

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02371

研究課題名(和文) 分裂酵母の二つのRecAホモログRad51とDmc1の機能的相違

研究課題名(英文) Similarity and difference between Rad51 and Dmc1, two RecA homologs

研究代表者

坪内 英生 (Tsubouchi, Hideo)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：20283822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNAの塩基配列間に相同性を見出し相同領域を交換する反応は相同組換えと呼ばれ生命に普遍的に存在する。相同組換え反応の中核を担うのは大腸菌のRecA及びそのファミリーに属するタンパク質(RecAホモログ)である。多くの真核生物は体細胞分裂期で発現するRecAホモログであるRad51以外に減数分裂期特異的に発現するDmc1を持つ。本研究ではDmc1が2種類の補助因子により異なるメカニズムで活性化されることを明らかにした。Swi5-Sfr1複合体がDmc1のプレシナプティックフィラメントを安定化する段階で機能するのに対してHop2-Mnd1複合体はDNA鎖交換の開始反応を強く促進すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

相同組換えはDNA傷害修復に重要なだけでなく、遺伝情報を次世代に伝える上で根幹をなす減数分裂にも必須の機能を持つ。本研究では減数分裂期組換えに中心的役割を果たすDmc1の活性化メカニズムを明らかにした。具体的には2種類の補助因子であるHop2-Mnd1とSwi5-Sfr1が独自の働きによりDmc1を活性化するメカニズムを分子レベルで明らかにした。減数分裂期組換えが異常になると不妊や遺伝性疾患の原因となることが知られている。本研究で得られた知見が生殖異常の原因究明や症状改善の手がかりとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The reaction of finding homology between DNA sequences and exchanging homologous regions is called homologous recombination and is ubiquitous in life. RecA and its family of proteins (RecA homologs) play a central role in homologous recombination. Many eukaryotes have two RecA homologs, Rad51 and Dmc1. While Rad51 is expressed in both somatic and meiotic cells, Dmc1 is expressed only during meiosis. In this study, we found that Dmc1 is activated by two types of accessory factors through different mechanisms: the Swi5-Sfr1 complex functions in the stabilization of Dmc1 presynaptic filaments, whereas the Hop2-Mnd1 complex strongly promotes the initiation reaction of DNA strand exchange. The Hop2-Mnd1 complex is thought to strongly promote the initiation reaction of DNA strand exchange.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：相同組換え 減数分裂 DNA二重鎖切断 分裂酵母 RecAホモログ Dmc1 Rad51 DNA修復

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA の塩基配列間に相同性を見出し相同領域を交換する反応は相同組換えと呼ばれ生命に普遍的に存在する。相同組換え反応の中核を担うのは大腸菌の RecA 及びそのファミリーに属するタンパク質 (RecA ホモログ) である。多くの真核生物は体細胞分裂期で発現する RecA ホモログである Rad51 以外に減数分裂期特異的に発現する Dmc1 を持つ一方、一部の真核生物 (線虫やハエ) は減数分裂を行うにも関わらず Dmc1 を持たない。減数分裂期に二種類の RecA ホモログが機能することの意義は生物学的に見ても大変興味深いはまだまだ不明な点が多い。これらの RecA ホモログはその活性化因子においても興味深い要求性を示す。出芽酵母で Dmc1 の補助因子として働く Mei5-Sae3 複合体は減数分裂期特異的に発現するが、分裂酵母や高等真核生物でそれらに対応する Swi5-Sfr1 複合体は体細胞分裂期にも発現し Rad51 を活性化する。一方で出芽酵母と分裂酵母の両方で減数分裂期に Dmc1 特異的補助因子として働く Hop2-Mnd1 複合体はヒトやネズミでは体細胞分裂期にも発現し Rad51 と協働する。Rad51 と Dmc1 の機能的違いや補助因子要求性の違いの分子レベルでの理解は殆ど進んでいなかった。

2. 研究の目的

多くの真核生物は体細胞分裂期で発現する RecA ホモログである Rad51 以外に減数分裂期特異的に発現する Dmc1 を持つ。本申請では Rad51 と Dmc1 という二種類の RecA ホモログの機能的相違を明らかにすることを目標として掲げた。特に、これらのタンパク質の活性化に必要な補助因子の違いに着目し、分裂酵母の Dmc1 の活性化に必須な 2 種類の補助因子 (Hop2-Mnd1 と Swi5-Sfr1) が Dmc1 とどのように協働するのか、その活性化メカニズムの理解を目指した。

3. 研究の方法

分裂酵母の相同組換え反応を試験管内で再構成すべく、2つの RecA ホモログである Rad51 と Dmc1、更には RecA ホモログの補助因子である Swi5-Sfr1 複合体と Hop2-Mnd1 複合体、相同組換えに必須な一本鎖 DNA 結合タンパク質複合体である RPA を大腸菌を用いて大量発現し精製を行った。タンパク質間の相互作用をプルダウンアッセイにより体系的に調べるとともに補助因子と各々の RecA ホモログとの機能的相互作用を、試験管内で再構成した DNA 鎖交換反応検出系により精査した。また、DNA 鎖交換反応に先立って必須な中間体である一本鎖 DNA と RecA ホモログの複合体形成に対する補助因子の効果を物理化学的手法と生化学的手法を組み合わせ高感度で検出した。

4. 研究成果

(1) Hop2-Mnd1 による Dmc1 の活性化により組換え中間体ネットワークが形成される

分裂酵母の減数分裂期相同組換えにおける DNA 鎖交換反応を試験管内で再構成すべく、減数分

裂期特異的 RecA ホモログである Dmc1 と、その主要な活性化因子である Swi5-Sfr1 複合体および Hop2-Mnd1 複合体、更には相同組換え反応に必須の働きをする一本鎖 DNA 結合タンパク質複合体である RPA を大腸菌内で大量発現させ、それぞれについて高純度の精製サンプルを得た。これらを相同性を有する一本鎖 DNA と二本鎖 DNA に添加することで Dmc1 依存的に高効率の DNA 鎖交換が検出された。Swi5-Sfr1 と Hop2-Mnd1 は両方とも Dmc1 依存的 DNA 鎖交換反応を強く活性化したが、その最終産物のゲル移動度は大きく異なっていた。Swi5-Sfr1 の存在下では一本鎖 DNA と二本鎖 DNA が一対一で DNA 鎖交換を行い、多くの反応が最終産物（一本鎖 DNA が相手の二本鎖 DNA の内の相補的な DNA 鎖と完全にアニールする状態）まで到達する。一方で、Hop2-Mnd1 の存在下では極めて大きな分子量を示す DNA ネットワーク構造が形成されたことから、一本鎖 DNA が複数の二本鎖 DNA を相手に活発に DNA 鎖交換反応を行っていることが強く示唆された。

(2) Dmc1 は Hop2-Mnd1 および Swi5-Sfr1 と異なる部位を介して結合する

Hop2-Mnd1 と Swi5-Sfr1 は共に Dmc1 と物理的相互作用を示した。それではこれらの因子は Dmc1 の同じ部位に対し競合的に相互作用しているのだろうか。この問いに答えるため、プルダウンアッセイを用いて結合実験を行った。His6 でタグした Hop2-Mnd1 と Dmc1 を混合したのちニッケルレジンで Hop2-Mnd1 をプルダウンすると Dmc1 が共沈する。その際タグを持たない Hop2-Mnd1 を加えると、その添加量に相関して共沈する Dmc1 の量は低下した。一方でタグを持たない Swi5-Sfr1 を添加したところ共沈する Dmc1 の量は変化せず、加えた Swi5-Sfr1 に応じて Swi5-Sfr1 の共沈量の増加が見られた。以上から Hop2-Mnd1 と Swi5-Sfr1 はそれぞれ Dmc1 の異なる部位を認識して Dmc1 と相互作用していることが示唆された。

(3) Hop2-Mnd1 は DNA 鎖交換反応を促進する際の二本鎖 DNA 末端要求性をバイパスする

試験管内の DNA 鎖交換反応においては環状一本鎖 DNA と線状二本鎖 DNA を基質として用いるのが一般的である。その際、線状二本鎖 DNA 末端には短い一本鎖 DNA の存在することが効率の良い DNA 鎖交換反応の必須条件である。上述 (1) の結果より、Hop2-Mnd1 存在下では一本鎖 DNA に結合した Dmc1 が複数の二本鎖 DNA を相手に、並行して DNA 鎖交換を開始していることが示唆された。もし二本鎖 DNA 末端の一本鎖部分が通常の DNA 鎖交換開始点だとすれば、Hop2-Mnd1 存在下では二本鎖 DNA 末端に一本鎖 DNA が存在しなくても効率の高い DNA 鎖交換反応が起こることが予想される。実際、平滑末端を形成する制限酵素を使い線状二本鎖 DNA を調整し DNA 鎖交換をアッセイしたところ、Swi5-Sfr1 は DNA 交換を活性化出来なかった一方で Hop2-Mnd1 は末端に一本鎖 DNA が存在する時と同等の高い DNA 鎖交換反応を引き起こした。このことから Hop2-Mnd1 は Dmc1 による DNA 鎖交換反応の内、特に開始反応を強く促進することが示唆された。

(4) Hop2-Mnd1 は一本鎖 DNA 上に形成される Dmc1 のプレシナプティックフィラメントを安定化しない

相同性検索および DNA 鎖交換反応においては切断された DNA 二重鎖の末端近傍に形成される一

本鎖 DNA に Dmc1 がフィラメント状に結合することが必要であり、この DNA-Dmc1 複合体をプレシナプティックフィラメントと呼ぶ。プレシナプティックフィラメントを安定化することは相同組換えを活性化する有効な制御手段となっている。試験管内でプレシナプティックフィラメントの安定化を調べるために2種類のアッセイ系を用いた。1つ目は RPA chase assay であり、この方法ではまず一本鎖 DNA 上に Dmc1 フィラメントを形成させ、その後 Swi5-Sfr1 または Hop2-Mnd1 存在下でインキュベートを行う。その後反応液に RPA を加える。Dmc1 単独の場合は RPA と一本鎖 DNA の結合が Dmc1 の一本鎖 DNA に対する親和性を上回るため、一本鎖 DNA 上の Dmc1 は徐々に RPA に置き換わる。Swi5-Sfr1 存在下でこのアッセイを行うと RPA の Dmc1 に対する置換が強く抑制された。一方で Hop2-Mnd1 を加えた場合は、加えない場合と同様に一本鎖 DNA 上の Dmc1 は効率よく RPA に置換された。さらに蛍光異方性を用いてプレシナプティックフィラメントの安定性を検証した。蛍光基でラベルした一本鎖 DNA 上に Dmc1 フィラメントを形成させ Swi5-Sfr1 もしくは Hop2-Mnd1 でインキュベートしたのちサンプルを希釈することで、Dmc1 の一本鎖 DNA からの解離を標識 DNA の蛍光異方性を測定することで検出した。上述の結果と同様に、Swi5-Sfr1 存在下では Dmc1 の DNA からの解離が強く抑制された一方で、Hop2-Mnd1 は Dmc1 フィラメントの安定性に殆ど影響を与えなかった。以上より Swi5-Sfr1 は Dmc1 プレシナプティックフィラメントの安定化に寄与するのに対して Hop2-Mnd1 はその過程に影響を及ぼさないことが分かった。

(5) Swi5-Sfr1 と Hop2-Mnd1 は Dmc1 の DNA 鎖交換反応を異なるメカニズムで段階的に活性化する

細胞内で起こっている事象により近い反応を試験管内で実現するため、アッセイに使用する DNA に改良を加えた。細胞内では、まず切断を受けた DNA の末端に一本鎖 DNA が形成されそこに RecA ホモログに結合することでプレシナプティックフィラメントが形成される。プレシナプティックフィラメントはゲノム中の二本鎖 DNA を対象に検索を行い、相同な領域を見つけると DNA 鎖交換反応により一本鎖 DNA を二本鎖 DNA 間に侵入させる。そこで、このような相同性検索を試験管内反応系にも反映させるため、加える一本鎖 DNA に対して相同領域が二本鎖 DNA の真ん中部分にのみ存在する二本鎖 DNA を基質に用いた。この基質を用いた場合、Swi5-Sfr1 は Dmc1 の DNA 鎖交換反応を促進することが出来なかった一方で、Hop2-Mnd1 は DNA 鎖交換を活性化することが出来た。一方で、細胞内で DNA が二重鎖切断を受けた場合、切断末端に最初に結合するのは RPA であり、RPA が Dmc1 に置換されるには Swi5-Sfr1 が必要である。この条件を試験管内反応系に反映させるため、まず一本鎖 DNA に RPA を加えたのち Dmc1、Hop2-Mnd1 および Swi5-Sfr1 を加えたところ、Hop2-Mnd1 と Swi5-Sfr1 はどちらも単独では Dmc1 の DNA 鎖交換反応を促進することが出来なかったが、両方を加えた場合のみ反応が強く促進された。

以上より、Dmc1 が2種類の補助因子により異なるメカニズムで活性化されることを明らかにした。Swi5-Sfr1 が Dmc1 のプレシナプティックフィラメントを安定化する段階で機能するのに対して Hop2-Mnd1 は DNA 鎖交換の開始反応を強く促進すると考えられる。この二種類の補助因子

を同時に加えることで Dmc1 による DNA 鎖交換反応は RPA 存在下でも強く促進されたことから、Hop2-Mnd1 と Swi5-Sfr1 はお互いに対し相補的に Dmc1 を活性化していると考えられる。興味深いことに Swi5-Sfr1 は Rad51 も活性化することが出来る一方で、Hop2-Mnd1 の活性化は Dmc1 に特異的であった。Hop2-Mnd1 は Dmc1 と Rad51 の両方と物理的相互作用を示すことから、このような活性化の特異性が何に由来するのか現時点では明らかではなく、今後の研究の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Esquivel-Chavez Alfredo, Maki Takahisa, Tsubouchi Hideo, Handa Testuya, Kimura Hiroshi, Haber James E., Thon Genevieve, Iwasaki Hiroshi	4. 巻 97
2. 論文標題 Euchromatin factors HULC and Set1C affect heterochromatin organization and mating-type switching in fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 123 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.22-00012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Palihati Maierdan, Tsubouchi Hideo, Argunhan Bilge, Kajitani Rei, Bakenova Omirgul, Han Yong-Woon, Murayama Yasuto, Itoh Takehiko, Iwasaki Hiroshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Homology length dictates the requirement for Rad51 and Rad52 in gene targeting in the Basidiomycota yeast <i>Naganishia liquefaciens</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 919 ~ 936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-021-01201-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsubouchi Hideo, Argunhan Bilge, Iwasaki Hiroshi	4. 巻 71
2. 論文標題 Biochemical properties of fission yeast homologous recombination enzymes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Genetics & Development	6. 最初と最後の頁 19 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gde.2021.06.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Muraszko Jakub, Kramarz Karol, Argunhan Bilge, Ito Kentaro, Baranowska Gabriela, Kurokawa Yumiko, Murayama Yasuto, Tsubouchi Hideo, Lambert Sarah, Iwasaki Hiroshi, Dziadkowiec Dorota	4. 巻 49
2. 論文標題 Rrp1 translocase and ubiquitin ligase activities restrict the genome destabilising effects of Rad51 in fission yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 6832 ~ 6848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab511	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Argunhan Bilge, Iwasaki Hiroshi, Tsubouchi Hideo	4. 巻 104
2. 論文標題 Post-translational modification of factors involved in homologous recombination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103114 ~ 103114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2021.103114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Afshar Negar, Argunhan Bilge, Palihati Maierdan, Taniguchi Goki, Tsubouchi Hideo, Iwasaki Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 A novel motif of Rad51 serves as an interaction hub for recombination auxiliary factors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e64131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.64131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zdravkovic Aleksandar, Daley James M., Dutta Arijit, Niwa Tatsuya, Murayama Yasuto, Kanamaru Shuji, Ito Kentaro, Maki Takahisa, Argunhan Bilge, Takahashi Masayuki, Tsubouchi Hideo, Sung Patrick, Iwasaki Hiroshi	4. 巻 118
2. 論文標題 A conserved Ctp1/CtIP C-terminal peptide stimulates Mre11 endonuclease activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2016287118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2016287118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Han Yong-Woon, Kajitani Rei, Morimoto Hiroya, Palihati Maierdan, Kurokawa Yumiko, Ryusui Rie, Argunhan Bilge, Tsubouchi Hideo, Abe Fumiyoshi, Kajiwara Susumu, Iwasaki Hiroshi, Itoh Takehiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of Naganishia liquefaciens Strain N6, Isolated from the Japan Trench	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00827-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00827-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsubouchi Hideo, Argunhan Bilge, Ito Kentaro, Takahashi Masayuki, Iwasaki Hiroshi	4. 巻 117
2. 論文標題 Two auxiliary factors promote Dmc1-driven DNA strand exchange via stepwise mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 12062 ~ 12070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1917419117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Argunhan Bilge, Sakakura Masayoshi, Afshar Negar, Kurihara Misato, Ito Kentaro, Maki Takahisa, Kanamaru Shuji, Murayama Yasuto, Tsubouchi Hideo, Takahashi Masayuki, Takahashi Hideo, Iwasaki Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Cooperative interactions facilitate stimulation of Rad51 by the Swi5-Sfr1 auxiliary factor complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.52566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 坪内英生、Palihati Maierdan, Bakenova Omirgul、青木陸登、今井健人、梶谷 嶺、韓 龍雲、伊藤武彦、岩崎博史
2. 発表標題 BRCA2を持つ担子菌Naganishia liquefaciens(ナガニシア酵母)を用いた相同組換え機構の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坪内英生
2. 発表標題 クリプトコッカス酵母をモデルとした相同組換え研究の新展開
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------