

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19370073

研究課題名 (和文) Rad52 の SUMO 修飾による組換え制御機構の解析

研究課題名 (英文) Regulation of homologous recombination through sumoylation of Rad52

研究代表者 関 政幸 (Seki Masayuki)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：19370073

研究成果の概要：

相同組換えの中心酵素 Rad52 は、複製チェックポイントの欠損株で誘導される通常は活性化しない複製開始点領域に蓄積後、SUMO 修飾を受けることを明らかにした。Rad52 の SUMO 化には、Rad52 のオリゴマー形成、核への移行などが事前に必要であり、Rad52 が機能する場にリクルートされて SUMO 化を受け、Rad51 の一本鎖 DNA へのリクルートを部分的に促進し、それとカップルして Rad52 の脱 SUMO 化が起こる制御機構を世界ではじめて提唱した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：Ubc9, SUMO, Rad52, Rad51, 複製チェックポイント、相同組換え

1. 研究開始当初の背景

ヒト早老症ウェルナー症候群の原因遺伝子産物 WRN が ユビキチン様の SUMO ペプチドによる修飾を受けることを世界ではじめて明らかにしていた。SUMO およびその修飾を触媒する Ubc9 が酵母からヒトまで高度に保存されていることに着目し、出芽酵母 Ubc9 の欠損株を解析することで、Ubc9 が DNA 傷害剤で誘導される相同組換え修復に必須であることを立証していた。

その後の海外のグループによる網羅的な研究により、SUMO 修飾の標的は出芽酵母から

約 300 個見いだされた。しかし、その 300 の候補の中に相同組換えに明確に関わると思われるものはほとんどなかった。そこで、Two-hybrid 法を用い、独自に相同組換え酵素の中から SUMO 化されそうなものを個別にスクリーニングし、Rad52 の SUMO 修飾を明らかにした。さらに、その修飾されるリジン残基の候補を 2 つ見つけていた。

我々とは独立に海外のグループにより、Rad52 が SUMO 修飾を受け、3 つのリジン残基が SUMO 修飾を受けると報告された。驚くべきことに、我々の同定したリジン残基と海外のグループが同定したリジン残基は全く

異なっていた。具体的には、Rad52 の 126 番目と 200 番目のリジンがアルギニンに置換した、*rad52-K126R*, *rad52-K200R* で SUMO 修飾が消失することを我々が見だし、海外のグループから Rad52 の 10, 12, 220 の 3 つのリジンを同時にアルギニンに置換した *rad52-3KR* 変異で SUMO 修飾が消失するとの報告がなされた。

両者の明らかな矛盾の解明は Rad52 の SUMO 修飾の意義を解明する絶好の機会であると考へ、本研究を開始した。

2. 研究の目的

以下の大きな 3 つの疑問に答えることを目指した。

- a) Rad52 のどのリジン残基が真に SUMO 修飾を受ける部位なのかの決定
- b) Rad52 が細胞内で SUMO 修飾を受ける状況の解明
- c) SUMO 化された Rad52 の細胞内での機能の変化の解明

3. 研究の方法

rad52-K126R, *rad52-K200R*, *rad52-3KR* 変異を同時に解析することで、その 3 者間での相違を見つけ出し、その相違が生じた原因を追求する方針を立てた。

4. 研究成果

主に以下の 5 つの成果をあげた。それぞれ順次説明する。

- (1) *rad52-K126R* 変異では Rad52 のオリゴマー形成が起こらない(論文 6)
rad52-K126R 変異株は DNA 傷害剤に高い感受性を示した。一方、*rad52-3KR* (*K10R, K12R, K220R*) 変異は SUMO 修飾を受けられないのに関わらず、DNA 傷害剤に感受性を示さなかった。このことは、SUMO 修飾自体は DNA 修復に必須なものではないこと、および両者の変異による Rad52 の SUMO 修飾の消失に本質的な違いがあることを示唆した。

Rad52 はオリゴマー形成し、リング状の構造をとることが知られている。126 番目のリジン残基 (K126) は Rad52 の DNA への結合およびオリゴマー形成に必要な領域に属していたことから、K126 が SUMO の直接の修飾部位というよりは、

K126R 変異により間接的に SUMO 修飾を受けられなくなったのではないかとの仮説を立てた。もし、そうならば K126 と同じ領域に属するリジン以外のアミノ酸に変異を入れた場合でも Rad52 の SUMO 修飾が消失する可能性がある。そこで、上の条件を満たすアミノ酸として 103 番目のアルギニンに着目し、それをアラニンに置換した *rad52-R103A* 変異を作製した。予想通り、*rad52-R103A* は *rad52-K126R* 変異と同様に DNA 傷害剤に高い感受性を示し、しかも SUMO 修飾されなくなった。

そこで、実際に Rad52-R103A および *-K126R* にオリゴマー形成不全が見いだされるか Two-hybrid 法を指標にアッセイしたところ、Rad52-3KR はオリゴマー形成が野生型 Rad52 と同様にされているのに対し、Rad52-R103A と *-K126R* ではそれが欠損していた。以上より、Rad52-K126R は Rad52 の機能不全により SUMO 修飾を受けられない状態にあることが推論された。

- (2) *rad52-3KR* 変異では DNA 傷害剤で誘導される相同染色体間の組換えが効率良く起こらない(論文 6)

rad52-3KR 変異では何が欠損しているのであろうか？ Rad52 が関わる、HO エンドヌクレアーゼで誘導される相同組換え、複製フォーク中で出現するホリデージャンクション様構造の形成などを調べたが、*rad52-3KR* 変異で顕著な欠損は観察できなかった。

そこで、我々が SUMO 修飾酵素 Ubc9 の欠損株で以前に報告していた DNA 傷害剤で誘導される相同染色体間の組換えを *rad52-3KR* 変異株で解析したところ、野生株に比べ相同組換えの誘導効率が半分に減じた。このことは Rad52 の SUMO 修飾は基本的に相同組換えに必須ではない。しかし、DNA 傷害剤で DNA が大きなダメージを受けた際には、SUMO 化された Rad52 のほうが細胞内でより効率よく機能できることを示唆した。

- (3) DNA 傷害剤の処理により Rad52 の SUMO 化は亢進する (論文 6)

内在性の Rad52 にタグを付加した細胞を構築し、様々な DNA 傷害剤で処理したところメチルメタンスルホン酸 (MMS) により Rad52 の SUMO 修飾が亢進することを見いだした。興味深いことに、Rad52 と相互作用とともに相同組換えに関わる Rad51 を細胞から欠損させると MMS に

より誘導される Rad52 の SUMO 修飾が異常なまでに亢進した。同様に相同組換えに関わる Rad54, Rad55, Rad59, Mre11, Sgs1, Srs2 を欠損させても、Rad51 の欠損と同様のことは起こらなかった。そこで、次に Rad51 の点変異により Rad54 のクロマチンへのリクルートには欠損があるが、変異 Rad51 自身のクロマチンへの結合が可能な細胞を構築し、解析した。その結果、SUMO 修飾の亢進が消失した。以上および 1) の結果を考慮すると、オリゴマーを形成した Rad52 はクロマチン上にリクルートされ SUMO 修飾を受ける。その修飾は Rad51 がクロマチン上にリクルートされることで脱 SUMO 修飾反応が開始し、Rad52 の SUMO 修飾は解消されるといったモデルを提出した。

(4) Rad52 の核への移行が SUMO 修飾の前提条件となる (論文 5)

Rad52-K200R は SUMO 修飾されないが、Rad52-K126R と異なり、オリゴマー形成は野生型 Rad52 と同様に正常だった。一方、海外のグループから K200 残基の付近に Rad52 の核移行シグナルが存在するとして報告がなされた。そこで、Rad52-K200R に核移行シグナルを付加したところ、SUMO 修飾されるようになった。すなわち、K200 は SUMO の直接の標的リジンではなく、その変異により Rad52 が核に移行できなくなることが主因であると結論した。1~4) より Rad52 は核に移行し、オリゴマー形成していなければクロマチン上にリクルートされず、SUMO 修飾されないというモデルを提出した。

(5) Rad52 は停止した複製フォーク上で SUMO 化される (論文 1)

複製チェックポイントの変異株を DNA 合成阻害剤で処理した際に、ゲノムワイドな手法で Rad52 が ectopic な DNA 複製開始点に蓄積する事象を初めて観測し、報告した。Rad52 は Rad51 がリクルートされると脱 SUMO 化を受ける可能性を考慮に入れると、異常な複製フォークに Rad52 が蓄積するが Rad51 が正常に染色体にリクルートされず、活性化状態の Rad52 が ectopic な相同組換えを介した染色体異常を引き起こす可能性を提案した。

ヒト遺伝病で複製チェックポイントの異常により癌が多発し、その癌細胞で染色体異常が観察される。従って、本研究で明らかにした Rad52 の SUMO 修飾機構は基礎研究のみならず、発がん機構の解明など

にも繋がる成果である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

- 1) Ohuchi, T., Seki, M., Kugou, K., Tada, S., Ohta, K., Enomoto, T. Accumulation of sumoylated Rad52 in checkpoint mutants perturbed in DNA replication. *DNA Repair* 8, 690-696, 2009. 査読有り
- 2) Takada, S., Inoue, E., Tano, K., Yoshii, H., Abe, T., Yoshimura, A., Akita, M., Tada, S., Watanabe, M., Seki, M., Enomoto, T. Generation and characterization of cells that can be conditionally depleted of mitochondrial SOD2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379(2):233-238, 2009. 査読有り
- 3) Tsuyama, T., Watanabe, S., Aoki, A., Cho, Y., Seki, M., Enomoto, T, Tada, S. Repression of nascent strand elongation by deregulated Cdt1 during DNA replication in Xenopus egg extracts. *Mol. Biol. Cell.* 20, 937-947, 2009. 査読有り
- 4) Nishino, K., Inoue, E., Takada, S., Abe, T., Akita, M., Yoshimura, A., Tada, S., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Seki, M., Enomoto, T. A novel role for Rad17 in homologous recombination. *Genes Genet. Syst.* 83, 427-431, 2008. 査読有り
- 5) Ohuchi, T., Seki, M., Enomoto, T. Nuclear localization of Rad52 is pre-requisite for its sumoylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 126-130, 2008. 査読有り
- 6) Ohuchi, T., Seki, M., Branzei, D., Maeda, D., Ui, A., Ogiwara, H., Tada, S., Enomoto, T. Rad52 sumoylation and its involvement in the efficient induction of homologous recombination. *DNA Repair* 7, 879-889, 2008. 査読有り
- 7) Otsuki, M., Seki, M., Inoue, E., Abe, T., Narita, Y., Yoshimura, A., Tada, S., Ishii, Y., Enomoto, T. Analyses of functional interaction between RECQL1, RECQL5, and BLM which physically interact with DNA topoisomerase III α . *Biochim. Biophys. Acta* 1782, 75-81, 2008. 査読有り
- 8) Hayashi, T., Seki, M., Inoue, E., Yoshimura, A., Kusa, Y., Tada, S., Enomoto, T. Vertebrate

- WRNIP1 and BLM are required for efficient maintenance of genome stability. *Genes Genet. Syst.* 83, 95-100, 2008. 査読有り
- 9) Seki, M., Otsuki, M., Ishii, Y., Tada, S., Enomoto, T. RecQ family helicases in genome stability: lessons from gene disruption studies in DT40 cells. *Cell Cycle* 7, 2472-2478, 2008. 査読なし
- 10) Otsuki, M., Seki, M., Inoue, E., Yoshimura, A., Kato, G., Yamanouchi, S., Kawabe, Y., Tada, S., Shinohara, A., Komura, J., Ono, T., Takeda, S., Ishii, Y., Enomoto, T. Functional interactions between BLM and XRCC3 in the cell. *J. Cell Biol.* 179, 53-63, 2007. 査読有り
- 11) Ogiwara, H., Ohuchi, T., Ui, A., Tada, S., Enomoto, T., Seki, M. Ctf18 is required for homologous recombination-mediated double-strand break repair *Nucleic Acids Res.* 35, 4989-5000, 2007. 査読有り
- 12) Lai, M.S., Seki, M., Ui, A., Enomoto, T. Rmi1, a member of the Sgs1-Top3 complex in budding yeast, contributes to sister chromatid cohesion *EMBO Rep.* 8, 685-690, 2007. 査読有り
- 13) Kumata Y, Tada S, Yamanada Y, Tsuyama T, Kobayashi T, Dong YP, Ikegami K, Murofushi H, Seki M, Enomoto T. Possible involvement of RecQL4 in the repair of double-strand DNA breaks in *Xenopus* egg extracts *Biochim. Biophys. Acta.* 1773, 556-564, 2007. 査読有り
- 14) Ui A, Seki M, Ogiwara H, Lai MS, Yamamoto K, Tada S, Enomoto T. Activation of a novel pathway involving Mms1 and Rad59 in sgs1 cells *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 1031-1037, 2007. 査読有り
- 15) Dong, Y.P., Seki, M., Yoshimura, A., Inoue, E., Furukawa, S., Tada, S., Enomoto, T. WRN functions in a RAD18-dependent damage avoidance pathway. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1080-1083, 2007. 査読有り
- 16) Tomizawa Y, Ui A, Onoda F, Ogiwara H, Tada S, Enomoto T, Seki, M. Rad50 is involved in MMS-induced recombination between homologous chromosomes in mitotic cells. *Genes Genet. Syst.* 82, 157-160, 2007. 査読有り
- 17) Ogiwara, H., Enomoto, T., Seki, M. The INO80 chromatin remodeling complex functions in sister chromatid cohesion. *Cell Cycle* 6, 1090-1095, 2007. 査読有り
- 18) Ogiwara, H., Ui, A., Kawashima, S., Kugou, K., Onoda, F., Iwahashi, H., Harata, M., Ohta, K., Enomoto, T., Seki, M. Actin-related protein Arp4 functions in kinetochore assembly. *Nucleic Acids Res.* 35, 3109-3117, 2007. 査読有り
- 19) Kawashima, S., Ogiwara, H., Tada, S., Harata, M., Wintersberger, U., Enomoto, T., Seki, M. The INO80 complex is required for damage-induced recombination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 835-841, 2007. 査読有り
- 20) Otsuki, M., Seki, M., Kawabe, Y., Inoue, E., Dong, Y.P., Abe, T., Kato, G., Yoshimura, A., Tada, S., Enomoto, T. WRN counteracts the NHEJ pathway upon camptothecin exposure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 477-482, 2007. 査読有り
- 21) Ogiwara, H., Ui, A., Lai, M.S., Enomoto, T., Seki, M. Chl1 and Ctf4 are required for damage-induced recombinations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 222-226, 2007. 査読有り
- 22) Ogiwara, H., Ui, A., Enomoto, T., Seki, M. Role of Elg1 protein in double strand break repair. *Nucleic Acids Res.* 35, 353-362, 2007. 査読有り
- [学会発表] (計 2 件)
- 1) Takashi Ohuchi, Masayuki Seki, Takemi Enomoto Requisite conditions for sumoylation of Rad52 and enhancement of the modification in checkpoint mutants、第31回日本分子生物学会年会(第81回日本生化学会大会)合同大会、平成20年12月12日、神戸ポートアイランド
- 2) 関政幸、Requirement of specific amino acids in Rad52 for sumoylation and recombination、第三回 Japan-US DNA Repair Meeting、平成19年5月9日、仙台 秋保 ホテル クレセント
- [図書] (計 1 件)
- 1) 関政幸/Mong Sing Lai/榎本武美、共立出版、蛋白質 核酸 酵素 「別冊；染色体サイクル」 Vol.54, 543-546 (2009)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 政幸 (Seki Masayuki)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：19370073

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし