

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：32685

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12328

研究課題名(和文) ゲノム反復配列上で起こる二重鎖切断修復の分子機構の解明

研究課題名(英文) Mechanistic studies of double-strand break repair at repeated sequences in the genome

研究代表者

香川 亘 (Kagawa, Wataru)

明星大学・理工学部・教授

研究者番号：70415123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNA二重鎖切断は染色体の分断を意味する重篤な損傷であり、細胞にはこれを修復するための機構が複数種類存在する。本研究では、ヒトゲノムの大半を占める反復配列で生じた二重鎖切断を修復するSSA(single-strand annealing)の分子機構に着目した。細胞内でのSSAを検出する実験系と、試験管内でSSAを再現した実験系を用い、ミスマッチ塩基対やRAD52の発現量がSSAの効率に及ぼす影響を解析した。その結果、RAD52が過剰に存在すると正確性の低いSSAが促進されることがわかった。さらに、RPAによって正確性の低いアニーリング反応が抑制されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RAD52はがん細胞において過剰発現し、がんの発症と進行に関わっていることが指摘されている。抗がん剤の開発を目的としたRAD52の阻害剤の探索は世界的に行われているが、RAD52の分子レベルでの機能は未だ不明な点が多い。本研究で明らかにしたRAD52による不正確なDNAアニーリング反応は、がん細胞におけるゲノム不安定性と関係している可能性が考えられ、このメカニズムの理解は学術的に意義があるだけでなく、がん治療開発の観点からも意義深い。

研究成果の概要(英文)：DNA double-strand break is the most lethal form of DNA damage, and cells have multiple mechanisms to repair it. In the present study, we focused on the molecular mechanism of single-strand annealing (SSA), which repairs double-strand breaks that occur within repetitive sequences of the genome. Using a GFP reporter assay and a biochemical assay, we examined whether mismatch base pairs and altered RAD52 expression levels have an effect on the efficiencies of SSA and DNA annealing. We found that over-expression of RAD52 leads to inaccurate SSA. Furthermore, we found that inaccurate DNA annealing reaction was suppressed in the presence of RPA.

研究分野：構造生物学, 生化学

キーワード：DNA二重鎖切断修復 DNA修復経路 single-strand annealing 反復配列 ミスマッチ塩基対 DNAアニーリング反応 RAD52

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの約 50%は、繰り返し配列である。繰り返し配列が密集するゲノム領域で生じた DNA 二重鎖切断損傷は、RAD51 タンパク質に依存した DNA 修復経路(相同組換え修復),または RAD52 タンパク質に依存した DNA 修復経路(Single-strand annealing: SSA)によって修復されると考えられている。RAD51 に依存した相同組換え修復は一般的に正確性が高いと言われているが、繰り返し配列上では、間違った場所で DNA 鎖交換反応を行ってしまう危険性があり、修復後の染色体に重大な欠失、重複、逆位、転座等の染色体異常が生じる可能性がある。一方、RAD52 に依存した SSA は、切断によって生じた末端同士をアニーリング反応によってつなぐことから、大規模な染色体異常は発生しないことが考えられる。これらの DNA 修復経路の使い分けがどのようになされているのかは不明であり、それを明らかにすることはゲノムの安定維持機構を理解する上で重要である。

RAD52 は RAD51 より先に DNA 二重鎖切断領域に集積することが報告されている。そのため、DNA 二重鎖切断が SSA 経路によって修復されるのか、それとも相同組換え修復経路によって修復されるのかの選択において、RAD52 が関与することが考えられる。RAD52 が触媒する DNA アニーリング反応の分子機構は、研究代表者らが明らかにした RAD52 と単鎖 DNA との複合体の結晶構造(Saotome et al., iScience, 2018)により、明らかになりつつある。その一方で、ゲノム上の繰り返し配列はリピート間で 100%相同ではないことが多く、そこで生じた DNA 二重鎖切断が SSA によって修復される際にミスマッチ塩基対が形成される問題がある。塩基対のミスマッチは二重鎖 DNA を不安定化するため、SSA に対して阻害的にはたらくことが考えられる。しかし、RAD52 が触媒する DNA アニーリング反応において、ミスマッチ塩基対の形成がどのような影響を及ぼすのかは解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、RAD52 を中心とした解析によって DNA 二重鎖切断修復において SSA 修復経路が選択される分子機構を明らかにすることを目的とした。そのために、RAD52 が触媒する DNA アニーリング反応において、ミスマッチ塩基対の形成が反応の効率にどのような影響を与えるのかを *in vivo* および *in vitro* の実験系を用いて明らかにすることを旨とした。さらに、RAD52 が DNA アニーリング反応においてミスマッチ塩基対の形成を許容する構造基盤を明らかにするために、全長のヒト RAD52 を用いたクライオ電子顕微鏡構造解析を行なった。

3. 研究の方法

RAD52 依存的 DNA アニーリング反応を *in vivo* および *in vitro* で解析するために、ヒト培養細胞内で SSA を検出する GFP レポーターアッセイ系と、試験管内で RAD52 が触媒する DNA アニーリング反応を検出するゲルシフトアッセイ系を構築した。それぞれの実験系において、ミスマッチ塩基対の影響を調べるために、ミスマッチの頻度が異なる複数種類の DNA 基質を用いて検討を行なった。さらに、*in vivo* の解析では、RAD52 を過剰発現させたときの影響を調べた。*In vitro* の解析では、様々なミスマッチ基質に対する RAD52 の DNA アニーリング触媒効率を比較し、同様の比較を DNA アニーリング反応において RAD52 と直接相互作用し、協同的にはたらくと考えられている replication protein A (RPA) 存在下でも行なった。また、RAD52 を含む DNA アニーリング中間体の立体構造を明らかにするために、RAD52 をリコンビナントタンパク質として大量調製し、RAD52 単体および DNA と複合体にした RAD52 のクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 細胞内アニーリング反応系を用いたミスマッチ塩基対の影響の解析

ヒト培養細胞内で SSA を検出するために用いる GFP レポータープラスミドの塩基配列を改変し、SSA による DNA 修復の際にミスマッチ塩基対が周期的に生じるようにデザインした。このプラスミドを用い、野生型 RAD52 が発現するヒト培養細胞における SSA の効率を調べたところ、ミスマッチ塩基対が生じないプラスミドと比べて SSA が顕著に低下していることがわかった。一方、RAD52 を過剰発現させた場合、ミスマッチ塩基対が生じないレポータープラスミドでは SSA 効率の上昇がほとんど見られなかったのに対し、ミスマッチ塩基対が生じるプラスミドでは SSA 効

率の顕著な上昇が見られた。このことから、RAD52 が過剰に存在すると不正確な DNA 修復が促進されることが考えられた。

(2) 試験管内アニーリング反応系を用いたミスマッチの影響の解析

試験管内アニーリング反応系を構築し、ミスマッチ塩基対が生じる DNA 基質 (ssDNA) を用いて RAD52 の DNA アニーリング触媒効率を調べた。その結果、RAD52 が触媒するアニーリング反応においてミスマッチ塩基対の形成が許容されることがわかった。RAD52 の触媒効率はミスマッチ塩基対が出現する頻度によって異なったが、高頻度にミスマッチ塩基対が出現する場合においても触媒効率の大きな低下は見られなかった。一方、同様の実験を RPA 存在下で行なったところ、ミスマッチ塩基対の頻度の上昇に伴い、RAD52 の DNA アニーリング触媒効率の低下が見られた。以上の結果から RPA によって不正確な DNA アニーリング反応が抑制されることがわかった。

(3) RAD52 が触媒する DNA アニーリング反応の構造生物学的解析

RAD52 の DNA アニーリング触媒活性に重要な領域は N 末端側半分であり、これまで RAD52 の N 末端側半分の領域を含む断片の X 線結晶構造に基づく詳細な解析から RAD52 の作用機構モデルが提唱されている。しかし、このモデルは過去に報告されている酢酸ウラニルで染色された全長 RAD52 の低解像度の電子顕微鏡構造と一致しない。そのため、RAD52 の詳しい作用機序は未だ不明瞭である。そこで本研究では、クライオ電子顕微鏡法を用い、全長 RAD52 の立体構造を解析した。得られた全長 RAD52 の立体構造はこれまで報告されている全長 RAD52 のそれよりも分解能が高く、全長 RAD52 が形成する多量体リング構造の詳細が明らかになった。RAD52 の N 末端側半分の領域を含む断片の結晶構造と詳細な構造比較を行ったところ、リング構造の形成に関わる領域と DNA 結合部位の構造は、全長と欠失変異体の間で類似していることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Onaka AT, Su J, Katahira Y, Tang C, Zafar F, Aoki K, Kagawa W, Niki H, Iwasaki H, Nakagawa T.	4. 巻 3
2. 論文標題 DNA replication machinery prevents Rad52-dependent single-strand annealing that leads to gross chromosomal rearrangements at centromeres.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-0934-0	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 -

1. 著者名 Yuzurihara H, Aizawa Y, Saotome M, Ichikawa Y, Yokoyama H, Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kurumizaka H, Kagawa W.	4. 巻 39
2. 論文標題 Improved methods for preparing the telomere tethering complex Bqt1-Bqt2 for structural studies.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein J.	6. 最初と最後の頁 174,181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10930-020-09887-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasuda T, Takizawa K, Ui A, Hama M, Kagawa W, Sugasawa K, Tajima K.	4. 巻 26
2. 論文標題 Human SIRT2 and SIRT3 deacetylases function in DNA homologous recombinational repair	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 328,335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12842	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荻野 駿、五月女 美香、香川 亘
2. 発表標題 RAD52・RPA・DNA三者複合体のin vitro再構成
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土屋 怜平、 五月女 美香、 荻野 駿、 鴨井 一輝、 香川 亘
2. 発表標題 RAD52が触媒するRNAに依存したDNA修復の生化学的解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鴨井 一輝、 五月女 美香、 香川 亘
2. 発表標題 ヒトRAD52のD-loop形成活性
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五月女美香, 相澤由有希, 香川亘
2. 発表標題 RAD52が触媒するアニーリング反応において許容されるミス マッチ塩基対の形成
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻野駿, 五月女美香, 鴨井一輝, 滝沢由政, 胡桃坂仁志, 香川亘
2. 発表標題 DNA修復タンパク質RAD52のクライオ電子顕微鏡解析
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鴨井一輝, 香川亘
2. 発表標題 ヒトRAD52による液-液相分離
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五月女美香, 中島菜花子, 相澤由有希, 木下千明, 安田武嗣, 香川亘
2. 発表標題 RAD52タンパク質が触媒するDNA二重鎖切断修復の正確性
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋怜平, 五月女美香, 木下千明, 鴨井一輝, 荻野駿, 香川亘
2. 発表標題 DNA修復におけるRAD52のRNA上での機能の生化学的解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下千明, 滝沢由政, 五月女美香, 荻野駿, 胡桃坂仁志, 香川亘
2. 発表標題 DNA修復タンパク質RAD52のクライオ電子顕微鏡構造解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鴨井一輝, 土屋怜平, 香川亘
2. 発表標題 RAD52タンパク質による液滴形成
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋怜平, 五月女美香, 木下千明, 鴨井一輝, 荻野駿, 香川亘
2. 発表標題 RNA-DNA鎖交換触媒反応におけるRAD52 C末端側領域の役割
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021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
研究協力者	五月女 美香 (Saotome Mika)		
研究協力者	胡桃坂 仁志 (Kurumizaka Hitoshi)		
研究協力者	滝沢 由政 (Takizawa Yoshimasa)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------