3PA137

ヒトRad51-N末端ドメインの高次構造とRad52結合領域の解析

○胡桃坂仁志^{1,2}、相原秀樹^{3,4}、
香川亘^{2,4}、柴田武彦³、横山茂之^{1,2,4} (理研・1ゲノム科学総合研究センター、²細胞情報伝達、³遺伝生化学、⁴東大・院理・生化)

真核生物のRad51は、遺伝的組換えおよびDNA組換え修復において中心的な役割を果たす。このタンパク質は、原核生物RecAのホモログであり、酵母からヒトまで広く保存されている。これまでに、出芽酵母およびヒトのRad51が、RecAと同様に単鎖DNAと二重鎖DNAとを対合させる、いわゆる相同的対合反応を行うことが報告された。その際、RecAとは異なりRad51は、Rad52、Rad54、Rad55、Rad57そしてRPAなどの蛋白質と直接または間接的に相互作用して働くと考えられている。特にRad52は、遺伝的組換えにおいて必須の因子であり、Rad51と直接相互作用することが知られている。今回我々は、出芽酵母Rad51のRad52結合部位に対応する、ヒトRad51(HsRad51)のN末端ドメインの高次構造をNMRによって決定した。そして酵母の場合と異なりこの領域がヒトRad52(HsRad52)と相互作用しないこと、そしてDNAと直接結合することをNMRおよび生化学的方法により見いだした。また、HsRad51のRad52結合領域を同定する目的で、領域指定PCR変異法によりC末端側に点変異を持つ7種類の変異HsRad51を作製した。これらの変異HsRad51を精製してHsRad52結合活性を調べた結果、5種類の変異HsRad51が、HsRad52との結合に欠損を有することが明らかになった。また、これら7種類の変異HsRad51はすべて野生型と同等もしくはそれ以上のDNA結合能を有することも分かった。このことは、ヒトRad51と出芽酵母Rad51は、異なる領域によってそれぞれのRad52と相互作用することを示している。

H. Kurumizaka, H. Aihara, W. Kagawa, T. Shibata, and S. Yokoyama: Functional domains of the human Rad51 protein.

3PA139

RNA二重らせん分子のコンフォメーション解析法の開発とRNA-タンパク質相互作用

○田中好幸、京極好正
(工技院・融合研、福井工大・工学部)

RNAオリゴマー、r(UGAGCUUCGGCUC): (tridecamer)の結晶構造解析 (1.8Å分解能)の結果から、結晶中ではtridecamer二分子が会合し、G-U、C-U塩基対を中央にそれぞれ二つずつ含む二重らせん構造を形成していることを報告してきた。そこで今回、RNA二重らせん分子がどのようなコンフォメーションをとっているかを調べる目的で、他のRNA二重らせん分子の結晶構造も含めて統計解析を行った。ヘリックス構造パラメータ (helical-twist、rise、inclination、x-displacement、y-displacement) およびmajor grooveとminor grooveの幅を各RNAオリゴマーごとに平均値をとり比較したところ、tridecamerの構造パラメータ中、major grooveの幅とinclination (らせん軸に対する塩基対の傾き) が他の結晶構造中のRNA二重らせん分子の値と大きく異なっており、標準的なA-RNA型構造とは異なる構造であることがわかった。またtridecamerの構造パラメータ値はX線繊維回折像によりモデリングされたA'-RNA型のコンフォメーションの値と非常に近く、tridecamerがA'-RNA型構造をとっていることが明らかとなった。その後さらに上記の全構造パラメータを用いてクラスター分析を行ったところ、コンフォメーションの類似性を数値化し分類することが可能であることが示された。このA'-RNA型構造の最大の特徴であるmajor grooveの広さは「二重らせんRNA分子のmajor groove側には蛋白質は結合不可能である」という通説を崩すものである。実際TAR-Tatペプチド複合体等のRNA-タンパク質複合体のNMRによる溶液構造の解析から、bulge-loopを含むRNA二重らせん分子のmajor groove (幅: 8Å) にタンパク質が結合できることが示されている。従ってA'-RNA構造をとっているRNA二重らせん分子のmajor groove幅 (8Å) があればタンパク質がそのmajor grooveに結合できる可能性を示唆している。現在、クラスター分析の手法をさらに改良するために、ヘリックス構造パラメータによらないdifference distance matrixを用いたコンフォメーション解析法の開発にも取り組んでいる。

3PA138

ヒトRad52 タンパク質の機能領域の解析

○香川亘^{1,2}、胡桃坂仁志^{1,3}、柴田武彦⁴、
横山茂之^{1,2,3}

(¹理研・細胞情報伝達、²東大・院理・生化、³理研・GSC、⁴理研・遺伝生化学)

遺伝的組換えは、相同染色体の間で遺伝情報を物理的に交換する DNA の代謝であり、それによって生物は遺伝的な多様性を獲得している。Rad52 は、出芽酵母の放射線感受性株より単離され、広く真核生物において保存されている。近年、ヒト Rad52 (HsRad52)が、大腸菌 RecA のヒトのホモログである HsRad51 と直接結合することが明らかになり、HsRad51 に依存的な組換え反応への HsRad52 の関与が議論されている。HsRad52 の遺伝的組換えにおける役割を理解するためには、その機能領域の解析が重要である。

今回我々は、HsRad52 (418 アミノ酸)のプロテアーゼによる限定分解を行った。その結果、HsRad52 の N 末端領域に、プロテアーゼに耐性なドメインが存在することが明らかになった。これをもとに、C 末端側が欠失した全長の 57%, 59%, 83% の鎖長の欠失変異体を作製し、大量精製を行った。そしてそれら 3 種の欠失変異 HsRad52 の性質を、ゲルろ過、光散乱、そして CD スペクトルにより解析した結果、いずれも野生型と同程度の 2 次構造を保持し、およそ 8 から 14 量体の多量体を形成することが明らかになった。また、これらの欠失変異体の DNA 結合活性を検討したところ、いずれも単鎖 DNA および二重鎖 DNA のどちらにも結合することが分かった。これらのことは、HsRad52 の N 末端領域が、多量体形成および DNA 結合に重要であることを示している。現在、DNA 組換え反応における HsRad52 の役割を明らかにするために、これらの欠失変異 HsRad52 を用いて試験管内組換え反応の解析を行っている。さらに、HsRad52 の N 末端側ドメインの高次構造を解析するために、種々の条件で結晶化を行っている。

W. Kagawa, H. Kurumizaka, T. Shibata, S. Yokoyama: Analysis of the functional domain of the human Rad52 protein.

3PA140

中性子小角散乱法による DNA 結合蛋白質 HU の溶液状態の塩濃度依存性の解析

○米澤康滋、¹藤原悟、²長尾道広 (筑波技短大、¹原研先端基礎、²東大物性研)

原核生物の核様体の主要構成蛋白質である HU は、核様体 DNA に塩基配列非特異的に結合する。HU は DNA に結合することで DNA を湾曲させ、核様体の空間的な凝縮及び転写機構や複製機構などの遺伝子発現に補因子として大きな役割を果たしていることが報告されている。このメカニズムを解明する上で、HU の結合によって DNA 鎖がどのような高次立体構造を形成するかを知ることは本質的に重要な知見である。

HU は DNA と溶液中で比較的緩く結合し解離離脱を繰り返す平衡状態にある。我々は中性子小角散乱のコントラストマッチング法を利用することでこのような状態下での DNA 構造のみを直接決定しようとしている。

前回の年会において HU のコントラストポイントが精度よく決定されたことを報告したが、同時に同溶液条件下で HU が四量体を形成することが明らかとなった。今まで HU が四量体で DNA に結合する可能性や機構は殆ど考察されていない。

今回我々は、HU の溶液状態をより詳細に調べるためにその塩濃度依存性を中性子小角散乱法で解析した。

種々の塩濃度 (50mM, 150mM 及び 300mM NaCl) の HU 溶液 (10mM Imidazole, pH7.0, 100% D₂O) のそれぞれについて HU 濃度 5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml 及び 20mg/ml の溶液からの散乱曲線を温度 12 度において測定した。測定には JAERI の JRR-3M に設置されている東大物性研中性子散乱装置 SANS-U を用いた。

現在各条件における散乱曲線の解析が進行中である。解析結果を基に、HU の溶液状態と HU の DNA 結合様式の関わり及び DNA 湾曲に及ぼす影響などを考察する。

Y. Yonezawa, S. Fujiwara, M. Nagao: A study of the salt concentration dependence of the conformation of the DNA-binding protein HU with small angle neutron scattering.