最近の研究から

ヒト DNA 組換え酵素 Rad52 の 11 量体リング構造

理化学研究所ゲノム科学総合研究センター*, 理化学研究所細胞情報伝達研究室**,

東京大学大学院理学系研究科***

香川 亘****, 胡桃坂仁志***, 横山茂之*****

Wataru KAGAWA, Hitoshi KURUMIZAKA and Shigeyuki YOKOYAMA: Undecameric Ring Structure of the Recombination Protein Rad52

The Rad52 protein and its homologs play critical roles in eukaryotic homologous recombination. In the present study, we have determined the crystal structure of the N-terminal, homologous-pairing domain of Rad52. The structure revealed an undecameric ring that has an exposed groove essential for DNA binding. Amino acid residues inside the groove are directly involved in DNA binding as evidenced by mutational analyses.

1. 相同 DNA 組換えと二重鎖切断修復

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、細胞にとって致命的である。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、やがて細胞は癌化する。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、図 1 で示した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 と同じ塩基配列をもった 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。²⁾ 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わかった。³⁾ このことは、2 つの可能性を示唆する。1 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 1 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

図 1 相同 DNA 組換え反応のモデル図。(A schematic diagram of the recombination reaction.)

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 % の相同性をも

つRad51 paralogs (Xrcc2, Xrcc3, Rad51B, Rad51C, およびRad51D) が相同的対合反応の過程で働くことが示された。^{4),5)} これらのタンパク質の詳細な機能はわかっていないが, 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 に属することがわかっている。しかし, Rad52 には, 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。そこで今回われわれは, Rad52 の 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。

2. Rad52 の相同的対合活性

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) が翻訳されており, 酵母では, 短縮型 Rad52 は別の遺伝子 (Rad59) として存在している。⁶⁾ 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た。そして, 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。

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。そして短縮型 Rad52 に対応する N 末端側の約 200 アミノ酸領域は, プロテアーゼによる限定分解に耐性であることがわかった。そこで, 短縮型 Rad52 に対応する領域 (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があることが明らかになった。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ドメイン構造を形成することを示した。

3. Rad52₁₋₂₁₂ の立体構造

3.1 Rad52₁₋₂₁₂ の結晶化

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, SPring-8 (BL44B2) 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 (Rad52₁₋₂₄₇, Rad52₁₋₂₃₇, Rad52₁₋₂₂₇, Rad52₁₋₂₂₂, Rad52₁₋₂₁₇, Rad52₁₋₂₁₂, Rad52₁₋₂₀₇, Rad52₁₋₂₀₂, Rad52₁₋₁₉₂, Rad52₁₋₁₈₂, および Rad52₁₋₁₇₇) を大量精製した。そして, それぞれの変異体について結晶化を行った。その結果, Rad52₁₋₂₁₂ は, 全長型 Rad52 と同程度の相同的対合活性を示し, また複数の結晶化条件で結晶化した。最終的に, ポリエチレングリコール (PEG) 5,000 と硫酸アンモニウムの存在下で Rad52₁₋₂₁₂ の結晶 (0.3 × 0.2 × 0.1 mm³ 程度) を作製し, SPring-8 の理研構造生物学ビームライン I (BL45XU) を用いて, 多波長異常分散 (MAD) 法より Rad52₁₋₂₁₂ の立体構造を 2.85 Å 分解能で決定した。⁷⁾ その結果, Rad52₁₋₂₁₂ は, 11 分子が集まったリング構造であることが明らかになり, 分子は回転対称の関係にあることがわかった (図 2A)。外径が 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) に対応する領域をもつ (図 2B)。

3.2 Stem の構造

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 2B と図 2C)。この領域を形成するアミノ酸残基 (79 番目から 156 番目) 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。中でも Tyr81, Leu115, Phe158 は Rad52 のホモログの間で保存されていて, モノ

図2 Rad52₁₋₂₁₂ の立体構造. (Structure of Rad52₁₋₂₁₂.) A: Rad52₁₋₂₁₂ の 11 量体構造のトップビュー. B: Rad52₁₋₂₁₂ の 11 量体構造のサイドビュー. C: 回転対称軸から見た Rad52₁₋₂₁₂ 単体の構造.

マー間の疎水相互作用に重要であることがわかった。また 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わかった。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。 β - β - α フォールドは、これまで報告されている RuvC, MuA transposase, RNaseH, retroviral integrase, Xlrbpa などの DNA や RNA 結合タンパク質の構造に見られているが、興味深いことに Rad52₁₋₂₁₂ の β - β - α フォールドは、ほかのフォールドに比べ、明らかに β シートと α ヘリックスが長く、フォールドの表面の大部分が疎水性である。⁸⁾⁻¹¹⁾

3.3 Domed cap の構造

Stem 構造の上にかぶさる domed cap 領域は、28-78 および 157-208 アミノ酸領域によって形成されている。N 末端側の 28-78 アミノ酸領域は、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を形成し、このモチーフと stem の間には溝が存在する。一方、C 末端側の 157-208 アミノ酸領域は、隣接したモノマーと相互作用しており、リング構造の安定化に寄与している。実際、この領域が欠失した変異体 (Rad52₁₋₁₈₂, Rad52₁₋₁₇₇) は不溶性であった。

4. Rad52₁₋₂₁₂ の DNA 結合領域

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わかった (図 3A)。リングの上半分の表面は、負または中性の電荷をもつのにに対し、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 3B)。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 25 Å 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、DNA 結合に直接関与するアミノ酸残基を同定するために、Rad52₁₋₂₁₂ リングの正の電荷を帯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。精製した 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。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、DNA 結合に直接関与することが考えられた。またこれらの残基は、二重鎖 DNA との結合にも重要であることがわかった。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 結合溝であることが明らかになった。そして、

図 3 Rad52₁₋₂₁₂ の表面電荷. (Surface potential of Rad52₁₋₂₁₂.)

図 4 Rad52₁₋₂₁₂ と単鎖 DNA との複合体モデル. (Model structure of the Rad52₁₋₂₁₂-ssDNA complex.) 単鎖 DNA をリボンで示した。

短縮型 Rad52 は DNA 結合溝で stem の外周に DNA を巻きつける形で結合するというモデルを提案した (図 4)。

5. 相同的対合反応のメカニズム

Rad52₁₋₂₁₂ の DNA 結合溝の幅は 10 Å あり、単鎖 DNA と結合するのに都合のいい大きさである。Rad52 が相同的対合反応を触媒するためには、はじめに単鎖 DNA と複合体を形成することが重要であり、二重鎖 DNA と先に複合体を形成した Rad52 は、相同的対合反応を触媒できない。¹²⁾ このことから、Rad52₁₋₂₁₂ に結合した二重鎖 DNA は、DNA 結合溝に単鎖 DNA が結合することを阻害すると考えられた。そこで、Rad52₁₋₂₁₂、単鎖 DNA、二重鎖 DNA の三者複合体 (ternary complex) 形成をゲルシフト法で観察した。その結果、Rad52₁₋₂₁₂ と単鎖 DNA との複合体は、効率よく二重鎖 DNA と結合し、三者複合体を形成することがわかった。一方、Rad52₁₋₂₁₂ と二重鎖 DNA との複合体は、単鎖 DNA とほとんど結合を示さず、三者複合体を形成することができなかった。これらの結果から、相同的対合反応を触媒する際、Rad52₁₋₂₁₂ は先に DNA 結合溝において単鎖 DNA と結合し、この複合体が二重鎖 DNA と結合して相同的対合反応の中間体である三者複合体を形成し、そして相同的対合反応を触媒することが明らかになった。

6. 2 種類の会合状態

今回われわれは、短縮型 Rad52 が 11 量体構造を形成することを明らかにした。一方、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。¹³⁾ 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。沈降平衡法による分子量の同定は、分子の形に依存しないため、正確に決定することができる。解析の結果、Rad52₁₋₂₁₂ の溶液中の分子量は 260,800 Da で、11 量体に対応し、結晶構造で見られた会合状態と一致した。また、全長型 Rad52 の溶液中の分子量も 320,600 Da と 7 量体に対応した分子量であった。

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)。¹³⁾ そこで、Rad52₁₋₂₁₂ の 11 量体構造を使って (図 2A)、全長型 Rad52 のモデル構造を構築した (図 5)。この 7 量体のモデル構造では、モノマー間における stem の β シートの間隔が 10 Å 開き、実際の 7 量体リング構造では、C 末端側の領域がモノマー・モノマーインターフェースの形成に関与することが予想された。このインターフェースの構造の可能性として、11 量体リング構造では、モノマー当たり 3 本の β ストランドが β バレル構造を形成しているが、7 量体構造では、モノマー当たり 5 本の β ストランドがバレル構造の形成にかかわっていることが推測される。また、DNA 結合溝に関しても、モデル構造から、全長型 Rad52 においてもリングの外周に並ぶことが推測された。このことは、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する。

7. おわりに

本研究では、Rad52 の相同的対合ドメインを同定し、そのドメインが 11 量体のリング構造を形成することを明らかにした。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 と異なることが考えられる。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。^{14),15)} 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る。

今回、同程度の相同的対合活性を示す全長型と短縮型 Rad52 は、会合状態が異なることが明らかになった。そして、全長型のモデル構造から、Rad52 の C 末端側の領域は 7 量体リングにおいてモノマー間に位置し、DNA 結合溝に近いことが予想された。これまで全長型 Rad52 の C 末端側の領域は、Rad51 との相互作用に重要であることが報告されている。^{12),16)} また遺伝学的解析から、Rad52 は Rad51 と共同的に機能することが示唆されている。¹⁷⁾ このことから、全長型 Rad52 は、C 末端側の領域で Rad51 と相互作用し、Rad51 に DNA を受け渡しているのかもしれない。

図 5 全長型 Rad52 の 7 量体モデル構造。(A model of the Rad52 heptameric ring.)

方, C末端側の領域が欠失した短縮型Rad52は, Rad51と共同的に働かず, Rad51非依存的な相同組換えにおいて相同的対合反応を触媒しているのかもしれない。今後, 全長型と短縮型の機能的な違いを理解するために, Rad52とRad51の複合体の構造解析が待たれる。

謝 辞

本研究は, 東京大学大学院理学系研究科の横山研究室の濡木 理先生, 石谷隆一郎氏, そして, 理化学研究所・遺伝生化学研究室主任研究員の柴田武彦先生との共同研究として行いました。心より感謝いたします。

文 献

- 1) D. O. Ferguson and F. W. Alt: *Oncogene* **20**, 5572 (2001).
- 2) T. Shibata, C. DasGupta, R. P. Cunningham and C. M. Radding: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1638 (1979).
- 3) H. Kurumizaka, H. Aihara, W. Kagawa, T. Shibata and S. Yokoyama: *J. Mol. Biol.* **291**, 537 (1999).
- 4) J. C. Game: *Semin. Cancer Biol.* **4**, 73 (1993).
- 5) M. Takata, M. S. Sasaki, S. Tachiiri, T. Fukushima, E. Sonoda, D. Schild, L. H. Thompson and S. Takeda: *Mol. Cell Biol.* **21**, 2858 (2001).
- 6) K. Kito, H. Wada, E. T. H. Yeh and T. Kamitani: *Biochim. Biophys. Acta* **1489**, 303 (1999).
- 7) W. Kagawa, H. Kurumizaka, R. Ishitani, S. Fukai, O. Nureki, T. Shibata and S. Yokoyama: *Mol. Cell* **10**, 359 (2002).
- 8) M. Ariyoshi, D. G. Vassilyev, H. Iwasaki, H. Nakamura, H. Shinagawa and K. Morikawa: *Cell* **78**, 1063 (1994).
- 9) P. Rice and K. Mizuuchi: *Cell* **82**, 209 (1995).
- 10) W. Yang and T. A. Steitz: *Structure* **3**, 131 (1995).
- 11) J. M. Ryter and S. C. Schultz: *EMBO J.* **17**, 7505 (1998).
- 12) W. Kagawa, H. Kurumizaka, S. Ikawa, S. Yokoyama and T. Shibata: *J. Biol. Chem.* **276**, 35201 (2001).
- 13) A. Z. Stasiak, E. Larquet, A. Stasiak, S. Muller, A. Engel, E. VanDyck, S. C. West and E. H. Egelman: *Curr. Biol.* **10**, 337 (2000).
- 14) R. J. Thresher, A. M. Makhov, S. D. Hall, R. Kolodner and J. D. Griffith: *J. Mol. Biol.* **254**, 364 (1995).
- 15) P. Noirot and R. D. Kolodner: *J. Biol. Chem.* **273**, 12274 (1998).
- 16) Z. Shen, K. G. Cloud, D. J. Chen and M. S. Park: *J. Biol. Chem.* **271**, 148 (1996).
- 17) G. T. Milne and D. T. Weaver: *Genes & Dev.* **8**, 2552 (1993).

プロフィール

香川 亘 Wataru KAGAWA
 東京大学大学院理学系研究科博士課程3年
 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター(ジュニア・リサーチ・アソシエイト)
 Genomic Sciences Center, RIKEN
 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22
 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan
 TEL. 045-503-9206, FAX. 045-503-9201
 e-mail: wkagawa@jota.gsc.riken.go.jp
 最終学歴: 東京大学大学院理学系研究科博士課程在学中
 専門分野: 生化学, 構造生物学
 現在の研究テーマ: ヒト相同組換えの分子機構に関する研究

胡桃坂仁志 Hitoshi KURUMIZAKA
 理化学研究所細胞情報伝達研究室(研究員)
 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター(研究員)
 Genomic Sciences Center, RIKEN
 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22
 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan
 TEL. 045-503-9206, FAX. 045-503-9201
 e-mail: kurumi@jota.gsc.riken.go.jp
 最終学歴: 埼玉大学大学院理工学研究科博士課程修了(学術博士)
 専門分野: 生化学, 構造生物学
 現在の研究テーマ: ヒト相同組換えの分子機構に関する研究

横山茂之 Shigeyuki YOKOYAMA
 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター(プロジェクトディレクター)
 理化学研究所細胞情報伝達研究室(主任研究員)
 東京大学大学院理学系研究科(教授)
 Genomic Sciences Center, RIKEN
 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22
 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan
 e-mail: yokoyama@biochem.s.u-tokyo.ac.jp
 最終学歴: 東京大学大学院理学系研究科博士課程修了(理学博士)
 専門分野: 生化学, 構造生物学