

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16039

研究課題名(和文) 真核細胞型RecAファミリーリコンビナーゼによるヘテロ二重鎖形成の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of DNA strand exchange reaction driven by eukaryotic RecA family recombinases

研究代表者

伊藤 健太郎 (Ito, Kentaro)

東京工業大学・科学技術創成研究院・特任助教

研究者番号：60837128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：相同組換えは遺伝情報の維持に重要な生理機能で全ての生物種で保存されている。相同組換えは多段階の複雑な反応が組合わさって進行するが、その中でRecAファミリーリコンビナーゼによって触媒されるDNA鎖交換反応が中心的なステップである。しかし、リコンビナーゼによってどのように相同DNA配列が認識されてDNA鎖が交換されるかは不明であった。そこで、本研究では真核細胞型RecAファミリーリコンビナーゼであるRad51の変異体を多数作製して、DNA鎖交換反応をリアルタイムで解析し、この反応の分子メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

相同組換えの機能不全は発ガンや不妊の原因になり、近年ではゲノム編集の際にも重要な役割を果たしていると考えられている。特にRad51リコンビナーゼは乳ガンの原因遺伝子であるBRCA2と直接相互作用しており、ガンのマーカーや抗ガン剤の標的として注目されている。本研究によって明らかになったRad51リコンビナーゼによるDNA鎖交換反応の分子機構は、発ガンのメカニズムの理解に貢献することが期待される。また、この研究で新たに構築したリコンビナーゼの酵素活性をリアルタイムで定量的に解析する手法は抗ガン剤の評価にも有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Homologous recombination is a biological mechanism that is essential for the maintenance of genetic information and is conserved in all species. DNA strand exchange reaction catalyzed by RecA family recombinases is a central step of homologous recombination. However, it has been unclear how homologous DNA sequences are recognized and how DNA strands are exchanged by recombinases. In this study, to clarify the molecular mechanism of this reaction, we generated many mutants of Rad51, a eukaryotic RecA family recombinase, and analyzed DNA strand exchange reaction in real-time.

研究分野：生化学

キーワード：相同組換え Rad51 DNA鎖交換反応 RecAファミリーリコンビナーゼ

1. 研究開始当初の背景

相同組換えはゲノムの維持と遺伝的多様性の創出に必須な機構で、全ての生物種で保存された重要な生命機能である。DNA 鎖交換は相同組換えの中心的な反応であり、進化的に保存された RecA ファミリーリコンビナーゼによって触媒される。この反応の初期過程では、単鎖 DNA にリコンビナーゼが螺旋状に結合して presynaptic フィラメントが形成される。そして presynaptic フィラメントはドナーとなる二重鎖 DNA を相同性に関係無く無作為に捕捉して 3 本鎖 DNA 複合体を形成し、その複合体中で相同配列の検索を行い、相同配列が見つかりと鎖の交換を行う。リコンビナーゼが単鎖 DNA 上に presynaptic フィラメントを形成する過程については研究が進んでいたが、特にこの presynaptic フィラメントが二重鎖 DNA を捕捉して 3 本鎖 DNA 複合体を形成して以降の反応機構については、この複合体が不安定で解析が困難であるために不明であった。そこで我々は DNA を蛍光ラベルし蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理を利用して、分裂酵母 Rad51 による DNA 鎖交換反応をリアルタイムで観察する実験系を確立した。そして、Rad51 依存的 DNA 鎖交換反応は 2 つの中間体 (C1 と C2) を経て進行する 3 ステップからなることを発見し(図 1)、C1 中間体においては、取り込まれた二重鎖 DNA は、最初に形成された Rad51-単鎖 DNA フィラメント

(presynaptic フィラメント) 中の単鎖 DNA と整列しているだけであるが、C2 中間体においては、取り込まれた二重鎖 DNA の相補鎖は presynaptic フィラメント中の DNA と対合し(すなわち鎖を交換し) 新しくヘテロ二重鎖が形成されていることを実験的に明らかにした。

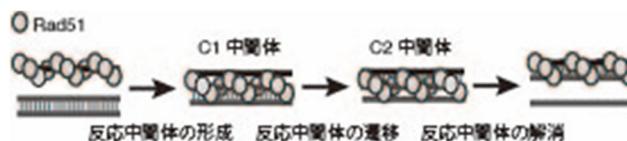


図 1. Rad51 による DNA 鎖交換反応は 3 段階で進行する

2. 研究の目的

本研究では、上記の DNA 鎖交換反応のリアルタイム解析から、特に C1 から C2 中間体への遷移の段階が、すなわち反応中間体の内部で DNA 鎖が交換されてヘテロ二重鎖が形成される過程が、この反応の本質であると考えてこの反応段階の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 構造生物学的アプローチによって Rad51 の DNA 鎖交換反応の活性部位を予測

現在までの構造生物学的解析から、RecA ファミリーリコンビナーゼは 2 つの DNA 結合部位 (Site 1 と Site 2) を持つことがわかっている。Site 1 は presynaptic フィラメントの軸に位置し 2 つのループ構造 (L1 と L2) によって構成されている。また、リコンビナーゼが単鎖または二重鎖とフィラメントを形成する際に、フィラメントの内部にある DNA はこれら 2 つのループ構造によって DNA 塩基のスタッキング相互作用を壊されて B 型 DNA が 1.5 倍引き伸ばされた構造をとることが知られている。そして、この DNA の伸長構造が相同配列の検索と DNA 鎖交換に重要だと予想されている。一方で、Site 2 にはフィラメント上で軸から少し離れたところに位置し、DNA のリン酸骨格との静電的相互作用を利用して相同性を必要としない無作為なドナー二重鎖 DNA の取り込みに重要な働きを果たすと考えられている。

そこで、DNA 鎖交換反応の活性中心となるアミノ酸残基を同定するために RecA の結晶構造解析を元に分子置換法で分裂酵母 Rad51 の構造を分子置換法によって再構成し、上記の DNA 結合部位 (Site 1 と Site 2) から候補となるアミノ酸残基をピックアップした。そして、それらの残基をそれぞれアラニンに置換した変異体 Rad51 を作製し、変異体 Rad51 タンパク質を精製した。

(2) DNA 鎖交換反応のリアルタイム解析

現在までに構築したオリゴ DNA を蛍光ラベルして DNA 鎖交換反応の際の中間体形成と最終産物の生成をそれぞれリアルタイムで観察し、得られた反応曲線を化学反応速度論的に解析する実験系を用いた(図 2)。

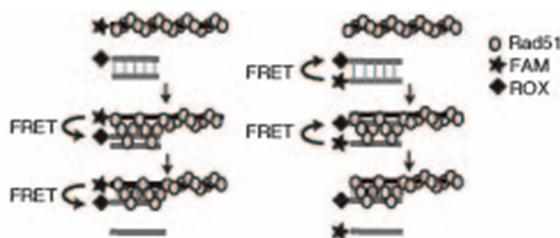


図 2. FRET を利用した 2 種類の DNA 鎖交換反応のアッセイ系

(3) Rad51-単鎖 DNA または二重鎖 DNA フィラメントの形成と解離をリアルタイムで解析

蛍光ラベルされたオリゴ単鎖・二重鎖 DNA を用意しリアルタイムで蛍光異性を測定することで Rad51 が DNA 上にフィラメントを形成・解離する過程をリアルタイムで観察した(図 3A)。

(4) Rad51-単鎖 DNA または二重鎖 DNA フィラメント中の DNA のコンフォメーション解析

ドナーとアクセプターの2種の蛍光基でラベルされたオリゴ単鎖・二重鎖 DNA 準備し、Rad51 と混合し Rad51-単鎖 DNA または Rad51-二重鎖 DNA フィラメントを形成させる。フィラメントを形成させると単鎖と二重鎖 DNA の両方とも Rad51 によって伸長されるので、Rad51 混合前と後でドナーとアクセプターの距離が変化する。そこで、ドナーとアクセプターの蛍光を測定して FRET 効率を計算することで、フィラメント中の DNA のコンフォメーションを解析した(図 3B)。

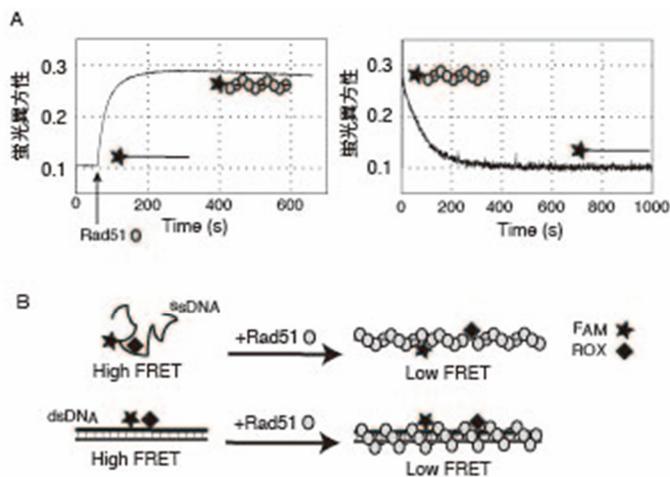


図 3. REFT による DNA-リコンビナーゼフィラメント構造解析と蛍光異方性による DNA-リコンビナーゼフィラメントの形成・解離のリアルタイム解析

A. 蛍光異方性を利用したフィラメント形成・解離のリアルタイム観察結果
B. 二重ラベルされた単鎖または二重鎖 DNA を用いたフィラメント構造解析模式図

4. 研究成果

(1)DNA 結合部位 Site の L2 ループがヘテロ二重鎖形成に重要である

Rad51 の L2 ループの変異体 (Rad51-V295A) を解析した結果、C1 から C2 中間体への遷移の段階で特異的に反応が進行しなくなることがわかった。また、この変異体では、単鎖と二重鎖 DNA に対して野生型と同等の結合活性を有し、フィラメント中で単鎖 DNA を引き伸ばすことができたが、一方で二重鎖 DNA の伸長が野生型に比べて著しく弱くなっていたことがわかった。これらのことから L2 ループ (Rad51-V295) が反応中でヘテロ二重鎖 DNA が形成される際、すなわち C1 から C2 中間体への遷移の際に、C2 中間体内部の DNA コンフォメーションを安定化しこの反応を促進していると考えられた。つまり、この DNA 結合部位が DNA 鎖交換反応の活性中心であると言える。

(2)DNA 結合部位 Site の L1 ループは DNA3 本鎖中間体形成に重要である

Rad51 の L2 ループの変異体 (Rad51-R257A) を解析した結果、この変異体では DNA 鎖交換反応の際に安定的に C1 中間体が形成できないことがわかった。さらにこの変異体では単鎖 DNA への結合と伸長活性は野生型と同等であったが、二重鎖 DNA に結合することができなかった。これらのことから L1 ループ (Rad51-R257) は DNA 鎖交換の際にドナー二重鎖 DNA を相同鎖検索のために Site 近傍で安定的に保持するために重要であると考えられた。

(3)DNA 結合部位 Site は DNA のエンリーゲートとして働く

Rad51 の Site の変異体 (Rad51-R324AK334A) を解析した結果、この変異体では C1 中間体は形成されるがその形成速度が野生型の約 200 倍程度遅くなっていた。さらにこの変異体では Rad51-DNA フィラメント形成速度が野生型に比べて著しく遅くなっていた。一方で興味深いことに一度フィラメントが形成されると、フィラメントの安定性やフィラメント中の DNA のコンフォメーションは野生型と遜色なかった。これらのことから、Site (Rad51-R324K334) は単鎖・二重鎖にかかわらず DNA が Rad51 に捕捉されて複合体を形成する際のエンリーゲートとして機能していると考えられた。

上記の(1)~(3)より、Rad51 による DNA 鎖交換反応においてそれぞれの DNA 結合部位が協調して相同 DNA 配列の検索と鎖の交換を行なっている分子機構を酵素学的に明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Argunhan Bilge, Sakakura Masayoshi, Afshar Negar, Kurihara Misato, Ito Kentaro, Maki Takahisa, Kanamaru Shuji, Murayama Yasuto, Tsubouchi Hideo, Takahashi Masayuki, Takahashi Hideo, Iwasaki Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Cooperative interactions facilitate stimulation of Rad51 by the Swi5-Sfr1 auxiliary factor complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.52566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito Kentaro, Murayama Yasuto, Kurokawa Yumiko, Kanamaru Shuji, Kokabu Yuichi, Maki Takahisa, Mikawa Tsutomu, Argunhan Bilge, Tsubouchi Hideo, Ikeguchi Mitsunori, Takahashi Masayuki, Iwasaki Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Real-time tracking reveals catalytic roles for the two DNA binding sites of Rad51	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16750-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zdravkovic Aleksandar, Daley James M., Dutta Arijit, Niwa Tatsuya, Murayama Yasuto, Kanamaru Shuji, Ito Kentaro, Maki Takahisa, Argunhan Bilge, Takahashi Masayuki, Tsubouchi Hideo, Sung Patrick, Iwasaki Hiroshi	4. 巻 118
2. 論文標題 A conserved Ctp1/CtIP C-terminal peptide stimulates Mre11 endonuclease activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2016287118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 健太郎
2. 発表標題 分裂酵母Rad51によるDNA三本鎖中間体からヘテロ二重鎖DNA形成機構の酵素学的解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	テキサス大学		