

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15050

研究課題名(和文) RecAファミリーリコンビナーゼによるヘテロ二重鎖形成機構の原子分解能での理解

研究課題名(英文) Understanding the mechanism of heteroduplex formation by RecA family recombinases at atomic resolution

研究代表者

伊藤 健太郎 (Ito, Kentaro)

横浜市立大学・生命医科学研究科・助教

研究者番号：60837128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：相同組換えの中心的な段階であるDNA鎖交換反応は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。真核生物には恒常的に働くRad51と減数分裂特異的に働くDmc1の2つのリコンビナーゼがあり、更にこれらは様々な因子によって活性が制御されている。しかし、2つのリコンビナーゼの生化学的活性の違いや制御因子の作用機序は不明であった。本研究ではリコンビナーゼの変異体コレクションとDNA鎖交換反応のリアルタイム解析系、クライオ電子顕微鏡観察を駆使してリコンビナーゼによるDNA鎖交換反応の分子機構と制御因子の作用機序を原子分解能で理解することを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

相同組換えは減数分裂時には遺伝的多様性の創出に重要な役割を果たしている。この際Rad51とDmc1はDNA鎖交換を介して相同染色体の遺伝子を攪拌する。2つのリコンビナーゼの酵素としての活性の違いやそれぞれの制御機構を理解することにより、不妊の原因解明と治療法の開発に役立つと考えられる。更に一方で体細胞分裂期では遺伝情報の維持に働き、これが機能不全に陥るとガンの原因となる。特にRad51は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。Rad51によるDNA鎖交換反応の分子機構を理解することは新たな抗がん剤創出に繋がっており、本研究で使用したリアルタイム解析系は抗がん剤の評価にも使用可能である。

研究成果の概要(英文)：The DNA strand exchange reaction, the central step in homologous recombination, is catalyzed by evolutionarily conserved RecA family recombinases. Eukaryotes have two recombinases, Rad51, which acts ubiquitously, and Dmc1, which acts meiosis-specifically, and various factors regulate their activities. However, the differences in the biochemical activities of the two recombinases and the action mechanisms of their regulatory factors have yet to be clarified. In this study, we attempted to understand the molecular mechanism of DNA strand exchange reaction by recombinases and the mechanism of action of regulatory factors at atomic resolution by using a collection of recombinase mutants, a real-time analysis system for DNA strand exchange reaction, and cryo-EM observations.

研究分野：生化学

キーワード：相同組換え DNA鎖交換 Rad51 Dmc1 Swi5-Sfr1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

相同組換えは減数分裂時に遺伝的多様性の創出と相同染色体の対合・分配に重要である一方、体細胞分裂期では遺伝情報の維持に必須な役割を果たしている。相同組換えは多段階の複雑な反応が組み合わさって進むが、中心的な反応段階は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 DNA 鎖交換である。真核生物は体細胞分裂期と減数分裂期の両方に働く Rad51 と減数分裂期特異的に働く Dmc1 の 2 種のリコンビナーゼを持っている。

DNA 鎖交換反応では、まず DNA 二重鎖切断末端にリコンビナーゼが右巻き螺旋状に結合してプレシナプティックフィラメントを形成する。そしてこのフィラメントがドナーとなる二重鎖 DNA を捕捉して、3 本の DNA を含む高次の核酸・タンパク質複合体(シナプティック複合体)を形成してその内部で相同 DNA 配列検索が起こり、相同配列を見つけると DNA 鎖が交換される。特に不安定なシナプティック複合体中で起こる配列検索と鎖交換の分子機構は解析法が無く長年不明であった。また、真核生物の 2 つのリコンビナーゼである Rad51 と Dmc1 の生化学的な活性の違いについてもほとんど解析が進んでいなかった。しかし、近年 Dmc1 は Rad51 に比べて相同性の低い DNA 同士、すなわち鎖交換をするとミスマッチを生じてしまうような DNA の間でも鎖交換反応を触媒する事ができることが報告された。しかし、このように 2 つのリコンビナーゼの活性の違いを生み出す分子基盤については不明である。更にリコンビナーゼが DNA 鎖交換反応を完遂するには、様々な補助因子が必要であることが知られているが、特にプレシナプティックフィラメントが形成されて相同配列の検索と鎖交換が起こる際に補助因子がどのように作用して反応を促進するかはわかっていない。

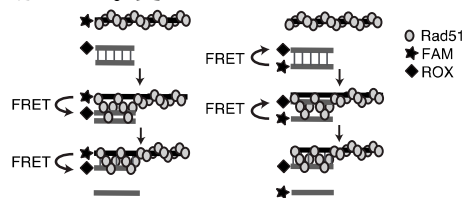


図 1. FRET を利用した 2 種類の DNA 鎖交換反応のアッセイ系

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(図 1)。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 2)。

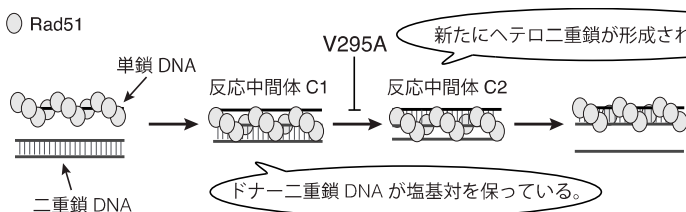


図 2. Rad51 による DNA 鎖交換反応の 3 段階反応モデル

更に進化的に保存され Rad51 と Dmc1 の両方に働く補助因子 Swi5-Sfr1 は Rad51 による DNA 鎖交換反応の中間体の遷移段階と最

終産物の生成段階を促進すること明らかにした。

更に 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ために Rad51 の DNA 結合部位の変異体を作製してリアルタイム解析を行った結果、進化的に保存された DNA 結合モチーフ L2 の Val-295 がこの反応過程に必須で、このアミノ酸残基が鎖交換の活性中心として働いていることを示した(図 2)。

2. 研究の目的

2 種類の分裂酵母リコンビナーゼ (Rad51 と Dmc1) を比較解析することでヘテロ二重鎖形成機構の普遍性と 2 種類のリコンビナーゼの本質的な違いを明らかにする。さらにクライオ電子顕微鏡を用いて Rad51-3 本鎖 DNA 反応中間体のスナップショットを撮影して、ヘテロ二重鎖が形成される機構の原子分解能での理解を目指す。

3. 研究の方法

(1) Dmc1 による DNA 鎖交換反応のリアルタイム解析

オリゴ DNA を蛍光標識して 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て、Dmc1 による反応キネティクスと補助因子の作用機序を解析した(図 1)。

(2) Rad51 または Dmc1-単鎖 DNA、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方性を測定することで Rad51 または Dmc1 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 3)。

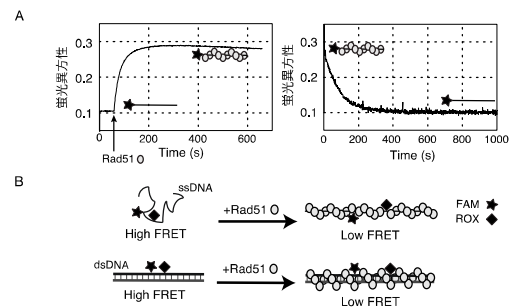


図 3. 蛍光異方性による DNA-リコンビナーゼフィラメントの形成・解離のリアルタイム解析と FRET によるリコンビナーゼフィラメント-DNA 構造解析

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

(3) Rad51 と Dmc1 のミスマッチ許容性の違いを生み出す分子基盤の解析

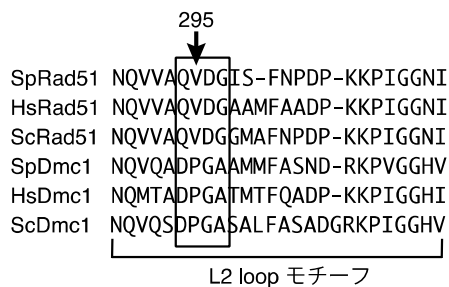


図 4. Rad51 と Dmc1 の L2 loop アミノ酸配列比較
Sp: 分裂酵母, Sc: 出芽酵母, Hs: ヒトを意味する

Dmc1 は Rad51 に比べて鎖交換反応産物であるヘテロ二重鎖中に形成されるミスマッチに対する許容性が高い。Rad51 と Dmc1 の DNA 結合モチーフ L2 のアミノ酸配列を比較したところ、アミノ酸の配列は大きく異なり、Rad51 では QVDG 配列で保存されている一方で、Dmc1 は DPGA 配列で保存されていた(図 4)。

上述したように、Rad51-Val295 が DNA 鎖交換反応においてヘテロ二重鎖の形成に重要であったことから、これら 4 つのアミノ酸の違いがミスマッチ許容性の差を生み出しているのではないかと予想した。そこでこれら 4 つのアミノ酸をそれぞれ入れ替えたキメラ Rad51 と Dmc1 変異体を作製して、上記の手法を駆使して、Rad51 と Dmc1 のミスマッチ許容性の違いを生み出す分子基盤を明らかにする。

(4) クライオ電子顕微鏡による Rad51-3 本鎖 DNA 複合体の構造解析

これまでの分裂酵母 Rad51 による DNA 鎖交換反応の酵素学的解析から、この反応の本質的な段階である C1→C2 遷移で特異的に反応が停止する変異体 Rad51-V295A を同定した。この変異体を用いてヘテロ二重鎖が形成される直前の Rad51-3 本鎖 DNA 複合体の構造のスナップショットをクライオ電子顕微鏡によって撮影して、この反応の分子機構を原子分解能で理解することを目標とする。まず第 1 段階として Rad51-単鎖 DNA フィラメントと Swi5-Sfr1 タンパク質の複合体の構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) 酵素活性の違いから Dmc1 による DNA 鎖交換反応の制御段階は Rad51 と異なることが明らかにした

DNA 鎖交換のリアルタイム解析から、Dmc1 による反応も Rad51 と同様に 3 段階で進行することがわかった。しかし、リコンビナーゼの反応促進因子として報告されている AMP-PNP、Swi5-Sfr1 や Ca²⁺添加しても Rad51 のときと比べて促進効果が著しく弱かった。そこで鎖交換反応の前段階の Dmc1-ssDNA フィラメント形成の段階を解析したところ Dmc1 では Rad51 に比べてアデノシンヌクレオチド依存的に単鎖 DNA への結合能が大きく変化することがわかった。AMP-PNP または Swi5-Sfr1 存在下では、Dmc1 の単鎖 DNA への結合能が著しく強くなり、特にフィラメント核形成が促進された。一方、Rad51 では単鎖 DNA への結合能が Dmc1 に比べて強く、これらの因子によってフィラメントの形成が促進されることはなかった。また、Ca²⁺存在下では上記の因子存在下に比べても更に強く Dmc1 のフィラメント形成が促進されたが、Rad51 のフィラメント形成への影響は小さかった。これらのことから、Rad51 では単鎖 DNA 上にフィラメントが形成された後に様々な因子によって活性が制御されて DNA 鎖交換が促進されているが、Dmc1 の場合は安定な活性型フィラメントを形成する段階がこの反応の制御ポイントになっていることが明らかとなった。進化的に保存された Swi5-Sfr1 複合体は、Rad51 ではフィラメント

形成後に Rad51 の ATP 加水分解活性を変化させて鎖交換反応を促進する活性化因子として働くが、Dmc1 ではフィラメント各形成を助けることでダイナミックに活性型フィラメントを維持することでこの反応を促進しており、一つの因子が全く違う機構で 2 つのリコンビナーゼを正に制御していることが明らかとなった。

(2) リコンビナーゼのミスマッチ許容性を決めるのに L2 モチーフ領域が重要な役割を果たす

Rad51 の Val-295 を Pro に Dmc1 の Pro-267 を Val に置換したキメラ変異体を作製して鎖交換反応の際のミスマッチ許容性に影響が出るかを解析した。Rad51-VP 変異体ではシナプティック複合体が過度に安定化されてしまい相同な DNA の間でも鎖交換の進行速度が遅くなった。一方、Dmc1-PV では相同な DNA 間では野生型と同レベルの鎖交換活性を示したが、ミスマッチの数依存的に野生型と比べて反応性が強く減弱した。これらのことから L2 モチーフの V または P はシナプティック複合体の安定性に重要な役割を果たし、この部分が V だと複合体安定可能が弱くミスマッチ許容性が低く、P だと安定可能が強くなり許容性が高くなると考えられた。

(3) Swi5-Sfr1 複合体は Rad51-単鎖 DNA フィラメントの溝部分にはまり込むように結合する

クライオ電子顕微鏡を用いて Rad51-単鎖 DNA フィラメントと Swi5-Sfr1 タンパク質との複合体の構造解析を行った。電子顕微鏡観察で得られた画像を 2 次元再構成した結果、フィラメントの溝部分に Swi5-Sfr1 と考えられる長細い分子がはまり込んでいる結果が得られた。しかし、フィラメント自体がかなり柔らかいため 3 次元の立体構造を再構成できる程度の質の画像を得るためには、試料の調製条件や撮影条件のさらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2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、岩崎博史
2. 発表標題 分裂酵母 Rad51 によるヘテロ二重鎖 DNA 形成の分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第 26 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤健太郎、岩崎博史
2. 発表標題 DNA鎖交換反応におけるRad51のDNA結合部位の機能解析
3. 学会等名 日本生化学会第95回大会（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------	---------