

2002年8月16日
独立行政法人 理化学研究所

ヒト DNA 組み換え修復の分子メカニズムの一端を解明

- 生体内における DNA 修復機構を X 線結晶構造解析から明らかに -

理化学研究所（小林俊一理事長）は、ヒトの生体内において遺伝子損傷の修復に中心的な役割を果たすタンパク質の立体構造を決定し、その修復機構を解明することに世界で初めて成功しました。理研播磨研究所細胞情報伝達研究室（横山茂之主任研究員）の協力のもと、理研横浜研究所ゲノム科学総合研究センター（和田昭允センター所長）タンパク質構造・機能研究グループの横山茂之プロジェクトディレクター、胡桃坂仁志研究員、香川亘ジュニア・リサーチ・アソシエイト（東京大学大学院）らの研究グループによる成果です。

細胞内では、放射線や活性酸素、DNA 複製のエラーなどの要因により、DNA の二重鎖切断が頻繁に引き起こされています。細胞にとって二重鎖切断は、致命的な損傷であり、主に DNA の組み換えによって修復されます。研究グループでは、この組み換え修復反応において中心的な役割を持つタンパク質「ヒト Rad52」の立体構造を、大型放射光施設 SPring-8 の理研構造生物学ビームラインを用いて決定することに成功しました。さらに解析の結果から、11 のユニットが規則的に環状に並んで Rad52 を形成し、その外周に単鎖 DNA と二重鎖 DNA を巻きつけるように結合することによって、修復を促進していることが分かりました。

Rad52 は、わが国で推進している「タンパク 3000 プロジェクト」として解析してゆくべき重要なタンパク質に位置づけられています。DNA 組み換え修復機構が損傷すると、がんや遺伝病の直接の原因になることが報告されており、このタンパク質の構造決定は、がんが発症するメカニズムの解明に重要な知見を与えるだけでなく、人工的に DNA 組み換え反応を生体内で行うといった、より効果の高い遺伝子治療へと発展する基礎技術となるものと期待されています。

本研究結果の詳細は、米国の学術雑誌『Molecular Cell』8月号に掲載されます。

1. 背景

傷ついた DNA の修復は、細胞が正常に機能するために不可欠なメカニズムです。DNA 修復機構が欠損すると、細胞のがん化や遺伝病につながるということが知られています。今までの研究から、がんを頻発する遺伝病の原因遺伝子が DNA 修復に深く関わっていることが明らかにされてきました。DNA 修復機構は全ての生物が持ち合わせているものですが、特にヒトの場合、進化の過程で複数の DNA 修復経路を獲得しており、それらは DNA が受けた損傷の種類によって役割分担をしていると考えられています。

DNA 損傷の中でも、DNA の二重鎖切断は、放射線や化学療法剤などの外的要因、または体内に生じた活性酸素や DNA 複製のエラーなどの内的要因によってしばしば引き起こされます。このタイプの DNA 損傷は、相同 DNA 組み換え^{*1}によって修復されます。相同 DNA 組み換えが欠損した細胞では、DNA の二重鎖切断が修復

されずに蓄積し、染色体間での無秩序な DNA 組み換えを誘発します。その結果、染色体異常がおこり、細胞はその秩序だった増殖調節能を失い、やがてがん化します。この相同 DNA 組み換え機構の中では、DNA の二重鎖切断部位と同じ塩基配列を無傷の染色体の中から見つけてだして、二分子の染色体の間で DNA を組み換える「相同的対合反応（図 1）」が非常に重要です。

研究グループでは、相同的対合反応を行い、二重鎖 DNA 切断の修復の中核となるヒト Rad52 タンパク質に着目。相同的対合に関わるドメインの立体構造を決定し、立体構造に基づいた生化学的解析によって Rad52 による作用機構の解明を試みました。

2. 研究の手法

ヒト Rad52 遺伝子は、まず、全長である 418 アミノ酸からなるもの (Rad52 longer form : 全長型 Rad52) と、スプライシングバリエーション^{*2}である約 200 アミノ酸からなるもの (Rad52 shorter form : 短縮型 Rad52) の 2 種類のタンパク質を産生しています。両者とも DNA に結合し、相同的対合反応を促しますが、それぞれの役割・構造などの詳細は明らかになっていませんでした。研究グループは、全長型 Rad52 の役割を明らかにすることを目的に、まず全長型 Rad52 をプロテアーゼで分解する「限定分解法^{*3}」によって、相同的対合反応を促す、独立したドメイン構造を見つけました。この領域は、N 末端から約 200 アミノ酸までの領域であり、短縮型 Rad52 に対応します。次に、Rad52 の 1 番目から 212 番目までのアミノ酸領域からなる Rad52₁₋₂₁₂ をデザインして単離・精製し、優れた単結晶を作製 (図 2)。大型放射光施設 SPring-8 の理研構造生物学ビームライン・(BL45XU) を用いて、多波長異常分散 (MAD) 法^{*4} で立体構造を決定しました。

3. 立体構造の解析結果から明らかになったこと

SPring-8 からの高輝度なシンクロトロン放射光により、最終的には 2.85 Å^{*5} の高分解能の X 線解析データを得ることができました。これらのデータを解析し、得られた立体構造から、Rad52₁₋₂₁₂ の DNA 結合領域を推測することができました。さらに部位特異的にアミノ酸変異を導入する方法を用いて、DNA 結合に重要なアミノ酸が領域内に存在することを証明しました。

1) 「Rad52 短縮型は 11 量体のリング構造を形成している」

これまで、電子顕微鏡観察や生化学的解析などから、全長型 Rad52 は、7 量体のリング構造を形成することが推定されてきました。今回の結晶構造解析により、短縮型 Rad52 は、全長型とは異なり 11 量体のリング構造を形成することが分かりました。このように、同一遺伝子から作られる 2 つのタンパク質が、7 量体と 11 量体という異なった会合体を形成する例はこれまでに報告されておらず、今回のケースが世界で最初の報告となります (図 3)。

2) Rad52 リングの外周には、DNA 結合を行うための溝が存在する」

短縮型 Rad52 の 11 量体リング構造の表面電荷を解析した結果、リングの外周に塩基性アミノ酸が局在している溝が存在することが分かりました。DNA は酸性

の物質であるため、この塩基性の溝が DNA との結合部位であると予測されます。そこで、この塩基性の溝の中に側鎖を突き出しているアミノ酸を立体構造より同定し、部位特異的にアミノ酸変異を導入する方法によって、アミノ酸をアラニンに置換した変異体 Rad521₋₂₁₂ を 12 種類作製しました。これらの変異体 Rad521₋₂₁₂ と DNA との結合を生化学的に解析した結果、この塩基性の溝が単鎖 DNA と二重鎖 DNA の両方を結合し、両者の間で相対的対合反応を促す DNA 結合部位であることが明らかになりました。また、この塩基性の溝の中に側鎖を突き出しているアミノ酸こそが、DNA 結合に直接関係するアミノ酸であることが分かりました (図 4)。

3) 「7 量体を形成する Rad52 全長型のリング構造のモデルを提案」

決定した短縮型 Rad52 単量体の立体構造から、全長型 Rad52 の 7 量体形成モデルを構築しました。短縮型 Rad52 では、単量体当たり 3 本の β シート構造が樽状につながって (β バレル構造) リング構造を形成していますが、全長型 Rad52 の 7 量体モデルでは、5 本の β シートからなる β バレル構造によってリング構造が形成されると予測されます。また、全長型 Rad52 の 7 量体モデルにおいても、DNA 結合溝は 11 量体と同様にリングの外周に位置しており、全長型 Rad52 と短縮型 Rad52 が同様のメカニズムで相対的対合反応を触媒することも推定されました。つまり、両者は、構造が異なるが、作用機構はほぼ一致していることを示唆しています (図 5)。

4. 今後の展開

本成果によって、今までヴェールに包まれていた DNA 組み換え修復の分子機構の一端が明らかになりました。また、ある種のがん細胞において Rad52 における変異が見出されていることから、DNA 組み換え修復欠損による発がんのメカニズムの解明に重要な知見を与え、さらには Rad52 の機能不全を原因とする腫瘍形成に対する薬の創製にもつながると考えられます。また Rad52 は、生体内の DNA 組み換えをつかさどる中核的タンパク質であることから、DNA 組み換え技術として分子生物学的分野で応用できる可能性があります。将来的には、人工的に DNA 組み換え反応を生体内で行う遺伝子治療や、家畜や作物の品種改良などへ応用することも可能になるなど、医学、産業の場面で基盤技術として活用されることが期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所 横浜研究所

ゲノム科学総合研究センター

タンパク質構造・機能研究グループ

プロジェクトディレクター

横山 茂之

Tel : 045-507-2515 / Fax : 045-507-2509

研究員

胡桃坂 仁志

Tel : 045-503-9206 / Fax : 045-503-9201

横浜研究所 研究推進部

丸山 亮介

Tel : 045-503-9121 / Fax : 045-503-9113

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

嶋田 庸嗣

仁尾 明日香

Tel : 048-467-9271 / Fax : 048-462-4715

<補足説明>

※1 相同 DNA 組み換え

2分子の DNA の間でおこる組み換え反応の内、塩基配列の相同性に依存して行われるものを指す。生体内では、DNA の二重鎖切断を修復することに加え、精子や卵子などの配偶子を形成する過程で必須であり、両親のゲノム DNA の情報の再編成を行う。

※2 スプライシングバリエント

真核生物の遺伝子には、本来タンパク質に翻訳されない領域が含まれており、遺伝子から転写によって mRNA が作られた後に、スプライシングという mRNA の切りつなぎによってタンパク質に翻訳されるべき領域のみが再編される。この過程で、同一遺伝子から作られた初期の mRNA から、異なった切りつなぎによって複数の若干ことなったタンパク質が作られることがある。このような、同一遺伝子に由来する、異なったタンパク質をスプライシングバリエントという。

※3 プロテアーゼによる限定分解法

タンパク質分解酵素（プロテアーゼ）によって、立体構造を持つタンパク質を弱く切断すると、安定に立体構造を形成している部分は、プロテアーゼに切られにくいですが、立体構造を形成していないループ状の領域はプロテアーゼによって切断される。このことを利用して、タンパク質内で安定に立体構造を保持しているドメインを同定する方法をプロテアーゼ限定分解法という。

※4 多波長異常分散(MAD)法

MAD 法とは、X 線の波長を変えられる放射光を使って、波長に依存した原子の X 線散乱の変化に基づいて解析する方法。これまでは、原子量の大きい金、白金、水銀などでラベルした質のよい結晶が複数種必要だったが、MAD 法ではただ一つのラベルされた結晶を使った解析が可能になる。ただし、これによって測定できる信号は微小なため、これまでの方法より数段も精度の高い測定が必要となる。理研ビームライン I では、「ダイヤモンドトリクロメータ」を用いることによって、発生した高輝度かつ高性能な放射光を 3 波長同時に取り出すことにより、MAD 法でのデータ収集を効率的かつ高精度に行うことができる。

※5 Å(オングストローム)

一般的には長さの単位を示す。1 オングストロームは 1×10^{-10} メートル (= 0.1 ナノメートル)。X線結晶構造解析においては、高次構造の解像度を示す単位として用いられる。数字が小さいほどより高解像度の立体構造であることを示す。

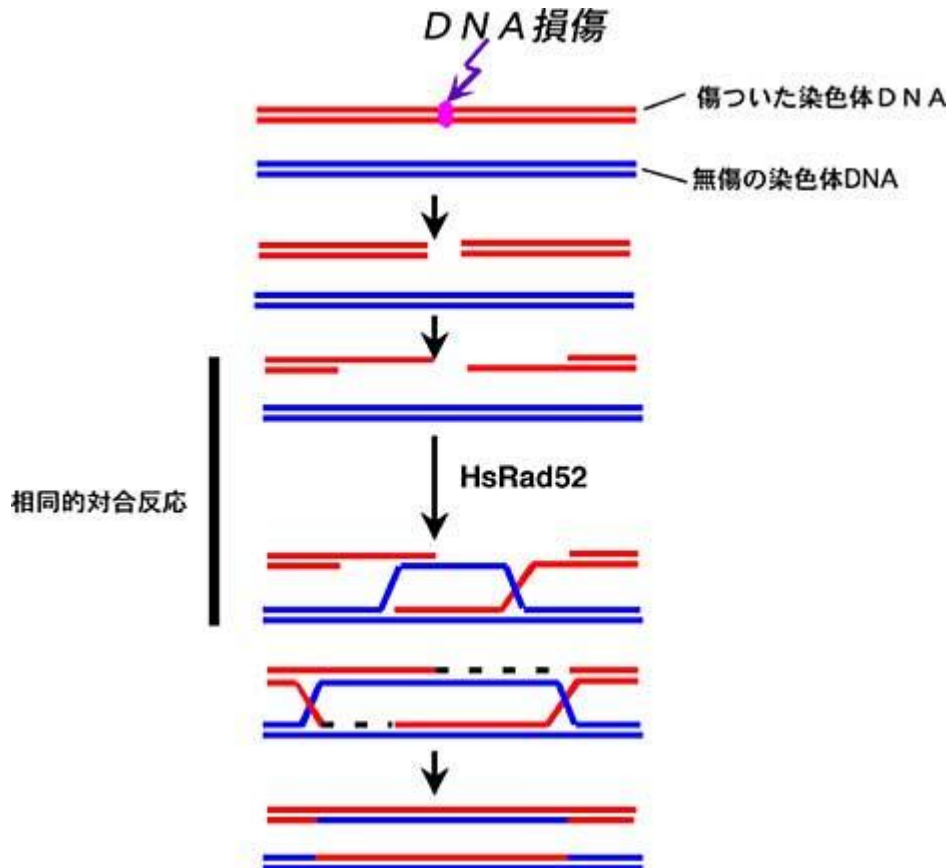


図1 相同 DNA 組み換え

DNA 損傷により二重鎖 DNA 切断を受けた染色体 DNA (赤) が、DNA 組み換え修復によって無傷の染色体 DNA (青) を鋳型として修復する。

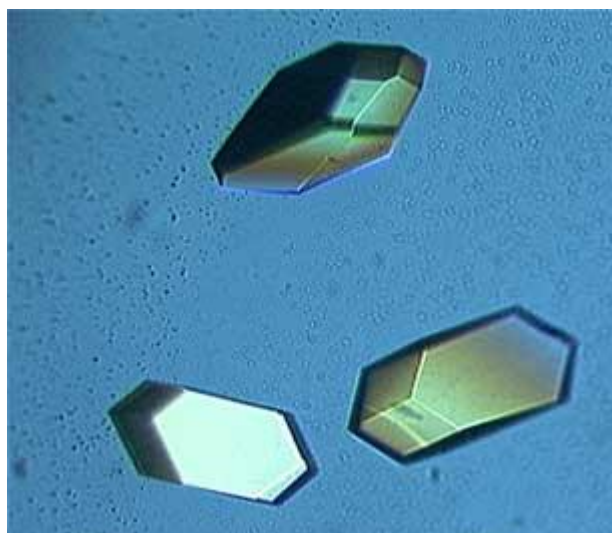


図2 Rad52₁₋₂₁₂の結晶

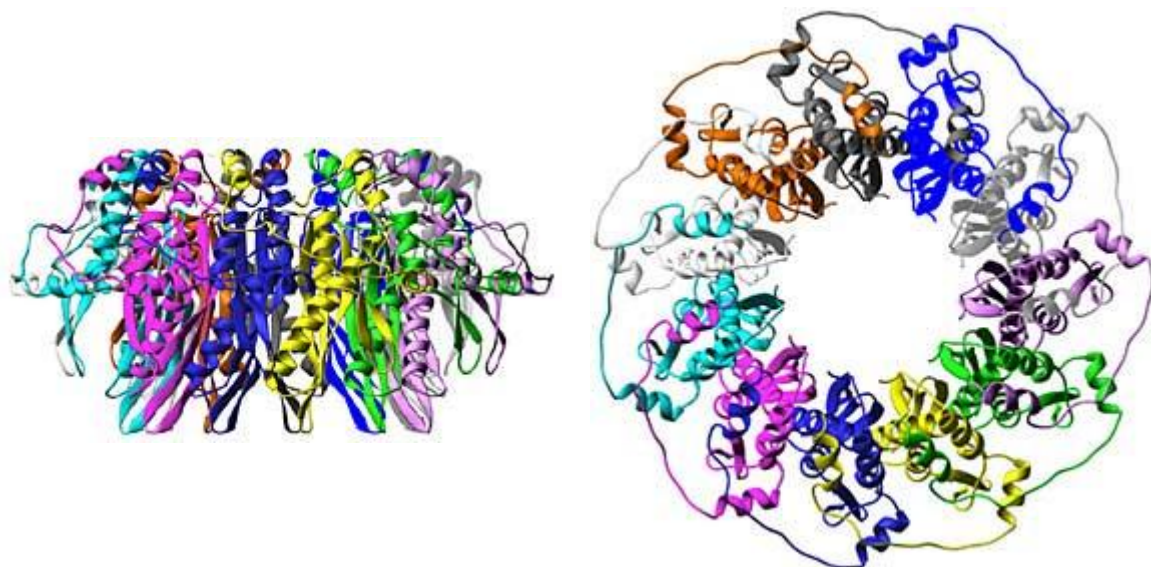


図3 Rad52₁₋₂₁₂の結晶構造

横から見た図（左）と真上から見た図（右）。単量体ごとに色を変えて表示してある。

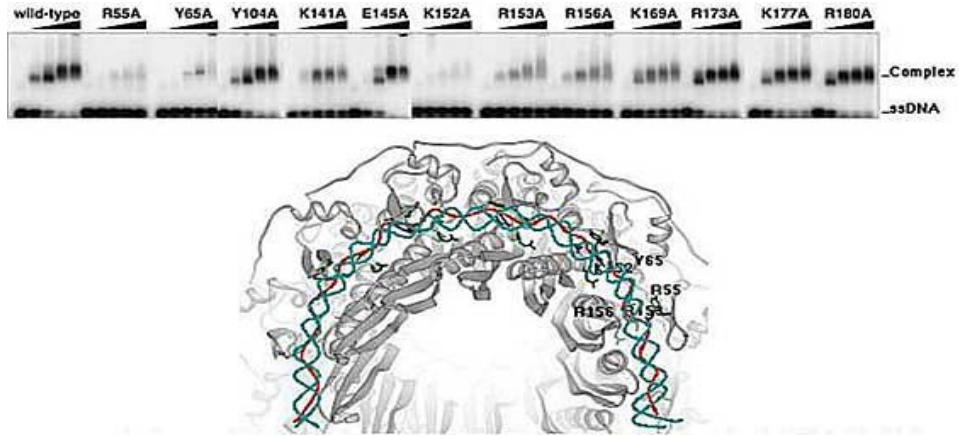


図4 Rad52₁₋₂₁₂の結晶構造から予測されたDNA結合領域のアミノ酸の変異体解析（上）とDNA結合に関するアミノ酸をリング上に表示（下）

下図は、単鎖DNA（赤）と二重鎖DNA（青）の結合位置を示す。

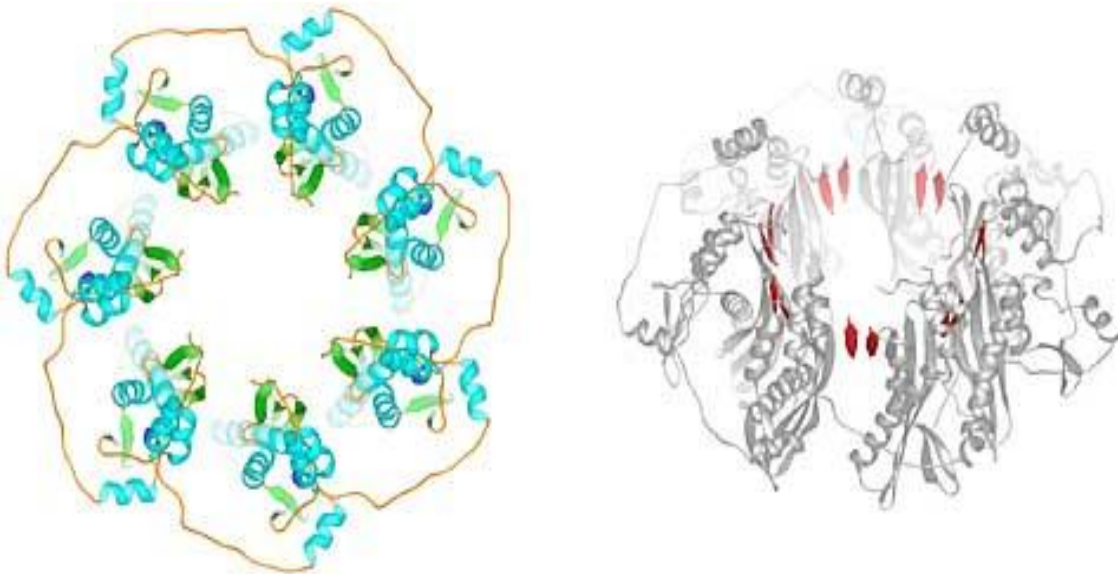


図5 Rad52の7量体のモデル

Rad52₁₋₂₁₂の結晶構造を使用して構築した。赤で示したβシート構造は、Rad52 longer formで追加されると予測されたもの。