

相同組換えにおけるホリデー中間体プロセッシングの機構

岩崎 博史

(横浜市立大学大学院・総合理学研究科・生体超分子システム科学専攻)

1. 研究のねらい

遺伝的相同組換えは、生物界に普遍的かつ重要な生理機能にもかかわらず、その反応中間体として形成されたホリデー構造がプロセスされるメカニズムは、長い間不明であった。我々は、大腸菌 RuvA RuvB RuvC タンパク質がホリデー構造のプロセッシングに直接関わり、組換え体分子の生成の過程に働くことを明らかにした。そこで本研究では、RuvABCが触媒する反応機構の詳細を解明するとともに、真核生物における組換え中間体のプロセッシングに関わる因子の同定を目指した。

2. 研究成果と考察

2-1 バクテリア RuvABC タンパク質によるホリデー中間体プロセッシングの機構

RuvAはホリデー構造特異的DNA 結合タンパク質で、RuvB ATPase をホリデー分岐に呼び込む働きがある。RuvB は ATPの分解エネルギーを利用してホリデー分岐点の移動反応を触媒する。RuvC はホリデー分岐点特異的エンドヌクレアーゼで、ホリデー構造の解消に働く。これらの反応の詳細を理解するために、X線結晶構造解析を試み、RuvA, RuvA-ホリデー分岐DNA複合体, RuvB及びRuvC の立体構造を決定し、また、多数のミュータントを分離解析した。これらの2つの相補的な解析をもとに、反応の素過程が原子レベルで議論できるようになった。具体的成果は以下の通りである。

2-1-A) RuvA 4量体は、ディスク状の形態を取り、正電荷を帯びた凹面でホリデー分岐と結合する。RuvA モノマーは3つのドメインからなり、中央ドメインが、ホリデー分岐DNAとの結合に直接関与する。このドメインにはヘリックス-ヘアピン-ヘリックス (HhH) モチーフが存在し、モチーフ中の複数の塩基性残基によってDNAリン酸残基が認識される。その結果、ホリデー分岐は構造変化をおこし“開いた十字構造”となる。N末端ドメインは安定な4量体形成に、C末端ドメインはRuvBとの結合に関与する。

2-1-B) RuvB は、AAA⁺ ATPase [ATPase associated activities with various cellular activities] に共通なタンパク質フォールドを有する6量体リング状タンパク質である。モノマーは3つのドメインからなり三日月型をしている。N末端ドメインが多くのATPase に共通するドメインであるが、このドメインから飛び出したRuvB 特異的なβ-ヘアピンがRuvAと相互作用する。中央部のドメインは、ATPase活性の調節ドメイン、C-末端はDNA結合ドメインである。ATPの水解に伴って、C-末端ドメインの空間的配置が変化しDNAを繰り出すことによって、分岐点移動が促進されると予想される。

2-1-C) RuvC はRNaseH スーパーファミリーと共通のタンパク質フォールドを有する。活性中心にある4個の酸性アミノ酸がMg²⁺などの2価の陽イオンを配位し、加水分解反応の中心的役割を司る。さらに、近傍にあるフェニルアラニンがDNA塩基とstacking相互作用をし、2個の塩基性アミノ酸がDNA主鎖のリン酸と静電的結合をすることによって、切断反応を補助する。

2-2 真核微生物のホリデー中間体プロセッシングの機構

真核生物におけるホリデー中間体プロセッシングの機構を明らかにする目的で、2種類の酵

母を用いて、遺伝的解析を行った。

2-2-A) 分裂酵母の新規組換え遺伝子の同定とその解析

DNA 複製の際生じる Okazaki 断片のプロセッシングに關与する *rad2* 遺伝子との合成致死変異株を分離することによって、相同組換え遺伝子の変異株が効率よく分離できることを示した。この方法を用いて、組換え変異株候補を約500株分離した。この中で、表現型が比較的はっきりしている株を優先的に解析している。これまでに、この解析を通して、*rhp57⁺* 遺伝子を発見し詳しく解析し、2重鎖切断修復に關与するヒト *XRCC3* の構造的かつ機能的ホモログであることを明らかにした。

2-2-B) 出芽酵母 *MGS1* 遺伝子の機能解析

MGS1 は *ruvB* と配列上高い相同性を示し、最初、酵母における *ruvB* ホモログであると予想されたが、変異株の解析の結果、相同組換えに直接關与しているとは考えられなかった。しかし、大腸菌からヒトまで高度に保存されていることから重要な遺伝子であると予想され、詳細な遺伝学的解析を行った。その結果、ゲノムの安定維持機構に關与する重要な遺伝子であることが明らかになった。

3. 主な論文

1. Hishida, T., Iwasaki, H., Ohno, T., Morishita, T., and Shinagawa, H. (2001). A yeast gene, *MGS1*, encoding a DNA-dependent AAA⁺ ATPase is required to maintain genome stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 8283-8289.
2. Yamada, K., Kunishima, N., Mayanagi, K., Ohnishi, T., Nishino, T., Iwasaki, H., Shinagawa, H., and Morikawa, K. (2001). Crystal structure of the Holliday junction migration motor protein RuvB from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 1442-1447.
3. Yoshikawa, M., Iwasaki, H., and Shinagawa, H. (2001). Evidence that phenylalanine 69 in *Escherichia coli* RuvC resolvase forms a stacking interaction during binding and destabilization of a Holliday junction DNA substrate. *J. Biol. Chem.* 276, 10432-10436.
4. Ariyoshi, M., Nishino, T., Iwasaki, H., Shinagawa, H., and Morikawa, K. (2000). Crystal structure of the Holliday junction DNA in complex with a single RuvA tetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 8257-8262.
5. Tsutsui, Y., Morishita, T., Iwasaki, H., Toh, H., and Shinagawa, H. (2000). A recombination repair gene of *Schizosaccharomyces pombe*, *rhp57*, is a functional homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* *RAD57* gene and is phylogenetically related to the human *XRCC3* gene. *Genetics* 154, 1451-1461.

4. その他

日本遺伝学会 奨励賞 2001年9月

招待講演 7件 (うち国内国際会議1件、海外0件)