

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570168
 研究課題名（和文）酵母の遺伝子相同組換えに関与する Rad55-Rad57 蛋白複合体の生化学的解析
 研究課題名（英文）Biochemical analysis of homologous recombination proteins Rad55-Rad57 of budding yeast.
 研究代表者
 新井 直人（ARAI NAOTO）
 日本大学・生物資源科学部・講師
 研究者番号：70297795

研究成果の概要: 遺伝子相同組換えの相同な DNA 鎖の検索と対合の過程(相同対合)には、Rad51、Rad52、Rad55、Rad57 蛋白が関与している。Rad55 と Rad57 を大腸菌で発現し可溶化条件を確立し、Rad55 を精製した。Rad55 は一本鎖 DNA にのみ結合した。Rad51 の相同対合は Rad55 により促進された。また、Rad51-Rad52 による相同対合活性も Rad55 によって促進された。一方、Rad51 と Rad52 による相同対合の詳細な解析から Rad52 は二本鎖 DNA への結合に関与していることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：相同組換え、酵母、DNA、遺伝子、核酸、相同対合

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の相同組換えは、DNA への傷害により生じた、または減数分裂の過程で生物自らの制御によって生じた二本鎖 DNA の切断により開始される。その DNA の切断末端に生じた一本鎖 DNA と塩基配列の相同な部位が、切断されていない二本鎖 DNA から探し出され、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の間で対合体を形成する。この過程を相同対合といい、“D-loop”と呼ばれる構造を形成する。出芽酵母ではこの相同対合過程に複数の蛋白質が関与している。Rad51 は DNA の相同性検索に関与し、相同対合の中心的な役割を果たしている。Rad52 は、遺伝学的解析から最も重要である

とされ、Rad51 と複合体を形成して D-loop の形成を促進する。また Rad55 は Rad57 と Rad51 の両蛋白と複合体を形成することができる。そして Rad51 と Rad52 の両者の存在下により D-loop 形成が効率よく行われることを報告した。一方 Rad55 と Rad57 は相同対合に必要なであるがその機能は十分には明らかにされていない。

2. 研究の目的

- (1) Rad55 と Rad57 の精製方法の確立。
- (2) Rad55 と Rad57 の DNA 結合性の解析。
- (3) Rad51 を一本鎖 DNA へ優先的に結合させる効果についての解析

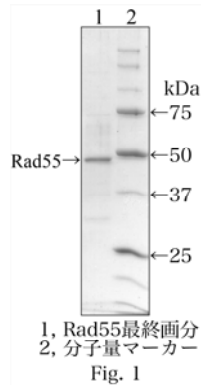
(4) Rad51、Rad52、Rad55、Rad57 の D-loop 形成の解析。

3. 研究の方法

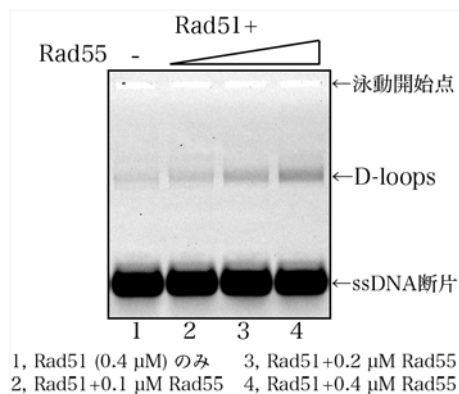
- (1) Rad55 と Rad57 を大腸菌内で発現し、カラムクロマトによる精製。
- (2) 精製した蛋白の DNA 結合性をゲルシフト法により解析。
- (3) D-loop アッセー系を用いた試験管内での相同対合を解析。

4. 研究成果

(1) Rad51 と Rad52 はすでに精製が完了しているため、Rad55 と Rad57 を大腸菌内で発現、精製することに着手した。両蛋白は通常の発現条件では不溶化するが、*trxB/gor* 変異をもつ大腸菌株でチオレドキシンを多量に共発現し低温で培養することにより可溶化が可能となった。しかし、Rad55 と Rad57 の両蛋白を同じ菌体内で同時に発現すると発現量が共に減少し、実験に必要な量の複合体の精製は極めて困難であった。そこで Rad55 蛋白と Rad57 蛋白を別々の菌体内で発現・精製した後、両蛋白を混合し複合体を形成させる計画に切り替えた。(His)₆-tag を付加した Rad55 蛋白を発現誘導した菌体から、硫酸分画、各種カラムクロマトにより SDS-PAGE (CBB染色) でほぼ単一のバンドにまで精製した (Fig. 1)。



(2) 精製した Rad55 についてゲルシフト法により DNA 結合性を調べた。Rad55 は一本鎖 DNA へ結合したが、二本鎖 DNA への結合は見られなかった。Rad55 と Rad51 の両方の存在下では、Rad51 単独と同様に一本鎖と二本鎖 DNA の両方に結合し、Rad55 の添加による結合促進や、Rad51 の一本鎖 DNA への優先的な結合は見られなかった。続いて試験管内での相同対合を解析するために、超らせん構造をもつ



二本鎖 DNA (6,457 bp) と塩基配列の同じ一本鎖 DNA 断片 (259 b) を基質 DNA とした D-loop アッセー系を用いた。Rad51 単独では D-loop 形成は検出できなかったのに対し、Rad55 を加えると D-loop 形成が見られた (Fig. 2)。しかし Rad51-Rad52 複合体による D-loop 形成の 1/10 程度の効率であった。

(3) Rad51-Rad52 複合体による D-loop 形成において、これまでの研究から Rad52 は一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の両方に結合し、D-loop 形成には二本鎖 DNA への結合が関連していることが推測されていた。さらに詳細な解析をするために Rad52 蛋白の二本鎖 DNA 結合に関与するアミノ酸リジン-117 とアルギニン-148 (Kagawa *et al.* J. Biol. Chem. **283**, 24264-24273, 2008) の両方をアラニン (K117A/R148A) またはアスパラギン酸 (K117D/R148D) に置換した変異 Rad52 を作成し精製した。それに加えて、Rad51 の DNA 結合欠損を示す変異 Rad51 (Rad51K191A) も作成し精製した。Rad52 は K117A/Rad148A 変異と K117D/Rad148D 変異の両方で同様に二本鎖 DNA への結合が弱くなっていたが、一本鎖 DNA への結合には影響なかった。Rad51K191A は、一本鎖と二本鎖のどちらの DNA にも結合しなかった。Rad51-Rad52 複合体による D-loop 形成は Rad52 の K117A/Rad148A 変異または K117D/Rad148D 変異により 1/6 以下に低下し、Rad51 の K191A 変異では D-loop は全く形成されなかった (Fig. 3)。Rad51-Rad52 複合体による D-loop 形成反応には、Rad51 と Rad52 が 1:2 の濃度比で複合体を形成し、一本鎖 DNA に結合した後、二本鎖 DNA に結合することが必須である。変異蛋白を用いてこれ

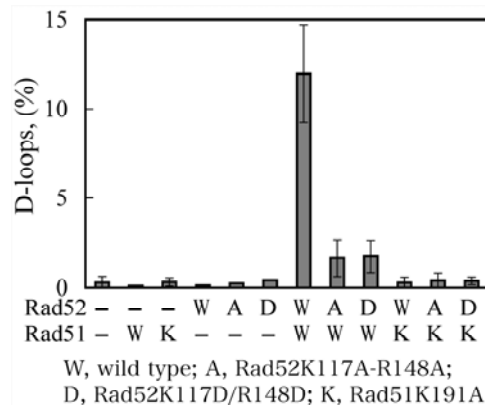


Fig. 3 Rad51 と Rad52 変異蛋白による D-loop 形成の各過程について解析を行った。その結果、Rad52 の K117A/Rad148A 変異または K117D/Rad148D 変異は、Rad51 と Rad52 の複合体形成と一本鎖 DNA に結合には影響しなかったが、その後の二本鎖 DNA への結合が低下していた (Fig. 4, ゲルシフトアッセー)。一方、Rad51 の K191A 変異では Rad51-Rad52 蛋白複合体の形成、一本鎖 DNA に結合、二本

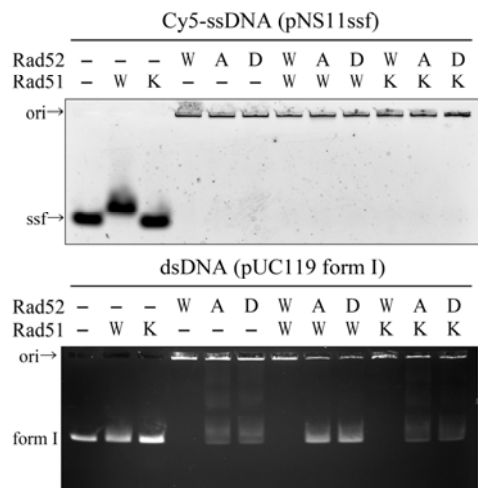


Fig. 4 Rad52変異蛋白によるssDNA-dsDNA複合体形成への影響

鎖 DNA への結合には影響がなかったが、一本鎖 DNA-Rad51-Rad52-二本鎖 DNA からなる複体内で相同性検索のために生じる二本鎖 DNA の巻き戻し (untwisting) が見られなかった。このように Rad52 は一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の蛋白を介した結合に関与し、Rad51 は一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の間の相同性検索に関与していた (J. Biol. Chem. 投稿中)。

(4) Rad51、Rad52、Rad55 の三者による D-loop 形成において、それぞれの蛋白を反応系に加える順序が活性に影響していた。そして一本鎖 DNA に Rad51 を結合させた後、Rad55 を加え、続いて Rad52、最後に二本鎖 DNA を加えたとき、Rad51 と Rad52 による D-loop 形成を Rad55 が効率良く促進した (Fig. 5)。

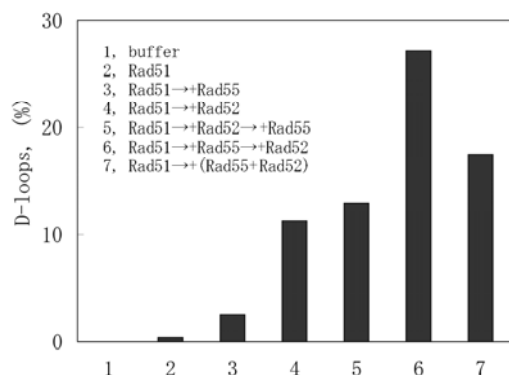


Fig. 5, Rad52-Rad51-Rad52蛋白によるD-loop形成一方、反応系に加える順序を変えて Rad52 を先に加えてから Rad55 を加えたときは、Rad55 による D-loop 形成の促進は見られなかった。これらのことは Rad52 より先に Rad55 が Rad51 と結合することの必要性を示唆する。

本研究から相同対合において Rad51 が相同性認識という中心的な役割をし、Rad52 は二本鎖 DNA への結合に働きかけて Rad51 による D-loop 形成を促進していることがわかった。その一方で Rad55 による Rad51 による D-loop 形成の促進効果は Rad55 が二本鎖 DNA に結合しないこと、Rad52 の存在下でも促進することから Rad52 の促進効果とは異なる機構であ

ると考えられる。今後 Rad57 の添加により新たな効果が期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 新井直人、香川亘、横山茂之、胡桃坂仁志、柴田武彦、「出芽酵母 Rad52-Rad51 複合体による D-loop 形成における Rad52 の二本鎖 DNA への結合の影響」、日本分子生物学会・日本生化学会合同大会、2008 年 12 月 10 日、神戸国際会議場。
- ② 新井直人、柴田武彦、「出芽酵母 Rad52-Rad51 蛋白質複合体における Rad52 の機能」、組換え・染色体再編成ワークショップ、2008 年 3 月 4 日、ラフォーレ修善寺研修センター。
- ③ 新井直人、柴田武彦、「出芽酵母 Rad52-Rad51 蛋白質複合体による D-loop 形成における Rad52 の役割」、文部科学省特定領域研究「染色体サイクルの制御ネットワーク」公開領域会議、2008 年 1 月 8 日、東京大学 弥生講堂。
- ④ 新井直人、「出芽酵母の遺伝子相同対合に関与する蛋白の役割」、日本分子生物学会・日本生化学会合同大会、2007 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 直人 (ARAI NAOTO)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号: 70297795

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし