

令和元年6月14日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07258

研究課題名(和文) DNA相同組換えタンパク質Rad52の非相同末端結合での働き

研究課題名(英文) Roles of Stimulation of ligase-catalyzed DNA-end joining by Rad52

研究代表者

新井 直人 (ARAI, Naoto)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：70297795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母のRad52は、相同組換えに必須な蛋白質である。試験管内で直鎖状プラスミドDNAにDNAリガーゼを加えるとDNA分子内の末端が結合し環状となるが、Rad52の存在下ではDNA末端の結合活性が促進され、DNA分子間が結合して直鎖状に連結した産物が形成された。この活性にはRad52のN末側とC末側の両方のDNA結合部位が必要であった。出芽酵母細胞内に直鎖状プラスミドDNAを導入すると非相同末端結合活性によりDNA末端が結合しプラスミドDNAが保持される。rad52遺伝子欠失株ではプラスミドDNAの保持率が野生型の1/4に低下し、Rad52が非相同末端結合に関連することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

出芽酵母においてRad52は、DNAの二本鎖切断(DSB)傷害の相同組換えによる修復に必須であるが、本研究により非相同末端結合への関与が示唆された。このことは相同組換えと非相同末端結合が密接に関係することを示すものと考えられる。ヒトRad52には未解明な点が多いが、出芽酵母Rad52と構造上の類似点が多いため、非相同末端結合への関与が推測される。ヒトでは、DSBの修復のために非相同末端結合が主要経路であり、Rad52のさらなる研究によりDNA修復のエラーにより引き起こされるガンなどの疾患や病態の解明、治療に新たな方向性を示すことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Rad52 of budding yeast is essential to homologous recombination. DNA ligase catalyzes joining of DNA-end of linear plasmid DNA and produces circular DNA by intramolecular association. In the presence of Rad52, joining of DNA-end was enhanced and products that many linear DNA were tandemly jointed by intermolecular association were formed. For these activity of Rad52, both DNA binding sites in N-terminal and C-terminal regions of the Rad52 were required. When linear plasmid DNA was introduced in yeast cell, the ends of the linear DNA molecule are joined at by non-homologous end-joining and the plasmid DNA is retained in the cell. In rad52-deleted strain, retention of the plasmid DNA was reduced in to 1/4 of wild-type, suggesting that Rad52 is associated with non-homologous end joining.

研究分野：分子生物学、遺伝生化学

キーワード：Rad52 Rad51 RecA 相同組換え 非相同末端結合 出芽酵母

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物は、ゲノム DNA に起こった二本鎖切断の傷害を相同組換えまたは非相同末端結合により修復している。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の相同組換えにおいて、Rad52 と Rad51 は中心的な働きをしている。Rad52 は、酵母の相同組換えに必須なタンパク質であるが、ヒトでは必須ではなく Brca2 と機能が分担されている。また、Rad52 と複合体を形成する Rad51 は、大腸菌 RecA からヒト Rad51 まで幅広く存在し、機能も保存されている。

試験管内で直鎖状 DNA は DNA リガーゼにより DNA 分子内で末端が結合し環状となるが、出芽酵母 Rad52 (または Rad51、大腸菌 RecA) の存在下では、DNA リガーゼによる直鎖状 DNA の DNA 末端結合が促進され、直鎖状 DNA が分子間で連結した直鎖状多量体を形成することを発見した。

2. 研究の目的

試験管内で DNA リガーゼによる DNA 末端結合を Rad52 が促進して直鎖状 DNA 多量体を形成する反応が、Rad52 のどのような機能によるものなのか、その分子機構の解明、Rad51 との関連及び生体内での非相同末端結合における Rad52 の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

プラスミド DNA (pUC119) を制限酵素切断により直鎖状にした基質 DNA に Rad52 (または Rad51、RecA) を加え、T4 または *E. coli* 由来の DNA リガーゼと共に 37 °C で反応し、臭化エチジウム存在下のアガロースゲル電気泳動により DNA を分離して解析した。Rad52 による DNA リガーゼの DNA 末端結合の促進と直鎖状 DNA 多量体の形成について、反応の至適条件の検討と共に、Rad52 構造上のどの領域が必要であるかを、欠損変異を構築し、精製して試験管内で解析した。また、Rad51 と Rad52 を同時に反応させて両者の関連を調べた。さらに、出芽酵母 *rad52* 欠損株で直鎖状 DNA を導入して DNA 末端結合の効率を調べた。

4. 研究成果

試験管内で DNA リガーゼにより直鎖状 DNA は DNA 末端の分子内結合により環状となるが、Rad52 (または Rad51、RecA) の存在下では、DNA 末端結合が促進されると共に、直鎖状 DNA の分子間結合が優先して起こり多量体を形成した。この反応について以下の点に焦点を当てて研究を行った。

- (1) Rad52 による DNA 末端結合の促進と直鎖状 DNA 多量体形成が同じ分子機構に由来するのか。
- (2) Rad52 構造上のどの領域が機能しているのか。
- (3) Rad51 と Rad52 による直鎖状 DNA 多量体の形成の活性に関連性はあるのか。
- (4) 出芽酵母内での非相同末端結合に、DNA リガーゼによる DNA 末端結合の Rad52 による促進が関与しているのか。

(1) Rad52 による DNA 結合促進と直鎖状 DNA 多量体形成が同じ分子機構に由来するのか。

(2) Rad52 構造上のどの領域が機能しているのか。

(1) と (2) の2つの項目については関連性があると考えて進めた。

S. cerevisiae の Rad52 (全長 34-504 アミノ酸残基: 生体内でのタンパク質への翻訳は 34 番目のメチオニンから始まる) は機能によって領域を分けることができる。Rad52 の N 末端側 34-237 アミノ酸領域は多くの生物種で保存されているが、C 末端側 238-504 アミノ酸領域は生物種によって異なっている。また N 末端側の 117 番目のリシン (K117) と 148 番目のアルギニン (R148) は、二本鎖 DNA への結合に必要なアミノ酸である (引用文献)。C 末端側にも DNA 結合領域があることが示唆されている (引用文献)。

Rad52 による DNA 末端結合の促進と直鎖状 DNA 多量体形成に重要である領域を特定するために以下の精製した 5 種類の *rad52* 変異体を用いた解析を行った。C 末側欠失変異、*rad52*Δ238-504。N 末側欠失変異、*rad52*Δ34-237。N 末側 DNA 結合欠損変異、

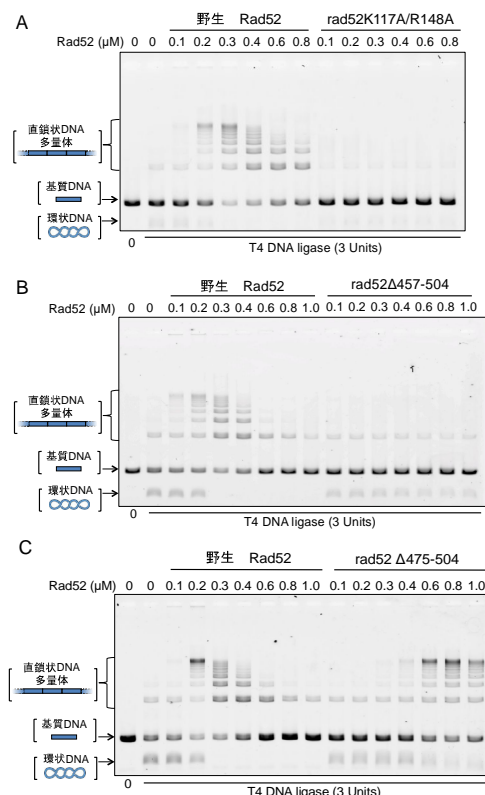


図 1、Rad52 による DNA 末端結合の促進と直鎖状 DNA 多量体形成。A、*rad52*K117/R148。B、*rad52* 457-504。C、*rad52* 475-504。

rad52K117A/R148A。C末側DNA結合欠損変異、rad52Δ457-504及びrad52Δ475-504。

この課題の遂行過程で、C末側のDNA結合領域は457-504アミノ酸領域にあることを特定した。さらに、相同組換えにおいてRad51による相同対合活性の促進には、Rad52の475-504アミノ酸領域が重要であり、欠失変異rad52Δ475-504により促進活性が完全に消失することを突き止めた。

Rad52によるDNA末端結合促進と直鎖状DNA多量体形成について、N末側側 (rad52Δ457-504) またはC末側側 (rad52Δ238-504) だけでは不十分であり両方に必要な領域が含まれていることが示された。さらにRad52のN末側DNA結合部位変異 (rad52K117A/R148A) またはC末側DNA結合領域欠損 (rad52Δ457-504) では活性が顕著に低下し、N末側とC末側側の両方のDNA結合部位が重要な役割をしていることが示された (図1A、B)。一方、rad52Δ475-504では活性が部分的にあり (図1C)、「相同組換えにおけるRad51の相同対合活性の促進には、rad52の475-504アミノ酸領域が重要である」という結論とは異なる結果となった。一方、これらの解析したrad52変異にはDNA末端結合と直鎖状DNA多量体形成を分離するような変異はなく、反応条件の検討を通して、常に連動していることから、両者は関連している反応であると考えられる。

(3) Rad51とRad52による直鎖状DNA多量体の形成の活性に関連性はあるのか。

Rad51と大腸菌RecAは、Rad52と同様にDNAリガーゼによる直鎖状DNAの末端結合を促進し、直鎖状DNAの多量体を形成する。Rad52による反応は、マグネシウムのみでDNA末端結合の促進と直鎖状DNA多量体形成を示すが、Rad51とRecAではPEG (ポリエチレングリコール) が必要であり、Rad51ではマグネシウムに加えてカルシウムとADPが必要であった。Rad52の至適濃度は狭い領域にあり過剰量では阻害され (図1)、至適濃度がある点においてはRad51、RecAと同様であった。Rad51とRecAではPEGが効果的に働くため、Rad52についてもPEGの効果を検討したが、DNAリガーゼによるDNA末端の結合活性は促進されたが、Rad52による促進効果の上昇は認められなかった。Rad51とRad52は複合体を形成するため、活性のさらなる促進を期待し、Rad51とRad52の両方の存在下で様々な反応条件を検討した。しかしDNA末端結合の促進効果において、Rad51とRad52の両者の存在下で活性はむしろ低下した。Rad51とRad52はDNA末端結合の促進活性を互いに打ち消し合っているようであり、これは異なる反応機構によるためであると考えられる。Rad51-Rad52複合体としてDNA末端結合を促進する条件がまだ見つかっていない可能性も残っているが、細胞内での相同組換えではRad52単独で働く経路があり、DNA末端結合でもRad51と相互作用せずに単独で機能していることも考えられる。試験管内でのRad52とRad51の共存下でのDNA末端結合の解析はここで停止し、Rad52単独で非相同末端結合に働いている可能性を細胞内で解析する実験へと移行した。

(4) 出芽酵母内での非相同末端結合に、DNAリガーゼによるDNA末端結合のRad52による促進が関与しているのか。

Rad52の非相同末端結合への関与には、酵母細胞内での解析が必要である。そのためにURA3とLEU2遺伝子をもつプラスミドDNAのURA3内の一箇所で切断した直鎖状DNAを酵母に導入して、非相同末端結合により環状になる効率を野生型株とrad52欠失株で観察する系の構築を行った。まずプラスミドDNAのURA3遺伝子と染色体ゲノムのURA3遺伝子の間で相同組換えが生じないように、プラスミドDNA上のURA3遺伝子と相同性のある領域を染色体ゲノム上から全て除去しHIS3遺伝子に置換したura3遺伝子欠失株 (ura3::HIS3) を作成した。しかし、作成したura3::HIS3株は極めて生育が悪く、非相同末端結合の解析が難しいと判断し、計画変更を余儀無くされた。

別の方法として、LEU2遺伝子のみを持つプラスミドDNAを用い、大腸菌由来のDNA配列内で制限酵素 (PstI) 切断により直鎖状にして、leu2欠損株を形質転換した。プラスミドDNAが非相同末端結合により環状となれば酵母細胞内で保持され、ロイシン非要求性となる。RAD52野生型株とrad52欠失株のそれぞれに直鎖状プラスミドDNAを導入し、ロイシン非要求性形質転換体 (Leu+) の形成率を調べた。rad52欠失株でのLeu+の形成率は野生型株の1/4に低下し、Rad52が非相同末端結合に関与していることが示された (図2)。

直鎖状プラスミドDNAがゲノム上に組み込まれてLeu+となった可能性 (例えば、ゲノムDNA上のleu2遺伝子とプラスミドDNA上のLEU2遺伝子の間での相同組換え) を考え、複製開始点を持たないプラスミドDNAを用いたLeu+形質転換体の形成率を測定した。その結果、RAD52野生型株における直鎖状DNAのゲノムへの取り込みは形質転換体全体の約0.4%であった。このことからLeu+形質転換体の大部分は非相同末端結合により直鎖状プラスミドDNAが環状になったことによるものであるといえる。またLeu+形質転換体からプラスミドDNAを回収して解析をした結果、プラスミドは95%以上が正確に結合され (PstIで再切断可能)、rad52欠失株と野生型株で差はなかった。

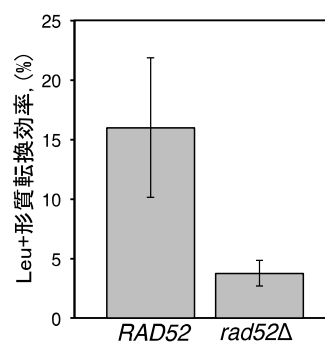


図2、LEU2遺伝子を持つ直鎖状DNAを用いたロイシン要求性出芽酵母の形質転換効率

$$\frac{\text{直鎖状DNAを用いたLeu+コロニー数}}{\text{環状DNAを用いたLeu+コロニー数}} \times 100$$

試験管内での実験でDNA末端結合欠損を示したrad52のDNA結合部位変異 (K117A/R148AとΔ457-504) の影響を解析することは期間内にできなかった。現在、rad52欠失株の染色体ゲノム上のrad52遺伝子欠失領域 (*rad52::URA3*) を*rad52Δ457-504*に置換する実験に取り組んでいる。

引用文献

- Naoto Arai, Wataru Kagawa, Kengo Saito, Yoshinori Shingu, Tsutomu Mikawa, Hitoshi Kurumizaka, Takehiko Shibata: “Vital roles of the second DNA binding site of Rad52 in yeast homologous recombination” J. Biol. Chem., 286, 17607-17617, 2011.
- Seong, C., Sehorn, M. G., Plate, I., Shi, I., Song, B., Chi, P., Mortensen, U., Sung, P., and Krejci, L. “Molecular Anatomy of the Recombination Mediator Function of *Saccharomyces cerevisiae* Rad52.” J. Biol. Chem. 283, 12166-12174, 2008.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Naoto Konomura, Naoto Arai, Takeshi Shinohara, Jun Kobayashi, Wakana Iwasaki, Shukuko Ikawa, Kohji Kusano and Takehiko Shibata “Rad51 and RecA juxtapose dsDNA ends ready for DNA ligase-catalyzed end-joining under recombinase-suppressive conditions” Nucleic acids Research, 査読あり, 45, 337-352, 2017.

[学会発表](計 12 件)

栗原正樹、小野文靖、金井皓一郎、新井直人「出芽酵母 Rad52 の C 末端 DNA 結合領域の機能」第 41 回日本分子生物学会年会、パシフィック横浜、2018 年 11 月 30 日

濱田翔太、崎山大輝、新井直人「Rad52 による DNA 分子間の末端結合の促進」第 41 回日本分子生物学会年会、パシフィック横浜、2018 年 11 月 30 日

押田博道、大谷直也、井出舞美、新井直人「Rad51 重合体形成の欠損変異の解析」第 41 回日本分子生物学会年会、パシフィック横浜、2018 年 11 月 30 日

Takeshi Shinohara, Naoto Arai, Yukari iikura, Kayo Suzuki-Nagata, Takehiko Shibata, Tsutomu Mikawa “Minimal functional unit of RecA for homologous pairing is dimer” The 11th 3R&3C Symposium, Kanazawa, Japan, 12-16th of November, 2018

柴田武彦、新井直人、此村直人、篠原昶、廣田耕志、美川務「RecA/Rad51 によるゲノム維持の分子基盤」第 35 回染色体ワークショップ・第 16 回核ダイナミクス研究会合同開催、グリーンホテル三ヶ根 (愛知県西尾市東幡豆町入会山 1-287) 2017 年 12 月 20 日

小林 純、柴田武彦、新井直人「出芽酵母 Rad51-Rad52 共同作用による相同 DNA 対合での DNA 結合の分担」2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) 第 39 回日本分子生物学会年会 第 90 回日本生化学会大会合同年会、神戸ポートアイランド、2017 年 12 月 6 日

柴田武彦、新井直人、篠原昶、廣田耕志、美川務「RecA/Rad51 による正確な DNA 修復維持機構」第 24 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、長良川国際会議場 (岐阜市長良福光) 2017 年 11 月 27-29 日

此村直人、新井直人、小林純、篠原昶、岩崎わかな、柴田武彦「RecA による E. coli/T4 DNA Ligase の DNA 末端連結活性促進と反応産物の生化学的解析」第 34 回染色体ワークショップ・第 15 回核ダイナミクス研究会合同開催、千葉県木更津市かずさアカデミアホール、2017 年 1 月 11 日

小野文靖、金井皓一郎、新井直人「出芽酵母 Rad52 の C 末端側 DNA 結合部位の解析」第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 12 月 1 日。

此村直人、新井直人、古久保哲朗、柴田武彦「ATP/ADP 結合型 RecA による E. coli/T4 DNA Ligase の DNA 末端結合活性促進の生化学的特性」第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日。

小林純、此村直人、柴田武彦、新井直人「直鎖状二重鎖 DNA 多量体形成促進における Rad51 の DNA 結合の必要性」第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日。

田辺真太郎、新宮良宣、美川務、柴田武彦、新井直人「出芽酵母 Rad51 の N 末端領域の機能について」第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日。

6 . 研究組織

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。