



Tokyo Tech

平成 29 年 12 月 1 日

報道機関各位

東京工業大学広報・社会連携本部長
岡田 清

相同組換えの DNA 鎖交換の素過程を世界で初めて解明

ー Rad51 の DNA 鎖交換反応は 3 ステップで進行する ー

【要点】

- 相同組換えは遺伝子情報や遺伝子の多様性を生み出すのに重要
- 相同組換えは DNA 修復においても必須
- Rad51 による DNA 鎖交換反応をリアルタイムに観察する手法を開発
- ガン化に関わる Rad51 の様々な補助因子の役割を解明できる可能性がある

【概要】

東京工業大学 科学技術創成研究院の伊藤健太郎研究員、岩崎博史教授、同生命理工学院の Takahashi Masayuki 教授、国立遺伝学研究所の村山泰斗准教授（研究当時・東工大助教）の研究グループは、相同組換えにおける DNA 鎖交換反応の解明に世界で初めて成功した。

相同組換えは、遺伝情報の維持や遺伝的多様性を生み出すのに必須な反応であり、全ての生物で保存されている。相同組換えにおける中心的な反応は、似た配列を持つ（このことを“相同”という）2 組の DNA 間の鎖の交換反応である。DNA 鎖交換反応は、**Rad51 リコンビナーゼ**（注 1）によって触媒されるが、反応がどのように進行するのか不明だった。

今回の研究では、蛍光標識した DNA で鎖交換反応をリアルタイムにモニターして解析を行った。その結果、鎖交換反応は連続した 3 ステップ反応で進行することを発見した。さらに、Rad51 の低分子補助因子である **ATP**（注 2）やタンパク質性補助因子である **Swi5-Sfr1 タンパク質複合体**（注 3）の役割を明らかにした。

この成果は、2017 年 12 月 4 日の Nature Structural and Molecular Biology 電子版に掲載される。

●研究成果

今回、DNA 鎖を蛍光標識し、**蛍光共鳴エネルギー移動（Fluorescence resonance energy transfer: FRET）**（注4）の原理を利用することで、DNA 鎖交換反応の反応中間体形成と最終産物生成をそれぞれリアルタイムで観察する2種類の分析方法（アッセイ系）を構築した。このアッセイ系を用いることで、極めて複雑な反応のため正確なアプローチが困難であった Rad51 による DNA 鎖交換反応を解析した。その結果、次の3つのステップを経て、この交換反応が進行することを発見した。

これは、1）一本鎖 DNA に数珠状に結合した Rad51 リコンビナーゼが鎖交換相手となる DNA の相同な配列を見つけて、最初の反応複合体（C1 反応中間体）を形成する、2） C1 反応中間体に変化し、次の反応中間体 C2 ができる、3） C2 反応中間体が解消されて反応が完了するという3つのステップである。

Rad51 による DNA 鎖交換反応には低分子補助因子 ATP が必要であるが、これまでその役割が不明であった。今回、最初の C1 反応中間体を形成する際には Rad51 が ATP と結合する必要があること、そして、ステップが進み C1→C2 遷移や最終産物生成時には ATP が加水分解されることが必須であることがわかった

（但し、ある条件では C1→C2 遷移時に ATP 加水分解は必要ないことも判明したが、最終産物生成するにはどの条件でも ATP 加水分解が必須）。また、Rad51 補助因子である Swi5-Sfr1 複合体は、リコンビナーゼによる ATP 加水分解を伴って、C1→C2 遷移と最終産物生成のステップを促進することが明らかになった(図1)。

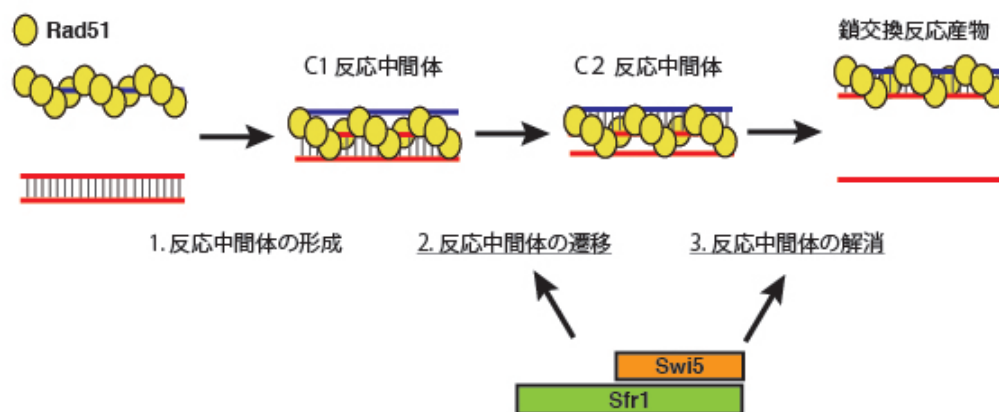


図1. Swi5-Sfr1 複合体による DNA 鎖交換反応の促進モデル

●研究の背景と経緯

紫外線や放射線などの外的要因、DNA 複製の阻害や代謝で発生した活性酸素などの内的要因により、DNA は日常的に様々な種類の損傷を受けている。DNA の

二重鎖が切断された損傷（DNA 二重鎖切断）は特に重篤な損傷で、修復されなければ細胞死の原因となり、間違った修復が行われるとがんの原因となりうる。

相同組換えは、遺伝的多様性を生み出すのに必須な反応であるが、DNA 二重鎖切断を正確に修復する機構（組換えによる DNA 修復機構、組換え修復といわれている）としても極めて重要な働きをしている。例えば、マウスでは、*RAD51* 遺伝子を欠損すると死んでしまうことから、その重要性が実証されている。実際、全ての生物種が相同組換え機構を持っており、この機構は生命に必須の普遍的な生理機能である。

相同組換えは多段階で起こる極めて複雑な反応であり、DNA 複製や転写などといった他の核内現象に比べるとその仕組みの解明は遅れている。相同組換えの中心的な反応は DNA 鎖交換反応であり、Rad51 リコンビナーゼによって触媒される（図 2）。Rad51 リコンビナーゼは、一本鎖 DNA に数珠状に結合し DNA 鎖交換反応の開始前複合体を形成する。その後、開始前複合体は、鎖を交換する相手となる二重鎖 DNA の相同な配列を探し、相同鎖が見つかりと DNA 鎖の交換を行う。

RAD51 遺伝子は、大阪大学のグループによって 1992 年に出芽酵母から発見され、その後、ヒトを含めて多くの生物種で見つかっている。これまで Rad51 タンパク質の DNA 鎖交換活性について世界中で様々な解析がなされてきた。2003 年に、岩崎教授の研究グループは、分裂酵母を用いた研究から Swi5-Sfr1 タンパク質複合体が Rad51 の補助因子であることを発見し、その後継続して Swi5-Sfr1 複合体による Rad51 の活性制御機構について解析を続けてきた。これまで多くの研究者が Rad51 による DNA 鎖交換反応の進行過程を明らかにしようとしていたが、今回 FRET を用いたリアルタイムのアッセイ系でその進行過程の観察に世界で初めて成功した。

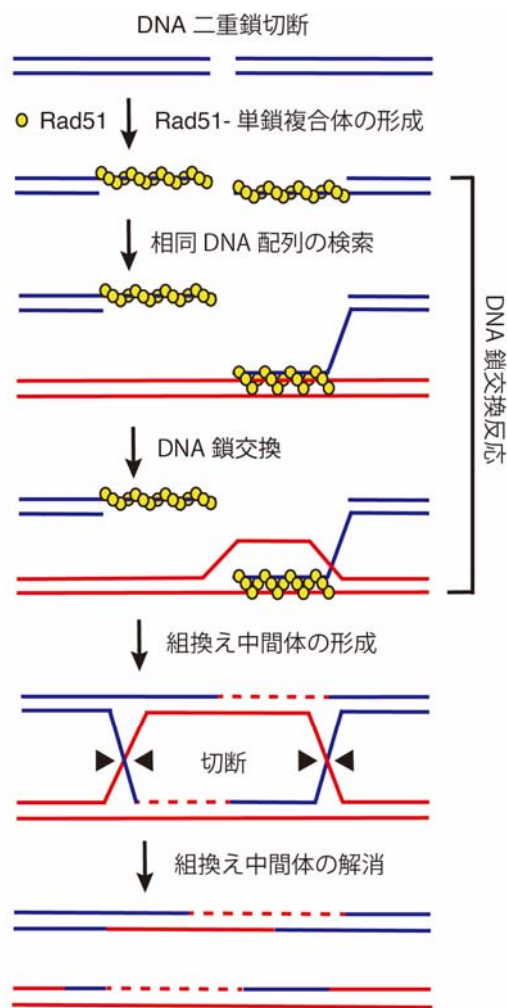


図 2. 相同組換えによる DNA 二重鎖切断の修復モデル

●今後の展開

マウスにおいて *RAD51* 遺伝子を欠損すると死んでしまうことから、生命にとって組換えや組換え修復が極めて重要な働きをしていることがわかる。*RAD51* の補助因子には *Swi5-Sfr1* 複合体の他にも様々なものが知られている。有名なものでは、*BRCA2* タンパク質がある。*BRCA2* 遺伝子の欠損や突然変異は致死とはならないが、家族性乳がんの原因となることが知られている。これは、致死と比べれば軽度な表現型であるといえるが、組換え修復不全が発がんの原因になるということを直接的に示している例である。すなわち、これは正常な組換え（修復）機能がゲノムの安定性を維持しガンを抑制していることを示す一つの典型例である。

今回確立したアッセイ系を用いて、*BRCA2* タンパク質による *RAD51* 活性制御機構の詳細が解析されると、細胞内で相同組換えを正しく進行させる仕組みの理解が大きく進展する。このような詳細な基礎研究を基盤として、今後、発がんやがん抑制の詳細な仕組みが明らかにされていくと考えられる。

【用語説明】

（注 1）Rad51 リコンビナーゼ：相同組換えの中心的な反応である DNA 鎖交換反応を触媒するタンパク質。酵母などの単細胞真核生物からヒトまで、すべての真核生物に存在する。バクテリアの *RecA* タンパク質と相似タンパク質である。Rad51 や *RecA* タンパク質は、ATP 存在下で一本鎖 DNA 上に右巻らせん状に巻き付き、このタンパク質核酸複合体（開始前複合体）は相手となる二重鎖 DNA の相同性を検索し、相同性が見つかれば DNA 鎖の交換反応を推進する。

（注 2）ATP：アデノシン三リン酸（adenosine triphosphate）。生体内に広く存在し、3 位にリン酸が結合したり解離したりすることで、エネルギーの放出や貯蔵、代謝や合成に重要な役目を果たしている。その重要性からエネルギーの通貨と形容されている。ある種のタンパク質や酵素は、ATP との結合や ATP を加水分解することで、構造変化を引き起こし、その機能を発揮することが知られている。

（注 3）*Swi5-Sfr1* タンパク質複合体：Rad51 の鎖交換反応を促進する補助因子の 1 つ。2003 年、分裂酵母で最初に見つかった。Rad51 の鎖交換反応を促進したり抑制したりするタンパク質は、これ以外にも複数知られている。これら複数のタンパク質複合体によって Rad51 による DNA 鎖交換活性は精緻に制御されているが、まだ、その全容は解明されていない。

(注4) 蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer: FRET) : 二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。今回の実験では、受容体が近くにあると遠くにある場合に比べて、励起した供与体から発する蛍光強度が低下することを利用している。すなわち、1) Rad51 と結合した一本鎖 DNA (供与体蛍光分子を付加してある) と相同な二重鎖 (受容体蛍光分子を付加してある) が複合体を形成した際に FRET が起こり、その結果、供与体の蛍光強度の低下が起こる現象と、2) 鎖交換の末に元の二重鎖 (供与体と受容体を付加してあり、FRET が起こっている) が引きはがされて一本鎖 DNA になることで FRET から解放されて供与体の蛍光強度が上昇する現象を利用した。今回の研究では、これらの蛍光変化をリアルタイムで観測する2種類のアッセイ系を構築し、鎖交換反応の素過程を解析した。

【論文情報】

掲載誌 : Nature Structural and Molecular Biology

論文タイトル : Two three-strand intermediates are processed during Rad51-driven DNA strand exchange

著者 : Kentaro Ito, Yasuto Murayama, Masayuki Takahashi, and Hiroshi Iwasaki

DOI : 10.1038/s41594-017-0002-8

【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 (いわさき ひろし)

E-mail: hiwasaki@bio.titech.ac.jp

TEL: 03-5734-2588

FAX: 03-5734-3781

【取材申し込み先】

東京工業大学 広報・社会連携本部 広報・地域連携部門

E-mail: media@jim.titech.ac.jp

TEL: 03-5734-2975

FAX: 03-5734-3661