

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07255

研究課題名(和文) DNA二本鎖切断修復機構で働くヒトMre11複合体の酵素活性とその制御機構の解析

研究課題名(英文) Biochemical analysis of Human Mre11 complex working in DNA double-strand break repair

研究代表者

古郡 麻子 (Furukohri, Asako)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：90546293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトMre11-Rad50-Nbs1(MRN)複合体はDNA二本鎖切断修復機構に必須の因子であるが、その詳細な分子機構については未だ不明な点が多い。本研究ではヒトMRN複合体蛋白質の性状解析を通じ、ヒトMRN複合体の働きやその制御機構を明らかにすることを目的とした。本研究でヒトMRN複合体蛋白質のヌクレアーゼ活性や蛋白質高次構造を調べ、大腸菌のMre11/Rad50複合体と比較したところ、大腸菌からヒトまで基本的に共通した蛋白質構造や酵素活性の特徴を持つことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MRN複合体はヒトの生存に必須の酵素複合体であり、ヒトのゲノムDNAの傷を修復し安定に維持するために働いている。本研究ではこのMRN複合体の蛋白質構造や酵素活性を詳細に調べ、その基礎的な知見を明らかにした。ヒトMRN複合体は発がんやがん治療のみならず、近年注目を集めるゲノム編集にも関係する重要な酵素であることから、本研究によりMRN複合体が働く仕組みの理解が深まったことは、医学・生物学的にも意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex is a central player in protecting our genome from toxic DNA damages such as DNA double-strand break. In this project, we carried out biochemical and structural analyses of human MRN complex. We found that the basic properties of human MRN and its bacterial homolog SbcCD, including their enzymatic actions and entire architectures, are mostly well-conserved among species.

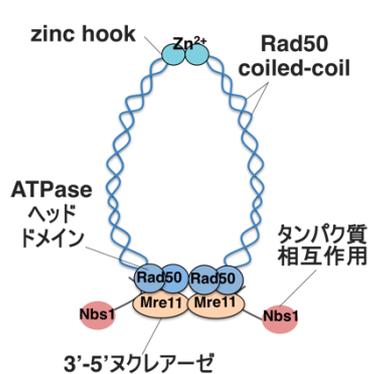
研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：DNA修復 DNA二本鎖切断 高速AFM

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の遺伝情報はゲノム DNA によってコードされており、その安定な維持伝達は生命にとって重要である。このゲノム DNA は放射線、活性酸素、発がん性物質などの様々な要因によって恒常的に損傷を受けるため、細胞は様々な DNA 損傷修復機構を発達させてきた。例えば放射線照射や抗がん剤などによって引き起こされる最も重篤な DNA 損傷の一つである DNA 二本鎖切断 (DNA double-strand break, DSB) は相同組換えや非同末端連結機構などにより修復されることが知られており、ヒトの生存にはこれらの機構は極めて重要である。ヒト Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) 複合体はこれらのゲノム安定維持機構に必須の酵素複合体であり、MRN 複合体を形成するサブユニットの変異は神経変性や早期発がんを伴う Ataxia telangiectasia-like disorder (Mre11 変異) や Nijmegen breakage syndrome (Nbs1 変異) といった深刻な遺伝性疾患を引き起こす。また出芽酵母 Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX)、古細菌 Mre11-Rad50 (MR)、細菌 SbcD-SbcC (SbcCD) など二本鎖 DNA ゲノムを持つ生物は MRN ホモログを保持しており、MRN 複合体ホモログを欠失変異した酵母は放射線や変異原性化学物質に高感受性になることや、DNA 複製や減数分裂組換えの異常が高頻度で起こるようになることも知られている。また MRN 複合体はチェックポイント機構やテロメア維持などにも重要な役割を持っていることが知られているが、どのようにして MRN 複合体がこのような多岐にわたる経路で働いているかはよく解っていない。



また MRN 複合体は ATPase 活性やヌクレアーゼ活性、ヘリカーゼ活性、DNA 会合促進活性など多彩な活性を持つことも知られている。ヌクレアーゼ活性も 3' -5' エキソヌクレアーゼ活性とエンドヌクレアーゼ活性の両方を持っており、基質として一本鎖、二本鎖 DNA 両者を使用することが可能である。更に MRN 複合体は非常に特徴的な蛋白質構造を持つことでもよく知られている。全長 50 nm にも及ぶ長いアーム状の coiled-coil 領域からなる Rad50 二分子が、ATPase 活性を持つヘッドドメインと zinc hook と呼ばれる亜鉛を配位した短いモチーフ部位でリング状の二量体を形成する。その Rad50 ヘッドドメインへヌクレアーゼ活性を持つ Mre11 二分子と蛋白質間相互作用を担う Nbs1 二分子が結合したヘテロ 6 量体構造を取る (図 1)。こうした蛋白質構造を持つヌクレアーゼは他には知られておらず、むしろ染色体構造に関わる cohesin や

condensin などの SMC ファミリー蛋白質に蛋白質構造的には近いと考えられている。この zinc hook モチーフに変異を持つ Rad50 は細胞内で機能しないことから、MRN 複合体の特異な蛋白質構造がその機能に重要であることは報告されているが、実際どのようにこの特異な構造が MRN 複合体の活性を制御し、多彩な生体内機能において働いているのかについては未だ完全には解明されていない。

2. 研究の目的

研究代表者らはこれまで大腸菌内で逆向き反復配列が遺伝的不安定性を引き起こす仕組みに興味を持ち研究を行ってきた。その中で大腸菌 MRN ホモログ (SbcCD) のヌクレアーゼ活性がその一つの要因であると考え、SbcCD の酵素活性について調べてきた。その結果、SbcCD が DNA 末端構造依存的に DNA 二本鎖を両鎖同時に切断する新規 DNA エンドヌクレアーゼ活性を持つことを見出した。また前述の通り、MRN 複合体は細菌からヒトまで広く保存されている。そこで大腸菌 SbcCD の研究で得られた知見を元に、ヒト MRN 複合体の酵素活性を調べれば、新たな発見があるのではないかと考えた。また興味深いことに、大腸菌 SbcCD はヒト MRN 複合体とは異なりリング状の構造を取らず、ヘッドドメインが開裂したサクランボ状の構造を取ると考えられていた。またその一方、ヒト MRN 複合体はヘッドドメインとは逆側の zinc hook 領域でリングの開裂が起こることが報告されていた。そこで本研究ではヒト MRN 複合体を精製し、その酵素活性および蛋白質構造を大腸菌 SbcCD と詳細に比較することで、ヒト MRN 複合体の特異な蛋白質構造と酵素活性の関係についての新たな知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 蛋白質発現・精製

バキュロウイルス発現系を用いてヒト MRN 複合体を大量発現し、アフィニティタグ精製、イオン交換カラム、ゲル濾過カラム等を用いて精製した。また各種変異型 MRN 複合体や Nbs1 を含まない Mre11/Rad50 複合体、Rad50 の精製も行なった。更に DNA 末端結合蛋白質や一本鎖 DNA 結合蛋白質など MRN 複合体の酵素活性に影響を与えられとされる DNA 結合蛋白質も精製し、以降の実験に使用した。

(2) 酵素活性測定

一本鎖 DNA や二本鎖 DNA を基質にヒト MRN 複合体の酵素活性測定を行なった。その際には DNA 末端を放射線同位体で標識し DNA 切断産物を検出した。またビオチン標識 DNA 末端をアビジン

ビーズでブロックした二本鎖 DNA や、DNA 末端結合蛋白質で DNA 末端をブロックした二本鎖 DNA を用いてヌクレアーゼ活性を測定し、エキソヌクレアーゼ活性とエンドヌクレアーゼの解析を行った。

(3) 高速原子間力顕微鏡を用いた蛋白質構造変化の解析

内橋貴之教授（名古屋大学）、建部恒助教（奈良先端科学技術大学院大学）らとの共同研究により、高速原子間力顕微鏡（High-speed Atomic Force Microscopy、HS-AFM）を用いてヒト MRN 複合体の溶液中における構造変化を調べた。また分裂酵母 Mre11/Rad50 や大腸菌 SbcCD の蛋白質構造の変化も同様に解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト MRN 複合体ヌクレアーゼ活性の解析

精製したヒト MRN 複合体や Mre11/Rad50 複合体のヌクレアーゼ活性を調べ、ATP 非依存性 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性など既知のヌクレアーゼ活性を持つことを確認した。また種々の変異型複合体を精製しその活性を比較したところ、既に報告されたヌクレアーゼドメイン変異型 Mre11 を持つ複合体では全くヌクレアーゼ活性は検出されなかった。興味深いことに、複合体全体の蛋白質構造を変化させることが予想された zinc hook 変異型 Rad50 を持つ複合体では、Mre11 サブユニットのヌクレアーゼドメインは正常にもかかわらず 3' -5' エキソヌクレアーゼ活性が顕著に低下していた。この変異体は後述の構造解析では Mre11/Rad50 および Rad50 同士の相互作用は完全には失われておらず複合体自体は形成されているものの、全体のリング構造が破壊されていた（後述）。このことから、3' -5' エキソヌクレアーゼ活性には Rad50 二分子の zinc hook での相互作用が重要であることが示唆された。

また DNA 末端をビオチン-アビジンビーズブロックした基質二本鎖 DNA および DNA 末端結合蛋白質を用い、ヒト MRN 複合体に大腸菌 SbcCD と同様の二本鎖 DNA 切断型エンドヌクレアーゼ活性が保存されているかについて調べる実験を行なったが、期間内に解析が終了せずはっきりした結論を得ることはできなかった。しかし、大腸菌と同じ活性かは不明ながらも二本鎖 DNA を切断するエンドヌクレアーゼ活性の存在を示唆する結果は得られたことから、現在この活性の実態について解析を進めている。またヒト MRN 複合体の一本鎖エンドヌクレアーゼ活性を促進することが報告されていたヒト SSB1 が 3' -5' エキソヌクレアーゼ活性についても有意に促進するなど、ヒト MRN 複合体の酵素活性に関する多くの知見を得た。今後様々な蛋白質とヒト MRN 複合体が協調的に働く機構を調べる上の基盤的知見が得られたと考えている。

(2) ヒト MRN 複合体の溶液中構造変化の解析

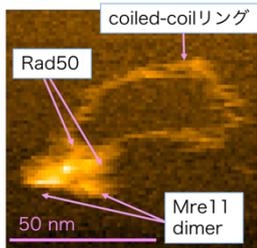
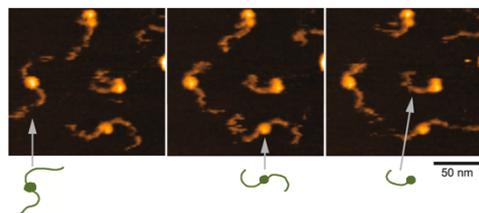


図2 ヒトMre11/Rad50の溶液中AFM画像

ヒト MRN 複合体、Mre11/Rad50 複合体、Rad50 の蛋白質構造を調べるため、HS-AFM を用いて溶液中のこれらの蛋白質の構造変化を観察した。その結果、MRN 複合体、Mre11/Rad50 複合体、Rad50 がこれまで言われていたように溶液中でリング状の構造を取ることがわかった（図2）。また前述の zinc hook 変異型 Mre11/Rad50 複合体を観察したところ、Mre11 サブユニットが結合する Rad50 ヘッド部位の二量体構造は正常であることが示唆された（図3）。このことから、ヌクレアーゼ活性の低下が MRN 複合体のリング構造形成異常による可能性が示唆された。

またヒト MRN 複合体の溶液中の蛋白質構造変化を継続的に調べたところ、ヒト MRN 複合体のリング構造がヘッド部位で開裂することを見出した（図4）。これまで国外グループの研究により、MRN 複合体のリング構造の開裂は zinc hook モチーフ部位で起こると報告されていたため、この結果は非常に興味深い結果である。また前述のように、zinc hook モチーフ部位での二量体形成はヌクレアーゼ活性に重要であることから、zinc hook モチーフ部位の二量体形成は安定なものであり、リングの開裂はヘッドドメインで起こると考えられる。更に分裂酵母 Mre11/Rad50 や細菌 SbcCD の溶液中の蛋白質構造および構造変化のダイナミクスについても調べた。これまでの報告では、大腸菌 SbcCD はリング構造を作らないとされていたが、ヒト、分裂酵母、大腸菌の複合体は全てリング状構造を形成しており、リングの開裂は全てヘッド部位で起こることが明らかとなった。これらの結果からヒト MRN 複合体のリング構造およびヘッド部位での開裂などの動的構造変化は大腸菌からヒトまで高度に保存されており、その酵素活性制御において重要であることが明らかとなった。

図3 hook変異型Mre11/Rad50複合体



またヒト MRN 複合体の溶液中の蛋白質構造変化を継続的に調べたところ、ヒト MRN 複合体のリング構造がヘッド部位で開裂することを見出した（図4）。これまで国外グループの研究により、MRN 複合体のリング構造の開裂は zinc hook モチーフ部位で起こると報告されていたため、この結果は非常に興味深い結果である。また前述のように、zinc hook モチーフ部位での二量体形成はヌクレアーゼ活性に重要であることから、zinc hook モチーフ部位の二量体形成は安定なものであり、リングの開裂はヘッドドメインで起こると考えられる。更に分裂酵母 Mre11/Rad50 や細菌 SbcCD の溶液中の蛋白質構造および構造変化のダイナミクスについても調べた。これまでの報告では、大腸菌 SbcCD はリング構造を作らないとされていたが、ヒト、分裂酵母、大腸菌の複合体は全てリング状構造を形成しており、リングの開裂は全てヘッド部位で起こることが明らかとなった。これらの結果からヒト MRN 複合体のリング構造およびヘッド部位での開裂などの動的構造変化は大腸菌からヒトまで高度に保存されており、その酵素活性制御において重要であることが明らかとなった。

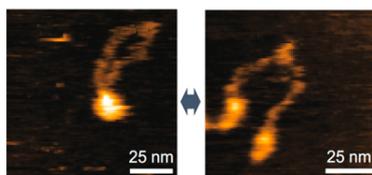


図4 観察されたMRN分子の映像

高速原子間力顕微鏡観察により、MRNがリング構造からサクランゴ構造へと変化する様子を捉えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Thanh Thi Le, Asako Furukohri, Masahiro Tatsumi-Akiyama and Hisaji Maki	4. 巻 7
2. 論文標題 Collision with duplex DNA renders Escherichia coli DNA polymerase III holoenzyme susceptible to DNA polymerase IV-mediated polymerase switching on the sliding clamp	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-13080-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tatebe H., Lim CT., Konno H., Shiozaki K., Shinohara A., Uchihashi T. and Furukohri A.	4. 巻 11
2. 論文標題 Rad50 zinc hook functions as a constitutive dimerization module interchangeable with SMC hinge	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-14025-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 7件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 古郡 麻子
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復機構で働くMre11/Ra50/Nbs1複合体の構造と機能
3. 学会等名 日本遺伝学会第90回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古郡 麻子
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復機構で働くヒトMre11/Ra50/Nbs1複合体の動的構造解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古郡 麻子
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復機構で働くMre11/Rad50/Nbs1複合体の構造と機能
3. 学会等名 日本生化学会第91回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古郡 麻子、 Chew Theng Lim、 David R.F. Leach、 真木 壽治
2. 発表標題 DSB修復で働くMre11/Rad50複合体の生化学的解析
3. 学会等名 日本遺伝学会第89回大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古郡 麻子
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復機構で働くMre11/Rad50/Nbs1複合体の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（第40回日本分子生物学会年会）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Asako Furukohri
2. 発表標題 Biochemical analysis reveals a novel action of bacterial Mre11/Rad50 complex (SbcCD) at a DNA end
3. 学会等名 10th 3R International Symposium（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Asako Furukohri
2. 発表標題 Biochemical analysis on nuclease activities of Mre11/Rad50 complex
3. 学会等名 IPR seminar: Chromosome dynamics and genome stability in meiosis and mitosis (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古郡 麻子
2. 発表標題 Biochemical analysis of DNA polymerase actions across the trinucleotide repeats
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古郡 麻子
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復機構で働くヒトMRN複合体の動的構造解析
3. 学会等名 第25回DNA複製・修復・組換えワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古郡 麻子
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復機構で働くヒトMre11/Ra50/Nbs1複合体の動的構造解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2019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
研究 分担 者	建部 恒 (Tatebe Hisashi) (00596819)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	