

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570147

研究課題名（和文） タンパク質間相互作用に基づくDNA相同組換え制御機構の解明

研究課題名（英文） A regulation mechanism of homologous recombination by protein-protein interactions.

研究代表者

美川 務 (MIKAWA TSUTOMU)

独立行政法人理化学研究所・遺伝制御科学特別研究ユニット・専任研究員

研究者番号：20321820

研究成果の概要（和文）：DNA 相同組換えによる DNA 修復は染色体を安定に維持するのに必須の生命現象であるが、そこに働く蛋白質群が明確に分かっているのは原核生物の RecF 経路のみである。本研究課題では、相同組換え制御のモデル系として RecF 経路に働く蛋白質群 (RecA, RecF, RecO, RecR, SSB) を取り上げ、それら蛋白質間の相互作用とその組換え制御との関係を解析した。その結果、これまでにない詳細な制御モデルの提唱に成功した。

研究成果の概要（英文）：Homologous recombinational repair (HRR) is an important pathway to maintain genomic stability. The RecF pathway is a bacterial HRR, in which RecA, RecF, RecO, RecR, and SSB proteins regulate HRR via their interactions. In this study, relationships between the interactions and regulation of HRR have been analyzed. As a result, a model mechanism of HRR regulation based on the protein-protein interaction was proposed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：相同組換え、タンパク質間相互作用、タンパク質-DNA 間相互作用、NMR

1. 研究開始当初の背景

DNA 相同組換えによる DNA 組換え修復はヒトでは染色体を安定に維持し発癌や老化を防ぐのに必須の生命現象であり、その基本的な機構は生命で共通である。研究開始当初、そこに働く蛋白質群が明確に分かっている経路は原核生物の RecF 経路のみであり、組換えを制御する複数の蛋白質 (RecA, RecF, RecO, RecR, SSB, RecX) が協調的に働く

ことにより、組換え修復を進行させることが知られていた。当初までに研究代表者が明らかにしていたこととして、①RecO は SSB と同程度の単鎖 DNA 結合活性を持ち、単鎖 DNA 上で SSB と入れ替わること、②RecO のみでは SSB を単鎖 DNA 上から解離させられないこと、③RecF, RecO, RecR が溶液中共存する時には RecF 2 分子、RecR 4 分子からなるリング状の RecFR 複合体が主に形成

されること、④RecFR 複合体は二本鎖 DNA に強く結合すること、⑤RecR は RecO に相互作用して、RecO の単鎖 DNA 結合様式に変化を与えること、⑥RecOR 複合体は RecA の活性を促進すること、⑦RecR 上の RecO の相互作用部位と RecF の相互作用部位はオーバーラップしていること、などが挙げられる。研究代表者は、さらにこれら蛋白質の個々の機能やその複合体としての機能、また、それらの間に存在する相互作用や、その相互作用が各蛋白質の機能に及ぼす影響などを解析することにより、DNA 組換えの制御機構の理解が深まると考え、本研究課題の発案に至った。

2. 研究の目的

研究開始までに得られた結果から研究代表者は次のような RecF 経路のモデルを提唱した。1) DNA 傷害の結果生じた単鎖 DNA 部分に SSB が結合する。2) RecO が SSB と単鎖 DNA 上で入れ替わり、SSB を単鎖 DNA から解離させやすい状態にする。3) RecFR 複合体が二本鎖 DNA 上を移動し、(おそらく RecO に誘導されて) 二本鎖 DNA と単鎖 DNA の境界に結合する。4) RecFR 複合体中の RecR が単鎖 DNA 上の RecO に相互作用することにより SSB が RecO から解離する。ギャップ領域に RecOR 複合体が形成し、RecA がフィラメント形成しやすい単鎖 DNA 構造を構築する。5) RecA がギャップ領域から核蛋白質フィラメントを形成し、相同組換え反応によって傷害部位を修復する。

本研究では、組換え制御のモデル系としてこれら RecF 経路に働く蛋白質群を取り上げ、それらの単体や複合体としての機能、また、それらの間に存在する相互作用が系全体に与える影響を詳細に解析した。そして、上述のモデルを検証しつつ、最終的には DNA 相同組換え制御において生命に普遍的に存在する機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の目的は DNA 相同組換え反応の制御機構をそこに働く蛋白質の詳細な相互作用に基づいて理解することである。これらを実現するために本研究では、注目した蛋白質に対する相互作用を網羅的に同定できる NMR 分光法を用いた。また、使用する蛋白質として、安定で物理化学的な測定に向いている高度好熱菌 *Thermus thermophilus* (*Tth*) 由来のものを使用した。安定同位体標識された試料(通常の試料ではプロトンしか観測されないため、各蛋白質を NMR 観測可能な核種である ^{13}C , ^{15}N などの安定同位体で標識する必要がある)を調製し、その主鎖のアミドプロトンを帰属する為の一連の測定と解析を行った。これらにより、RecA,

RecR, RecO, RecX については相互作用をアミノ酸残基レベルでモニタできる系を順次構築した。得られた各蛋白質に対する高分解能な相互作用解析系を用いて、DNA など基質との相互作用部位や他の蛋白質との相互作用部位の解析を行った。さらに、得られた相互作用部位の情報を基にして部位特異的変異を導入し、その相互作用に欠損を持つ変異体を調製した。これら変異体を用いて生化学的な解析を行うことにより、それら相互作用がどのような働きを持つのかを解析した。

4. 研究成果

(1) SSB を単鎖 DNA から除去するメカニズムの解明。SSB は DNA 損傷などの結果生じた単鎖 DNA 領域に結合し、RecA による組換え修復までの間その部分を保護する役割を持つ。RecO と RecR はその単鎖 DNA 領域を SSB から RecA へ受け渡す役割を持つがその詳細は明らかにされていなかった。研究代表者はこれまでに RecO が SSB に直接相互作用することを明らかにしていたことから、RecO と SSB の相互作用解析を目的とした NMR 測定を行った。その結果、RecO の C 末端ドメインのポジティブチャージを帯びた領域に SSB の C 末端領域が相互作用することを明らかにした。さらに、SSB に相互作用しない RecO 変異体を調製し、その詳細な生化学的実験を行った。その結果、RecO は SSB と相互作用し、SSB に結合している単鎖 DNA を自身の OB フォールドに移すことにより SSB から単鎖 DNA を解離させていることが示唆された。本結果をもとに、SSB と相互作用して単鎖 DNA に結合する数多くの蛋白質に共通な SSB 除去メカニズムの提唱に至った。

(2) RecX が RecA 活性を阻害するメカニズムの解明。これまで、RecX は RecA フィラメントの伸長末端に結合し、そのフィラメント形成を抑制することにより RecA の活性を阻害していると考えられて来た。しかしながら、研究代表者は RecX と SSB が直接相互作用することを世界で初めて明らかにし、SSB 存在下では RecA に対する RecX の阻害効果が増大することを見出した。さらに、NMR 解析により RecX の SSB 結合部位を同定し、その結果を基に RecA には相互作用するが SSB に相互作用しない RecX 変異蛋白質を調製した。そして、この変異体が SSB 非存在下では野生型と同程度の阻害を示すにも関わらず、SSB 存在下では野生型に見られる阻害の増大を示さないことを明らかにした。SSB は単鎖 DNA 上を移動しながらその二次構造を解消するため、RecA のフィラメント形成を促しその活性を促進することが知られている。今回得られた結果から、SSB に RecX が結合することにより SSB の単鎖

DNA 上での動きが抑制され、その結果 RecA のフィラメント形成、さらにはその活性が阻害されるという全く新しい阻害メカニズムが明らかになった。

(3) RecA の活性に対する RecO の影響。これまでに、RecA に直接相互作用する蛋白質としては RecX しか報告されていない。しかしながら、研究代表者は RecO も RecA と相互作用することを見出した。そこで、これらの蛋白質の相互作用が RecA の触媒活性にどのような影響を与えるかについて詳細に解析を行った。その結果、RecO の相互作用は RecA の組換え活性に阻害的に働くことが明らかになった。

(4) RecA のループ領域のダイナミクス。RecA にはその触媒反応に重要と考えられる 2 つのループ領域 (L1 ループ, L2 ループ) が存在する。そこで、それらループのダイナミクスについて LD (linear dichroism) を中心とした分光法を用いて解析した。その結果、これらループのダイナミクスが DNA 結合や Mg 濃度などによって変化することを明らかにした。

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 10 件)

- 1) Hamatsu, J., O'Donovan, D., Tanaka, T., Shirai, T., Hourai, Y., Mikawa, T., (他 7 名) (2013). High-resolution heteronuclear multidimensional NMR of proteins in living insect cells using a baculovirus protein expression system. *J Am Chem Soc* **135**, 1688-91. 査読有
DOI: 10.1021/ja310928u
- 2) Ito, Y., Mikawa, T. & Smith, B. O. (2012). In-cell NMR of intrinsically disordered proteins in prokaryotic cells. *Methods Mol Biol* **895**, 19-31. 査読有
DOI: 10.1007/978-1-61779-927-3_2
- 3) Inoue, J. & Mikawa, T. (2012). Use of native gels to measure protein binding to SSB. *Methods Mol Biol* **922**, 175-82. 査読有
DOI: 10.1007/978-1-62703-032-8_13
- 4) Shingu, Y., Tokai, T., Agawa, Y., Toyota, K., Ahamed, S., Kawagishi-Kobayashi, M., Komatsu, A., Mikawa, T., (他 4 名) (2012). The double-stranded break-forming activity of plant SPO11s and a novel rice SPO11 revealed by a *Drosophila* bioassay. *BMC Mol Biol* **13**, 1. 査読有
DOI: 10.1186/1471-2199-13-1
- 5) Arai, N., Kagawa, W., Saito, K., Shingu,

Y., Mikawa, T., Kurumizaka, H. & Shibata, T. (2011). Vital roles of the second DNA-binding site of Rad52 protein in yeast homologous recombination. *J Biol Chem* **286**, 17607-17. 査読有

DOI: 10.1074/jbc.M110.216739

- 6) Inoue, J., Nagae, T., Mishima, M., Ito, Y., Shibata, T. & Mikawa, T. (2011). A mechanism for single-stranded DNA-binding protein (SSB) displacement from single-stranded DNA upon SSB-RecO interaction. *J Biol Chem* **286**, 6720-32. 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M110.164210
 - 7) Ling, F., Mikawa, T. & Shibata, T. (2011). Enlightenment of yeast mitochondrial homoplasmy: diversified roles of gene conversion. *Genes*, **2**, 169-190. 査読有
DOI: 10.3390/genes2010169
 - 8) Ikeya, T., Sasaki, A., Sakakibara, D., Shigemitsu, Y., Hamatsu, J., Hanashima, T., Mishima, M., Yoshimasu, M., Hayashi, N., Mikawa, T., (他 6 名) (2010). NMR protein structure determination in living *E. coli* cells using nonlinear sampling. *Nat Protoc* **5**, 1051-60. 査読有
DOI: 10.1038/nprot.2010.69
 - 9) Shingu, Y., Mikawa, T., Onuma, M., Hirayama, T. & Shibata, T. (2010). A DNA-binding surface of SPO11-1, an Arabidopsis SPO11 orthologue required for normal meiosis. *FEBS J* **277**, 2360-74. 査読有
DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07651.x
 - 10) 柴田武彦、美川 務 (2010). 相同 DNA 組換えの機構理解から新規蛋白質創出へ 酵素工学ニュース, **63**, 16-22. 査読有
http://www.enzyme-eng.com/modules/pi_co02/index.php?content_id=3
- [学会発表] (計 34 件)
- 1) 篠原 赴、Regulation of *Thermus thermophilus* RecA function by Recombination mediators、2012 年 12 月 20 日、淡路
 - 2) 柴田武彦、RecA 組換え酵素の L1 ループの制御機能、第 30 回染色体ワークショップ、2012 年 12 月 19 日、淡路
 - 3) 美川 務、バクテリアにおける DNA 組換え修復の制御機構、第 30 回染色体ワークショップ、2012 年 12 月 19 日、淡路
 - 4) 篠原 赴、*Thermus thermophilus* 由来組換えメディエーターの分子機能解析、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、福岡

- 5) 新井直人、出芽酵母 Rad51 組換え酵素の N 末端領域の機能、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、福岡
- 6) 篠原 赴、A comparative study on homologous recombination mediators from *T. thermophiles*、第 2 回モデル生物丸ごと一匹学会、2012 年 9 月 29 日、佐用
- 7) 井上 仁、Reconstitution of homologous recombination in vitro by using *Thermus thermophilus* RecF pathway proteins、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜
- 8) 奥居 沙弥、A novel mechanism for the inhibition of RecA filament extension by RecX、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜
- 9) 新井 直人、出芽酵母 Rad52-Rad51 による D-loop 形成における Rad52 の C 端ドメインの必要性、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜
- 10) 篠原 赴、Analysis of the functions of recombination mediators in homologous pairing、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜
- 11) 美川 務、Local folding of the N-terminal domain of RecA upon protein-protein / protein-DNA interactions and its role、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜
- 12) 重森 康司、酵素結晶固定化電極を用いたバイオ電池の高出力化、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜
- 13) 井上 仁、バクテリアにおける DNA 組換え修復系、第 21 回 DNA 複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ、2011 年 10 月 25 日、福津
- 14) 美川 務、天然変性領域としての RecA の N 末端ドメイン:その機能と役割、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日、京都
- 15) 井上 仁、高度好熱菌蛋白質を用いた *in vitro* DNA 相同組換えの再構築、第 1 回モデル生物丸ごと一匹学会、2011 年 8 月 20 日、佐用
- 16) 奥居 沙弥、RecA の組換え反応に対する RecX の阻害機構、第 1 回モデル生物丸ごと一匹学会、2011 年 8 月 19 日、佐用
- 17) 篠原 赴、組換えメディエーターによる D-loop 反応制御、第 1 回モデル生物丸ごと一匹学会、2011 年 8 月 19 日、佐用
- 18) 井上 仁、蛋白質間相互作用により生じる単鎖 DNA 結合蛋白質 (SSB/RPA) の ssDNA からの解離の一般的機構、第 11 回日本蛋白質科学会年会、2011 年 6 月 8 日、吹田
- 19) Jin Inoue, Displacement mechanism for SSB from single-stranded DNA by a recombination mediator: SSB-RecO interaction at the atomic resolution, International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities, 24 Jan 2011, Awaji
- 20) 新井 直人、出芽酵母 Rad51 による D-loop 形成促進のための Rad52 第二 DNA 結合部位の機能、第 28 回染色体ワークショップ、2011 年 1 月 12 日、加賀
- 21) Takehiko Shibata, Mitochondrial DNA homoplasmy as gene homogenization of repeated sequences by rolling circle replication, 7th ASMRM and 10th J-mit, 16 Dec 2010, Fukuoka
- 22) 井上 仁、ssDNA 上での SSB の置換における SSB-蛋白質相互作用の役割、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 (BMB2010)、2010 年 12 月 9 日、神戸
- 23) 増田 ときは、RecA/Rad51 ファミリーのフィラメント形成は相同 DNA 対合反応には必要ない、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 (BMB2010)、2010 年 12 月 7 日、神戸
- 24) 新井 直人、出芽酵母 Rad52 の第二 DNA 結合部位も相同組換えに必要な、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 (BMB2010)、2010 年 12 月 7 日、神戸
- 25) Jin Inoue, A mechanism for SSB displacement from single-stranded DNA upon SSB-protein interaction, The 7th International 3R Symposium, 27 Oct 2010, Toyama
- 26) Tsutomu Mikawa, A mechanism of DNA homology search, based on the structure of DNA bound to proteins that promote homologous recombination, The 12th IUBMB (OzBio2010), 27 Sep 2010, Melbourne, Australia
- 27) 井上 仁、A general mechanism for SSB displacement from ssDNA upon SSB-protein interaction、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 9 回連携研究会、2010 年 8 月 20 日、佐用
- 28) 篠原 赴、Direct interaction of RecO with RecA is involved in regulation of RecA function、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 9 回連携研究会、2010 年 8 月 20 日、佐用
- 29) 奥居 沙弥、Analysis of the inhibition mechanism of extension of RecA filament by RecX、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 9 回連携研究会、2010 年 8 月 20 日、佐用

- 30) Tsutomu Mikawa, The universal DNA structure in homologous recombination, The 24th Symposium of the Protein Society, 3 Aug 2010, San Diego, USA
- 31) 柴田 武彦、相同組換え開始制御に働く天然変性タンパク質の機能、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月18日、札幌
- 32) 井上 仁、SSB-C 末端酸性領域と RecO の相互作用による SSB の ssDNA からの解離機構の解明、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月17日、札幌
- 33) 笠置 原央、RecA はなぜフィラメントを形成する必要があるのか?—単量体及び二量体の活性をもとに—、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月17日、札幌
- 34) Yoshinori Shingu, A novel rice SPO11 homologue, SPO11D, induces meiotic chromosome aberration and DNA double-stranded breaks in the fruit-fly, EMBO Conference Series on Recombination & Connections to SUMO and Ubiquitin Modifications, 19 May 2010, Lucca, Italy

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称：酵素結晶固定化電極及び酵素結晶固定化電極の製造方法、並びに酵素結晶固定化電極を備えるバイオ電池及びバイオセンサー
 発明者：重森康司、美川 務
 権利者：理化学研究所、アイシン精機
 種類：特許
 番号：PCT/JP2011/069060
 出願年月日：2011年8月24日
 国内外の別：国内・外国

名称：酵素結晶固定化電極及び酵素結晶固定化電極の製造方法、並びに酵素結晶固定化電極を備えるバイオ電池及びバイオセンサー
 発明者：重森康司、美川 務
 権利者：理化学研究所、アイシン精機
 種類：特許
 番号：特願 2010-189788
 出願年月日：2010年8月26日
 国内外の別：国内

○取得状況 (計2件)

名称：高度好熱菌由来の改変型一本鎖 DNA 結合タンパク質、及び該タンパク質を用いた核酸の等温増幅方法
 発明者：美川 務、柴田武彦、重森康司
 権利者：理化学研究所、アイシン精機
 種類：特許
 番号：特許 4860199

取得年月日：2011年11月11日
 国内外の別：国内 (日本)

名称：高度好熱菌由来の改変型一本鎖 DNA 結合タンパク質、及び該タンパク質を用いた核酸の等温増幅方法
 発明者：美川 務、柴田武彦、重森康司
 権利者：理化学研究所、アイシン精機
 種類：US Patent
 番号：7973131
 取得年月日：2011年7月5日
 国内外の別：外国 (米国)

6. 研究組織

(1)研究代表者

美川 務 (MIKAWA TSUTOMU)

独立行政法人理化学研究所・遺伝制御科学特別研究ユニット・専任研究員

研究者番号：20321820

(2)研究協力者 (所属は研究実施当時)

井上 仁 (INOUE JIN)

独立行政法人理化学研究所・遺伝制御科学特別研究ユニット・特別研究員

研究者番号：10469893

増田ときは (TOKIHA MASUDA)

独立行政法人理化学研究所・遺伝制御科学特別研究ユニット・ジュニアリサーチアソシエイト

篠原 赳 (SHINOHARA TAKESHI)

独立行政法人理化学研究所・遺伝制御科学特別研究ユニット・ジュニアリサーチアソシエイト

奥居 沙弥 (OKUI SAYA)

独立行政法人理化学研究所・遺伝制御科学特別研究ユニット・研修生

笠置 原央 (KASAGI MOTOCHIKA)

独立行政法人理化学研究所・遺伝制御科学特別研究ユニット・研修生