

令和元年6月7日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07202

研究課題名(和文) DNA相同組換え修復におけるコヒーシンの分子機能の解析

研究課題名(英文) Analysis on the molecular function of a cohesin-like protein in homologous recombination repair

研究代表者

毛谷村 賢司 (Keyamura, Kenji)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：70464386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生物の遺伝情報を担うゲノムDNAの切断は、細胞死や突然変異を誘発する重篤なDNA損傷である。一方、生物は、この損傷を正確に修復するDNA相同組換え機構を備えている。この機構において、ゲノムDNAの構造維持に関わるSMCファミリータンパク質が重要な役割を果たしていることが明らかになっているが、その分子メカニズムはほとんど不明である。そこで本研究では、相同組換えに関与し、かつSMCファミリーに属する大腸菌のRecNタンパク質の生化学的な機能解析を行った。結果として、RecNがコヒーシンと類似したDNA分子間を近接させる活性を有し、相同組換えの初期反応過程を促進する機能をもつことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸菌のRecNは、ゲノムDNA切断時の相同組換え修復に関わるRecファミリーの中で、唯一機能が未解明であったタンパク質である。本研究課題において、代表者は、RecNタンパク質を精製、解析することによって、その分子機能を明らかにした。真核生物のSMCファミリータンパク質の中には相同組換え修復に関わるものが報告されているものの、その分子メカニズムは不明である。そのため、本研究成果は、大腸菌の相同組換え修復の分子機構の解明に貢献するだけでなく、真核生物の相同組換え修復に関与するSMCタンパク質の分子機能の基盤を築くことができ、がん化や遺伝子疾患などの発生機構の理解につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：DNA double-strand breaks (DSBs) are a major threat to genome stability and cell survival, and if left unrepaired or repaired inappropriately, can lead to genomic mutations or cell death. Homologous recombination (HR) is highly conserved in all organisms and plays a critical role in DSB repair. SMC (structural maintenance of chromosomes) family proteins, including cohesin and the SMC5-6 complex in eukaryotes, play a crucial role in HR, however those molecular mechanisms remain unknown. In this research subject, An Escherichia coli RecN protein, which is the SMC family and related to HR repair of DSBs, was analyzed using a biochemical technique for understanding its molecular function. As a result, this study demonstrates that RecN has a cohesin-like activity that links between DNA molecules and promotes an initial process in HR.

研究分野：DNA修復、生化学、分子生物学

キーワード：DNA切断修復 相同組換え SMCファミリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物の遺伝情報を担うゲノム DNA は、内的、外的要因によって常に損傷を受けている。これらの DNA 損傷によって引き起こされる DNA の二本鎖切断は、DNA 相同組換え経路によって誤りなく修復されることでゲノムの安定性は維持されている。一方で、この経路の破綻は突然変異や細胞死を引き起こすため、ヒトにおいては細胞のがん化や老化と密接に関係している。DNA 相同組換えの基本的な反応は、原核生物から真核生物まで高度に保存されている。相同組換え研究の進んでいる大腸菌では、DNA の切断が生じると、先ず DNA 切断末端からの削り込みにより一本鎖 DNA が生成される。この一本鎖 DNA 上にリコンビナーゼタンパク質 RecA (真核生物の Rad51 ホモログ) がフィラメント状に結合し、相同鎖探索と DNA 鎖交換反応を行う。その後、相同配列を鋳型にした DNA 合成と組換え中間体の解消を経て、修復が完了する。recN 遺伝子は、RecA の一本鎖 DNA 結合による活性化に伴って発現誘導される遺伝子 (SOS 応答遺伝子) の一つで、SMC (structural maintenance of chromosomes) ファミリーに属する ATP 結合 / ATP 加水分解性タンパク質をコードしている。SMC ファミリー群は、生物種間を問わず存在し、一般的にはコヒーシンやコンデンシンといった染色体構造の維持や制御に重要な役割を果たしている。研究代表者等によるこれまでの解析から、RecN は DNA 二本鎖切断修復において特異的に機能することが明らかになっている。また、緑色蛍光タンパク質融合型 RecN (GFP-RecN) の局在解析等から、RecN は RecA との相互作用を介して DNA 損傷部位に集合し、DNA 構造を安定化することで相同組換え反応を促進していることが示唆されている。また、DNA 上からの解離には、RecN の ATP 結合あるいは ATP 加水分解が重要であることも見出されている。さらに、真核生物においても DNA 二本鎖切断時にコヒーシンが損傷部位にリクルートされることが報告されており、生物種間で普遍的な分子メカニズムの存在が考えられる。しかしながら、相同組換えとコヒーシンを介した DNA 構造制御は密接に関わることが示唆されるものの、その詳細な分子メカニズムはよくわかっていない。

2. 研究の目的

染色体 DNA 構造の維持や制御が相同組換え反応を促進する分子メカニズムを理解するには、RecN の分子機能を解明する必要がある。そのためには、精製した RecN タンパク質の生化学的な機能解析が必要不可欠である。しかしながら、大腸菌の RecN タンパク質は非常に凝集しやすい性質のため、これまで解析レベルの精製が困難であると報告されていた。研究代表者は、先行研究として、この問題を克服し、ヒスチジntag融合型の RecN タンパク質 (His-RecN) を高純度かつ高濃度で精製可能な方法を確認している。そこで、精製 RecN タンパク質の機能解析等を通じて、DNA 二本鎖切断時に RecN が染色体 DNA 構造をどのように制御し、また、どのように DNA 相同組換えに貢献しているのかについての分子メカニズムの解明や生理学的意義の理解をめざす。

3. 研究の方法

(1) RecN の性状解析

SMC タンパク質は、一般的に多量体 (二量体以上) を形成することが知られている。そこで、精製したヒスチジntag融合型 RecN タンパク質 (His-RecN) が、多量体形成能を有するか解析する。

(2) RecN と RecA の相互作用解析

これまでの解析から、RecN の DNA 損傷部位への集合には RecA との相互作用が必要であることが示唆されている。そこで、His-RecN を用いて、RecA との物理的な相互作用を検討する。

(3) RecN と DNA との相互作用解析

様々な DNA 構造に対する RecN タンパク質の結合能を解析する。また、結合が検出された場合には、様々な種類のヌクレオチド (ATP や ADP、非加水分解性 ATP アナログなど) の存在下での RecN の DNA 結合に対する影響についても解析する。

(4) RecN の ATP 加水分解活性測定

種々の条件下での RecN の ATP 加水分解活性を測定することで、RecN の ATP 加水分解活性の生理的な意義を見出す。

(5) RecN の相同組換え反応に及ぼす影響

相同組換え反応の試験管内再構成系を用いて、RecN 存在下における影響について解析する。

(6) RecN の機能欠損変異体の単離と解析

ランダム変異導入法を用いて、DNA 損傷剤に対して感受性を示す RecN 機能欠損変異株を多数単離する。単離した変異株について、シーケンス解析により変異部位のマッピングを行い、RecN の機能に重要なアミノ酸残基やモチーフを見出す。また、タンパク質発現の安定性や GFP 融合型変異体の細胞内局在変化について解析する。

4. 研究成果

(1) RecN の性状解析

RecN の多量体形成能について解析するため、精製した His-RecN タンパク質を用いて非変性ゲル電気泳動を行った。その結果、RecN は多量体を形成しうることがわかった。また、架橋剤で処理した RecN を解析した結果、RecN は 2~4 量体の安定したホモ多量体を形成できることが明らかになった。

(2) RecN と RecA の相互作用解析

His-RecN を用いて RecA との結合能をプルダウン法によって解析した結果、RecN と RecA は直接結合することがわかった。

(3) RecN と DNA との相互作用解析

ゲルシフト法を用いて、RecN の DNA 結合活性を解析した。基質となる DNA としては、環状二本鎖 DNA、直鎖状二本鎖 DNA、環状一本鎖 DNA をそれぞれ用いた。解析の結果、RecN は環状 DNA に結合する一方で、直鎖状二本鎖 DNA にはほとんど結合しないことがわかった。また、環状 DNA どうしを比較したとき、RecN は環状一本鎖 DNA により強く結合することがわかった。

次に、RecN に融合したヒスチジンタグを利用してプルダウン法により DNA 結合活性を解析した。その結果、ゲルシフト法の結果と一致して、RecN は環状一本鎖 DNA に最も強く結合することがわかった。これらのことから、RecN は二本鎖 DNA よりも一本鎖 DNA により優先的に結合することが示唆された。また、RecN の環状 DNA との結合能は、高塩濃度処理に対して耐性を示した一方で、直鎖状二本鎖 DNA との結合能は、高い感受性を示した。これらの結果から、RecN はリング様構造を形成し、その分子内に DNA を通すような結合様式（以下、トポロジカルな結合と呼ぶ）をとりうることを示唆された。

実際にトポロジカルな結合能を有するか検討するため、環状 DNA と RecN の複合体を単離した後、回収された環状 DNA を制限酵素で切断し、直鎖状 DNA に変換した。その結果、RecN に結合していた DNA が RecN から外れることが確認できた。このことから、RecN はトポロジカルな DNA 結合活性を持っており、DNA 上をスライディングしながら移動できることが示唆された。

RecN の DNA 結合活性におけるヌクレオチドの影響についてプルダウン法を用いて解析を行った。その結果、RecN の二本鎖 DNA への結合は、ATP や非加水分解性 ATP アナログの存在下において促進することがわかった。一方、一本鎖 DNA との結合については、ヌクレオチド依存性はほとんど見られなかった。これらの結果から、RecN の DNA 結合様式は、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA とで異なることが示唆された。

RecN の詳細な DNA 結合様式を検討するため、DNA 結合ビーズを用いたプルダウン法により解析を行った。その結果、RecN は、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の二つの異なる DNA 分子と同時に結合できることがわかった。また、RecN と一本鎖 DNA との複合体を単離した後、さらに二本鎖 DNA を加え反応させた結果、一本鎖 DNA に結合した RecN に依存して二本鎖 DNA が回収されることがわかった。さらに、回収された二本鎖 DNA は、一本鎖 DNA 上の RecN とトポロジカルに結合していることも確認できた。これらの結果より、一本鎖 DNA に結合した RecN は、さらに二本鎖 DNA を自身の分子内に取り込むことで、二つの DNA 分子間を近接させる効果を持つことが示唆された。一方で、RecN は二本鎖 DNA 同士を分子内に取り込む活性は非常に低いことがわかった。

(4) RecN の ATP 加水分解活性測定

RecN の ATP 加水分解活性について放射性 ATP を用いて測定した。その結果、RecN は ATP の加水分解活性を有するものの、その活性は非常に弱いことがわかった。また、DNA 存在下においてもその活性にほとんど変化を示さなかった。このことから、RecN の ATP 加水分解活性は、RecN の DNA 結合活性にほとんど影響しないことが示唆された。

(5) RecN の相同組換え反応に及ぼす影響

相同組換えの初期反応である相同鎖配列同士の対合に RecN が影響を及ぼすかどうか、D-loop 反応系を用いて解析を行った。その結果、RecN は RecA 依存に起こる D-loop 形成を促進することがわかった。このことより、RecN は、RecA による相同鎖対合を促進することが示唆された。

次に、相同組換え反応過程における DNA 鎖交換段階に RecN が影響を及ぼすか検討した。その結果、RecN は、RecA に依存した DNA 鎖交換反応を促進することがわかった。

以上の結果より、RecN は相同組換え反応に必要な相同な一本鎖 DNA と二本鎖 DNA をトポロジカルな結合を介して互いに近接させることで、RecA による相同組換えの初期反応を促進していることが示唆された。

(6) RecN の機能欠損変異体の単離と解析

ランダム変異導入法を用いて RecN の機能欠損変異体のスクリーニングを行った。その結果、DNA 損傷剤に対して高感受性を示す変異体を多数単離することができた。さらに、シーケンス解析を行った結果、2 アミノ酸以下の置換変異をもつ変異体が複数見出された。それらの変異体について、タンパク質発現量を解析した結果、いくつかの変異体については、発現量が低下

していた。そのため、これらの変異部位は、RecN タンパク質の構造安定性に関与していることが示唆された。また、その他の変異体について、GFP を融合させ、DNA 損傷時における変異タンパク質の細胞内動態を解析した結果、野生型と異なり染色体上に集積しないものが存在した。また、染色体上からの RecN の消失速度が、野生型よりも著しく低下しているものも存在していた。これらの結果より、DNA との結合能が低下した変異体や相同組換え反応の進行が遅延している変異体が得られたと考えられた。

(7)今後の展望

大腸菌の RecN が RecA と直接結合することや ATP 加水分解活性を有することが本研究課題により示すことができたものの、その機能的な役割については明らかにすることができていない。また、複数の表現型を示す変異体を単離できたものの、それらの変異体の機能と構造の相関性についても明らかにできていない。そのため、今後は、RecN の RecA との結合活性や ATP 加水分解活性の相同組換え反応における機能的、制御的な意義を解明する必要がある。また、単離した変異体については、それらのタンパク質精製を行い、生化学的な解析を行うことで、変異部位の機能を明らかにすることが重要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者および研究協力者には下線を付す。)

[雑誌論文](計2件)

著者名: Hayashi, M., Keyamura, K., and Hishida, T.

論文標題: Cyclin-dependent kinase modulates budding yeast Rad5 stability during cell cycle.

雑誌名: PLoS One

査読: 有り

巻: 13 (9)

発行年: 2018

ページ: e0204680

DOI: 10.1371/journal.pone.0204680

著者名: Keyamura, K., Arai, K., and Hishida, T.

論文標題: Srs2 and Mus81-Mms4 prevent accumulation of toxic inter-homolog recombination intermediates.

雑誌名: PLoS Genetics

査読: 有り

巻: 12 (7)

発行年: 2016

ページ: e1006136

DOI: 10.1371/journal.pgen.1006136

[学会発表](計20件)

発表者名: 桶谷 浩之、毛谷村 賢司、菱田 卓

発表標題: DNA 二本鎖切断修復に関与する大腸菌 RecN の変異体解析

学会等名: 第41回日本分子生物学会年会

発表年月日: 2018年11月28-30日

発表者名: Hayashi, M., Keyamura, K., and Hishida, T.

発表標題: Phosphorylation of Rad5 regulates Rad5 stability during cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*.

学会等名: 3R & 3C Symposium

発表年月日: 2018年11月12-16日

発表者名: 林 匡史、毛谷村 賢司、吉田 麻美、菱田 卓

発表標題: DNA 損傷ストレス応答におけるクロマチン構造の影響とその解析

学会等名: 第90回日本遺伝学会

発表年月日: 2018年9月19-22日

発表者名: 田中 紫苑、毛谷村 賢司、菱田 卓

発表標題: DNA 二本鎖切断修復に関与するアセチル基転移酵素の機能解析

学会等名: 第90回日本遺伝学会

発表年月日: 2018年9月19-22日

発表者名: 芝田 眞菜、毛谷村 賢司、塩入 拓馬、菱田 卓

発表標題: 慢性的低線量率紫外線環境下におけるNER欠損株の損傷ストレス耐性メカニズムの

解析

学会等名：第90回日本遺伝学会
発表年月日：2018年9月19-22日

発表者名：毛谷村 賢司、菱田 卓
発表標題：ゲノム DNA の切断修復に関する RecN の機能解析
学会等名：第15回21世紀大腸菌研究会
発表年月日：2018年5月24-25日

発表者名：菱田 卓、塩入 拓馬、芝田 眞菜、毛谷村 賢司
発表標題：倍数体化による紫外線ストレス耐性獲得の分子メカニズム
学会等名：2017年度生命科学系学会合同年次大会（第40回分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会）
発表年月日：2017年12月6-9日

発表者名：毛谷村 賢司、菱田 卓
発表標題：ゲノム DNA の切断修復に関する大腸菌由来 RecN の機能解析
学会等名：第24回DNA複製・組換え修復ワークショップ
発表年月日：2017年11月27-29日

発表者名：林 匡史、毛谷村 賢司、吉田 麻美、菱田 卓
発表標題：DNA 損傷ストレス応答を制御するヌクレオソーム機能の解析
学会等名：第24回DNA複製・組換え修復ワークショップ
発表年月日：2017年11月27-29日

発表者名：毛谷村 賢司、菱田 卓
発表標題：大腸菌の DNA 二本鎖切断修復に関する RecN の機能解析
学会等名：第89回日本遺伝学会
発表年月日：2017年9月13-16日

発表者名：林 匡史、毛谷村 賢司、吉田 麻美、菱田 卓
発表標題：ヒストン変異による DNA 損傷ストレス耐性への影響とそのメカニズムの解析
学会等名：第89回日本遺伝学会
発表年月日：2017年9月13-16日

発表者名：田中 紫苑、毛谷村 賢司、菱田 卓
発表標題：DNA 二本鎖切断修復に関するアセチル基転移酵素の機能解析
学会等名：第89回日本遺伝学会
発表年月日：2017年9月13-16日

発表者名：毛谷村 賢司、菱田 卓
発表標題：ゲノム DNA の切断修復に関する RecN タンパク質の機能解析
学会等名：第14回21世紀大腸菌研究会
発表年月日：2017年6月8-9日

発表者名：毛谷村 賢司、菱田 卓
発表標題：SMC ファミリータンパク質 RecN の二本鎖 DNA 切断修復における役割
学会等名：第39回日本分子生物学会年会
発表年月日：2016年11月30-12月2日

発表者名：林 匡史、毛谷村 賢司、菱田 卓
発表標題：出芽酵母 Rad5 におけるリン酸化修飾の解析
学会等名：第39回日本分子生物学会年会
発表年月日：2016年11月30-12月2日

発表者名：塩入 拓馬、毛谷村 賢司、菱田 卓
発表標題：Effect of chronic low-dose UV irradiation in nucleotide excision repair-deficient cells.
学会等名：第10回3Rシンポジウム
発表年月日：2016年11月13-17日

発表者名：塩入 拓馬、毛谷村 賢司、菱田 卓
発表標題：慢性的な紫外線ストレスに対する出芽酵母ヌクレオチド除去修復欠損株の耐性獲得

メカニズム

学会等名：第88回日本遺伝学会

発表年月日：2016年9月7-10日

発表者名：長谷川 ゆき、毛谷村 賢司、菱田 卓

発表標題：複製ストレス応答における出芽酵母 Mgs1 の役割

学会等名：第88回日本遺伝学会

発表年月日：2016年9月7-10日

発表者名：林 匡史、毛谷村 賢司、菱田 卓

発表標題：出芽酵母 DNA 損傷トランス経路関連タンパク質におけるリン酸化修飾の解析

学会等名：第88回日本遺伝学会

発表年月日：2016年9月7-10日

発表者名：毛谷村 賢司、菱田 卓

発表標題：二本鎖 DNA の切断修復に關与する SMC タンパク質 RecN の DNA 相互作用メカニズム

学会等名：第13回21世紀大腸菌研究会

発表年月日：2016年6月2-3日

〔その他〕

ホームページ等

学習院大学理学部生命科学科 分子生物学研究室ホームページ

<https://www.univ.gakushuin.ac.jp/sci/bio/laboratory/detail-hishida/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：菱田 卓

ローマ字氏名：(HISHIDA takashi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。