

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20870042  
研究課題名（和文）新奇相同組換え抑制システムの構造機能解析  
研究課題名（英文） Structural and functional analyses on a novel mechanism of homologous recombination suppression.  
研究代表者  
福井 健二（Fukui Kenji）  
独立行政法人理化学研究所・機能解析第2研究チーム・研究員  
研究者番号：00466038

研究成果の概要（和文）： MutS2 蛋白質は相同組換えを抑制する働きを持つが、抑制の反応機構は不明であった。そこで、高度好熱菌 MutS2 の構造機能解析を行った。MutS2 の C 末端ドメインの X 線結晶構造解析の結果、このドメインは DNA 切断酵素に特徴的な構造を持つことが分かった。また、生化学的解析により、MutS2 全長が相同組換えの初期中間体を好んで切断することを明らかにした。以上より、MutS2 は、初期中間体を解消することで相同組換えを抑制すると考えられる。

研究成果の概要（英文）： Recent studies revealed the existence of a novel anti-recombination enzyme, MutS2; however the mechanism by which MutS2 inhibits homologous recombination has been unknown. To elucidate the mechanism, we performed structural and functional analyses on *Thermus thermophilus* MutS2. X-ray crystallographic analysis on the C-terminal domain of MutS2 revealed that this domain resembles the structures of known endonucleases. Furthermore, biochemical experiments demonstrated that MutS2 preferentially incises the early intermediates in homologous recombination. These results indicate that MutS2 suppresses homologous recombination through a novel mechanism involving resolution of early intermediates.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,180,000 | 354,000 | 1,534,000 |
| 2009 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 2,180,000 | 654,000 | 2,834,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード： DNA、相同組換え抑制、X 線結晶構造解析、DNA 切断酵素

## 1. 研究開始当初の背景

多くの生物のゲノムが解読された現在、ゲノムにコードされている蛋白質の機能を明らかにすることが重要であるが、現段階では

機能が全く分からない蛋白質が数多く残されている。これらの蛋白質の機能を明らかにすることによって、生物に共通の重要な生命現象や、工業的・医学的に応用可能な機能の発見がもたらされる可能性がある。そのような機能未知蛋白質のひとつ、

MutS2 は MutS ファミリーと呼ばれる生物界に広く存在する蛋白質ファミリーに属する。MutS ファミリー蛋白質は特徴のある DNA 構造を認識する蛋白質群で、DNA 修復や組換えなど多様な生体反応に関与すると考えられている。近年、MutS2 が DNA 相同組換えの抑制に関わる可能性が報告された。過剰な相同組換えは、好ましくない遺伝情報の変化をもたらすため、生物は相同組換えを抑制する機構を備えていると予想される。しかし、MutS2 がどのような活性を持ち、どのような反応機構で相同組換えを抑制しているのかは知られていなかった。

## 2. 研究の目的

MutS2 がどのような反応機構で DNA 相同組換えを抑制するのかを、立体構造解析および生化学的解析により明らかにすることを目的とした。この目的のために、高度好熱菌由来 MutS2 を用いた。高度好熱菌由来蛋白質は、熱に安定で、立体構造解析やその他の物理化学的解析が容易であることが知られている。

## 3. 研究の方法

立体構造解析では、SPring-8 の放射光による X 線結晶構造解析を行い、特に MutS2 の触媒ドメインに注目して解析を行った。X 線結晶構造解析の結果から予想された機能を生化学的解析によって確認した。この実験においては、MutS2 の全長および各ドメインについて、DNA 結合能、DNA 切断活性を詳細に調べた。さらに、MutS2 の細胞内における役割を明らかにするために、マイクロアレイ解析を行った。

## 4. 研究成果

モデル生物として用いた高度好熱菌において *mutS2* 遺伝子を破壊すると、相同組換え効率の上昇が認められた。このことから、多くの生物と同様に、高度好熱菌内においても MutS2 は相同組換えを抑制する働きを持つ事が分かった。そこで、高度好熱菌 MutS2 の構造機能解析を行った。

まず、X 線結晶構造解析のために MutS2 の全長について結晶化を試みたが、結晶は得られなかった。そこで、MutS ファミリーの中でも MutS2 にしか見られない特徴的な C 末端ドメインに注目し、このドメインの結晶化を試みたところ、良質な結晶が得られ、SPring-8 放射光を用いた構造解析に成功した (図 1)。その結果、このドメインは、既知の DNase I や RNase E といった DNA/RNA 切断酵素 (エンドヌクレアーゼ) に特徴的な構造を持つことが判明した。

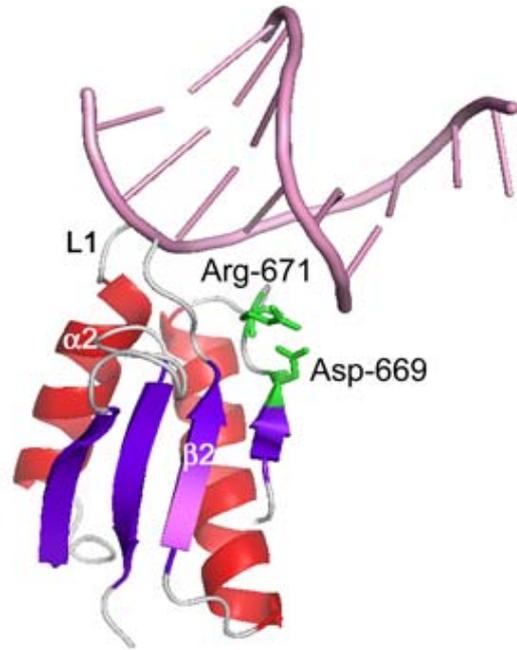


図 1: MutS の触媒ドメインの立体構造 (2 本鎖 DNA の結合様式は推測モデル)

また、生化学的解析により、MutS2 C 末端ドメインが実際に DNA 切断活性 (エンドヌクレアーゼ活性) を持つことが確かめられた。さらに、MutS2 の N 末端ドメインは相同組換えの初期中間体構造である、分岐 DNA 構造に対して強い親和性を示すこと、MutS2 全長はそれらの中間体構造の分岐部分を好んで切断することが分かった (図 2)。

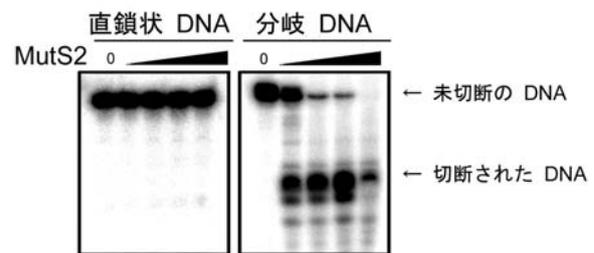


図 2: MutS2 による相同組換え中間体構造 (分岐 DNA 構造) の切断。MutS2 を通常の DNA である直鎖状 DNA または相同組換え反応の途中で生じる分岐した構造を持つ DNA と反応させた。MutS2 は、直鎖状 DNA をほとんど切断しなかったが、分岐 DNA を強く切断した。

これらの結果から、MutS2 は初期中間体構造を切断・解消するという直接的な方法で、相同組換えを抑制すると考えられる。これまでに、中間体構造をヘリカーゼ活性でほどく、という相同組換

え抑制機構は知られていたが、エンドヌクレアーゼ活性により中間体を切断するという直接的な抑制機構は初めての報告である。

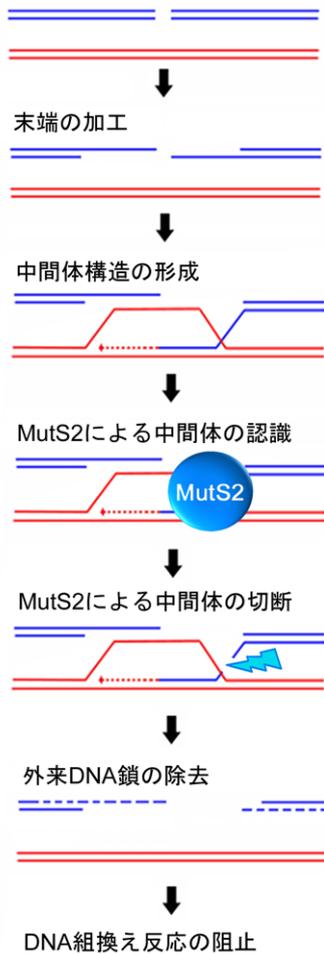


図 3: MutS2 による DNA 組換え反応の抑制モデル。DNA 組換え反応の開始により、青い DNA 鎖が赤い DNA 鎖にもぐり込み、分岐した DNA 構造が形成される。MutS2 は、分岐 DNA 構造に結合し、DNA 鎖を切断することで組換え反応の進行を阻害する。

さらに、MutS や MutL といったミスマッチ DNA 修復系酵素群が MutS2 の活性に影響を与えることを明らかにし、これらの酵素に関する構造機能解析を行い、新たな DNA 修復機構の存在の可能性を示した。

## 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 2 件)

①Atsuhiko Shimada, Ryoji Masui, Yoshio

Takahata, Kwang Kim, Seiki Kuramitsu, and Kenji Fukui, A novel single-stranded DNA-specific 3' -5' exonuclease, *Thermus thermophilus* exonuclease I, is involved in several DNA repair pathways. *Nucleic Acids Research*, in press, (2010) 査読有り

② Kenji Fukui, Noriko Nakagawa, Yoshiaki Kitamura, Yuya Nishida, Ryoji Masui, and Seiki Kuramitsu, Crystal structure of MutS2 endonuclease domain and the mechanism of homologous recombination suppression., *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 33417-33427. (2008) 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

①福井健二、飯野均、満足美穂、中川紀子、増井良治、倉光成紀、DNA ミスマッチ修復系初期反応における MutL エンドヌクレアーゼ活性の制御機構、第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)、2008 年 12 月 11 日 神戸ポートアイランド

②福井健二、飯野均、満足美穂、中川紀子、増井良治、倉光成紀、*Thermus thermophilus* HB8 の DNA ミスマッチ修復機構、理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第 7 回連携研究会、2008 年 9 月 14 日、SPRING-8 センター

③増井良治、福井健二、若松泰介、石川大仁、新海暁男、中川紀子、倉光成紀、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 の DNA 修復系および RNA 分解系、第 3 回日本ゲノム微生物学会年会、2009 年、3 月 6 日、中央大学後楽園キャンパス

④福井健二、飯野均、満足美穂、Kim Kwang、高畑良雄、井上由美子、中川紀子、増井良治、倉光成紀、*Thermus thermophilus* HB8 の DNA ミスマッチ修復システム：MutL エンドヌクレアーゼの機能解析、理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第 8 回連携研究会、2009 年、8 月 22 日、SPRING-8 センター

⑤島田敦広、福井健二、中川紀子、増井良治、倉光成紀、Functional differentiation of ssDNA-specific exonucleases in DNA repair pathways in *Thermus thermophilus*、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年、12 月 10 日、パシフィコ横浜

⑥Zhang Huiping、福井健二、渡部暁、原田拓志、藤倉由紀子、小原收、木川隆則、倉光成紀、林文晶、横山茂之、Structural Basis for Characterization of the DNA Binding Activity of

the SMR in Human Blc-3 Binding Protein  
(B3BP)、第 32 回日本分子生物学会年会、  
2009 年、12 月 11 日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 健二 (Fukui Kenji)

独立行政法人理化学研究所・機能解析第 2 研  
究チーム・研究員

研究者番号 : 00466038