

特集：タンパク質の化学構造から生物機能に迫る

構造から理解する相同 DNA 組換え機構

胡桃坂 仁志¹, 美川 務², 引場 樹里¹, 柴田 武彦³

相同組換えは、減数分裂と体細胞分裂の両方において機能しており、DNA 配列情報の変動に依存した生物進化と、配列情報の安定維持という相反する機能を担っている。DNA の傷としてあるいは生体のプログラムに従って起こる DNA 二重鎖切断（または単鎖ギャップ）によって誘導される相同組換えの要は、DNA 二重鎖切断の末端に由来する単鎖 DNA が相補基配列をもつ別の二重鎖 DNA に割り込んでヘテロ二重鎖とよばれる分子間の二重鎖を形成する反応—相同的対合反応—である。本総説では、タンパク質および DNA の立体構造の視点から、相同的対合に働くタンパク質とそれを DNA にリクルートする組換えメディエーターと呼ばれるタンパク質の働きに焦点を当てて相同組換え機構について概説する。

1. はじめに

現在、地球上に生息が確認されているすべての生物種は、DNA を担体として遺伝情報（ゲノム DNA）を保持している。このゲノム DNA の配列が進化の過程で変動し、それによって生じた配列情報の差異がこれらの 300 万種を越える生物種を生み出した。従って、ゲノム DNA 配列変動は、生物種の誕生と進化の根本であると考えられる。相

同 DNA 組換え（以下相同組換えと記す）は、この DNA 配列変動に重要な役割を果たしてきた。真核生物では、相同組換えは減数分裂の第一分裂期に引き起こされる（減数分裂期組換え）。この相同組換え反応は、配列情報が同一である姉妹染色分体ではなく、配列情報に若干の違いを含む相同染色体間で優先的に起こり、その結果として、第一分裂での相同染色体の分離に欠かせない相同染色体間での物理的な連結であるキアズマが形成される。この相同染色体間でのキアズマ形成の副産物として遺伝情報の交換が行われるため、ゲノム DNA 配列の変動が起こる。

またゲノム DNA は、環境からの外的要因（紫外線や放射線など）や細胞自身による内的要因（DNA 複製のエラーや活性酸素など）によって日常的に損傷を受けている。このような多様な DNA 損傷を効率よく修復するために、生物は進化の過程で多様な DNA 損傷修復経路を獲得した。その一つとして相同組換えを経由した DNA 修復経路が知られている。相同組換え修復では、DNA の二重鎖切断損傷が修復されるが、その際、減数分裂期組換えとは異なり、配列情報が同一である姉妹染色分体が優先的に利用される。そのため、相同組換え修復は、配列情報の変動を伴わずに正確に二重鎖切断損傷を修復することができる。相同組換え修復のゲノム DNA 安定維持における重要性は、この経路の破綻が染色体異常や発がんの原因となることから明確である。

¹ 早稲田大学理工学術院（〒162-8480 東京都新宿区若松町 2-2）

² 独立行政法人理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター城生体金属科学研究室（〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29）

³ 独立行政法人理化学研究所基幹研究所柴田遺伝制御科学研究室（〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1）

Structural and biochemical aspects of homologous genetic (DNA) recombination

Hitoshi Kurumizaka (Graduate School of Science and Engineering, Waseda University, 2-2 Wakamatsu, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8480, Japan), Tsutomu Mikawa (Biometal Science Laboratory, RIKEN SPring-8 Center, 1-7-29, Suenohiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan), Juri Hikiba (Graduate School of Science and Engineering, Waseda University, 2-2 Wakamatsu, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8480, Japan), and Takehiko Shibata (Cellular & Molecular Biology Laboratory, RIKEN Advanced Science Institute, 2-1 Hiro-sawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan)

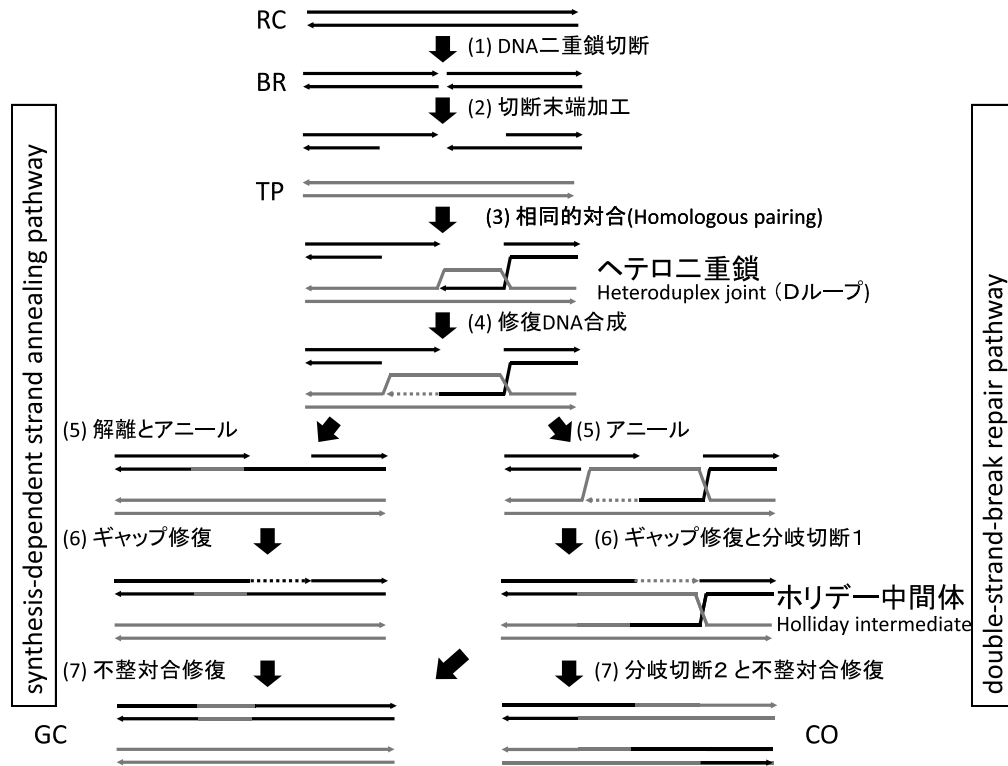


図1 相同組換えの分子機構モデル

二重鎖切断された二重鎖 DNA (dsDNA; 黒の二重線, BR) が, 同じ塩基配列をもつ dsDNA (灰色の二重線, TP) を鋳型として修復され, gene conversion 体 (GC) または交差体 (CO) ができる. synthesis-dependent strand annealing モデル (SDSA) では GC だけができる. double-strand break repair モデル (DSBR) ではホリデー中間体を経て, その切断の方向で GC または CO (厳密にはヘテロ二重鎖部分で GC が起こることがある. その両側で CO になっている) ができる.

このように相同組換えは, 減数分裂と体細胞分裂の両方において機能しており, DNA 配列情報の変動に依存した生物進化と, 配列情報の安定維持という相反する機能を担っている. しかし, そのメカニズムの詳細に関してはいまだ不明な点が多く, その理解のためには構造生物学的アプローチが重要であると考えられる. そこで本総説では, タンパク質および DNA の立体構造の視点から見た相同組換え機構について概説する.

2. 相同対合反応とその触媒酵素

相同組換えは DNA 二重鎖切断による損傷部位を, 極めてよく似た塩基配列をもつ別の二重鎖 DNA を鋳型にする修復機構と見なす (図 1; BR から GC) と理解し易いであろう. 結果として, DNA 二重鎖切断が入った DNA (図 1, 黒二重線 BR) の切断部位の両側の領域が, 鋳型 DNA (図 1, 灰色二重線 TP) のよく似た配列を糊代にして上書きされる. これを gene conversion^{注1)} という. 相同組換えといえ

ば, 組換え部位の両側で二つの DNA で部分を交換する組換えが一般的である. この型の組換えは交差体 (図 1, CO) という. 1960 年代までは, gene conversion と交差とは異なる反応によって行われると考えられていたが, R. Holliday によって提唱された¹⁾, 組換え開始時期に両親に由来する相補配列をもつ DNA 鎖同士がヘテロ二重鎖 (heteroduplex) という合いの子 DNA を作り, その中の不整合塩基対を修復するという仮説で, gene conversion と交差とを同一の機構で説明できることが分かった. その後の研究で, この仮説に修正が加えられ, 現在では, Szostak らが 1983 年に提唱した double-strand-break repair モデル (DSBR)²⁾ (図 1) が, 相同組換えの主要な反応機構として認知されている. 加えて, ホリデー中間体を経ない synthesis-dependent strand annealing (SDSA) という経路によっても gene conversion が説明され (図 1), 種々の実験結果より, この経路も生体内での gene conversion を触媒する経路として, 比較的最近受け入れられるようになった³⁾.

単鎖 DNA が相手の二重鎖 DNA 中の相補配列を見つけ出してヘテロ二重鎖を作る過程が相同組換えの中核であり, 相同的対合反応 (図 1, 第 3 段階) という. その結果

注 1: gene conversion は, 本来の邦訳「遺伝子変換」は, 今では変異などを含むより広い意味での使用が主流になったので, 本稿では原語のまま表記した.

できる、ヘテロ二重鎖の3'末端から、二重鎖DNA由来の相補鎖を鋳型として行う修復合成(図1, 第4段階)で切断によって失われた塩基配列が回復される。更に、SDSA機構では、回復された配列をもつDNA鎖が鋳型から離れて、切断の相手側由来する3'単鎖領域とアニールする。一方、DSBR機構では、修復合成で置き換えられたDループに、切断の相手側由来する3'単鎖領域がアニールする(図1)。

相同的対合は、精製された大腸菌のRecAがATPを補助因子として、単鎖DNA断片と相補配列をもつ二重鎖DNAの間で、ヘテロ二重鎖と置き換えられたループ(Dループ; 図1)を形成する反応として発見された^{4,5)}。加水分解できないATPアナログ添加でも相同的対合を触媒するが、RecAは相同的対合の結果生じたヘテロ二重鎖を、ATPの加水分解を伴って単鎖DNAの5'から3'の方向に伸長させる(分岐移動, branch migration)活性も併せもつ^{6,7)}。このRecAによる分岐移動活性は、単鎖DNA断片と環状二重鎖DNAを基質として生じたDループの場合には、一度できたヘテロ二重鎖を解離させる反応として検出される⁸⁾。このようなATP水解に依存する活性により、RecAは、親DNA間の塩基配列の完全な相補性と不完全な相補性を識別すると考えられる。事実、RecAをPCR反応系に加えるとATP水解に依存して非特異的なDNA増幅を強く抑制する⁹⁾。

バクテリアRecAのホモログとして、真核生物ではRad51¹⁰⁾とDmcl¹¹⁾の2種類のタンパク質が発見された。Rad51およびDmclは共に相同的対合反応とDループの解離を触媒する。二重鎖DNAを単鎖DNAに融解する酵素DNAヘリカーゼは分岐移動を効率よく行うが、RecAの立体構造は、ある種のDNAヘリカーゼ(T7 DNA helicase-primaseのヘリカーゼドメイン)と酷似している(122個のC α 原子がrmsd 1.6Åで重なる¹²⁾)。この事実は、自身は顕著なDNAヘリカーゼ活性をもたないRecAでも、分岐移動活性はDNAヘリカーゼと共通なことを示唆する。

相同組換えには、RecA, Rad51, Dmclが関わらない例もある。rad51欠損変異をもつ出芽酵母でも相同組換えによるDNA二重鎖切断修復が起こる。このRad51に依存しない組換え修復はRad52に依存し、また、二重鎖切断から染色体末端までの遺伝子すべてが相手のDNAの対立形質に置き換わる極端なgene conversionとなる¹³⁾。Rad52はATPがなくても相同的対合を行う¹⁴⁾。このようなATPを要求しないタイプの相同的対合活性は、出芽酵母のミトコンドリアDNA(mtDNA)での相同組換えに働くMhr1¹⁵⁾や大腸菌ウイルス、ラムダファージの β タンパク質¹⁶⁾という組換えタンパク質でも見いだされている。Mhr1による相同的対合は組換え体を作る他、mtDNAの複製開始にも働くことが示された¹⁷⁾。 β タンパク質もまたDNA複製に

も働く。Rad52, Mhr1, β タンパク質は、RecAやRad51とはまったく一次構造(アミノ酸配列)も立体構造も異なる^{14,18,19)}。また、これらは、互いに一次構造上の相同性をもっていないが、DNAがない時にはリング状構造を作ることでは共通性がある。これらATPを必要としないタンパク質による相同的対合は、組換え中間体DNA構造において、ヘテロ二重鎖の3'末端からはじまる修復合成がいつまでも続くという型のDNA複製を誘導する。その結果、環状DNAが鋳型であるmtDNAやラムダファージDNAの場合は、コンカテマーとよばれる直列多量体をつくるローリングサークル型になる¹⁷⁾。

3. RecA, Rad51, Dmclの構造と反応機構

前述したように、相同組換え反応において、開始点に形成された単鎖DNAが、相補配列をもつ二重鎖DNAとの間でヘテロ二重鎖を形成する相同的対合が重要である。1992年に、この過程を触媒するバクテリアの酵素RecAについて結晶構造が報告¹⁸⁾されて以来、これまでに様々なバクテリアのRecA構造が決定されている。いずれの構造においても、RecAは多量体としてらせん状のフィラメント構造を形成していた(図2)。RecAは、相同的対合反応を触媒する際にはATPを要求することが知られている。そのため、RecA-ATPアナログ複合体や不活性型と考えられているRecA-ADP複合体の立体構造解析も行われたが、いずれもRecA約6分子でらせんを1周するフィラメント構造を形成していた。しかし興味深いことに、これらのRecAフィラメントの構造を比較すると、それぞれが異なったらせんのピッチをもっていることが分かった(図2)。このことは、RecAフィラメントの柔軟性を示唆しており、このような柔軟性が、組換え反応の触媒において重要な役割を果たしていると考えられる。

原子分解能でのRecA構造の決定がなされたことにより、RecAフィラメントの内側にL1およびL2と呼ばれる2箇所のDNA結合ループが存在することが分かった。これらのDNA結合部位は、相同的対合のための活性中心と予測されている。電子顕微鏡解析により、RecAに結合した単鎖DNAおよび二重鎖DNAは、いずれもRecAフィラメントの内側に位置していることが示されており、L1およびL2ループの結晶構造における位置は、電子顕微鏡解析の結果とよく一致している。相同的対合反応を触媒するためには、単鎖DNAと二重鎖DNAとの両方が同時にRecAフィラメントの内側に取り込まれ、L1およびL2ループに結合する必要がある。ごく最近RecAと単鎖および二重鎖DNAとの複合体の結晶構造解析が行われ、Protein Data Bank(PDB)に登録され、Natureに記事が掲載された⁵⁴⁾。

バクテリアRecAのホモログとして、真核生物では

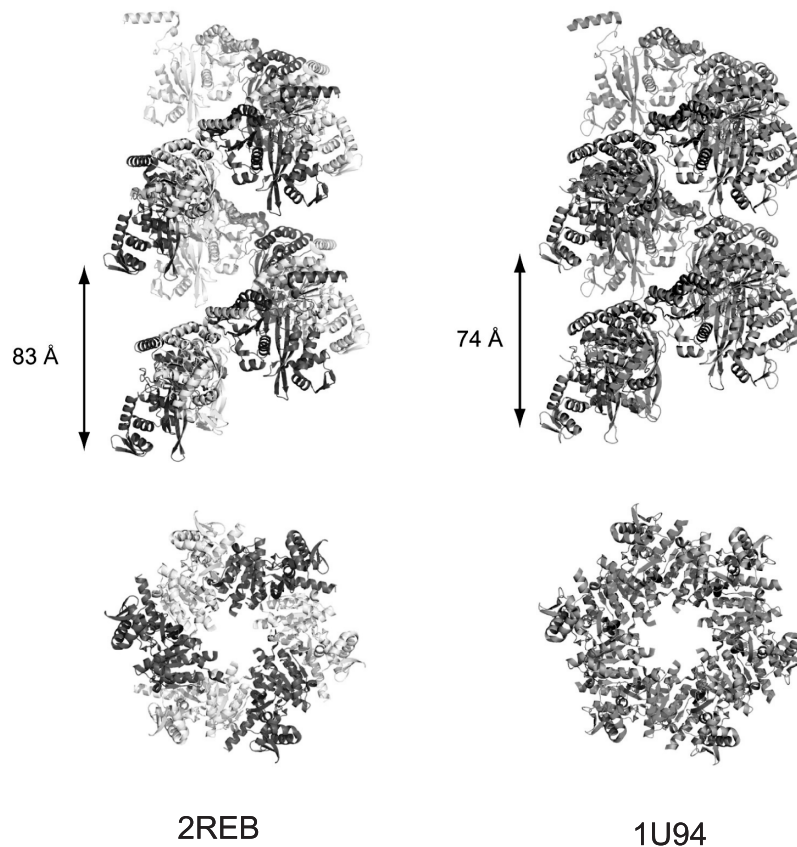


図2 RecA フィラメントの結晶構造
 ピッチの異なる RecA フィラメントの例を示した。サイドビューとトップビューをそれぞれ上段と下段に示した。図の最下部には、本図にて使用した構造の PDB accession number を示した。

Rad51 と Dmc1 の 2 種類のタンパク質が発見された^{10,11)}。これらは、酵母から植物、ヒトにいたるまで幅広く保存されており、このことは RecA 類縁タンパク質の生命維持における重要性を示している。これら 2 種類の RecA ホモログは、互いに 50% 以上のアミノ酸同一性を有しており、まさに双子タンパク質といえることができる。興味深いことに、Rad51 は減数分裂期および体細胞分裂期の両方の組換えで働くが、一方、Dmc1 は減数分裂期組換えのみで機能していることが報告されている。このことは、Dmc1 が減数分裂期組換えにおいてのみ見られる過程、すなわち相同染色体間での特異的なキアズマ形成などにおいて重要な役割を果たすことを示している。

このような Rad51 と Dmc1 の機能的差異を反映するように、両タンパク質は異なった会合状態を示す。互いに 50% 以上のアミノ酸相同性を有していることから想像されるように、Rad51 と Dmc1 の単量体レベルでの立体構造はほぼ同一である。しかし、Dmc1 は八量体のリング構造とらせん状のフィラメント構造を、一方、Rad51 はらせん状のフィラメント構造を形成して機能するという違いを有している。

筆者らは、世界に先駆けてヒト Dmc1 の結晶構造解析に

成功し、Dmc1 の八量体リング構造を原子分解能で解明した(図3)。八量体リング構造の Dmc1 プロトマー間では、258 番目のグルタミン酸が隣の Dmc1 プロトマーのチロシン 194、アルギニン 192、そしてアスパラギン 163 の三つのアミノ酸残基と強固な水素結合を形成していることが明らかになった²⁰⁾。この 258 番目のグルタミン酸は、八量体リング構造を形成しない Rad51 では保存されていない。この結合のため、八量体リング構造において Dmc1-Dmc1 間に位置する ATP 結合部位がタイトで、リング構造には ATP が結合できないことが推測された。このことから、Dmc1 が形成する八量体リング構造は、不活性型であると考えられているが、Dmc1 が八量体リング構造の状態でも DNA に結合できることなどから、その機能的側面も興味深い。

これまでに古細菌の RecA ホモログである RadA および出芽酵母 Rad51 において、らせん状フィラメント構造の立体構造解析が報告されている²¹⁻²⁴⁾。加えて RadA の七量体リング構造やヒト Rad51 の ATPase ドメインの構造解析も行われており^{25,26)}、RecA 類縁タンパク質群の多様な多量体形成能とそれらの相同組換え能との相関の解明が期待されている。

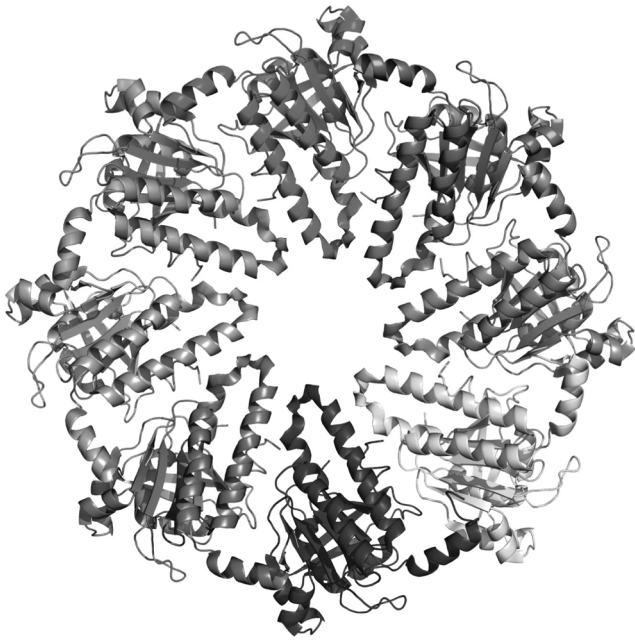


図3 ヒト Dmc1 の八量体リング構造
それぞれのプロトマーを濃淡で示した。

RecA と真核生物型ホモログ (Rad51 および Dmc1) との一次配列を比較すると, ATPase ドメインは高い相同性を示すが, 互いに相同性をもたない領域が存在する。それらは, RecA の C 末ドメインと Rad51 および Dmc1 の N 末ドメインである。筆者らは, RecA の C 末ドメインが単独で高次構造を形成し, DNA に直接結合することを示した²⁷⁾。そしてヒト Rad51 の N 末領域も同様に DNA 結合能を有することが明らかになった²⁸⁾。これら RecA-C 末ドメインと Rad51-N 末ドメインは, 立体構造上の相同性は見られなかったが, フィラメントモデル上ではいずれも同様の位置に存在し, 溶媒に露出している²⁸⁾。これらのことから, RecA-C 末ドメインと Rad51-N 末ドメインは, 相同的対合の活性中心と思われる L1 および L2 ループへ DNA を導く“ゲートウェイ”であると筆者らは考えた²⁹⁾。これらのゲートウェイ上に変異を導入すると, RecA, Rad51, Dmc1 のいずれもが DNA 結合活性および相同対合活性に著しい低下を示した^{28, 29)}。これらの事実は, ゲートウェイ仮説を支持している。相同的対合反応の過程では, DNA はダイナミックに RecA 類縁タンパク質のフィラメント構造中へ取り込まれるが, RecA-C 末ドメインと Rad51-N 末ドメインのさらなる解析によって, このダイナミックなプロセスの理解が深まると期待される。

4. RecA, Rad51 に結合した DNA 構造

相同的対合機構理解の有力な手掛かりは, NMR 分光法によって決められた, RecA や Rad51 に結合したオリゴ単鎖 DNA の立体構造から得られた。この結果は, 既に述べ

た ATP を必要としない相同的対合タンパク質群の発見につながった。

ATP の非水解性アナログ存在下で RecA に結合したいろいろな塩基配列の 3 マーから 6 マーまでのオリゴ単鎖 DNA の立体構造解析を, NMR の一つの技術である転移 NOE 法により行った結果, すべての単鎖 DNA で一定の構造をとることを筆者らは明らかにした。それらの結果を基にして導かれた活性型 RecA に結合した単鎖 DNA の共通構造のモデルと, B 型二重鎖 DNA の一方の鎖の構造とを比較して図 4 に示した³⁰⁾。この構造は, DNA だけでは得られないが, RecA の代わりに酵母 Rad51 を加えても得られ³¹⁾、また, この構造をとるには ATP アナログを必要とする。この構造は RNA ではとれず, DNA に特有である³⁰⁾。一見してわかる, 活性型 RecA に結合した単鎖 DNA の構造と通常の B 型 DNA との大きな違いは, とともに隣り合う塩基は平行になっているが, それらの塩基の間隔が活性型 RecA の結合では B 型の 3.5 Å の約 1.5 倍である 5 Å に引き伸ばされた構造になっていることと, そのため失われた塩基間のスタッキングの代わりに, デオキシリボース環のデオキシ部位である 2' メチレン基と塩基との CH- π 相互作用で, 引き伸ばされた構造が保たれていることである。ATP との結合で活性化された RecA に結合した単鎖 DNA または二重鎖 DNA は, いずれも同じ塩基配列をもつ B 型二重鎖 DNA の長さの 1.5 倍に引き伸ばされているという電子顕微鏡観察結果が説明された。

転移 NOE 法によって求められた DNA 構造では, 本来糖パッカーと呼ばれる歪みをもつはずのデオキシリボース環が平面になっていたことから, 可能性の一つとして, 相互変換する 2' エンド型と 3' エンド型との糖パッカーが等量含まれている結果ではないかと考え, 分子模型で, 糖パッカーを 2' エンド型と 3' エンド型間で相互変換させてみたところ, その変換に伴い, 塩基が水平に大きく回転することが分かった³¹⁾。

電子顕微鏡観察による単鎖 DNA・RecA 複合繊維構造と, 二重鎖 DNA・RecA 複合繊維構造とは外見上区別がつかない。そこで, 単鎖 DNA の伸長構造を基に二重鎖 DNA 構造モデルを構築したところ, 糖パッカーを 3' エンドにした時, 電子顕微鏡観察と, トポロジカルな解析の結果得られた活性型 RecA に結合して巻き戻され伸長した二重鎖 DNA について知られている構造パラメーター (ヘリカルピッチ 95 Å, DNA らせん 1 回転当たり 18.6 塩基対) に合う二重鎖 DNA 構造モデルが構築できた。しかし, 糖パッカーを 2' エンドにすると, このパラメーターをもつ二重鎖構造は取れず, 代わりに不活性型 RecA・二重鎖 DNA 複合繊維構造について知られているパラメーター (ヘリカルピッチ 64 Å, DNA らせん 1 回転当たり 12.5 塩基対) をもつ伸長二重鎖 DNA 構造モデルを得ることができ

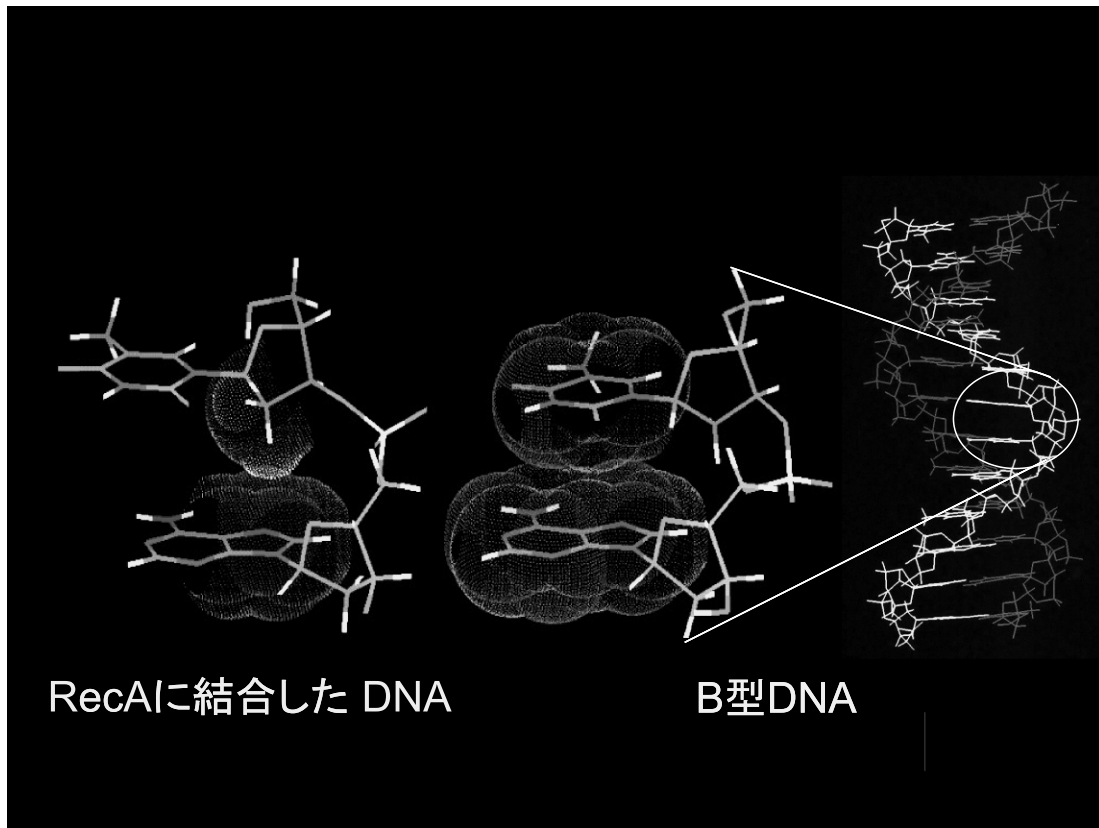


図4 RecAに結合した単鎖DNAの構造モデル
 左側は活性型RecAに結合した単鎖DNAを、右側は、通常の二重鎖DNA（B型）の一方の鎖のみを示す。

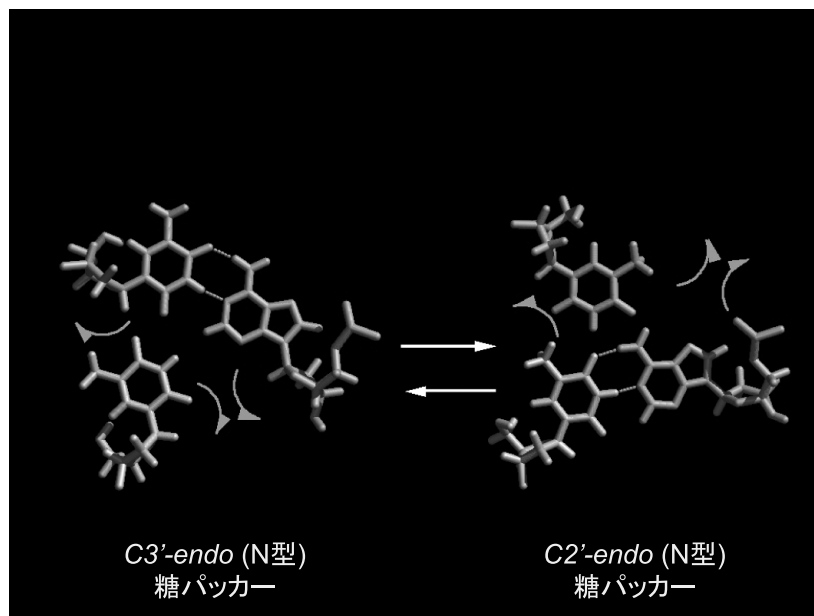


図5 糖パッカー相互変換に伴う塩基回転による塩基対スイッチ

た³¹⁾。それらの二重鎖 DNA 構造モデルの中では、塩基対間水素結合が開かれた塩基は糖パッカーの相互変換で立体障害なく自由に回転できる³¹⁾。二重鎖 DNA の塩基対の寿命は 35°C でミリ秒のオーダーであり、毎秒数千回も形成・解離を繰り返している。3'エンド型糖パッカーをもつ活性型二重鎖 DNA の副溝にやはり伸長した単鎖 DNA をもってくると、二重鎖 DNA のデオキシリボース環の3'エンド型から2'エンド型への糖パッカー変化に伴い、塩基が副溝側へ回転した時、そこにある単鎖 DNA の塩基が相補塩基の時には、塩基対スイッチとなる (図5)³¹⁾。その塩基がもし相補配列の対応する塩基であれば、その前後でも塩基対スイッチが起こり、相補性の認識とヘテロ二重鎖形成が同時に起こる結果となる。このように、伸長した二重鎖 DNA と単鎖 DNA との間での相同的対合機構が説明できる³¹⁾。通常の B 型二重鎖 DNA では、糖パッカーは、2'エンドであるが、活性型 RecA と結合した伸長三重鎖ではフーリエ変換型赤外分光法で3'エンド型糖パッカーの存在が検出されている³²⁾。A-T 塩基対は、G-C 塩基対に比べ、水素結合が一つ少ないだけ熱安定性が低い。GC 含量が多くなると RecA や Rad51 による相同的対合が遅くなる。また、親 DNA 同士間で、A または T での不整対の方が G または C での不整対よりも Rad51 による相同的対合に対する阻害的影響が大きいことが知られている。これらの事実は、塩基対解離、回転、塩基対スイッチという相同 DNA 対合機構モデルから予測されることに一致している。一方、RecA・単鎖 DNA 複合体の結晶構造⁵⁴⁾はこの機構モデルを支持しているとは言い難い。結晶構造はスナップショットであるのに対して、NMR 構造は溶液中での動的構造であることから、今後、両手法で得られた構造に動力学計算で得られた情報を加えるなどでより精密なモデルが構築できるであろう。

この相同 DNA 対合機構モデルでは、相同的対合そのものは DNA 間の衝突と分子内の熱運動だけで十分で、相同的対合過程のどこにも ATP 水解によるエネルギーの供給は必要ない。事実、水解されない ATP アナログ存在下でも RecA は相同 DNA 対合だけができる。また、筆者らは、Rad52^{14,33)}、Mhr1¹⁵⁾、Xrcc3-Rad51C 複合体³⁴⁾など、ATP の添加なしで相同的対合を行うタンパク質群の存在を明らかにした。

5. 組換えメディエーターの構造と機能

生命には実際に相同組換えそのものを触媒する RecA や Rad51 などの相同組換えを起こす酵素以外に、これら酵素をリクルートする組換えメディエーターと呼ばれるタンパク質群が存在する³⁵⁾。ヒト RAD51 の欠損がその重要性から致死に至るのに対して、これらメディエーターの欠損は疾患の原因になる可能性が高く近年注目されている。例え

ば、メディエーターの一つとして知られているヒト BRCA2 (breast cancer, 乳がん) タンパク質が変異すると特に乳がんの腫瘍罹患リスクが上昇することが知られており、その機能解析が待たれている³⁶⁾。

相同組換えの開始時には DNA 二重鎖切断端が3'突出単鎖 DNA 末端に加工され、RecA や Rad51 が最初にフィラメント形成する際の基質となる。しかし、細胞内では単鎖 DNA 領域はその分解を抑えるために直ちに単鎖 DNA 結合タンパク質 (バクテリアでは SSB, 真核生物ではヘテロ三量体である RPA) により保護されるため、RecA, Rad51 などはそのままでは働くことができない。実際、試験管内であらかじめ単鎖 DNA 結合タンパク質で飽和した単鎖 DNA を基質として用いると、RecA や Rad51 による相同組換え反応を観察できないが、この状態にメディエーターを添加すると組換え反応が再び観察されるようになる^{35,37~39)}。このことから、メディエーターの分子機能は単鎖 DNA 結合タンパク質で覆われた単鎖 DNA 領域を RecA や Rad51 に受け渡すことと考えられるようになった。この機能はそこに働くタンパク質は異なるもののバクテリアから高等真核生物まで保存されており、バクテリアでは RecF, RecO, RecR という3種のタンパク質が、出芽酵母では Rad52 が、ヒトでは RAD52 に加えて BRCA2 がメディエーターとして知られている。これらの内、その分子機構が最も詳細に調べられている RecFOR タンパク質について次に述べる。

RecF, RecO, RecR には RecF と RecR の間、また RecO と RecR の間に相互作用があり、RecFR 複合体あるいは RecOR 複合体を形成する。また、この三者が同時に溶液中に存在すると RecFR 複合体が優位に形成される⁴⁰⁾。RecFR 複合体の構造はまだ決定されていないが、近年 *Deinococcus radiodurans* (dr) 由来の RecR の立体構造が決定された (図6)。drRecR は四量体でちょうど DNA が入る程度のリング構造を形成し、その内側には DNA 結合モチーフであるヘリックス-ヘアピン-ヘリックスが位置していた⁴¹⁾。*Escherichia coli* (ec) や *Thermus thermophilus* (tt) の RecR は二量体で存在することが知られているが、ttRecR は ttRecF と相互作用すると4分子の RecR と2分子の RecF からなる複合体を形成する⁴⁰⁾。また、ecRecR や ttRecR は二量体では DNA に強く結合できないが RecFR 複合体になると ATP 存在下で DNA に強く結合するようになる⁴²⁾。これらのことから、RecFR 複合体の中で RecR はやはりリング構造を形成すると考えられる。近年、drRecF の立体構造も決定され、その構造は ATP 結合と連動した二量体形成を行う Rad50 のヘッドドメインに類似していた⁴³⁾。このことを考え合わせると、RecF は RecR リングの形成のみでなく、その開閉など機能的にも関係していることが考えられる。

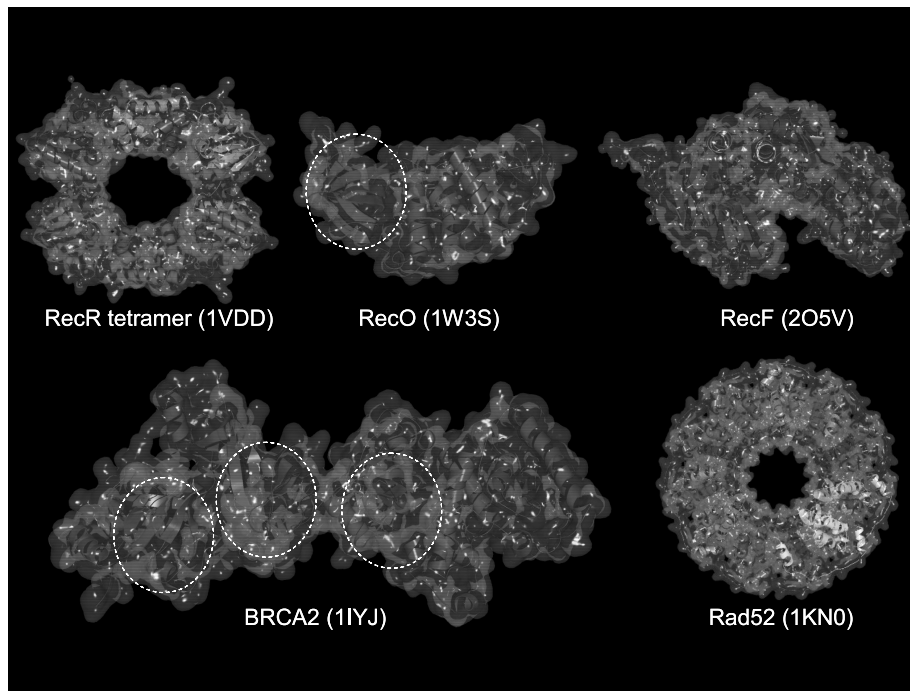


図6 組換えメディエーターの立体構造
() 内は PDB ID を、点線内は OB フォールドを示す。

一方、RecO は SSB と同程度の単鎖 DNA に対する強い結合力を示す。電子顕微鏡観察において SSB-単鎖 DNA は特徴的な縮れた像を示すのに対して、RecO-単鎖 DNA はフィラメント様の像を示した。あらかじめ SSB で覆われた単鎖 DNA に RecO を加えても、RecO-単鎖 DNA の像が優位に得られたことから、RecO は SSB に覆われた単鎖 DNA から単鎖 DNA を奪うことが明らかになった⁴⁴⁾。また、生化学的な解析により、単鎖 DNA から外れた SSB は単鎖 DNA 上にある RecO に結合したままであり、この状態の単鎖 DNA はまだ RecA の基質にならないことが示された。試験管内でさらにこの状態に RecO と相互作用する RecR を添加すると、RecA は単鎖 DNA 上にフィラメントを形成して活性を示した⁴⁴⁾。このように試験管内では RecOR のみで RecA を SSB に覆われた単鎖 DNA に結合させることができる。近年、drRecOR 複合体の立体構造が決定された。この構造中でも RecR はリングであり、RecO はリングの両サイドからリングにはまり込むように配置していた⁴⁵⁾。この構造では二重鎖 DNA はリング内に入れないが、DNA 存在下でのクロスリンク実験結果は、二重鎖 DNA-単鎖 DNA 領域には 2 分子の RecR と 1 分子の RecO から構成される RecOR 複合体として結合していることを示した。上述したように、RecFR 複合体はリングを形成して二重鎖 DNA 上をクランプのように移動する可能性が高い。また、NMR による相互作用解析と生化学的解析の結果、RecR 上の RecF と RecO の相互作用部位はオーバー

ラップしていることが示唆され、実際に RecO に結合できなくなる RecR の変異体は RecF にも結合しなかった⁴⁰⁾。

以上をまとめると RecF, RecO, RecR によるメディエーターとしての機能発現機構について次のモデルが構築できる(図7)。1) 相同組換えの開始反応の結果生じた単鎖 DNA 領域は直ちに SSB の結合により保護される。2) RecF, RecO, RecR のうち RecO は SSB で覆われた単鎖 DNA 領域に結合し、単鎖 DNA から解離した SSB は RecO 上に留まる。一方、3) RecR, RecF は 4 分子の RecR と 2 分子の RecF から構成される RecFR 複合体を形成し二重鎖 DNA 上をクランプのように移動する。4) RecFR 複合体が二重鎖 DNA-単鎖 DNA の境界に来ると、RecR が RecO と相互作用することにより、2 分子の RecR と 1 分子の RecO から構成される RecOR 複合体が形成される。おそらく、5) この RecOR を土台として RecA のフィラメント形成が始まり、相同組換えが開始される。現在のところ RecO と RecA の間、あるいは RecR と RecA の間に物理的な相互作用は確認されていないが、真核生物のメディエーターである Rad52, BRCA2 両者とも Rad51 と物理的に相互作用することから^{46,47)}、DNA 上の RecOR 複合体と RecA の間には何らかの相互作用があることが推定される。

RecO, Rad52, BRCA2 はその全体構造は全く異なるが(図6)、その発現活性は非常に類似している。これらのタンパク質は全て ATP を必要とせずに RecA や Rad51 と同様に相同的対合を触媒する^{44,48,49)}。RecA や Rad51 による相

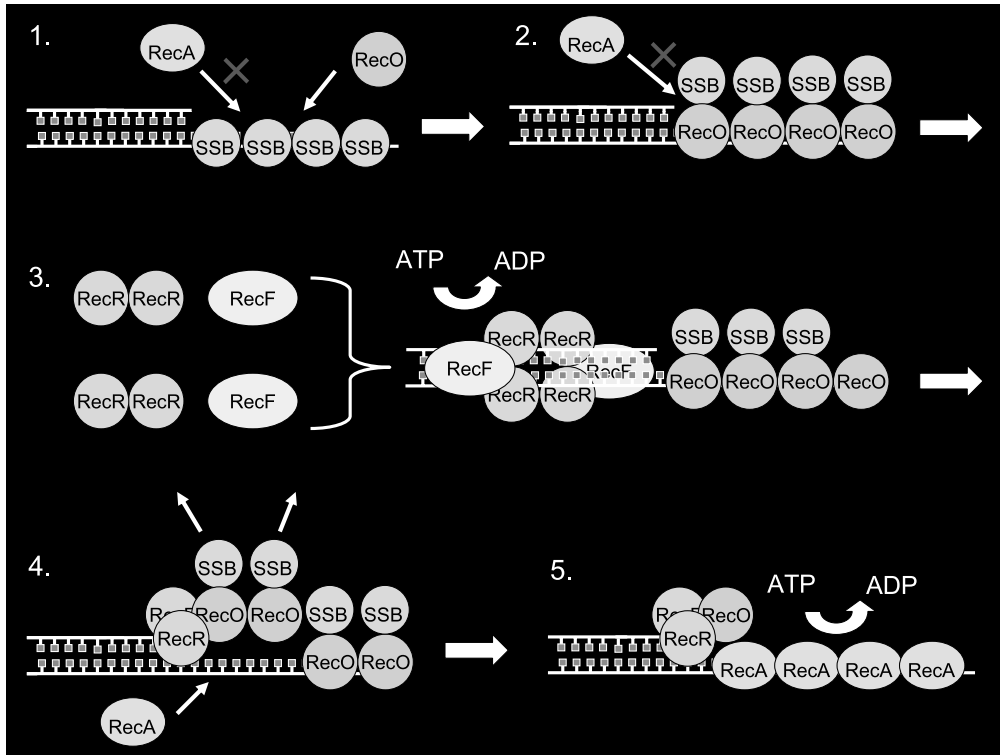


図7 RecF, RecO, RecR による, SSB で覆われた単鎖 DNA 領域への RecA のリクルート

同組換えが非常に長い DNA 鎖長に渡るのに対して, これらメデイエーターによる相同組換えは比較的短い DNA 領域に限定されることから, 相同対合反応の開始を助ける役割があるのかもしれない。また, これらのメデイエーターは全て単鎖 DNA 結合タンパク質で覆われた単鎖 DNA 同士をアニーリングさせる活性もあわせもつ^{50,51)}。この活性の役割として最も有力な仮説は RecA や Rad51 による DNA 対合の結果追い出された単鎖 DNA (直ちに単鎖 DNA 結合タンパク質に覆われる) と対合反応に使われていない 3' 突出単鎖 DNA 末端をアニーリングさせることである。特に RecO においては, このアニーリング活性は RecR と相互作用することにより阻害されることから, 二重鎖 DNA 上を移動してきた RecFR との相互作用の結果 RecOR となった複合体は RecA のフィラメント形成を助けて相同対合に進み, そうでない RecO は上述のアニーリングを行える状態で待機していると考えればこれらタンパク質による機能発現機構をうまく説明できる。

RecO と BRCA2 は OB (oligonucleotide binding) フォールドといわれる構造ドメインをもつ (図 6)。OB フォールドは単鎖 DNA 結合タンパク質に広く保存されており, メデイエーターはこのドメインを利用して単鎖 DNA 結合タンパク質から単鎖 DNA を奪うことが予測される。Rad52 は N 末端領域の構造は決定されているがこの部位には OB フォールドは確認されていない。Rad52 は C 末端領域で

RPA や Rad51 と相互作用することが知られている^{52,53)} ので, まだその構造が明らかにされていない C 末端領域に OB フォールドが存在するのかもしれない。

6. おわりに

高分解能の立体分子構造を基礎にした遺伝的組換えについての理解は進んだとはいえ, まだ入り口である。誌面の関係で, 相同組換えの要の反応である相同 DNA 対合に焦点を絞って紹介した。タンパク質の立体分子構造に基づく機能理解は, 普遍的組換えともいわれる相同組換えよりも, 部位特異的組換えや転移という特殊な組換えの方がより進んでいる。これらの組換えが特別な DNA 配列部位で起こるためかえて研究し易い。減数分裂期の調節された相同組換え開始の DNA 二重鎖切断での Spo11 タンパク質の分子機能は仮説をでていないが, その前に働くクロマチン再編成は研究が進んでいる。しかし, この話題は転写制御と基本的には共通なので, 関連の記事を参照してほしい。DNA 切断活性と DNA ヘリカーゼ活性を併せもつ複合タンパク質であるバクテリアの RecBCD についても結晶構造が解かれているが触れることができなかった。相同組換えを任意に制御できれば, 遺伝子交換というより安全な遺伝子治療や, 安全性が確認されている伝統的な交配育種の 10 倍以上の加速による環境変動下での食糧生産確保など, 技術の種としても期待が大きい。分子構造からの理

解はその基礎であり、研究フロンティアとして、より多くの研究者の参入が要望される。

文 献

- 1) Holliday, R. (1964) *Genetic Res., Camb.*, **5**, 282-304.
- 2) Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., & Stahl, F.W. (1983) *Cell*, **33**, 25-35.
- 3) Allers, T. & Lichten, M. (2001) *Cell*, **106**, 47-57.
- 4) Shibata, T., DasGupta, C., Cunningham, R.P., & Radding, C. M. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1638-1642.
- 5) McEntee, K., Weinstock, G.M., & Lehman, I.R. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2615-2619.
- 6) Cox, M.M. & Lehman, I.R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6018-6022.
- 7) Kahn, R., Cunningham, R.P., DasGupta, C., & Radding, C.M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4786-4790.
- 8) Shibata, T., Ohtani, T., Iwabuchi, M., & Ando, T. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 13981-13986.
- 9) Shigemori, Y., Mikawa, T., Shibata, T., & Oishi, M. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, e126.
- 10) Shinohara, A., Ogawa, H., & Ogawa, T. (1992) *Cell*, **69**, 457-470.
- 11) Bishop, D.K., Park, D., Xu, L.Z., & Kleckner, N. (1992) *Cell*, **69**, 439-456.
- 12) Sawaya, M.R., Guo, S., Tabor, S., Richardson, C.C., & Ellenberger, T. (1999) *Cell*, **99**, 167-177.
- 13) Malkova, A., Ivanov, E.L., & Haber, J.E. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7131-7136.
- 14) Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ishitani, R., Fukai, S., Nureki, O., Shibata, T., & Yokoyama, S. (2002) *Mol. Cell*, **10**, 359-371.
- 15) Ling, F. & Shibata, T. (2002) *EMBO J.*, **21**, 4730-4740.
- 16) Rybalchenko, N., Golub, E.I., Bi, B., & Radding, C.M. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17056-17060.
- 17) Ling, F. & Shibata, T. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 310-322.
- 18) Story, R.M., Weber, I., & Steitz, T.A. (1992) *Nature*, **355**, 318-325.
- 19) Singleton, M.R., Wentzell, L.M., Liu, Y., West, S.C., & Wigley, D.B. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13492-13497.
- 20) Kinebuchi, T., Kagawa, W., Enomoto, R., Tanaka, K., Miyagawa, K., Shibata, T., Kurumizaka, H., & Yokoyama, S. (2004) *Mol. Cell*, **14**, 363-374.
- 21) Wu, Y., He, Y., Moya, I.A., Qian, X., & Luo, Y. (2004) *Mol. Cell*, **15**, 423-435.
- 22) Conway, A.B., Lynch, T.W., Zhang, Y., Fortin, G.S., Fung, C. W., Symington, L.S., & Rice, P.A. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 791-796.
- 23) Wu, Y., Qian, X., He, Y., Moya, I.A., & Luo, Y. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 722-728.
- 24) Chen, L.T., Ko, T.P., Chang, Y.C., Lin, K.A., Chang, C.S., Wang, A.H., & Wang, T.F. (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, 1787-1801.
- 25) Pellegrini, L., Yu, D.S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T.L., & Venkitaraman, A.R. (2002) *Nature*, **420**, 287-293.
- 26) Shin, D.S., Pellegrini, L., Daniels, D.S., Yelent, B., Craig, L., Bates, D., Yu, D.S., Shivji, M.K., Hitomi, C., Arvai, A.S., Volkmann, N., Tsuruta, H., Blundell, T.L., Venkitaraman, A. R., & Tainer, J.A. (2003) *EMBO J.*, **22**, 4566-4576.
- 27) Aihara, H., Ito, Y., Kurumizaka, H., Terada, T., Yokoyama, S., & Shibata, T. (1997) *J. Mol. Biol.*, **274**, 213-221.
- 28) Aihara, H., Ito, Y., Kurumizaka, H., Yokoyama, S., & Shibata, T. (1999) *J. Mol. Biol.* **290**, 495-504.
- 29) Kurumizaka, H., Aihara, H., Ikawa, S., Kashima, T., Bazemore, L.R., Kawasaki, K., Sarai, A., Radding, C.M., & Shibata, T. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 33515-33524.
- 30) Nishinaka, T., Ito, Y., Yokoyama, S., & Shibata, T. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6623-6628.
- 31) Nishinaka, T., Shinohara, A., Ito, Y., Yokoyama, S., & Shibata, T. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11071-11076.
- 32) Dagneaux, G., Porumb, H., Liquier, J., Takahashi, M., & Tailandier, E. (1995) *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **13**, 465-470.
- 33) Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ikawa, S., Yokoyama, S., & Shibata, T. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 35201-35208.
- 34) Kurumizaka, H., Ikawa, S., Nakada, M., Eda, K., Kagawa, W., Takata, M., Takeda, S., Yokoyama, S., & Shibata, T. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5538-5543.
- 35) Beernink, H.T., & Morrical, S.W. (1999) *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 385-389.
- 36) Yang, H., Jeffrey, P.D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N.H., Zheng, N., Chen, P.L., Lee, W.H., & Pavletich, N.P. (2002) *Science*, **297**, 1837-1848.
- 37) Umez, K. & Kolodner, R.D. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 30005-30013.
- 38) Sigurdsson, S., Van Komen, S., Bussen, W., Schild, D., Albala, J.S., & Sung, P. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 3308-3318.
- 39) Gasior, S.L., Olivares, H., Ear, U., Hari, D.M., Weichselbaum, R., & Bishop, D.K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8411-8418.
- 40) Honda, M., Inoue, J., Yoshimasu, M., Ito, Y., Shibata, T., & Mikawa, T. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 18549-18559.
- 41) Lee, B.I., Kim, K.H., Park, S.J., Eom, S.H., Song, H.K., & Suh, S.W. (2004) *EMBO J.*, **23**, 2029-2038.
- 42) Webb, B.L., Cox, M.M., & Inman, R.B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 31397-31404.
- 43) Koroleva, O., Makharashvili, N., Courcelle, C.T., Courcelle, J., & Korolev, S. (2007) *EMBO J.*, **26**, 867-877.
- 44) Inoue, J., Honda, M., Ikawa, S., Shibata, T., & Mikawa, T. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, 94-109.
- 45) Timmins, J., Leiros, I., & McSweeney, S. (2007) *EMBO J.*, **26**, 3260-3271.
- 46) Krejci, L., Song, B., Bussen, W., Rothstein, R., Mortensen, U. H., & Sung, P. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 40132-40141.
- 47) Davies, O.R. & Pellegrini, L. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 475-483.
- 48) Luisi-DeLuca, C. (1995) *J. Bacteriol.*, **177**, 566-572.
- 49) Mazloum, N., Zhou, Q., & Holloman, W.K. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 524-529.
- 50) Sugiyama, T., Kantake, N., Wu, Y., & Kowalczykowski, S.C. (2006) *EMBO J.*, **25**, 5539-5548.
- 51) Petalcorin, M.I., Sandall, J., Wigley, D.B., & Boulton, S.J. (2006) *J. Mol. Biol.*, **361**, 231-242.
- 52) Park, M.S., Ludwig, D.L., Stigger, E., & Lee, S.H. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 18996-19000.
- 53) Shen, Z., Cloud, K.G., Chen, D.J., & Park, M.S. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 148-152.
- 54) Chen, Z., Yang, H., & Pavletich, N.P. (2008) *Nature*, **453**, 489-494.