

DNA 修復タンパク質 RAD52 が触媒する 相同 DNA 分子の検索と対合の構造生物学的研究

16D2-001

五月女 美香

【研究目的】 二本鎖 DNA は相補鎖を鋳型とした塩基情報の複製が可能であり、遺伝情報を担う優れた物質である。しかし、生体内において DNA は、放射線、紫外線、化学物質、活性酸素などにより、リン酸骨格の切断や塩基の化学修飾など様々な種類の損傷を日常的に受けている。DNA 損傷の中でもっとも重篤な損傷が、DNA の両方の鎖が切れてしまう二本鎖切断（図 1）である。二本鎖切断が正しく修復されない、細胞死や細胞のがん化を引き起こすことがわかっている。相同組換えは、DNA の二本鎖切断を正確に修復する反応機構であり、無傷で相同的な塩基配列を持つ DNA を鋳型とすることにより、損傷を受けた DNA 部位を正確に修復することができる。この過程において傷ついた DNA と鋳型の DNA が相同な領域で対合することが重要である。この反応ステップに関与する重要なタンパク質の一つが RAD52 である。RAD52 は窪みがある部分が連なるように自己会合することで、円周上に溝が一周しているリング構造を形成することがわかっている（図 2）。RAD52 は、相同な塩基配列同士の検索、対合の触媒を行うことや、RAD52 リング上の溝の内側と外側に DNA 結合領域が存在することがわかっている。しかし RAD52 が触媒する組換え反応の詳細な分子機構未だ明らかになっていない。そこで本研究では、RAD52 が触媒する相同組換え反応において生じると考えられる反応中間体である RAD52 と一本鎖 DNA との複合体の X 線結晶構造解析と RAD52 と一本鎖 DNA との生化学的解析を行うことで、RAD52 が触媒する相同組換え反応の分子機構の解明を試みた。

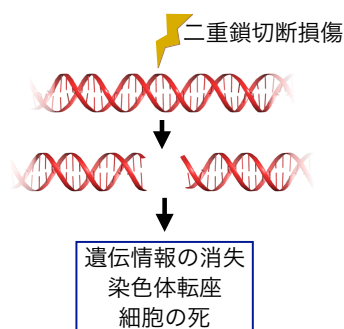


図 1. 二本鎖切断

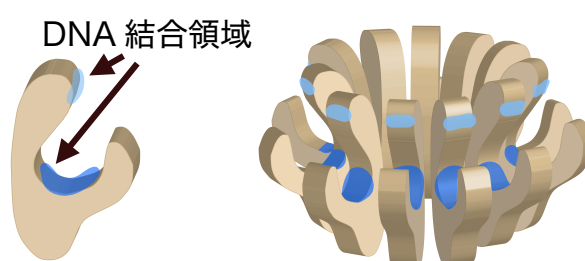


図 2. RAD52 の DNA 結合領域

【実験方法】

RAD52 の N 末断片と一本鎖 DNA の結晶構造解析

RAD52 が行う相同な一本鎖 DNA 同士の対合反応を触媒する分子メカニズムを解明するために、RAD52 の N 末端側のアミノ酸 1 番から 212 番からなる断片 (HsRAD52¹⁻²¹² K102A/K133A) と 40-mer の一本鎖 DNA (TTTTTTTTTTTTTTTTTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTT) との複合体の X 線結晶構造解析を行った。結晶化条件の探索には Hampton Research 社の PEG/Ion Screening kit を用い、ハンギングドロップ法により結晶を作製した。複合体の結晶は Photon Factory 放射光施設にて測定した。得られた X 線回折像から HKL2000, Phaser, Phenix 及び Coot を用い、分子置換法により結晶構造を決定した。

RAD52 による一本鎖 DNA の凝集の解析

RAD52 の溝の外側に位置する DNA 結合部位の機能解析を行うためにヒト RAD52 及びヒト

RAD52 K102A 点変異体が大腸菌の大量発現系を用いて大量調製を行った。これらのタンパク質を 5,000 bp 程度の一本鎖 DNA に結合させた後、遠心 (18,800×g, 5 min) をした。その後、遠心したサンプルを上層と下層に分け、それぞれを除タンパク処理した後にアガロースゲル電気泳動により DNA を分離し、バンドの定量を行った。

一本鎖 DNA と RAD52 の二つの DNA 結合領域との親和性

RAD52 の DNA 結合領域と一本鎖 DNA との親和性を調べるために、RAD52 変異体と一本鎖 DNA とが結合する際に生じる反応熱を ITC (ITC: Isothermal titration calorimetry) によって測定した。測定に用いたタンパク質は、2 つの DNA 結合領域が存在する RAD52 の N 末端側半分のドメイン (RAD52¹⁻²¹²) または DNA 結合領域が一ヶ所しかない RAD52 変異体 (RAD52¹⁻²¹²K133A, RAD52¹⁻²¹²R55A/K152A) である。一本鎖 DNA は 40-mer の一本鎖 DNA (TT) を用いた。

【結果および考察】

RAD52 と一本鎖 DNA との複合体の結晶構造

RAD52 と DNA との複合体の結晶は 0.05 M Calcium acetate hydrate, 5% w/v Polyethylene glycol 3,350 の条件下で得られ、3.6 Å 分解能で構造を決定することに成功した。X 線結晶構造解析から RAD52 リングの溝の内側に一本鎖 DNA が結合した構造が明らかになった。結晶構造から RAD52 と結合した一本鎖 DNA は、Watson-Crick 塩基対を形成する原子が溶媒側に露出することがわかった。この一本鎖 DNA の構造は相補的な DNA の塩基と相互作用するのに適している。従って相同組換えにおいて RAD52 は、一本鎖 DNA にこのような立体構造を誘起することにより、相同な塩基の検索と塩基対形成を促進することが考えられた。

溝の外側に位置する DNA 結合部位の役割

溝の外側に位置する DNA 結合部位の役割を調べるために、この部位に点変異を導入した RAD52 点変異体 (RAD52 K102A) の一本鎖 DNA との相互作用を解析し、野生型の活性と比較した。その結果、RAD52 K102A は野生型と比べ一本鎖 DNA を凝集する活性が著しく損なわれており、RAD52 の K102 は一本鎖 DNA を凝集させる機能を有することがわかった。過去の解析で K102 は RAD52 の一本鎖 DNA 同士の対合反応 (DNA アニールリング) において必須であることがわかっている。このことから、RAD52 が触媒するアニールリング反応において一本鎖 DNA の凝集が重要であることが考えられた。

RAD52 が持つ二つの DNA 結合領域の役割

ITC によって RAD52 が持つ二つ DNA 結合領域の一本鎖 DNA への親和性 (K_d) を調べたところ、溝の内側に位置する DNA 結合領域よりも溝の外側に位置する DNA 結合領域の方が一本鎖 DNA への親和性が高かった。また、それぞれの DNA 結合領域の親和性を合わせた値よりも、二つ DNA 結合領域が持つ親和性の方が高かった。そのため、二つ DNA 結合領域はそれぞれ共役していることが考えられた。

RAD52 が触媒する相同組換え反応機構のモデル

RAD52 は相同組換え反応における相補的な塩基対の検索と対合に関与していると考えられている。本研究で明らかにした RAD52 と一本鎖 DNA との複合体の結晶構造から RAD52 はリング間で相同組換えを行うことが考えられた。今回、野生型と RAD52 点変異体との活性比較により、RAD52 が触媒する DNA アニールリングにおいて一本鎖 DNA の凝集が重要であることが考えられた。以上の結果から RAD52 が触媒する相同組換え反応について以下のメカニズムが考えられた。まず初めに一本鎖 DNA は RAD52 リングの溝の外側に位置する DNA 結合部位と相互作用する（I）。この相互作用によって一本鎖 DNA 同士の凝集が起こり、RAD52 と一本鎖 DNA との衝突頻度が上昇することが考えられる。次に一本鎖 DNA は RAD52 リングの溝の内側に位置する DNA 結合部位に移動し、結合することで塩基が露出する（II）。そして別の RAD52 リングに同様の結合様式で結合した一本鎖 DNA と近づくことにより相同検索と対合反応が起こる（III）。対合反応が起こるとそれぞれのリングに結合した二分子の DNA は RAD52 から解離し、二本鎖 DNA を形成する。このように、RAD52 と一本鎖 DNA との複合体同士が結合と解離を繰り返すことにより組換え反応を促進させるモデルを提案することができた。

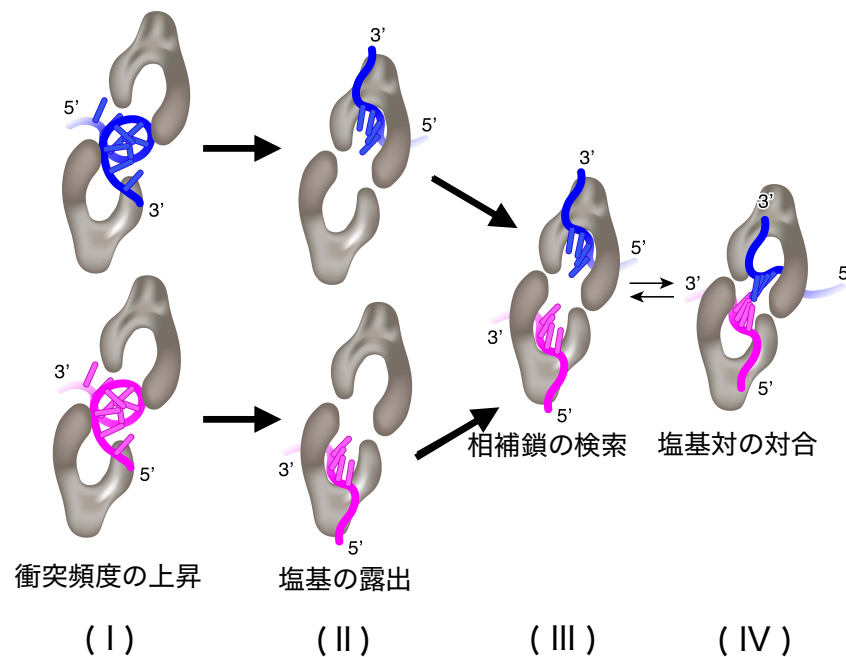


図 3. RAD52 がアニール反応を触媒する反応モデル図