

論文の内容の要旨

論文題目 Biochemical and structural studies of the human DNA recombination protein Rad52
(ヒト DNA 組換えタンパク質 Rad52 の生化学的および構造生物学的研究)

氏 名 香 川 亘

DNA の二重らせんが切れてしまう二重鎖切断 (Double strand break) と呼ばれる損傷は、細胞にとって致死的である。二重鎖切断は、放射線や抗癌剤などの外的要因に加え、DNA の複製エラーや活性酸素などの内的要因によって引き起こされている。二重鎖切断が修復されずに細胞分裂の段階に入ると、染色体 DNA が正常に分離できなくなり、細胞の癌化の原因となる。生物は、二重鎖切断を修復するために、相同 DNA 組換え (homologous DNA recombination) および非相同 DNA 組換え (non-homologous end joining) の 2 つの修復経路を備えている。非相同組換えは、切断された DNA の末端同士を再結合する機構で、修復される DNA の塩基配列にエラーが導入されるリスクを抱えている。一方、相同 DNA 組換えは、切断された DNA と相同な領域を無傷の染色体から見つけ出し、それを鋳型として正確に二重鎖切断部位を修復することができる。ヒトのゲノムは、約 30 億個の塩基対から構成されているが、この膨大なゲノムを相手に、相同 DNA 組換えは正確にそして速やかに行われる必要がある。

相同 DNA 組換えは、マルチステップな反応である。この反応において、切断を受けた DNA と同じ塩基配列を持った DNA を無傷の染色体の中から見つけ出す「相同的対合反応 (homologous pairing reaction)」が中心的な反応である。原核生物では、この反応を RecA タンパク質が触媒する。一方、RecA の真核ホモログである Rad51 タンパク質は、試験管内で相同的対合活性が RecA に比べ著しく弱いことが最近の研究から分かった。このことは、2 つの可能性を示唆する。ひとつは、Rad51 の活性を補助する因子が存在することである。もうひとつは、Rad51 以外に相同的対合反応を触媒する酵素が存在することである。いずれにしても、真核生物では原核生物に比べてより多くの因子を相同 DNA 組換えにおいて必要とすることが考えられる。

実際、高等真核生物において、遺伝学的な解析から Rad52, Rad54, および Rad51 と 20-30 % の相同性を持つ Rad51 paralogs (Xrcc2, Xrcc3, Rad51B, Rad51C, Rad51D) が相同的対合反応の過

程で働くことが示された。これらのタンパク質の詳細な機能は明らかになっていないが、アミノ酸の配列からは、Rad51 paralogs は RecA の相似体であり、また Rad54 は SNF2 / SWI2 family に属することが分かっている。しかし、Rad52 は、類似したタンパク質がなく、その機能の予測が困難である。そこで今回、Rad52 の生化学

的解析および X 線結晶構造解析を行い、その相同的対合反応における分子機構の解析を行った。

真核生物では、全長型 Rad52 と C 末端側の領域が欠失した短縮型 Rad52 と 2 種類のタンパク質が産生されている。ヒトでは、Rad52 遺伝子から全長型 Rad52 (418 アミノ酸) と N 末端側の領域を含むスプライシングバリエントである短縮型 Rad52 (約 200 アミノ酸) が転写されており、酵母では、短縮型 Rad52 は別の遺伝子 (Rad59) として存在している。われわれは全長型と短縮型 Rad52 の機能を明らかにするために、まずヒトの全長型 Rad52 をリコンビナントタンパク質として大量精製し、このタンパク質の相同的対合活性を調べた。その結果、全長型 Rad52 は、単独で相同的対合反応を触媒することが明らかになった (図 1A)。

次に、その機能ドメインを同定するために、全長型 Rad52 のプロテアーゼによる限定分解を行ったところ、短縮型 Rad52 に対応する N 末端側の 237 アミノ酸領域が、プロテアーゼに耐性であることが分かった。そこで、Rad52₁₋₂₃₇ を全長型 Rad52 と同様にリコンビナントタンパク質として大量精製を行い、相同的対合活性を調べた。その結果、Rad52₁₋₂₃₇ は、全長型 Rad52 と同レベルの相同的対合活性を有することが明らかになった (図 1B)。これらの結果は、短縮型 Rad52 は Rad52 の相同的対合反応の触媒ドメインであり、プロテアーゼに耐性な高次構造を形成することを示した。

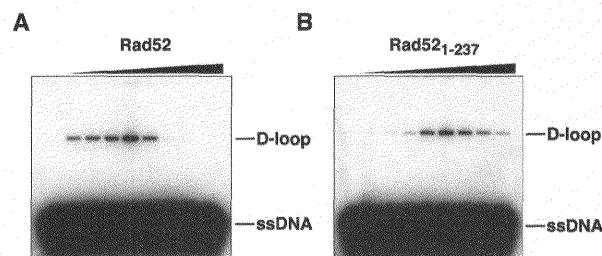


図 1 全長型と短縮型 Rad52 の相同的対合活性。
A:Rad52 の相同的対合活性。
B:Rad52₁₋₂₃₇ の相同的対合活性。

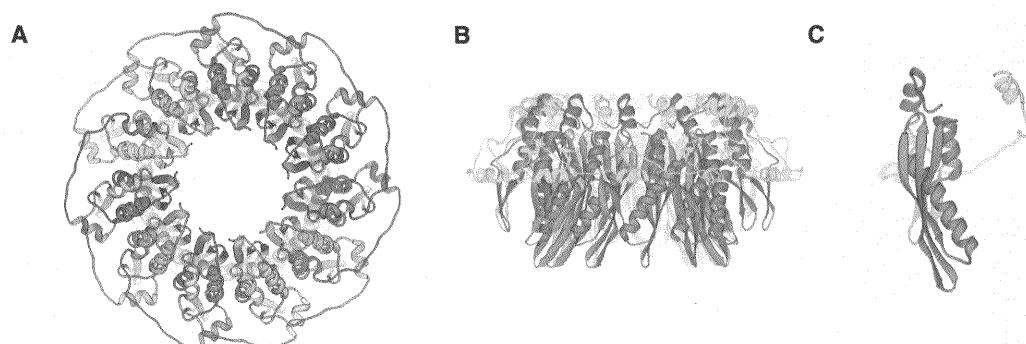


図 2 Rad52₁₋₂₁₂ の構造。

A:Domed cap の上から見た Rad52₁₋₂₁₂ の 11 量体構造。B:Stem (灰色) と domed cap (青色と赤色) を持つ Rad52₁₋₂₁₂。
C:回転対称軸から見た Rad52₁₋₂₁₂ 単体の構造。

Rad52 の相同的対合ドメインの立体構造を決定するために、限定分解より同定された

Rad52₁₋₂₃₇ の結晶化を行い、シンクロトロン放射光施設 (SPring-8) にて 6–7 Å 分解能の X 線回折データを得た。さらに高分解能のデータを得るために、相同的対合活性を保持し、C 末端が短縮された Rad52 の変異体 (Rad52₁₋₂₁₂) の結晶 (0.3 x 0.2 x 0.1 mm 程度) を作製し、SPring-8 にて、多波長異常分散 (MAD) 法よりその立体構造を 2.85 Å 分解能で決定した。その結果、Rad52₁₋₂₁₂ は、11 分子が集まったリング構造で、分子は回転対称の関係にあることが明らかになった (図 2A)。直径が 120 Å、内径が 25 Å、高さが 65 Å ある Rad52₁₋₂₁₂ のリング構造は、きのこの形に似ており、stem (茎) と domed cap (傘) に対応する領域を持つ (図 2B)。

Stem 領域では、3 本のβストランドと 1 本のαヘリックスからなる β-β-β-αフォールドがリング状に並んでいる (図 2A と 2C)。この領域を形成するアミノ酸残基は、Rad52 の N 末端領域の中でもとりわけよく保存されている。βシートの上部では、βシート間の水素結合によってβバレル構造が形成されていることも分かった。このβバレル構造は、リング構造の安定化に重要であることが考えられる。Stem 構造の上にかぶさる domed cap 領域では、2 本のアンチパラレルβストランドからなるヘアピンループが存在し、このモチーフと stem の間には溝が存在する。

Rad52₁₋₂₁₂ の DNA 結合領域を同定するために、リングの表面電荷を計算したところ、正と負の電荷がはっきり分極していることが分かった (図 3)。リングの上半分の表面は、負または中性の電荷を持つのにに対し、リングの下半分の表面は全体にわたり正の電荷を帯びていた (図 3)。特に、最も強い正の電荷を帯びた領域が、stem とヘアピンループの間にある溝であった。この溝の中には、複数の塩基性アミノ酸残基が側鎖を突き出しており、これらのアミノ酸残基が DNA と直接結合することが予想された。リングの中央に存在する穴は、直径が 25Å あり、二重鎖 DNA を収容できる大きさである。しかし、中央の穴には塩基性アミノ酸が存在しないため、Rad52₁₋₂₁₂ の場合、中央の穴よりむしろ stem の外周に巻きつける形で DNA と結合することが表面電荷の解析から推測された。

そこで、Rad52₁₋₂₁₂ リングのびた表面に存在する塩基性および芳香性アミノ酸残基をアラニンに置換した変異体を作製し、それぞれの変異体について単鎖 DNA 結合活性を調べた。その結果、12 種の変異体のうち 5 種 (R55A, Y65A, K152A, R153A, R156A) は、単鎖 DNA (50 mer) に対する結合活性が著しく低下していることが明らかになった (図 4A)。これらの残基は、いずれも stem とヘアピンループの間にある溝の中に側鎖を突き出しており (図 4B)、DNA 結合に直接関与することが考えられた。これらの結果から、stem とヘアピンループの間にある溝は、DNA

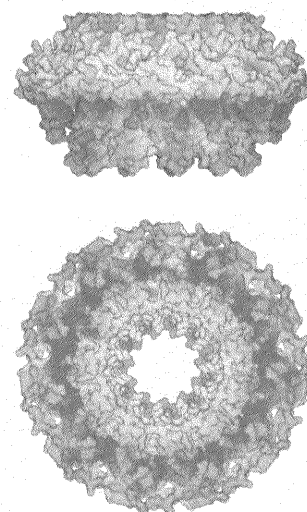


図 3 Rad52₁₋₂₁₂ の表面電荷。正の電荷を赤色、負の電荷を青色で示す (-12 k_BT⁻¹ から 12 k_BT⁻¹)。

結合溝であることが明らかになった。そして短縮型 Rad52 が、DNA 結合溝で stem の外周に DNA を巻きつける形で結合するモデルを提案した (図 4C)。

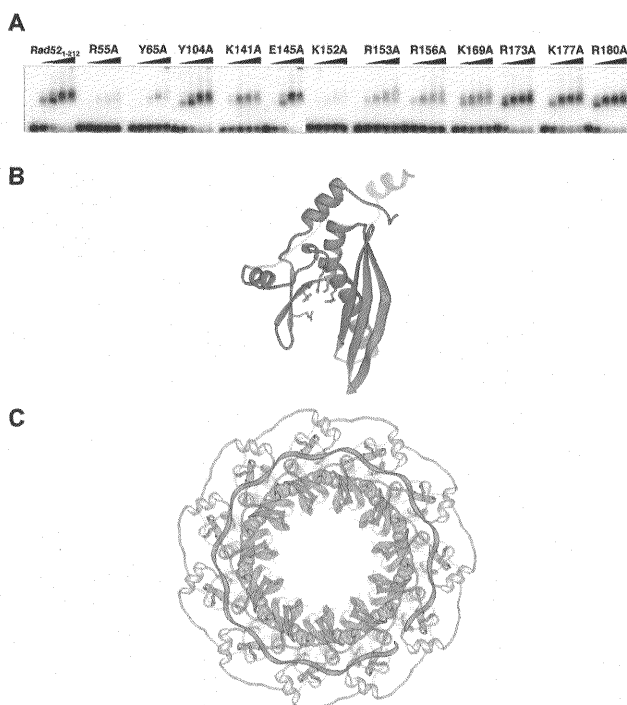


図 4 Rad52₁₋₂₁₂ の DNA 結合領域。
A: Rad52₁₋₂₁₂ 変異体の単鎖 DNA 結合活性。
B: 単鎖 DNA 結合活性に欠損を示したアミノ酸残基の位置。
C: Rad52₁₋₂₁₂ と単鎖 DNA との複合体モデル。単鎖 DNA を赤色のリボンで示す。

短縮型 Rad52 と同様に DNA 結合溝がリングの外周に存在することが推測され、全長型と短縮型の間で同程度の相同的対合活性を示す生化学的解析結果と一致した。

本研究では、Rad52 の相同的対合活性を明らかにし、その触媒ドメインが N 末端側の半分であることが分かった。そしてそのドメインが 11 量体のリング構造を形成することを合わせて明らかにした。このドメインは短縮型 Rad52 に対応し、11 量体リングの外周には塩基性の DNA 結合溝が存在し、リングの外周に巻きつける形で DNA と結合して相同的対合反応を触媒するメカニズムを示した。このメカニズムは、DNA 上でフィラメント構造を形成する RecA や Rad51 と異なると考えられる。興味深いことに、RecA と相同性がない大腸菌の RecT タンパク質は、リング構造を形成し、相同的対合反応を触媒することが報告されている。このことから Rad52 と RecT は、RecA とは異なった相同的対合酵素のクラスを形成している可能性が考えられた。

今回、短縮型 Rad52 が 11 量体構造を形成することを明らかにしたその一方で、全長型 Rad52 は 7 量体構造を形成することが電子顕微鏡解析から推定されている。そこで、2 種のリング構造の存在を確認するために、溶液中の全長型および短縮型 Rad52 の分子量を沈降平衡法により決定した。解析の結果、Rad52₁₋₂₁₂ の溶液中の分子量は 11 量体に対応し、そして、全長型 Rad52 の溶液中の分子量も 7 量体に対応していた。興味深いことに、Rad52₁₋₂₁₂ のリングの直径は、電子顕微鏡解析から推定されている全長型 Rad52 の直径とほぼ同じである (短縮型 : 120 Å, 全長型 : 130 Å)。そこで、Rad52₁₋₂₁₂ の 11 量体構造を使って (図 5A)、全長型 Rad52 のモデル構造を構築した (図 5B)。この 7 量体のモデル構造においても、短

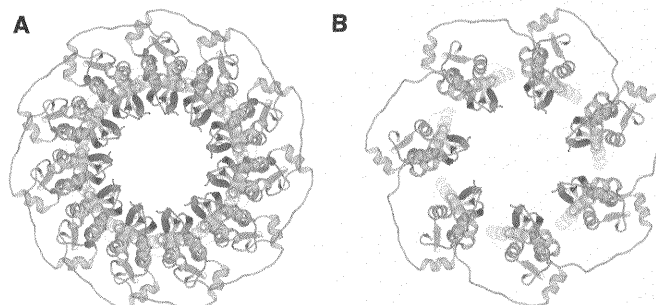


図 5 全長型 Rad52 のモデル構造。
A: Rad52₁₋₂₁₂ の 11 量体構造。 B: Rad52 の 7 量体モデル構造。