

## 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ていた。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. 研究結果及び自己評価

#### 2-1 研究結果

##### 2-1-A 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、多数の変異株の機能解析と X 線結晶立体構造解析を行った。これらの相補的な解析の結果、反応の素過程の概要が原子レベルで明らかになった。具体的成果は以下の通りである。

2-1-A-i) 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“開いた十字構造”に変化する。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-A-ii) RuvB は、AAA<sup>+</sup> ATPase [ATPase associated activities with various cellular activities]に属する 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 -ヘアピンが RuvA と相互作用する。中央部は、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-A-iii) RuvC は RNaseH スーパーファミリーに属する。活性中心にある 4 個の酸性アミノ酸が Mg<sup>2+</sup> 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。

##### 2-1-B 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。

##### 2-1-B-i) 分裂酵母の新規組換え遺伝子の同定とその解析

rad2 遺伝子は、DNA 複製の際生じる Okazaki 断片のプロセッシングに関与する。この変異との合成致死性を利用すると、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。これまでに、 rhp57 遺伝子を発見し、2重鎖切断修復に関するヒト 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。

#### 2-1-B-ii) 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、相同組換えには直接関与していないことがわかった。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たので詳細な遺伝学的解析を行った。その結果、MGS1 はゲノムの安定維持機構に重要な役割をすることが明らかになった。

#### 2-2 自己評価

原核生物 RuvABC の解析では、ほぼ満足のいく成果であった。一方、よりチャレンジングな計画であった酵母の実験系では、多数の組換え変異株を分離でき、今後大きな発展が期待できる。以上のことから、総じて、現時点での成果と将来における先行投資的な研究という両面でほぼ満足のいく成果を残せたと思う。

### 3 . 領域総括の見解

染色体交叉のメカニズムとして、古くから考察されてきたホリデーモデルについて、原核生物の大腸菌と真核生物の酵母を材料に、そこに働く数々のタンパク質について具体的な機能の決定を行い、国際的な成果を挙げていることを評価したい。

### 4 . 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<sup>+</sup> 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.

### 5 . 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)