

- 12) Fujisawa, T., Inoue, K., Oka, T., Iwamoto, H., Uruga, T., Kumasaka, T., Inoko, Y., Yagi, N., & Yamamoto, M., & Ueki T. (2000) *J. Appl. Cryst.*, **33**, 797-800.

藤澤 哲郎

(岐阜大学工学部生命工学科)

Low-resolution structure analyses on protein complex by use of small-angle scattering technique

Tetsuro Fujisawa (Department of Biomolecular Science, Faculty of Engineering, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan)

相同組換え初期反応に重要なリセクション

1. はじめに

相同組換えは、生物のゲノム DNA の恒常性維持に重要な過程である。相同組換えで中心的な役割を担う RecA (recombination A, 真核生物では Rad51 (radiation sensitive 51)) タンパク質は、一本鎖の DNA との複合体をつくり、タンパク質—一本鎖 DNA 複合体 (ヌクレオプロテインフィラメント) を形成して相同鎖の対合を行う。相同組換えの効率 (頻度) は、通常二本鎖 DNA を一本鎖 DNA に変換すること、及びその一本鎖 DNA に RecA タンパク質をいかに結合させるかによって左右される。最近相同組換え機構の初期反応において、「リセクション」をキーワードとする新しい知見が複数報告されている。

2. リセクション

二本鎖 DNA 切断点で DNA 末端を修飾し、比較的長い 3'端をもつ一本鎖 DNA 領域をつくることを「リセクション」と呼ぶ。このような構造をつくることは、細菌の SOS 反応の誘導や DNA 修復に重要である。

相同組換えの代表的モデルである二本鎖切断修復は、二本鎖 DNA の切断によって開始する。平滑に近い DNA 末端では、RecA タンパク質はヌクレオプロテインフィラメントを形成できないので、一本鎖 DNA 部分を露出させる (リセクション構造をつくる) 必要がある。最近この過程で働く候補となるタンパク質の同定が相次いでいる。例えば、酵母では二本鎖 DNA 切断点には MRX (Mre11 (meiotic recombination 11)-Rad50-Xrs1 (X-ray sensitive 1)) 複合体が結合することが既に知られていたが、ここに Sgs1 (slow

growth suppressor 1) ヘリカーゼと Exo1 (exonuclease 1) などが働いてリセクション構造を作ることが報告された¹⁻³⁾。古細菌、あるいはヒトのタンパク質を用いた試験管内再構成実験でも、同様のヘリカーゼとヌクレアーゼがリセクション構造を作ることが示された^{4,5)}。

3. 大腸菌の RecF 組換え経路～細菌からヒトまで共通の相同組換え経路

相同組換えの様式は、これまで原核生物と真核生物で異なるとされていた。例えば原核生物の大腸菌は二つの相同組換えの機構 (RecBCD 経路と RecF 経路) を備え、DNA の二本鎖切断点から開始される組換えは前者が、一本鎖ギャップから開始される組換えは後者が担うと考えられていた。一方、真核生物では Rad52 タンパク質が関与する組換え経路が知られている。これには、組換えで中心的な役割を担う Rad51 タンパク質の働きをサポートする「メディエーター」と呼ばれるタンパク質 (群) が重要である⁶⁾。この Rad52-Rad51 組換え経路は DNA の二本鎖切断修復を行うことが可能だが、実は大腸菌の RecF 経路と真核生物の組換え経路の間には共通点が多い。

私たちは最近、試験管内再構成実験を用いて大腸菌の RecF 経路も DNA 二本鎖切断修復に関与することを示すことができた⁷⁾。この実験では、近年相同組換えの初期反応に重要であることが示唆されている二本鎖 DNA 切断点の「リセクション」も観察することができた。さらに、真核生物と同様にメディエータータンパク質の重要性も明らかとなり、相同組換え経路の、すべての生物における共通の性質が明確になった。

4. RecF 組換え経路の構成分子

大腸菌の RecF 経路の初期反応には、RecA, RecF, RecO, RecR, RecQ, RecJ, RecN, 一本鎖 DNA 結合タンパク質 (SSB) などのタンパク質が関与する⁸⁾。相同組換えでは、いかにして RecA タンパク質の働ける場を用意できるか、言い換えれば、いかにして長い一本鎖 DNA 領域を作り、そこへ RecA タンパク質を乗せる (ローディング) かが重要である。なぜなら、作成された一本鎖 DNA には SSB タンパク質がまず結合するので、それを RecA タンパク質と置き換える必要があるからである。RecF 経路では、RecQ ヘリカーゼと RecJ ヌクレアーゼが協調して長い一本鎖 DNA 領域を作り、そこへ RecF-RecO-RecR (RecFOR) タンパク質複合体が RecA タンパク質を乗せると考えられていた (図 1)。RecA タンパク質が相同鎖 DNA の検索と

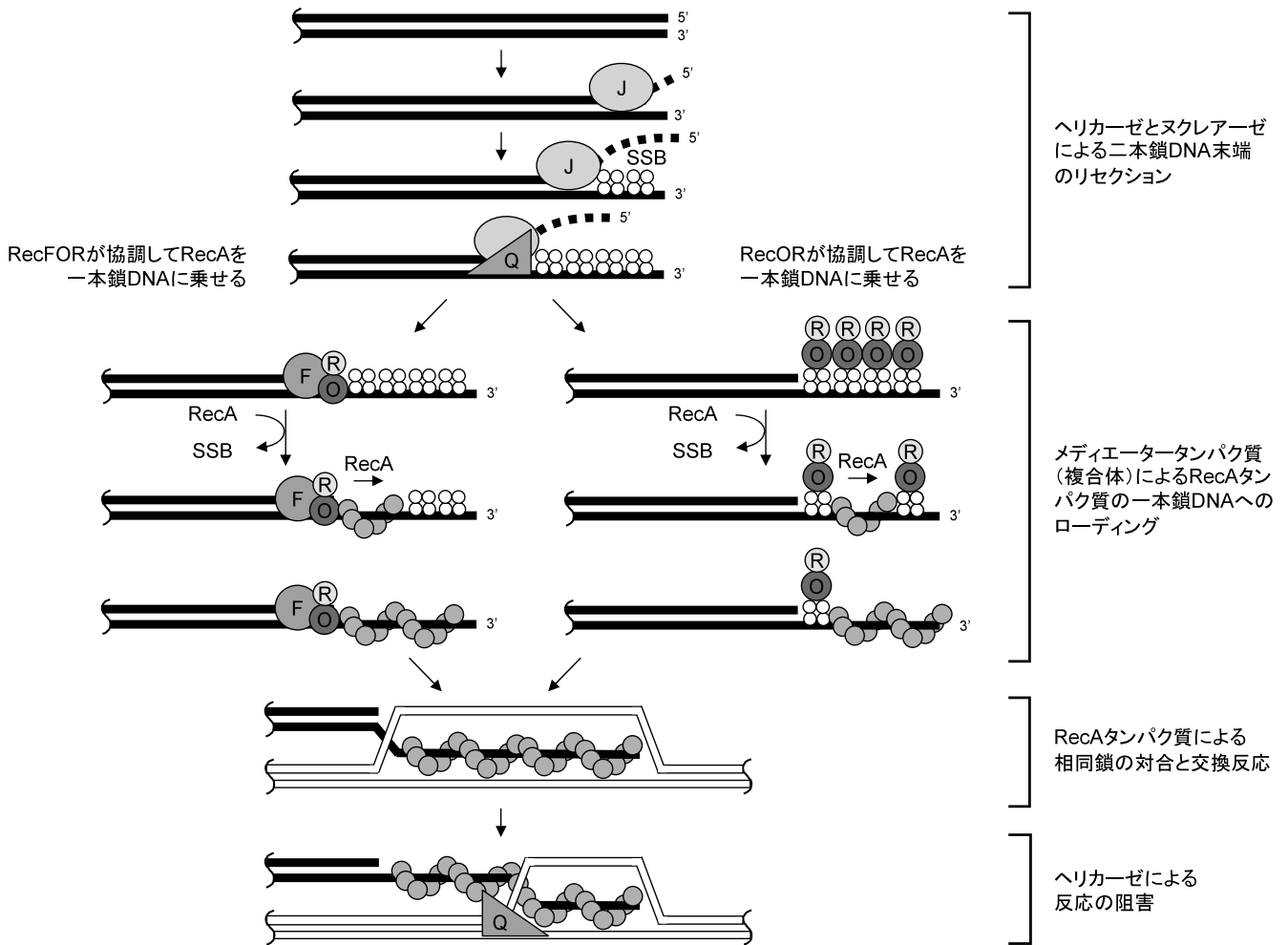


図1 RecF経路による二本鎖DNA切断修復の初期反応モデル

二本鎖DNA末端からRecJヌクレアーゼが5'端一本鎖DNAを削る。RecQヘリカーゼはこの反応を促進するかもしれないが(上), 下の図では反応を阻害する可能性も示した。こうしてできたりセクション構造をもつ二本鎖DNA末端が、RecAタンパク質による相同鎖対合の基質となる。RecF経路でRecAタンパク質を一本鎖DNAに乗せる機構には2通り考えられている。左: RecF-RecO-RecR (RecFOR) タンパク質複合体が二本鎖と一本鎖の境目で働いてRecAタンパク質に乗せる。右: RecO-RecR (RecOR) タンパク質複合体が、一本鎖部分のどこからでもRecAタンパク質に乗せる。

DNA鎖の交換反応を行い、相同な二本鎖の一方の鎖が取り替えられてできる十字型のホリデー組換え中間体が生じる(図1の下から2番目の左側のDNA構造)。このホリデー組換え中間体は、ホリデー構造分岐点移動酵素であるRecG,あるいはRuvABタンパク質複合体によって引継がれ、RuvCタンパク質が分岐点を切断することで相同組換えは完了すると考えられている。反応の初期に働くRecQ, RecJタンパク質は、組換え反応後期にも働くことが示唆されている。例えば過剰なRecQタンパク質は組換え反応を阻害する。また、RecJタンパク質は交換されてできた

一本鎖DNAを分解して組換え中間体を安定にする⁹⁾。RecFOR複合体はRecAタンパク質の一本鎖DNAへの結合を助けるが、そのためこれらは「メディエーター」と呼ばれ、酵母ではRad52, Rad55, Rad57, Rad59などのタンパク質がその機能を担うと考えられている^{10,11)}。このようなメディエーターが組換え反応で重要な機能を果たしているという意味で、大腸菌のRecF経路と酵母の組換え経路は相似(アナログ)であると言える。実際に、RecOタンパク質とRad52タンパク質の間には弱いながらも配列のホモロジーがあり¹²⁾、RecFとRad50タンパク質の一部の

間には立体構造のアナロジーが指摘されている¹³⁾.

5. 試験管内再構成実験

私たちは、大腸菌の RecF 経路がこれまで信じられてきた一本鎖ギャップ修復ばかりでなく、DNA 二本鎖切断修復を行うことを示すために、この経路に関わるタンパク質をそれぞれ精製し、試験管内再構成実験を行うことにした。この実験系では、線状二本鎖 DNA がプロセスされた後に、スーパーコイル DNA との複合体を形成する、いわゆる「組換え中間体」が観察される。結果として、RecQ, RecJ, RecF, RecO, RecR, RecA, SSB の 7 種類のタンパク質が同じ反応条件で働いて、これらのタンパク質依存的に（あるいは促進的に）二本鎖切断から始まる組換え反応

を再構成することができた (図 2)⁷⁾.

この反応に必要なタンパク質を決定するために、上の反応に含まれていたタンパク質をひとつずつ、あるいは組合わせを変えて除いてみた (図 3)。その結果、この反応に必要な因子は、RecA, RecJ, RecO, RecR であり、RecF, RecQ, SSB タンパク質は反応を促進することが分かった。また、上で紹介したように RecQ タンパク質は、過剰に加えると阻害的に働くことが示された⁷⁾。ヌクレアーゼの要求性がヘリカーゼに比べて高いことは、超高温菌の組換え経路再構築実験によっても示されている⁵⁾。

この実験により、新たに重要な知見が得られた。それは、相同鎖の交換反応が抑えられている時 (例えば、RecA タンパク質が反応に含まれていない時) に顕著であるが、

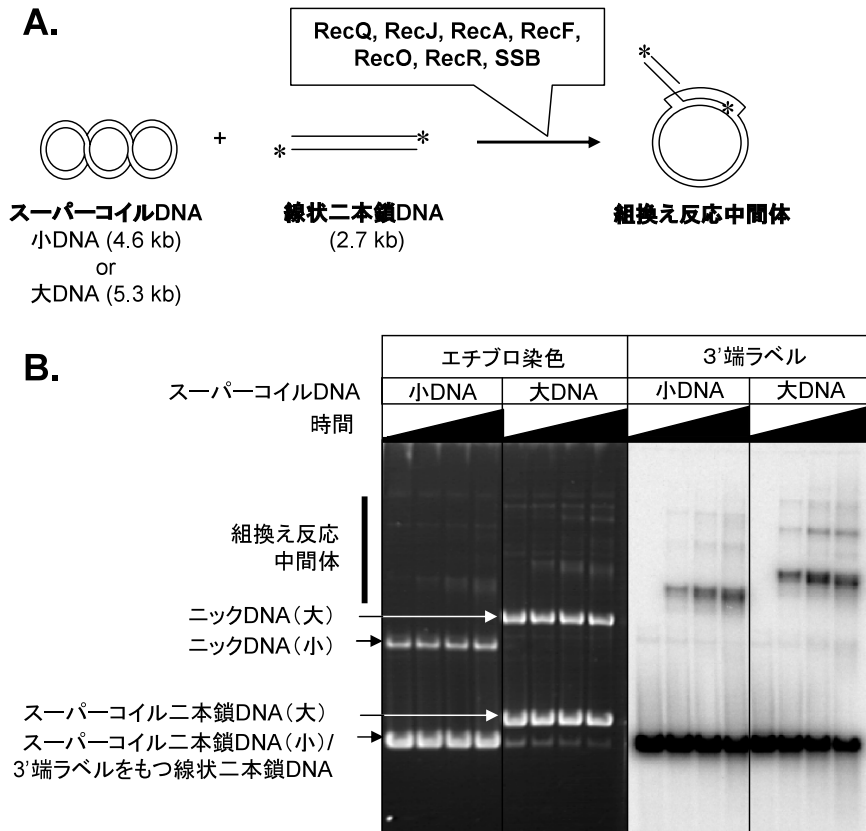


図 2 RecF 相同組換え経路による DNA 二本鎖切断修復過程の再構成実験

A: 反応模式図。相同領域をもつスーパーコイル DNA と線状二本鎖 DNA を、上に挙げた七つの精製したタンパク質と反応させてできる「組換え反応中間体」をアガロースゲル電気泳動によって観察する。B: 二つの大きさの異なるスーパーコイル DNA を基質とすることで、組換え中間体が線状二本鎖 DNA とスーパーコイル DNA からできていることが分かる。右側のラベル実験では、線状二本鎖 DNA の 3'末端にラベルが付けられている。反応時間は左から、0, 15, 30, 60 分。

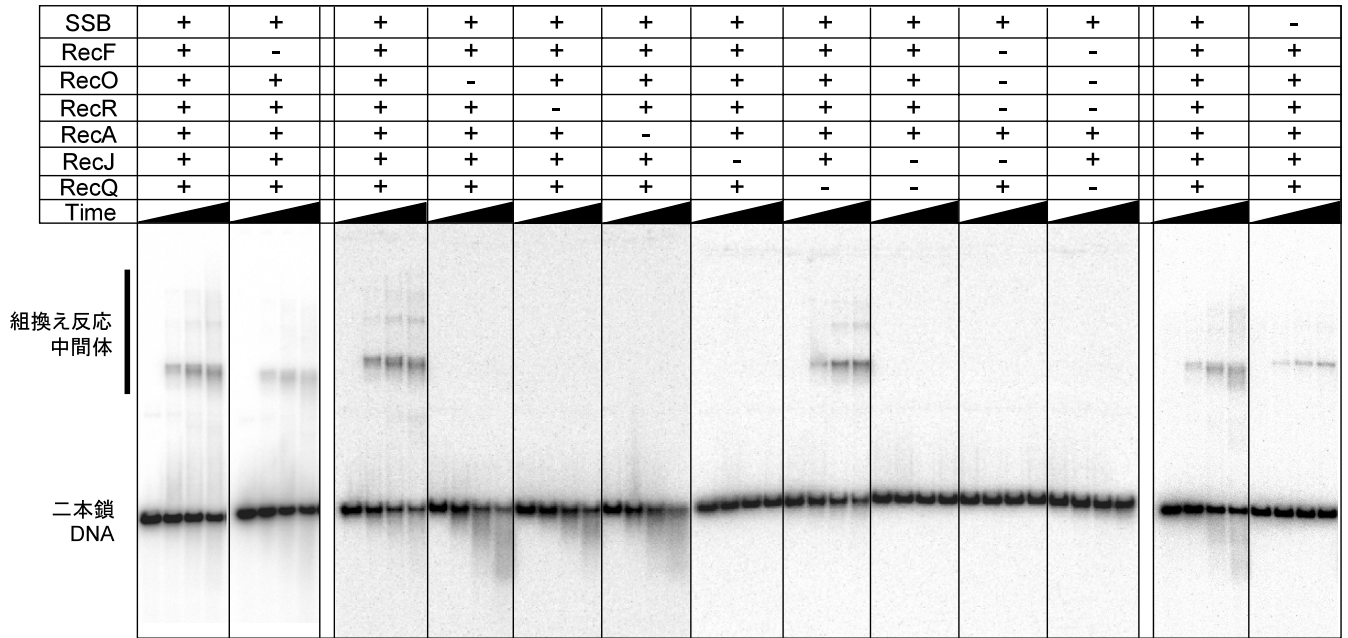


図3 RecF経路再構成反応からタンパク質を除いた時の効果

左から1, 3, 12番目の反応はすべてのタンパク質が含まれる対照実験。基質である二本鎖DNAの位置より下にスメアが観察されることは、二本鎖DNAが末端から削られていく様子を反映している。反応条件は、図2BのスーパーコイルDNA(小)を使ったものと同じ。

線状二本鎖DNAがRecQとRecJタンパク質の協調作用によってプロセスされるということである(図3)。現在この反応について詳しく解析を進めているが、線状二本鎖DNAに存在する制限酵素のサイトが、プロセスされた後にその制限酵素で切断できるか調べることによって、数百bp程度のリセクションが観察されている。

6. RecFORタンパク質は、SSBがなければ要求されない

RecFORタンパク質は、SSBタンパク質で覆われている一本鎖DNAに、それと代わってRecAタンパク質を結合させる。試験管内実験系ではSSBタンパク質を除くことができるので、SSBタンパク質がなければ、RecFORタンパク質の要求性が低くなるかどうかを検証することができる。そのような実験をしてみると、予想通り組換え中間体形成に対して、RecFORタンパク質は必須ではなくなった⁷⁾。また、この反応がこれらのタンパク質が同時に作用しないと起きないのか、それとも二本鎖DNAのプロセシングと相同鎖対合の二つの素過程に分けられるかを検証したところ、二つの反応をアンカプルできた⁷⁾。すなわち、RecQヘリカーゼとRecJヌクレアーゼで一本鎖部分が露出した“リセクト”された二本鎖DNAが用意されれば、タ

ンパク質を除去した後、この基質DNAに残りのタンパク質(SSB, RecF, RecO, RecR, RecA)を加えれば、組換え中間体を作ることができた。

7. RecF経路でのRecQ-RecJによるリセクション

このRecF経路試験管内再構成実験における新しい発見は、RecJヌクレアーゼによるリセクション機能である。大腸菌のRecJヌクレアーゼは、5'→3'の方向性をもつ一本鎖DNA分解酵素であることが知られていたが、今回この酵素の重要な活性として、二本鎖DNAの5'鎖を末端から二本鎖領域の内部に向かって削ることが示された。RecQヘリカーゼは、RecJヌクレアーゼの働きを促進すると考えられ、ヌクレアーゼとヘリカーゼがリセクション構造を作る過程で重要であることは、生物種を問わずDNA二本鎖切断修復機構に共通であるようだ¹⁻⁵⁾。

8. おわりに

多数の生物の全ゲノム塩基配列決定から、RecBCD経路に比べて、メディエーターが関与するRecF経路と相似の組換え機構が、広く生物界に保存されていることが確認された¹⁴⁾。これまで二本鎖切断修復のマイナーな経路と考え

られていた大腸菌の RecF 経路も二本鎖切断を効率良く修復できることが示されたことで、このメデイエーター経路が相同組換えの生物共通の機構と考えてよいと思われる。この過程は、二本鎖切断点からの二本鎖 DNA の修飾（リセクション）、メデイエータータンパク質(群)による RecA 様タンパク質の一本鎖 DNA 部分へのローディング、および RecA 様タンパク質による相同鎖の対合に分けることができる。さらに真核生物でも、この過程に関与する多くのタンパク質が報告されているが⁹⁾、それらをひとまとめにして反応させることができるようになれば、ここで紹介した大腸菌の RecF 経路と似ていることが明らかにされるであろう。

謝辞

ここで紹介した研究は、カリフォルニア大学デービス校の Steve Kowalczykowski 博士の研究室で、森松克実博士と共同で行ったものです。またブランダイス大学の Susan Lovett 博士には RecJ タンパク質を供与していただきました。この場をお借りして感謝いたします。

- 1) Mimitou, E.P. & Symington, L.S. (2008) *Nature*, 455, 770–774.
- 2) Zhu, Z., Chung, W.H., Shim, E.Y., Lee, S.E., & Ira, G. (2008) *Cell*, 134, 981–994.
- 3) Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C., & Jackson, S.P. (2008) *Genes Dev.*, 22, 2767–2772.
- 4) Hopkins, B.B. & Paull, T.T. (2008) *Cell*, 135, 250–260.
- 5) Nimonkar, A.V., Ozsoy, A.Z., Genschel, J., Modrich, P., & Kowalczykowski, S.C. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 16906–16911.
- 6) 春田(高橋)奈美, 岩崎博史 (2007) 生化学, 79, 449–453.
- 7) Handa, N., Morimatsu, K., Lovett, S.T., & Kowalczykowski, S. C. (2009) *Genes Dev.*, 23, 1234–1245.
- 8) Kuzminov, A. (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63, 751–813.
- 9) Corrette-Bennett, S.E. & Lovett, S.T. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 6881–6885.
- 10) Sung, P. & Klein, H. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 739–750.
- 11) Sung, P., Krejci, L., Van Komen, S., & Sehorn, M.G. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 42729–42732.
- 12) Kantake, N., Madiraju, M.V., Sugiyama, T., & Kowalczykowski, S.C. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 15327–15332.
- 13) Koroleva, O., Makharashvili, N., Courcelle, C.T., Courcelle, J., & Korolev, S. (2007) *EMBO J.*, 26, 867–877.
- 14) Rocha, E.P., Cornet, E., & Michel, B. (2005) *PLoS Genet.*, 1, e15.

半田 直史

(東京大学大学院新領域創成科学研究科
メデイカルゲノム専攻バイオ医療知財分野)

Resection, as an important step of homologous recombination
Naofumi Handa (Laboratory of Social Genome Sciences, Department of Medical Genome Sciences, University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan)

耳下腺腺房細胞における唾液分泌メカニズム

1. はじめに

ヒトは1日に0.5~1.5リットルもの唾液を分泌する。このように大量の唾液を口腔内に放出していることより唾液腺は極めて活発に機能していると考えられる。超高齢社会を迎え、唾液分泌量の低下による口腔乾燥を訴える患者が増加している。唾液分泌が低い状況下では、口腔内粘膜が乾き口の中がヒリヒリする、スムーズに話をする事ができない、食事が不味くうまく飲み込めない、感染症に罹り易く虫歯になり易い等々、口腔機能の著しい低下が予測される。高齢者のQOL(クオリティーオブライフ)を考える上で唾液分泌は口腔機能確保に重要な要素となっている。唾液の主な成分は99%以上を占める水分であるが、残り1%弱の大部分を占める唾液タンパク質が唾液に多くの機能を持たせている。唾液タンパク質は極性を持つ腺房細胞の分泌顆粒に貯蔵され(図1A)腺腔内に開口分泌される。その後、チャンネルや輸送体を通して放出される水や各種イオンと共に原唾液を構成し、介在部導管、線条部導管、排泄導管を通り唾液となって口腔内へ放出される。

唾液タンパク質の分泌経路には三つの経路が知られている¹⁾(図1B)。刺激による分泌である調節性分泌経路(図1B, I)、刺激とは無関係の小胞による構成性分泌経路(図1B, II)、および未成熟分泌顆粒が成熟する過程で派生してくる小胞による構成性様分泌経路(図1B, III)である。主なタンパク質分泌は刺激を受けて開口放出を行う調節性分泌経路であるのに対し、刺激のない状態でも残り二つの経路を経て僅かずつ唾液は分泌され続ける。

筆者らは唾液腺の開口分泌機構解明を目的として耳下腺