

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 29日現在

機関番号：32689  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23710221  
 研究課題名（和文） 相同組換えタンパク質RAD51のヌクレオソーム上での組換え反応機構の解析  
 研究課題名（英文） Functional analysis of RAD51 on nucleosomal DNA templates  
 研究代表者  
 高久 誉大（TAKAKU MOTOKI）  
 早稲田大学・理工学術院・次席研究員（研究院講師）  
 研究者番号：30547071

研究成果の概要（和文）：本研究は、相同組換えの中心酵素である RAD51 のヌクレオソーム上での組換え反応機構を明らかにすることである。本研究によって、試験管内でのクロマチン構造上での解析系を新たに確立し、クロマチン構造の違いが RAD51 の組換え活性に影響を及ぼすことが明らかになった。そのことから、クロマチン構造の動的制御が、直接的に相同組換え反応を制御していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to characterize the mechanism of RAD51-mediated homologous pairing on nucleosomal DNA templates. In this study, we established *in vitro* system to detect homologous pairing in nucleosomal DNA templates. We found that the linker histone significantly inhibited the homologous pairing on the nucleosomal DNA. These results suggest that the dynamic action of chromatin may regulate homologous recombination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：ゲノム維持修復、相同組換え

## 1. 研究開始当初の背景

相同組換えは放射線や活性酸素などによって内外的に生じる DNA の二重鎖切断損傷を修復する主要な経路の一つであり、細胞の生存及びゲノムの安定維持に必須の大変重要な機構である。相同組換え機構では損傷した DNA 領域と相同な DNA 領域を検索し、検索した無傷の DNA を鋳型として復元し修復するため、遺伝情報を失うことなく修復することが可能である。RAD51 はヒトの相同組換えの中心酵素であり、相同な DNA 領域の検索に必須のタンパク質である。相同組換え機構は大腸菌からヒトに至るまで高度に保存されており、その反応過程も類似しているが、真核生物においては DNA がクロマチン

構造を形成している点で原核生物と大きく異なる。クロマチン構造は、ヒストン（H2A, H2B, H3, H4）に DNA が巻き付いたヌクレオソームを構成単位とし、それが高度に折り畳まれて形成される。このようなクロマチン構造は相同組換えの各反応過程において障壁となると考えられ、クロマチン構造がダイナミックに構造変化しながら、相同組換え修復が行われていると考えられる。しかしながら、このようなクロマチン構造と相同組換えの機能的な関係性についてはほとんどわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、相同組換えの中心酵素で

ある RAD51 のヌクレオソーム上での反応機構を明らかにすることである。それにより、クロマチン構造制御機構が相同組換えにおいてどのような機能を担っているかを理解することを目指した。

### 3. 研究の方法

クロマチン構造が RAD51 の触媒する組換え反応に及ぼす影響を解析するため、具体的には以下のことを行った。まず、RAD51 のクロマチン構造上での組換え反応を解析する実験系を確立するため、解析に必要なタンパク質及び DNA を大腸菌もしくは昆虫細胞を用いて精製した。精製したタンパク質及び DNA を用いて、ヌクレオソーム構造を有する DNA 基質上での組換え反応解析系を試験管内で再構築した。確立した解析系を用いて、異なるヒストンからなるヌクレオソームが組換え反応に及ぼす影響及び、RAD51 活性化因子が及ぼす影響について解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 試験管内再構築系の確立

まず、解析に必要なタンパク質 RAD51, RAD54, ヒストン H2A, H2B, H3.1, H4 及び DNA 基質を精製した。精製したヒストンと DNA を用いて、ヌクレオソームがタンデムに並んだクロマチン様 DNA 基質を作製した。作製したクロマチン DNA 基質を用いて、RAD51 及び RAD54 存在化での組換え反応 (homologous pairing 活性) について調べた。その結果、RAD51 単独ではクロマチン DNA 基質上では組換え反応を行うことができず、クロマチンリモデリング因子である RAD54 共存在下において組換え反応を示すことが確かめられた

(図 1)。

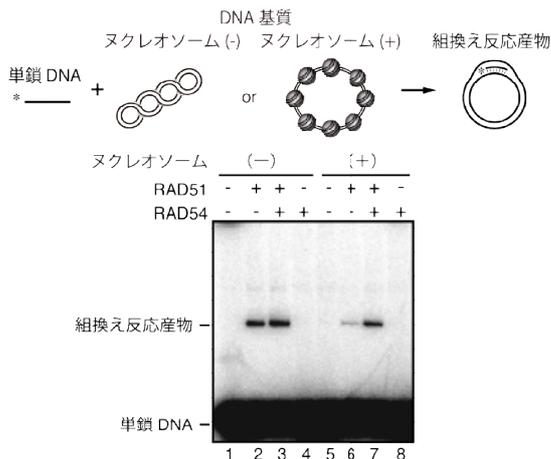


図 1. クロマチン DNA 基質上での RAD51 による組換え反応解析系再構築した解析系の反応模式図 (上段) および解析結果 (下段)。

また同時に、クロマチン構造上での解析を行うにあたり、RAD51 依存的な組換え反応

の詳細な特性理解が必要であったため、ヌクレオソーム構造を有さない DNA 上での RAD51 の組換え活性を様々な条件下で解析した。その過程で、SMN-GEMIN2 複合体が RAD51 の組換え反応を活性化することが明らかになり、その研究成果を学術論文として発表した (図 2, 発表論文(3))。SMN は、これまでに GEMIN2 などの因子と相互作用し、スプライシングに関与することがわかっているタンパク質であり、脊髄性筋萎縮症の原因遺伝子としても知られる。本研究成果によって、初めてこの SMN が相同組換えに関与することが示唆された。

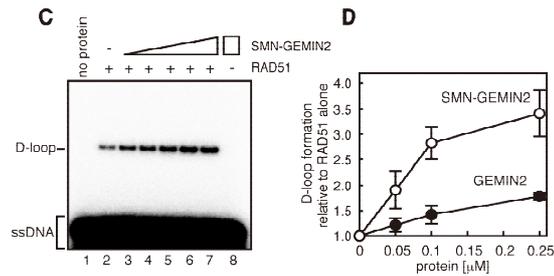


図 2. SMN-GEMIN2 複合体による RAD51 依存的な組換え反応の活性化  
発表論文(3) Figure 4C,4D より抜粋

#### (2) クロマチン構成因子の違いが組換え反応に及ぼす影響

確立した解析系を用いてまず、ヒストンバリエントがこれらの解析系に及ぼす影響を調べた。H3 のバリエントとして知られる H3.1, H3.2, H3.3 を用いて比較解析を行った結果、いずれのバリエントを含むヌクレオソームにおいても、RAD51 及び RAD54 によって組換え反応が触媒されることが明らかになった。さらに、様々な化学修飾を受けることや、高次構造形成の際に重要だと考えられる各ヒストンの N 末端テイル領域を欠損させたヒストンを含むヌクレオソームについても同様の解析を行った。その結果、N 末端テイルを欠損させたヒストンを用いた解析においても、RAD51 及び RAD54 は組換え活性を示すことがわかった。他のヒストンバリエントの影響や、活性の強弱を解明するためにはさらに詳細な解析が必要である。

そこで次にリンカーヒストン H1 の及ぼす影響について調べた。リンカーヒストン H1 は、ヌクレオソームに結合し、ヌクレオソームの高次構造形成に重要な役割を担うと考えられている。リンカーヒストンには多数のバリエントが存在するが、体細胞において最もユビキタスに発現している H1.2 をまずリコンビナントタンパク質として精製した。精製した H1.2 とクロマチン DNA 基質を混合し、H1 を含むクロマチン基質を作製した。H1 の結合したクロマチン DNA 基質を用いて組換え反応を解析したところ、H1 存在下

においては著しく RAD51 及び RAD54 の組換え活性が阻害されることが明らかになった (図 3)。一方、ヌクレオソームを含まない DNA に H1 を添加したところ、H1 による RAD51 及び RAD54 の組換え活性の阻害は顕著でなかった。これらのことから、リンカーヒストン H1 は、RAD51 のヌクレオソーム上での組換え反応に特異的に阻害効果を示すことが明らかになった。

#### (3) RAD51 活性化因子のヌクレオソーム基質上での活性

RAD51 が相同組換えにおいて機能する際には、様々な因子と相互作用し協同的に働くことが示唆されている。これまでに RAD51 の活性化因子として知られる、RAD52 及び RAD51AP1 をリコンビナントタンパク質として精製し、上記にて確立した試験管内再構築系を用いて、これらの因子が RAD51 のヌクレオソーム上での組換え活性に及ぼす影響を調べた。その結果、RAD51AP1 及び RAD52 のどちらについても、RAD51 依存的なヌクレオソーム基質上での組換え反応の活性化は見られなかった。そのことから相同組換え経路において、RAD51AP1 及び RAD52 はヌクレオソーム上で行われる RAD51 の機能には関与しないことが示唆された。

#### (4) 考察

以上の解析から、試験管内でのクロマチン構造上での解析系を新たに確立し、リンカーヒストン H1 が RAD51 依存的な組換え活性を著しく阻害することが明らかになった。このことは、クロマチン構造の違いが、直接的に相同組換え反応を制御しうることを示唆しており、クロマチン構造の動的制御が相同組換えの反応機構に密接に関わると考えられる。H1 を含むヌクレオソームは、染色体のあらゆる領域に存在すると考えられ、H1 を含むクロマチン上においても相同組換えは行われなければならない。そのため今後、H1 を含むクロマチン構造上において、どのようにその阻害的な効果を克服し、相同組換えを行っているのかを明らかにする必要がある。

#### 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 5 件)

(1) Osakabe A, Tachiwana H, Takaku M, Hori T, Obuse C, Kimura H, Fukagawa T, Kurumizaka H “Vertebrate Spt2 is a novel

nucleolar histone chaperone that assists in ribosomal DNA transcription” *Journal of Cell Science* (2013) in press, 査読有

(2) Morozumi Y, Ino R, Takaku M, Hosokawa M, Chuma S, Kurumizaka H “Human PSF concentrates DNA and stimulates duplex capture in DMC1-mediated homologous pairing” *Nucleic Acids Research* (2012) Vol.40, p3031-3041, 査読有  
doi: 10.1093/nar/gkr1229.

(3) Takaku M, Tsujita T, Horikoshi N, Takizawa Y, Qing Y, Hirota K, Ikura M, Ikura T, Takeda S, Kurumizaka H “Purification of the human SMN-GEMIN2 complex and assessment of its stimulation of RAD51-mediated DNA recombination reactions” *Biochemistry* (2011) Vol. 50, p6797-6805. 査読有  
doi: 10.1021/bi200828g.

(4) Takaku M, Ueno H, Kurumizaka H “Biochemical analysis of the human ENA/VASP-family proteins, MENA, VASP and EVL, in homologous recombination” *The Journal of Biochemistry* (2011) Vol. 149, p721-729. 査読有  
doi: 10.1093/jb/mvr029.

(5) Takaku M, Kainuma T, Ishida-Takaku T, Ishigami S, Suzuki H, Tashiro S, van Soest RW, Nakao Y, Kurumizaka H “Halenaquinone, a chemical compound that specifically inhibits the secondary DNA binding of RAD51” *Genes to Cells* (2011) Vol.16, p427-436, 査読有  
doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01494.x.

[学会発表] (計 7 件)

(1) 高久 誉大, 町田 晋一, 小林 航, 林田 亮太, 鈴木 秀和, 井倉 正枝, 越阪部 晃永, 立和名 博昭, 浦 聖恵, 田代 聡, 井倉 毅, 胡桃坂 仁志 “再構成系によるクロマチンでの相同組換え機構の解析”, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 (福岡)

(2) Motoki Takaku, Shinichi Machida, Wataru Kobayashi, Naoki Horikoshi, Wataru Kagawa, Hitoshi Kurumizaka “Mechanism of the RAD51-mediated homology search on nucleosomal DNA” 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月, 福岡

(3) Motoki Takaku, Shinichi Machida,

Wataru Kobayashi, Ryota Hayashida, Hidekazu Suzuki, Masae Ikura, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, Satoshi Tashiro, Tsuyoshi Ikura, and Hitoshi Kurumizaka “Biochemical studies of homologous pairing on chromatinized DNA” The 8th 3R Symposium, 2012年11月, 淡路島

(4) Motoki Takaku, Hitoshi Kurumizaka “Biochemical analyses of homologous recombination reaction in chromatin”、第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月, 札幌

(5) Motoki Takaku, Takashi Tsujita, Naoki Horikoshi, Yoshimasa Takizawa, Yong Qing, Kouji Hirota, Masae Ikura, Tsuyoshi Ikura, Shunichi Takeda, Hitoshi Kurumizaka “SMN-GEMIN2 complex stimulates the RAD51-mediated recombination reactions” 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月, 横浜

(6) Motoki Takaku, Samika Iwashita, Wataru Kobayashi, Yoshimasa Takizawa, Hitoshi Kurumizaka “PLEKHF1 is a novel factor that interacts with the meiosis-specific recombinase, human DMC1” World Congress on Reproductive Biology, 2011年10月, Cairns (Australia)

(7) 高久 誉大, 海沼 嵩, 石田-高久 恭子, 石上 進太郎, 鈴木 秀和, 田代 聡, 木村 宏, 中尾 洋一, 胡桃坂 仁志. “RAD51 活性制御化合物の探索とその生化学的解析” 第84回日本生化学会大会, 2011年9月23日, 京都

〔図書〕(計1件)

平尾一郎, 胡桃坂仁志 編 “実験医学別冊 目的別で選べる核酸実験の原理とプロトコール”(羊土社) 2011年 総ページ数: 15頁(担当項目: 核酸実験のためのワークフロー, ショ糖勾配遠心法, アルカリ変性法, サルコシルによる非変性法)

## 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・次席研究員(研究院講師)

研究者番号: 30547071