

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870037

研究課題名（和文）新規RAD51相互作用因子EVLの相同組換え修復における機能の解析

研究課題名（英文）Functional analysis of a novel RAD51-binding protein, EVL in the homologous recombinational repair

研究代表者

高久 誉大 (TAKAKU MOTOKI)

早稲田大学・理工学術院・助手

研究者番号：30547071

研究成果の概要（和文）：EVL がヒトの I 型トポイソメラーゼである TOPOIII α と共に単鎖 DNA のカテネーション反応を引き起こすことが明らかになり、これらが協同して相同組換え修復で働くことが示唆された。また、EVL の C 末端側に存在する EVH2 ドメインが EVL の相同組換え修復における機能ドメインであることが示された。さらに、RAD51、RPA 及び TOPOIII α が末端のない DNA 基質間で組換え反応を起こすことが明らかになり、これらが相同組換えの初期過程において協同的に働き、組換え中間体の安定化を促すことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：EVL promotes ssDNA catenation in the presence of human TOPOIII α , which is a type I topoisomerase. Therefore EVL and TOPOIII α may function in the processing of DNA intermediates formed during homologous recombinational repair (HRR). C-terminal EVH2 domain of EVL is responsible for the recombination activity of EVL. RAD51, RPA and TOPOIII α promote recombination reaction between circular ssDNA and supercoiled dsDNA. It suggests that these proteins cooperatively function in the initial step of HRR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゲノム構築・機能・維持、タンパク質と酵素、核酸、遺伝子及び染色体

1. 研究開始当初の背景

放射線などによって DNA の二重鎖切断損傷が生じるが、この DNA の二重鎖切断損傷を修復する機構の一つとして相同組換え修復がある。ヒトの相同組換え修復において中心的に働く酵素が RAD51 である。RAD51 は、相同組み合せ修復における最も重要な相同 DNA 配列を検索及び対合反応の過程において働くと考えられている。しかしながら、

Rad51 の試験管内でのそれらの組換え活性は、大腸菌ホモログである RecA のそれと比較すると著しく弱いことから RAD51 には共同的に働く因子がいると考えている。申請者らはこれまでに、ヒト RAD51 の新規相互作用因子としてヒト EVL を同定し、EVL が RAD51 の二重鎖切断損傷部位へのローディングに関わり、RAD51 の組換え活性を促進することを細胞生物学的解析及び生化学的

解析から明らかにしている。

2. 研究の目的

相同組換えタンパク質 RAD51 の新規相互作用因子である EVL の相同組換え修復における機能を明らかにすることが、本研究の目的である。具体的には、

(1) 相同組換え修復に関わる RAD51、EVL 及び TOPOIII α によって末端のない基質間で組換え反応を起こすのかどうかを明らかにする。

(2) それと同時に EVL による RAD51 の組換え活性の活性化のメカニズムを解明することも目指す。

これらを明らかにすることで、真核生物における相同組換え修復に必須な相同鎖検索機構の反応メカニズムの解明につなげることが、本研究の当該分野における意義である。

3. 研究の方法

EVL の相同組換え修復機構における機能解析を行うために、リコンビナントタンパク質を用いた生化学的解析を行なう。具体的な計画を以下に記す。

(1) RAD51、EVL 及び TOPOIII α をリコンビナントタンパク質として精製する。

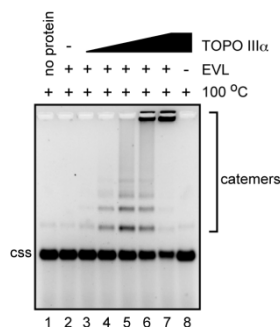
(2) 精製したタンパク質と環状単鎖 DNA 及び超らせん環状二重鎖 DNA を用いて、両 DNA の相同な領域で組換え反応が起こるかどうか（ヘミカテマーができるかどうか）を電気泳動、電子顕微鏡により解析する。

(3) TOPOIII α の有する活性への EVL の影響を調べる。さらに、TOPOIII α が RAD51 や EVL と相互作用するのかどうかも解析する。

(4) EVL 欠失変異体による解析から、EVL による RAD51 の組換え活性の活性化のメカニズムを考察する。

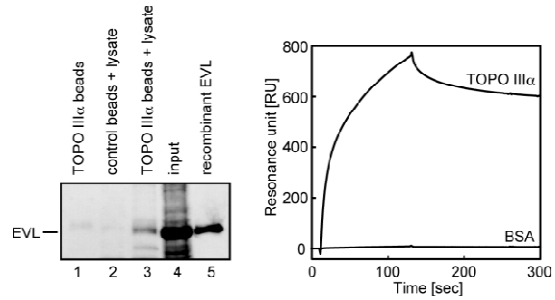
4. 研究成果

(1) EVL と TOPOIII α の機能的相互作用を調べた結果、EVL 及び TOPOIII α によって単鎖 DNA のカテネーションが起こることが明らかになった。



(2)

Biacore 及び Affi-Gel 樹脂を用いた相互作用解析から、EVL は TOPOIII α と直接結合することが明らかになった。



(3) さらに、TOPOIII α の有する超らせん環状二重鎖 DNA のリラクゼーション活性に、EVL が影響を及ぼさないことが示された。

(4) RAD51 及び TOPOIII α により環状単鎖 DNA と超らせん環状二重鎖 DNA の末端のない DNA 基質間で複合体（ヘミカテマー）が形成されることを明らかにした。

(5) 環状単鎖 DNA 及び超らせん環状二重鎖 DNA 混在下では、RPA により TOPOIII α の二重鎖 DNA リラクゼーション活性が促進されることも示された。

(6) RPA は相同組換えの初期過程において形成される単鎖 DNA に結合し、試験管内で RAD51 の鎖交換反応を促進することが明らかになっているが、この RPA 存在下では RAD51、及び TOPOIII α によるヘミカテマーの形成量が著しく増加することが示された。これらの解析から、RAD51、TOPOIII α 及び RPA が相同組換えの初期過程において協同的に働き、組換え中間体の安定化を促すことが示唆された。

(7) EVL 欠失変異体による解析から、EVL の 221~418 番目のアミノ酸領域が、RAD51 との結合や RAD51 の組換え活性の促進に重要であることが明らかになった。このことから EVL の C 末端領域に存在する EVH2 ドメインが、EVL の相同組換え修復における機能ドメインであることが示された。

(8) EVL のパラログである VASP 及び MENA についても生化学的解析を行い、RAD51 の組換え活性の促進活性などの EVL と同様の相同組換えに関わる活性を有することが明らかになった。このことから、EVL の相同組換えにおける機能を VASP 及び MENA が細胞内で補うことが示唆された。

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9件)

- ① Motoki Takaku, Hiroyuki Ueno, Hitoshi Kurumizaka
Biochemical analysis of the human Ena/Vasp- family proteins, MENA, VASP, and EVL, in homologous recombination
The Journal of Biochemistry, 2011 in press, 査読有
- ② Motoki Takaku, Takashi Kainuma, Takako Ishida-Takaku, Shintaro Ishigami, Hidekazu Suzuki, Satoshi Tashiro, Rob W. M. van Soest, Yoichi Nakao, and Hitoshi Kurumizaka
Halenaquinone a chemical compound that specifically inhibits the secondary DNA binding of RAD51
Genes to Cells, Vol.16, 2011, 427-436, 査読有
- ③ Motoki Takaku, Daisuke Takahashi, Shinichi Machida, Hiroyuki Ueno, Noriko Hosoya, Shukuko Ikawa, Kiyoshi Miyagawa, Takehiko Shibata, Hitoshi Kurumizaka
Single-stranded DNA catenation mediated by human EVL and a type I topoisomerase
Nucleic Acids Research, Vol.38, 2010, 3959-68, 査読有
- ④ Yoshimasa Takizawa, Yong Qing, Motoki Takaku, Takako Ishida, Yuichi Morozumi, Takashi Tsujita, Toshiaki Kogame, Kouji Hirota, Masayuki Takahashi, Takehiko Shibata, Hitoshi Kurumizaka, and Shunichi Takeda
GEMIN2 promotes accumulation of RAD51 at double-strand breaks in homologous recombination
Nucleic Acids Research, Vol.38, 2010, 5059-74, 査読有
- ⑤ Naoki Horikoshi, Yuichi Morozumi, Motoki Takaku, Yoshimasa Takizawa and

Hitoshi Kurumizaka

- Holliday junction binding activity of human SPF45
Genes to Cells, Vol.15, 2010, 373-383, 査読有
- ⑥ Motoki Takaku, Shinichi Machida, Shugo Nakayama, Daisuke Takahashi and Hitoshi Kurumizaka
Biochemical analysis of the human EVL domains in homologous recombination
The FEBS journal, Vol.276, 2009, 5841-5848, 査読有
 - ⑦ Yuichi Morozumi, Yoshimasa Takizawa, Motoki Takaku, Hitoshi Kurumizaka
Human PSF binds to RAD51 and modulates its homologous-pairing and strand-exchange activities
Nucleic Acids Research, Vol.37, 2009, 4296-307, 査読有
 - ⑧ Mari Katsura, Takanori Tsuruga, Osamu Date, Takashi Yoshihara, Mari Ishida, Yoshitaka Tomoda, Miyuki Okajima, Motoki Takaku, Hitoshi Kurumizaka, Aiko Kinomura, Hiromu K. Mishima and Kiyoshi Miyagawa
The ATR-Chk1 pathway plays a role in the generation of centrosome aberrations induced by Rad51C dysfunction
Nucleic Acids Research, Vol.37, 2009, 3959-68, 査読有
 - ⑨ Motoki Takaku, Shinichi Machida, Noriko Hosoya, Shugo Nakayama, Yoshimasa Takizawa, Isao Sakane, Takehiko Shibata, Kiyoshi Miyagawa and

Hitoshi Kurumizaka
Recombination activator function of the
novel RAD51- and RAD51B-binding protein,
human EVL
The Journal of Biological Chemistry,
Vol.284, 2009, 14326-14336, 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① Motoki Takaku, Daisuke Takahashi,
Shinichi Machida, Hiroyuki Ueno, and
Hitoshi Kurumizaka.
A novel homologous recombination factor,
human EVL forms single-stranded DNA
catemers with a type I topoisomerase.
International Symposium on
Physicochemical Field for Genetic
Activities, 2011年1月24日 兵庫県淡路市
- ② 高久 誉大、高橋 大介、胡桃坂 仁志
RAD51 による paranemic joint molecule
形成過程への topoisomerase III α の役割
第33回 日本分子生物学会年会 第83回
日本生化学会大会 合同大会, 2010年12月,
兵庫県神戸市
- ③ 高久 誉大, 滝沢 由政, 辻田 幹, 石田
恭子, 両角 佑一, 胡桃坂 仁志
新規 RAD51 活性化因子 GEMIN2 の相同組換
え修復における機能
第9回 核ダイナミクス研究会, 2010年 5
月, 静岡県伊豆市
- ④ 高久 誉大, 滝沢 由政, 辻田 幹, 石田
恭子, 両角 佑一, 胡桃坂 仁志
GEMIN2 による RAD51 組換え活性の制御
第32回日本分子生物学会年会, 2009年
12月, 神奈川県横浜市
- ⑤ 高久 誉大, 町田 晋一, 細谷 紀子, 宮
川 清, 胡桃坂 仁志
新規 RAD51 結合タンパク質 EVL の機能解析
第82回日本生化学会大会, 2009年10月,
兵庫県神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高久 誉大 (TAKAKU MOTOKI)
早稲田大学・理工学術院・助手
研究者番号: 30547071