖状一本鎖 DNA が超らせん二本鎖 DNA 相同領域に侵入し対合体 (水素結合) が形成される. このときに形成された産物を「D-loop」という.

と同様にリング構造を形成したり DNA と結合したりする大腸菌 RecO やファージ Red β 等があり^{4,5)}, Rad52 の N 末端側領域の構造と機能は生物界において広く保存されている.

一方, Rad52 の C 末端側半分は, RPA (replication protein A) や Rad51 と直接相互作用し (図 1B), これらのタンパク質と相同組換えにおいて協同的に働くために重要である. この領域は, 生物種間でのアミノ酸配列の相同性は低く, 天然変性領域を多く含むため決まった構造をとらないと予想される. また, SUMO 化修飾部位や, 核移行シグナルが存在し, Rad52 の機能制御に重要であると考えられている. しかし, その役割や詳細な分子機構については未解明である.

3. Rad52 の生化学的機能

Rad52 は相補的な一本鎖 DNA 間のアニーリングを促進する⁶⁾. また一本鎖と二本鎖 DNA の両方に結合し, 単独で相同な一本鎖と二本鎖 DNA の相同対合を触媒する. これらの機能が相同組換えにおいてどのような役割を果たすのかはいまだ明らかにされていないが, アニーリングについてはセカンドエンド DNA キャプチャー⁷⁾や, シングルスランドアニーリング⁸⁾と呼ばれる組換え経路に重要であると考えられている.

Rad52 は上述の機能のほかに, 試験管内で Rad51 が触媒する相同対合反応を促進する機能を持っている. Rad51 が触媒する相同対合を試験管内で解析する反応系の一つに, 基質 DNA として環状一本鎖 DNA (ϕ X ファージ DNA 等) と直鎖状二本鎖 DNA を用いた系 [鎖交換反応, 図 1D(i)]

がある。Rad51はまず環状一本鎖DNAに連続して結合 (co-operative binding) し多量体フィラメント構造を形成する必要がある。しかしこのとき、一本鎖DNAの二次構造は、Rad51による一本鎖DNA上でのフィラメント形成と相同対合を阻害する。その二次構造を解消するにはRPAが必要となる。実際、生体内では二本鎖DNA切断の末端に生じた一本鎖DNAにまずRPAが結合すると考えられている。しかし試験管内の鎖交換反応系で、Rad51より先にRPAを添加すると、対合体形成は著しく阻害される。Rad51は、一本鎖DNA上を覆ったRPAを取り除くことができないためである。ではどうやってRPAを取り除いてRad51が一本鎖DNAに結合しているのかという問題が生じてくる。

そこに働いているのがRad52である。Rad52は、Rad51と複合体を形成する⁹⁾とともにRPAとも結合する能力を持っている¹⁰⁾。そして、Rad52は一本鎖DNAに結合しているRPAをRad51と置き換える働きがあり、これを「メディエーター活性」と呼ぶ (図2A)^{11,12)}。この活性は酵母Rad52のほかにも、乳がんの原因遺伝子であるヒトのBRCA2や、T4ファージのUvsYが持っている。このようにさまざまな生物種にメディエータータンパク質が存在することから、相同組換えにおいてRPAとRad51の置換反応は重要であると考えられる。興味深いことに、これらのタンパク質はアミノ酸配列と立体構造がまったく異なるにも関わらず、同じ反応を触媒する。メディエータータンパク質がどのような分子機構でRPAとRad51の置換反応を行うのか、そしてその仕組みに共通した分子機構が存在するのかどうかは明らかにされていない。

4. Rad52とRad51との相互作用

Rad52とRad51複合体形成にはRad52のC末端側が関与している。著者らは、Rad52の多量体形成領域を欠失したC末端側半分の断片 (Rad52²³³⁻⁵⁰⁴) がRad51の多量体を解体し、Rad51と1:1のヘテロ二量体を形成することを見いだした (図2B)¹³⁾。この複合体形成には、Rad52の349番目のフェニルアラニン (F349) と409番目のチロシン (Y409) が重要である (図1B)¹³⁾。全長Rad52においてそれらのアミノ酸をアラニンに置換した変異体 (Rad52 F349A/Y409A) では、メディエーター活性が失われていた¹³⁾。これらの結果は、Rad52のメディエーター活性において、Rad51が単量体の状態でRPAが結合した一本鎖DNA上へ誘導される機構を示唆している。

これら2か所の結合部位のうち、F349から始まる4アミノ酸Phe-Val-Trp-Ala (FVTA) は、ほかの生物種のRad52オースログ (*Kluyveromyces lactis*, *Ashbya gossypii*, *Candida glabrata*, *Schizosaccharomyces pombe*) にもみられ、Rad52

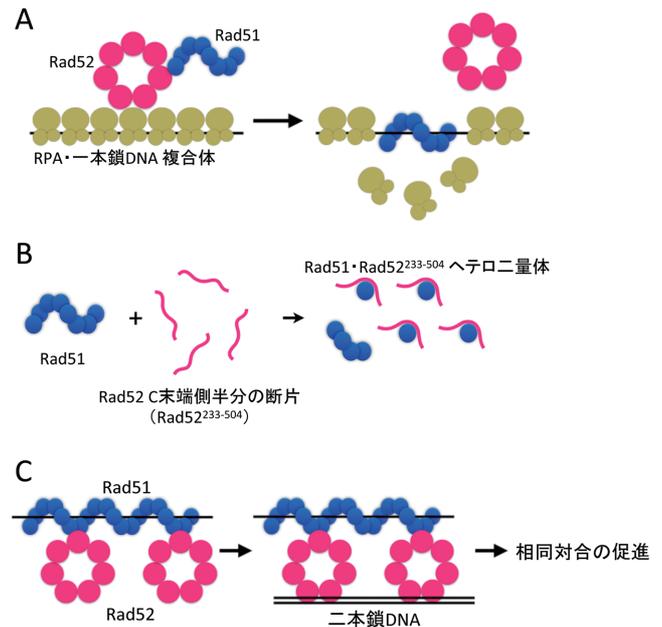


図2 相同組換えにおける酵母Rad52の機能

(A) メディエーター活性. Rad52 (赤色) はRad51 (青色) および一本鎖DNA (黒色) と結合したRPA (オリーブ色) と相互作用し、RPAをRad51と置換する。(B) 酵母Rad52のC末端側半分の断片によるRad51多量体フィラメントの解体。(C) Rad52によるD-loop形成の促進. Rad51に結合したRad52は二本鎖DNAと結合し、二本鎖DNAをRad51に受け渡すことでD-loop形成反応を促進する。

のC末端側半部分がRad51の多量体を解体する機能が他属の酵母Rad52の間でも高度に保存されていると予想される。またFVTA配列は出芽酵母Rad51どうしの重合に必要な領域にみられることから、一本鎖DNAに結合したRPAがRad51へと置き換えられる過程において、Rad51の多量体フィラメント形成と、Rad51とRad52の相互作用が拮抗していると考えられる。さらにFVTA配列と類似した配列は、ヒトRad51のメディエーターであるBRCA2にも存在する (ヒトBRCA2の場合、FHTA)。このようにFVTA配列はRad51との複合体形成に重要で普遍的な配列であると考えられる。

5. Rad52の二本鎖DNA結合活性の役割

Rad52は相同対合の前段階でメディエーターとして働くが、その一方で著者らは、Rad52が相同対合に直接的に働くことも見いだした¹⁴⁾。それを解析するために、相同対合のもう一つの反応系を用いた [D-loop形成, 図1D(ii)]。この系では、直鎖状一本鎖DNAと右巻き超らせんを持つ閉環状二本鎖DNAが基質DNAとして用いられる。この系を用いて、Rad51とRad52の両者の存在下で、効率よくD-loopが形成される反応条件を見つけた。このD-loop形

成には比較的短い一本鎖 DNA 断片 (259 塩基) を用いたため、二次構造の影響をほとんど受けず、RPA も必要としなかった。また、Rad52 単独の D-loop 形成が検出できない条件 (高マグネシウム濃度, 12 mM) であるため、Rad51 が触媒する相同対合を Rad52 が促進していると考えられる (図 2C)。興味深いことに、この反応では、Rad52 の N 末端側半分に存在する 117 番目のリシン (K117) と 148 番目のアルギニン (R148) が重要であることがわかった¹⁵⁾。これらのアミノ酸をアラニンに置換した Rad52K117A/R148A 変異体は二本鎖 DNA を捕らえることができないために D-loop 形成の効率が低いことを突き止めた。この結果は、著者 (香川) らが行ったヒト Rad52 の点変異体解析の結果とよく一致する³⁾。したがって、Rad52 はメデイエーター活性のほかに、相同対合において二本鎖 DNA を捕らえる機能を持ち、捕らえた二本鎖 DNA を Rad51 に受け渡しているメカニズムが考えられる。

6. おわりに

ここでは Rad52 が相同組換えにおいて、Rad51 と協同的に働く際の役割を中心に述べたが、Rad52 はさらに多様な働きをしている。Rad52 は、D-loop 形成によって生じた非相補一本鎖 DNA と二本鎖 DNA 切断の一方の切断末端にある一本鎖 DNA 部分とのアニーリングに働く (セカンド DNA キャプチャー) ことが報告されている⁷⁾。このように Rad52 は、相同対合初期の RPA を Rad51 に置き換えるメデイエーター活性、相同対合体形成過程の三者複合体 [一本鎖 DNA-(Rad51・Rad52)-二本鎖 DNA] 形成、相同対合後期のセカンド DNA キャプチャーに関与し、相同対合の全過程に働いている。また、Rad51 非依存的な相同組換え経路で働く Rad59 との関与が示されているだけでなく、酵母接合型転換に関わる部位特異的組換えや非相同末端結合にも関与している。Rad52 にはまだ知られてない機能があるのかもしれない、今後の研究の発展が期待される。

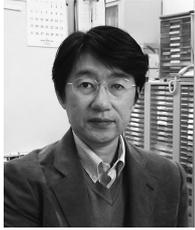
謝辞

本研究は、柴田武彦博士 (理化学研究所) および胡桃坂仁志教授 (早稲田大学) の研究グループとの共同研究による成果である。両先生並びに研究室の方々に深く感謝申し上げます。

- 1) Antunez de Mayolo, A., Lisby, M., Erdeniz, N., Thybo, T., Mortensen, U.H., & Rothstein, R. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2587–2597.
- 2) Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ishitani, R., Fukai, S., Nureki, O., Shibata, T., & Yokoyama, S. (2002) *Mol. Cell*, **10**, 359–371.
- 3) Kagawa, W., Kagawa, A., Saito, K., Ikawa, S., Shibata, T., Kurumizaka, H., & Yokoyama, S. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 24264–24273.
- 4) Erler, A., Wegmann, S., Elie-Caille, C., Bradshaw, C.R., Maresca, M., Seidel, R., Habermann, B., Muller, D.J., & Stewart, A.F. (2009) *J. Mol. Biol.*, **391**, 586–598.
- 5) Lopes, A., Amarir-Bouhram, J., Faure, G., Petit, M.A., & Guerois, R. (2010) *Nucleic Acids Res.*, **38**, 3952–3962.
- 6) Mortensen, U.H., Bendixen, C., Sunjevaric, I., & Rothstein, R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10729–10734.
- 7) Nimonkar, A.V., Sica, R.A., & Kowalczykowski, S.C. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 3077–3082.
- 8) Ivanov, E.L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J., & Haber, J.E. (1996) *Genetics*, **142**, 693–704.
- 9) Sung, P. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 28194–28197.
- 10) Plate, I., Hallwyl, S.C., Shi, I., Krejci, L., Muller, C., Albertsen, L., Sung, P., & Mortensen, U.H. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 29077–29085.
- 11) Song, B. & Sung, P. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 15895–15904.
- 12) Sugiyama, T. & Kowalczykowski, S.C. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 31663–31672.
- 13) Kagawa, W., Arai, N., Ichikawa, Y., Saito, K., Sugiyama, S., Saotome, M., Shibata, T., & Kurumizaka, H. (2014) *Nucleic Acids Res.*, **42**, 941–951.
- 14) Arai, N., Ito, D., Inoue, T., Shibata, T., & Takahashi, H. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 32218–32229.
- 15) Arai, N., Kagawa, W., Saito, K., Shingu, Y., Mikawa, T., Kurumizaka, H., & Shibata, T. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 17607–17617.

 著者寸描

●新井直人 (あらい なおと)



日本大学生物資源科学部応用生物科学科専任講師。博士(学術)。

■略歴 1963年埼玉県に生る。87年日本大学農獣医学部卒業。92年埼玉大学大学院修了(86~92年理化学研究所研修生)。コーネル大学博士研究員、理研奨励研究員、新技団研究員(東海大学総合医学研究所)、日本大学助手を経て2000年より現職。

■研究テーマと抱負 相同組換えに関わるタンパク質の役割を明らかにし、複数のタンパク質を反応系に入れて如何に細胞内の現象を再現できるかに挑戦したい。また、相同組換えを用いたゲノム改変技術の開発も試みていきたい。

■ウェブサイト <http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~inasweb/>

■趣味 山歩き、音楽・映画鑑賞。

●香川 亘 (かがわ わたる)



明星大学理工学部生命科学・化学系准教授。博士(理学)。

■略歴 1997年米国ミシガン州 Wayne State 大学理学部卒業。2003年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻博士課程修了。03~06年理化学研究所基礎科学特別研究員。06~09年同研究所研究員。09~12年早稲田大学次席研究員・助教。12年より現職。

■研究テーマと抱負 ゲノムの安定維持に寄与するタンパク質・タンパク質およびタンパク質・核酸複合体の構造生物学的研究を行っています。研究で得られた知見を、がんなどの難病の治療法の開発に役立てられることを期待して、日々研究を行っています。

■ウェブサイト <http://www.hino.meisei-u.ac.jp/chem/kagawalab/ja/index.html>

■趣味 自然や風景のカメラ撮影、音楽鑑賞(特にクラシック音楽)。