

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770127

研究課題名(和文) RAD52の組換え活性の分子機構に関する研究

研究課題名(英文) Molecular Mechanisms of RAD52-Mediated Homologous Recombination

研究代表者

香川 亘 (KAGAWA WATARU)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：70415123

研究成果の概要(和文)：相同DNA組換えは、ゲノムの安定維持に重要である。その分子機構を明らかにするために、組換え反応を触媒するタンパク質RAD52と一本鎖DNAとの複合体の立体構造をX線結晶構造解析法により明らかにした。RAD52に結合した一本鎖DNAは、これまでに類のない右巻きのらせん構造を形成し、塩基が露出していることが分かった。この構造は、効率よく相同組換えを行うのに適していると考えられた。相同組換えの詳細な分子機構を説明する初めての構造である。

研究成果の概要(英文)：Homologous recombination is an important mechanism for genomic stability. To understand the underlying molecular mechanisms, three-dimensional structures of RAD52-single-stranded DNA complexes were solved by X-ray crystallography. The single-stranded DNA bound to RAD52 has a characteristic, right-handed helical structure, with bases exposed to the solvent. This structure appears suitable for the efficient search of homologous DNA sequences. The present structure provides the first clear view of how DNA homology search takes place.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：相同組換え、X線結晶構造解析、一本鎖DNA

1. 研究開始当初の背景

相同組換えは、DNAを正確に修復すると同時に減数分裂において遺伝子の多様性を生み出すという、生物にとって重要な働きを担う。

また相同組換えは、ゲノムの情報を正確に書き換えるツールとして、医療、食物の品種改良、遺伝子工学など、あらゆる分野での応用が期待されている。

しかし、組換え反応の詳細な分子機構は未だ未解明であり、これを明らかにするために必要である構造生物学的解析はごくわずかしら報告されていない。

相同組換えの分子機構を解明する上で、もっとも重要な酵素の一つが、RAD52 タンパク質である。これまでの申請者の研究によって、RAD52 が組換え反応を触媒する酵素であることが明らかになっている。

RAD52 は、生物界で広く保存されている RecA ファミリーの組換え酵素群と、アミノ酸の配列および立体構造がまったく異なることから、RAD52 をはじめとする新規の組換え酵素群の存在が考えられる。従って、RAD52 の分子機構の詳細な解析は、RecA ファミリーなど他の種類の組換え酵素と共通した、相同組換えの基本的な分子機構を明らかにすると同時に、RAD52 をはじめとする新規の組換え酵素群特有の機能と役割について重要な知見を与えることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、DNA 組換え反応の分子機構を解明することを目的とする。申請者は組換え反応を触媒する RAD52 に着目し、RAD52 がどのようなメカニズムで DNA 間の相同な領域を検索するのかを、RAD52・DNA 複合体の X 線結晶構造解析より明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

これまでの研究から、RAD52 はポリプリン配列 (polyA) より、ポリピリミジン配列 (polyT, polyC) に優先的に結合することが分かっていた。そして RAD52/polyC 複合体については、構造解析が可能な大きさの結晶が得られていた。しかし、この結晶は壊れやすく、結晶から得られる X 線回折情報が極めて少ないため、構造解析が困難であった。

本研究では、結晶構造解析に耐えうる良質な RAD52/一本鎖 DNA 複合体の結晶を調製するために、一本鎖 DNA の配列に再度着目した。polyC オリゴヌクレオチドで良質な複合体結晶が得られなかった理由として、複合体が不均一であることが考えられた。そこで、polyC 配列の中に、プリン残基を様々な位置に挿入した配列をデザインし、それぞれの配列を用

いて複合体の結晶化を行った。その結果、構造解析に耐えうる良質な結晶が得られる配列が見つかった。

この結晶について、SPring-8 放射光施設で X 線回折データを収集し、分子置換法によって構造を決定した。

4. 研究成果

(1) 主な成果

RAD52/一本鎖 DNA 複合体は、3.0Å 分解能で構造決定した (図 1)。

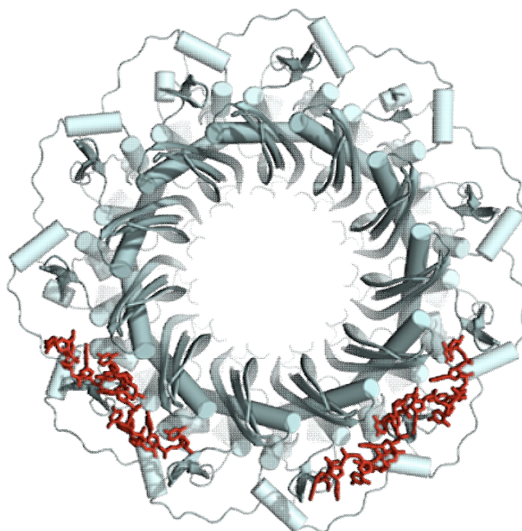


図 1 RAD52/一本鎖 DNA 複合体の結晶構造
一本鎖 DNA (赤) は RAD52 リング (シアン) の外側を巻き付く形で結合する。

一本鎖 DNA は DNA 結合部位と予測されていた RAD52 リングの外周に存在する塩基性の溝の中には結合せず、溝の入り口付近に結合することが分かった。この領域には、我々が以前アラニンスキャン変異導入法によって同定した DNA 結合に重要なアミノ酸残基 (Lys102 と Lys133) が存在する。従って、今回の結晶構造は、以前の生化学的解析結果と一致することが確認された。

一本鎖 DNA は、特徴的ならせん構造を形成し、塩基が周期的に溶媒にむき出しになっていることから、DNA の相同検索および対合反応に適した構造であることが考えられた (図 2)。今回の構造をもとに、RAD52 が触媒する一本鎖 DNA 同士のアニーリング反応の詳細なメカニズムを提案することができた。

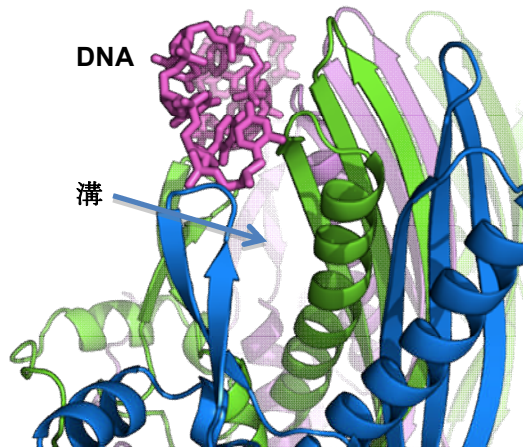


図2 RAD52 リングの溝の入り口付近に結合する一本鎖 DNA

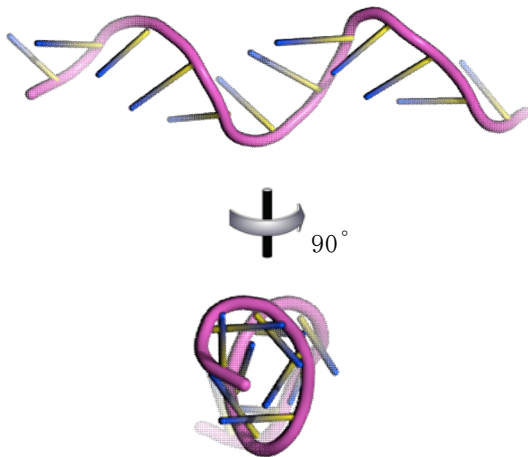


図3 RAD52 に結合した一本鎖 DNA の構造
右巻きのらせん構造を形成する。

(2) 国内外における位置づけとインパクト

今回明らかになった RAD52/一本鎖 DNA 複合体の構造は、相同組換えの詳細な分子機構を説明する初めての例である。詳細な分子機構が明らかになると、立体構造に立脚した RAD52 の組換え活性を制御する薬剤や変異体の設計が可能になる。相同組換えの異常は、がんや遺伝病の原因であり、また相同組換えはゲノムの情報を正確に書き換えるツールとして、医療、食物の品種改良、遺伝子工学など、あらゆる分野での応用が期待されている。従って、本研究成果は、これらの分野の研究に与えるインパクトが大きいことが考えられる。

(3) 今後の展望

現在、遺伝子などをターゲットした相同組換えの効率は低く、相同組換えを利用した遺伝子治療などは実用化に至っていない。今後の展望として、組換え反応の効率を高めるための RAD52 の人為的改良や、RAD52 と結合して、RAD52 の反応を促進する化合物のデザインなどが考えられる。

逆に、RAD52 の組換え活性を阻害する化合物のデザインも考えられる。近年、RAD52 はがん細胞特異的に機能することが示唆された。従って、RAD52 の活性を阻害する化合物は、抗がん剤として有用な可能性がある。

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7件)

- ① Horikoshi N, Tachiwana H, Saito K, Osakabe A, Sato M, Yamada M, Akashi S, Nishimura Y, Kagawa W, Kurumizaka H Structural and biochemical analyses of the human PAD4 variant encoded by a functional haplotype gene. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* (査読有) **67**, 112-118 (2011)
- ② 齋藤健吾, 香川亘, 胡桃坂仁志、発癌防御に重要な相同組換えの分子機構、*最新医学*、査読有、**65** 巻、76-88、(2010)
- ③ Tachiwana H, Kagawa W, Osakabe A, Kawaguchi K, Shiga T, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Kurumizaka H Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc Natl Acad Sci USA* (査読有) **107**, 10454-10459 (2010)
- ④ Saito K, Kagawa W, Suzuki T, Suzuki H, Yokoyama S, Saitoh H, Tashiro S, Dohmae N, Kurumizaka H The putative nuclear localization signal of the human RAD52 protein is a potential sumoylation site. *J Biochem* (査読有) **147**, 833-842 (2010)
- ⑤ Kujjo LL, Laine T, Pereira RJ, Kagawa W, Kurumizaka H, Yokoyama S, Perez GI Enhancing survival of mouse oocytes following chemotherapy or aging by targeting Bax and Rad51. *PLoS One* (査

- 読有) 5, e9204 (2010)
- ⑥ Kagawa W, Kurumizaka H Dynamics in the transmission of genetic information: from meiosis to postmeiotic events. *FEBS J* (査読有) **277**, 564 (2010)
 - ⑦ Kagawa W, Kurumizaka H From meiosis to postmeiotic events: Uncovering the molecular roles of the meiosis-specific recombinase Dmcl. *FEBS J* (査読有) **277**, 590-598 (2010)

〔学会発表〕(計7件)

- ① Kagawa W, Saito K, Sugiyama S, Onodera K, Kurumizaka H Roles of the N-terminal and C-terminal domains of the Rad52 protein in homologous recombinational repair. International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities 2011年1月 Awaji Island
- ② 香川亘、齋藤健吾、杉山修世、小野寺圭一、胡桃坂仁志 酵母とヒト DNA 修復タンパク質 Rad52 の機能ドメイン解析、BMB2010、2010年12月、神戸
- ③ 香川亘、齋藤健吾、杉山修世、胡桃坂仁志 Rad52 タンパク質の DNA positive supercoiling 活性の役割、第9回核ダイナミクス研究会、2010年5月、修善寺
- ④ Kagawa W Structural and biochemical studies of the human Rad52 protein and its implications for homologous recombination. The 6th NIRS International Open Laboratory Workshop 2010年3月 稲毛(千葉)
- ⑤ 香川亘、佐川智彦、仁木宏典、胡桃坂仁志、大腸菌染色体分配に関わる候補因子 MigP (YncE) の構造生物学的解析、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月、横浜
- ⑥ 香川亘、齋藤健吾、杉山修世、胡桃坂仁志、ヒトと酵母の DNA 修復タンパク質 Rad52 の機能比較、第20回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2009年11月、琵琶湖コンファレンスセンター
- ⑦ 香川亘、齋藤健吾、胡桃坂仁志、RAD52 の立体構造に基づく相同組換え反応機構の解析、第8回核ダイナミクス研究会、2009年5月、修善寺

6. 研究組織

(1) 研究代表者

香川 亘 (KAGAWA WATARU)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号: 70415123