



2020年6月26日

報道機関各位

東京工業大学
情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所
横浜市立大学
理化学研究所

相同な DNA 配列間で Rad51 リコンビナーゼによる DNA 鎖を交換するしくみを解明 ～ヒトがん抑制の分子機構研究に弾み～

【要点】

- DNA 相同組換えの中心である DNA 鎖交換反応をリアルタイムで観察
- 触媒の Rad51 リコンビナーゼが相同配列を見つけて、DNA 鎖を交換するしくみを解明
- DNA 鎖交換反応の分子機構のシミュレーションに成功

【概要】

東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センターの岩崎博史教授、伊藤健太郎研究員、同大学 生命理工学院 生命工学系の TAKAHASHI MASAYUKI 特任教授、国立遺伝学研究所の村山泰斗准教授、横浜市立大学の池口満徳教授、理化学研究所の美川務専任研究員らの研究グループは、DNA の相同組換えの中心的な反応である DNA 鎖交換の反応機構を明らかにした。

相同組換えは、**DNA 二重鎖切断**（用語 1）を正確に修復する生理機能であり、遺伝情報の維持や遺伝的多様性の創出にかかわる重要な生命現象である。その中心である DNA 鎖交換反応では、似た配列、すなわち、相同な配列を持つ 2 組の DNA 間で鎖を交換する。この反応は **Rad51 リコンビナーゼ**（用語 2）によって触媒されることが知られているが、Rad51 リコンビナーゼが相同配列を見つけて DNA 鎖を交換するしくみは不明であった。

今回の研究では、DNA 鎖交換反応をリアルタイムで観察し、Rad51 リコンビナーゼが DNA 鎖を交換する反応過程の詳細を明らかにした。さらに、その反応の実際の分子構造をシミュレーションすることに世界で初めて成功した。今回の成果により、相同組換えによるヒトがん抑制の分子機構研究にさらに弾みがつくことが期待される。

この成果は、6月11日付けの『Nature Communications』に掲載された。

●研究の背景と経緯

私たちの体の中にある DNA は様々な種類の損傷を、細胞 1 個あたり 1 日に約 10 万ヶ所も受けている。なかでも DNA の二重鎖切断は特に重篤な損傷であり、細胞死やがんの引き金となることが知られている。相同組換えはこの DNA 二重鎖切断を正確に修復する生理機能であり、すべての生命に普遍的に備わっている。

相同組換えは多段階の反応が組み合わさって進行する複雑な生命現象である。そのなかで特に重要なステップが、Rad51 リコンビナーゼによって触媒される DNA 鎖交換反応である (図 1)。この反応では、Rad51 リコンビナーゼが DNA 二重鎖切断の末端に生じた一本鎖 DNA 上でらせん状に結合して、フィラメント状の核酸タンパク質複合体を形成する。そのうえで、無傷の二重鎖 DNA を捕捉して、相同な DNA 配列の検索を行う。相同配列が見つかったら、二重鎖 DNA が巻き戻されて (用語 3) フィラメント中の一本鎖 DNA と対合し (DNA 鎖交換)、新たな二重鎖 DNA (これを「ヘテロ二重鎖 DNA」と呼ぶ) ができる。

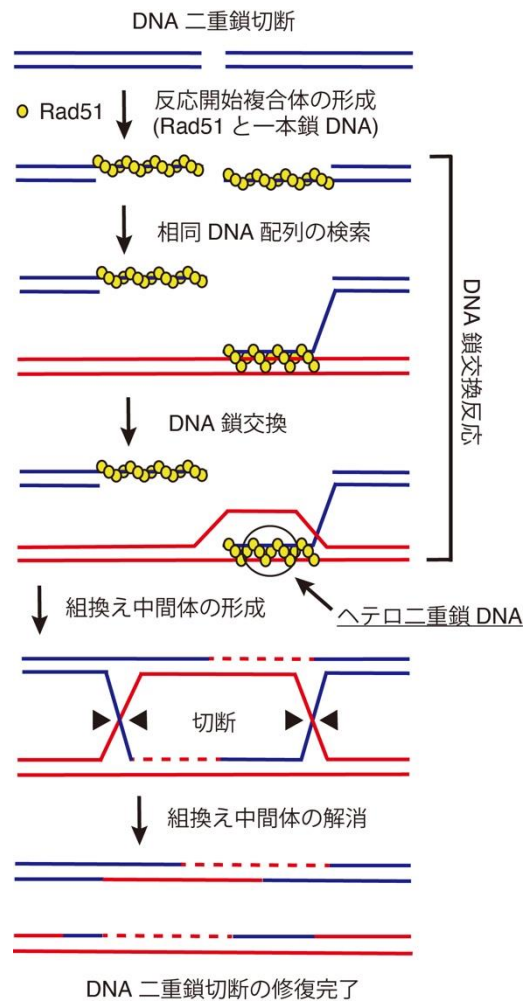


図 1. 相同組換えによる DNA 二重鎖切断修復のモデル

こうしたフィラメントについて、10 分子からなる Rad51 (白と灰色) が一本鎖 DNA (緑色) に結合した場合の立体構造モデルを図 2 に示した。Rad51 リコンビナーゼは **DNA 結合部位** (用語 4) を 2 ヶ所持っている。そのうち第 1 結合部位は、第 1 ループ (loop 1 : 青色の領域) と第 2 ループ (loop 2 : 赤色の領域) の 2 つのループで構成されており、第 2 結合部位 (黄色のアミノ酸残基) は一本鎖 DNA から少し離れた場所に位置している。注目すべきは、第 1 結合部位の 2 つのループが一本鎖 DNA を挟み込んでいる点である。これまで様々な解析が行われてきたが、これらの DNA 結合部位が、どのように相同 DNA 配列の検索と DNA 鎖の交換を行っているかは不明であった。

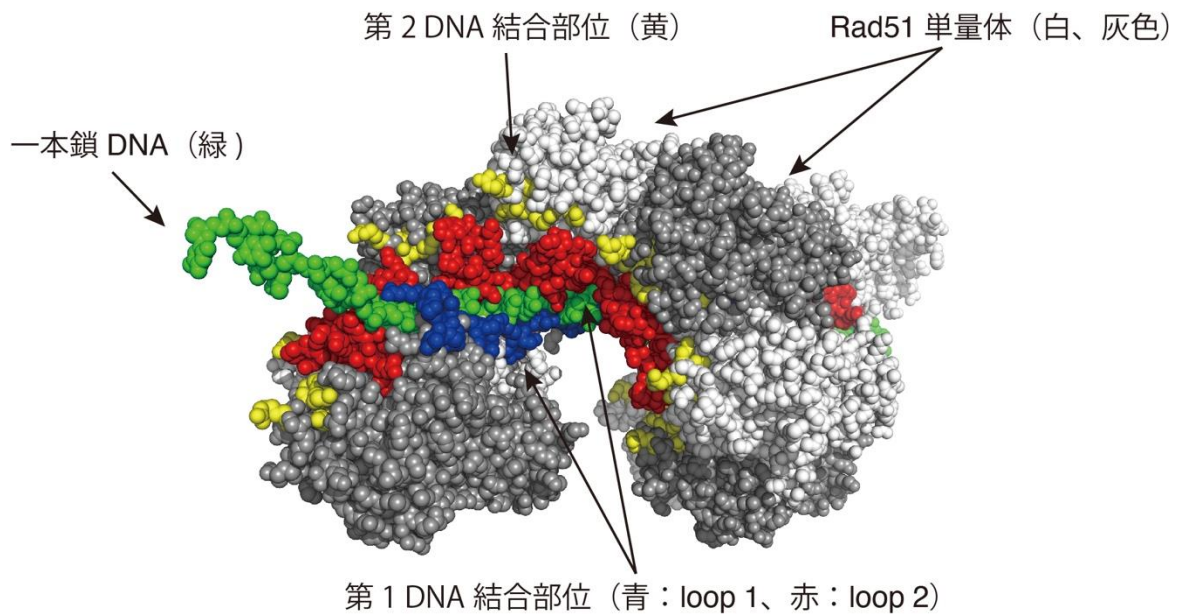


図 2. Rad51・一本鎖 DNA フィラメントの立体構造モデル。Rad51 単量体を、白または灰色の球を用いた空間充填モデルで表した。それぞれの分子の第 1 DNA 結合部位中の loop 1 を青色、loop 2 を赤色で表すと、一本鎖 DNA (緑色) を挟む配置をとる。第 2 DNA 結合部位は黄色で示した位置にあり、一本鎖 DNA から少し離れていることがわかる。このモデルでは 10 分子からなる Rad51 が一本鎖 DNA 上にらせん状に結合したフィラメントを表しているが、実際の細胞内では数千個もの Rad51 分子が一本鎖 DNA に結合し、フィラメント構造を形成すると考えられている。

●研究成果

岩崎研究室では、**蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET、用語 5)** を利用して蛍光標識した DNA 鎖の交換反応をリアルタイム解析し、反応機構を研究している。これまでに、Rad51 リコンビナーゼによる DNA 鎖交換反応が、次の 3 つのステップで進行することを見出していた。(1) Rad51・一本鎖 DNA フィラメント複合体が二重鎖 DNA を捕捉して、反応中間体 C1 を形成する。(2) 相同配列が見つかる、DNA 鎖が交換されて「ヘテロ二重鎖 DNA」を持つ反応中間体 C2 に移行する。(3) 反応中間体 C2 が解消されて反応が完了する。

今回の研究では、この FRET を利用した方法による、分裂酵母 Rad51 リコンビナーゼの DNA 結合部位の変異体のリアルタイム解析から、上記の反応ステップにおける重要な素反応と DNA 結合モチーフの役割を明らかにした。(1) Rad51・一本鎖 DNA フィラメント複合体は、Rad51 の第 2 DNA 結合部位を用いて二重鎖 DNA を捕捉し、その結果として C1 中間体が形成される。(2) loop 1 が二重鎖 DNA と結合することによって、C1 中間体が形成・安定化される。(3) 相同 DNA 配列が見つかる、loop 2 によって DNA 鎖交換が促進され、C1 中間体から C2 中間体へ遷移する (図 3)。

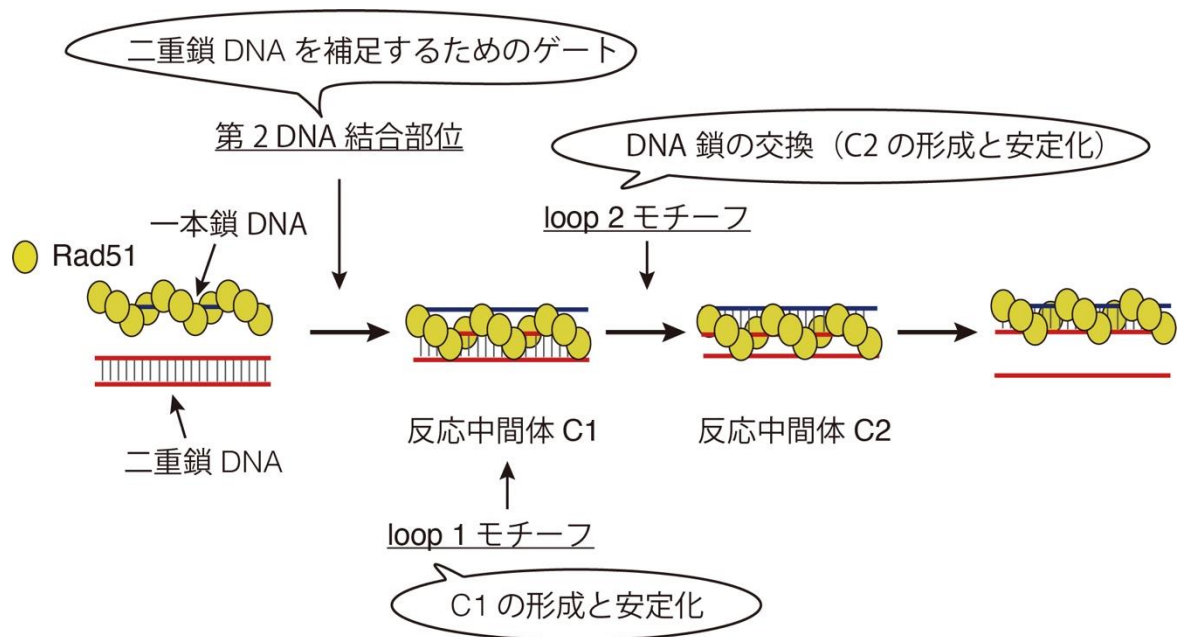


図 3. DNA 鎖交換反応における Rad51 リコンビナーゼの DNA 結合モチーフの役割

この結果に基づいて、DNA 鎖交換反応における、活性中心を形成するアミノ酸残基と DNA 鎖の動きをシミュレーションした (図 4)。リコンビナーゼタンパク質内の活性中心で起こっている DNA 鎖交換反応の実際の分子機構をシミュレーションしたのは世界初である。

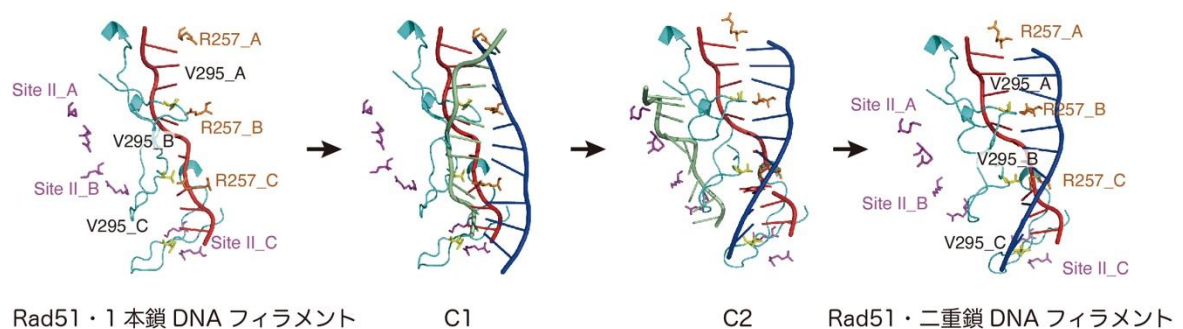


図 4. DNA 鎖交換反応における、DNA 鎖と活性中心を形成するアミノ酸残基のシミュレーション

R257 は loop 1 に存在する鎖交換活性に重要な残基、V295 は loop 2 に存在する鎖交換活性に重要な残基、site II は第 2 DNA 結合部位を形成する 2 つの重要なアミノ酸を示している。Rad51 の単量体を A、B、C で表しており、「R257_A」は「A サブユニットの R257 残基」を指す。最初に形成される Rad51・一本鎖 DNA フィラメントが二重鎖 DNA (青色と緑色の鎖からなる二重鎖) を捕捉し、最初の C1 複合体を形成する。その後、鎖を交換してヘテロ二重鎖 (赤色と青色の鎖からなる二重鎖) を含む C2 複合体ができ、最終的に、一本鎖 DNA (緑色) を放出して、Rad51・二重鎖 DNA フィラメントが形成される。

●今後の展開

相同組換えにおける DNA 鎖交換反応の分子機構は、Rad51 の立体構造が決定されているにもかかわらず、不明のままだった。今回の研究成果は、バクテリアからヒトまで保存されている DNA 鎖交換反応の根本的な分子機構を解明したもので、その普遍性から学問的価値が大きいといえる。

相同組換えの機能不全は、細胞死やガン発生の引き金になることが知られており、医学的にも重要な課題である。今回、分裂酵母 Rad51 リコンビナーゼによる DNA 鎖交換の反応原理が明らかになったことで、相同組換えによるヒトがん抑制の分子機構研究にさらに弾みがつくことが期待される。

【用語説明】

- (1) **DNA 二重鎖切断** : DNA は 2 本のポリヌクレオチド鎖 (1 本鎖 DNA) がお互いに巻きついた二重らせん構造をしている。放射線や化学変異原に曝露すると、その鎖が切断されるが、切断箇所が近いと、両方の鎖が分断され、二重鎖切断となる。
- (2) **Rad51 リコンビナーゼ** : DNA 鎖交換反応を触媒する酵素。バクテリアからヒトまで保存されている。すべての生物種に存在する。バクテリアの酵素は RecA、酵母やヒトなどの真核細胞では Rad51 とよばれている。
- (3) **DNA の巻き戻し** : DNA は 2 本の鎖が巻き戻されると 1 本鎖 DNA となる。1 本鎖 DNA に相補的な鎖があると、巻きついて再び二重鎖 DNA を形成することができる。
- (4) **DNA 結合部位** : タンパク質上の特定のアミノ酸残基が DNA と結合する。この部位を DNA 結合部位という。
- (5) **蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer : FRET)** : 2 つの蛍光分子が近接して存在している時、供与体となる蛍光分子から受容体となる蛍光分子へ励起エネルギーが直接移動する現象。

【論文情報】

掲載誌 : *Nature Communications*

論文タイトル : Real-time tracking reveals catalytic roles for the two DNA binding sites of Rad51

著者 : Kentaro Ito, Yasuto Murayama, Yumiko Kurokawa, Shuji Kanamaru, Yuichi Kokabu, Takahisa Maki, Tsutomu Mikawa, Bilge Argunhan, Hideo Tsubouchi, Mitsunori Ikeguchi, Masayuki Takahashi & Hiroshi Iwasaki

DOI : 10.1038/s41467-020-16750-3

【問い合わせ先】

東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センター 教授
岩崎 博史

情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 染色体生化学研究室 准教授
村山 泰斗

横浜市立大学 大学院生命医科学研究科 教授
池口 満徳

【取材申し込み先】

東京工業大学 総務部 広報・社会連携課

国立遺伝学研究所 リサーチ・アドミニストレーター室 広報チーム

横浜市立大学 広報室

理化学研究所 広報室 報道担当