

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19370002

研究課題名 (和文) 分裂酵母の遺伝的組換えを制御するメディエーターの機能解析

研究課題名 (英文)

Molecular analysis of recombination mediators from fission yeast

研究代表者

岩崎博史 (IWASAKI HIROSHI)

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科

研究者番号：60232659

研究成果の概要：

本研究は、分裂酵母の 2 種類の組換えメディエーター (Rad22, Swi5-Sfr1) が、協調して Rad51 リコンビナーゼによる DNA 鎖交換反応を促進することを *in vitro* で証明した。この時、Swi5-Sfr1 複合体は Rad51 の ATP 依存的 DNA 結合能の上昇を引き起こし、Rad22 は RPA にコートされた単鎖 DNA に Rad51 をリクルートするという、2 つのメディエーターの異なる役割分担による詳細な分子メカニズムが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
20年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：相同組換え・複製フォーク・DNA 二重鎖切断修復・Rad51 リコンビナーゼ・ATPase・試験管内再構成系・ホリデイ構造・DNA 結合タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

組換え反応の中心的な反応は、相同な 2 分子の DNA 間での鎖交換反応であり、リコンビナーゼによって触媒される。代表的なリコンビナーゼとして、バクテリアの RecA タンパク質、真核生物では、

体細胞分裂と減数分裂の両方で機能する Rad51 タンパク質 (分裂酵母ホモログは Rhp51 と呼ばれることもある) と、減数分裂期特異的な組換え反応に関与する Dmc1 の 2 種類のリコンビナーゼが良く知られている。これらのリコンビナーゼはお互いにアミノ酸配列上の相同性が高

く、それゆえ鎖交換反応は生物種を越えて共通の基本メカニズムで進行すると考えられている。

リコンビナーゼは、単鎖 DNA (ssDNA) 上でらせん状に結合してヌクレオプロテインフィラメントを形成し、この構造体によって DNA 鎖交換反応が触媒される。一般に、真核生物型リコンビナーゼはフィラメント形成能が低く、そのためメディエーターと呼ばれる活性化因子を必要とする。最も良く研究が進んでいる出芽酵母では、これまでに Rad52 と Rad55-Rad57 ヘテロ二量体の 2 種類の因子がメディエーターとして同定されている。Rad55 や Rad57 は、RecA/Rad51/Dmc1 と一次構造上の相同性を有することから、Rad51 パラログと呼ばれている。

セキツイ動物では、Rad52 に加えて、5 種類の Rad51 パラログ (Rad51B/C/D, 及び Xrcc2/3) の存在が知られている。また、家族性乳癌の原因遺伝子産物の一つである Brca2 が 26S プロテアゾームのコンポーネントの一つである Dss1 サブユニットと結合して、Rad51 による鎖交換反応を促進することが示されている。

以上のことから、セキツイ動物では、Rad51 ヌクレオフィラメント (言い換えると Rad51 依存的組換え反応経路) が複数の独立した経路から形成されることが示唆されるが、詳細は不明である。また、それぞれのメディエーターの機能分担や機能差異などは、全く解明されていない。

分裂酵母では、Rad52 の構造的機能的ホモログとして Rad22 が知られている。rad22 欠損株は、出芽酵母 rad52 変異株と同様に相同組換えや組換え修復において最も重篤な表現型を示し、Rad22 メディエーターが分裂酵母細胞内で極めて重

要な機能を果たしていることがわかる。

我々は、これまで分裂酵母の組換え修復に関与する遺伝子を網羅的に分離同定した。その最初の過程で、Rhp57 (分裂酵母 Rad57 ホモログ) を同定した。さらに Rhp57 は Rhp55 (分裂酵母 Rad55 ホモログ) と結合して、Rad51 活性を補助することを示唆していた (Tsutsui et al., 2000, 2001) (以下、出芽酵母の命名法に合わせて、それぞれ、Rad57、Rad55 と呼ぶ)。その後、接合型変換に関与する遺伝子として同定された Swi5 が、その結合パートナーを替えることによって、接合型変換特異的 (Swi5-Swi2 複合体)、もしくは、組換え修復特異的 (Swi5-Sfr1 複合体) Rad51 複合体を形成することを示した。また、組換え修復においては、Rad55-Rad57 と Swi5-Sfr1 が、独立した平行経路として機能することを発見した (Akamatsu et al., 2003)。

出芽酵母 Rad55-Rad57 複合体は、メディエーターとして機能すること、また、分裂酵母 Rad55-Rad57 と Swi5-Sfr1 の遺伝学及び細胞生物学的解析に基づく機能的相似性から、Swi5-Sfr1 は Rad51 に対してメディエーターとして機能する可能性が考えられたが、2006 年、我々は、生化学的にこれを証明した (Haruta et al., 2006)。

さらに、様々な状況証拠から Swi5-Sfr1 が Dmc1 に対してもメディエーターとして機能することが予想され、この仮説も生化学的に証明した (Haruta et al., 2006)。

これらの一連の事実から、3 種類のメディエーター (Rad55-Rad57, Swi5-Sfr1 及び Swi5-Swi2) が、単にリコンビナーゼの活性化因子というだけにとどまらず、リコンビナーゼフィラメントに作用して、最終産物を決定する組換えの制御因子としての機能を果していることが強く示唆される。それゆえ、組換え反応の制御を正確に理解するためには、メディエータ

一の機能解析が不可欠である。

## 2. 研究の目的

DNA 鎖交換反応は、リコンビナーゼが ssDNA 上に結合したヌクレオプロテインフィラメントによって触媒される。リコンビナーゼに加えて ssDNA 結合タンパク質である replication protein A (RPA) も組換え反応に必須な因子である。ところが、リコンビナーゼは、RPA より ssDNA に対する結合能が弱く、実際、ssDNA が生じると直ちに RPA が結合することが示されている。そのため、最初に RPA が ssDNA に結合してしまうと、リコンビナーゼフィラメントが形成できず、鎖交換反応が阻害される。この RPA による阻害効果を解消して、リコンビナーゼの ssDNA 上へのローディングを促進し、効率良く鎖交換反応を起こさせる因子として、「メディエーター」が定義された。

我々は、上記のように、Swi5-Sfr1 複合体のメディエーター活性を証明していた (Haruta et al., 2006)。しかし、RPA による阻害に対して、Swi5-Sfr1 の解消効果はこれまでに報告された「メディエーター」に比べてかなり低く、Swi5-Sfr1 の本来の機能は、むしろ、Rad51 フィラメントの活性化に特化したものであると予想された (Haruta et al., 2006)。

遺伝学的解析から、ssDNA 領域に最初に RPA が結合したあと、この部位に、Rad22 (Rad52 ホモログ) が Rad51 をリクルートすると考えられる。また、Rad22 と Swi5-Sfr1 は相同組換え(修復)において同じ経路で機能することが示されている。このことは、同じ反応経路でなぜ2種類のメディエーターが必要なのか、すなわち、2種類のメディエーターの機能分担の解明が最も興味深い問題である。このことを明らかにすることを、本研究の最優先課題とした。

## 3. 研究の方法

同じ反応経路でなぜ2種類のメディエーターが必要なのか、再構成系を利用して、この問題の解明を試みた。そのために、試験管内3本鎖 DNA 交換反応を利用した。3本鎖 DNA 交換反応は、M13 や  $\phi$ X174 ファージ由来の circular

ssDNA (css) とそれと相同な線状二重鎖 DNA (linear double stranded DNA: lds) を基質として用いる。鎖交換反応は、リコンビナーゼによる相同塩基対合(homologous pairing)と DNA 鎖転移(strand transfer)によって進行する。反応中間体は、接合分子(joint molecule: JM)、最終反応産物は nicked circular (NC) と線状 ssDNA (linear ssDNA: lss) であり、2種類の基質(css と lds) と反応産物 (JM と NC) はアガロース電気泳動によって分離解析した。

## 4. 研究成果

in vivo の機能解析から、Rad22 と Swi5-Sfr1 複合体は同じ経路で働くことが示されている。そこで、上述の3本鎖交換反応において、予め RPA でコートした ssDNA を用意して、Rad51-Swi5-Sfr1 依存的な鎖交換反応を開始したところ、Rad22 の添加によって、RPA による阻害効果が完全に解消された。

Rad22 を加えない鎖交換反応系 (Rad51, Swi5-Sfr1 及び RPA だけをタンパク質因子とする) では、上述のように、RPA が結合する前に Rad51 の安定なフィラメントを形成させる必要があった。この条件に加えて、lds を最後に添加するという人為的コントロールが必要であった。ところが、Rad22 を加えた鎖交換反応系では、lds 添加の順番依存性までもキャンセルされた。すなわち css と lds が入った混合液に対して、タンパク質混合液 (Rad22, Rad51, Swi5-Sfr1、及び RPA) を加えると鎖交換反応が効率良く起こった。このことは、Swi5-Sfr1 依存的な Rad51 組換え経路の in vitro 試験管内完全再構成系が確立できたことを示唆する。

次に、RPA の阻害効果の解消機構について詳細に解析した。その結果、単鎖 DNA に結合した RPA を引き剥がすタンパク質ファクターは Rad51 であり、Rad22 や Swi5-Sfr1 複合体ではないことが明らかになった。しかし、この引き剥がし活性は Swi5-Sfr1 複合体によって大きく上昇した。Rad22 を加えただけでは、引き剥がし活性の上昇は微々たるものであったが、

Swi5-Sfr1 複合体と Rad22 ともに存在すると、引き剥がし活性は最も上昇した。

Rad51 の単鎖 DNA に対する結合能の on-rate は、Swi5-Sfr1 複合体もしくは Rad22 によって影響されない。しかし、いったん単鎖 DNA に結合した Rad51 は Swi5-Sfr1 複合体によって安定化されることがわかった。この効果は、Rad22 によっては引き起こされない。

これらの事実や、他の詳細な生化学的解析から、Swi5-Sfr1 複合体が Rad51 フィラメントを鎖交換反応コンピテントな状態に活性化する活性化因子として機能し、一方、Rad22 は、主に RPA にコートされた ssDNA 部位へ Rad51 をリクルートするリクルーターとして機能することが示唆された。すなわち、2 種類のメディエーターの機能的差異が本研究で初めて明らかになった。

以上の成果は、論文 5、kurokawa et al に報告した。その他の研究成果として、以下に発表論文の要旨をまとめる。

(1) Hishida et al. 慢性的に低線量の紫外線に照射された酵母細胞の耐性機構において、Rad6 経路が重要であることを明らかにした。

(2) 分裂酵母 Mc11 のセントロメア構造への機能を示唆した。

(3) 分裂酵母の新しい組換え修復遺伝子 Nip1+ を同定、キャラクターゼーションをした。

(4) Mus81 が複製フォークの崩壊時の修復に重要な働きをしていることを明らかにした。

(5) 上記のとおり。

(6) Holliday 構造の試験管内形成に真核生物のリコンビナーゼで初めて成功した。

(7) Swi5 の総説

(8) 2 つの Rad51 副経路 (Swi5/Sfr1 依存経路と Rhp55/Rhp57 依存経路) の in vivo における機能的差異を明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 8 件) すべて査読有り

1. *RAD6-RAD18-RAD5* pathway-dependent tolerance to chronic low-dose UV light. Hishida T, Kubota Y, Carr AM and Iwasaki H. *Nature* (2009) 457:612-615.
2. A DNA polymerase  $\alpha$  accessory protein, Mc11, is required for propagation of centromere structures in fission yeast. Natsume T, Tsutsui Y, Takashi T, Dunleavy EM, Pidoux AL, Iwasaki H, Shirahige K, Allshire RC, and Yamao F. *PLoS One* (2008) 3:2221.
3. Molecular characterization of the *Schizosaccharomyces pombe nip1<sup>+</sup>/ctp1<sup>+</sup>* gene in DNA double strand break repair in association with the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. Akamatsu Y, Murayama Y, Yamada T, Nakazaki T, Tsutsui Y, Ohta K and Iwasaki H. *Mol. Cell. Biol.* (2008) 28:3639-3651.
4. Mus81 is essential for sister chromatid recombination at broken replication forks. Roseaulin L, Yamada Y, Tsutsui Y, Russell P, Iwasaki H, and Arcangioli B. *EMBO J.* (2008) 27: 1378-1387.
5. Reconstitution of DNA strand exchange mediated by Rhp51 recombinase and two mediators. Kurokawa Y, Murayama Y, Haruta-Takahashi N, Urabe I and Iwasaki H. *PLoS Biol* (2008) 6: e88.
6. Formation and branch migration of Holliday junctions mediated by eukaryotic

recombinases. Murayama Y, Kurokawa Y, Mayanagi K, and Iwasaki H. *Nature* (2008) 451:1018-1021.

7. Fission yeast Swi5 protein, a novel DNA recombination mediator. Haruta N, Akamatsu Y, Tsutsui Y, Kurokawa Y, Murayama Y, Arcangioli B, Iwasaki H. *DNA Repair (Amst)* (2008) 7: 1-9.
8. Fission yeast Swi5/Sfr1 and Rhp55/Rhp57 differentially regulate Rhp51-dependent recombination outcomes. Akamatsu Y, Tsutsui Y, Morishita T, Siddique, MDP, Kurokawa, Y, Ikeguchi M, Yamao F, Arcangioli B, and Iwasaki H. *EMBO J.* (2007) 26:1352-1362.

[学会発表] (計 10 件)

1. Biochemical analysis of DNA strand exchange mediated by the fission yeast recombinase Rhp51 and its auxiliary proteins. 岩崎博史. 2008 年度日本分子生物学会日本生化学会合同年会 4S11 シンポジウム 染色体サイクルの制御機構. 2008 年 12 月 9 日～12 日. 神戸ポートアイランド
2. Biochemical analyses of the Swi5-Sfr1 complex on the two different recombinases in fission yeast. Iwasaki H. The 6<sup>th</sup> international 3R symposium. 2008 年 10 月 27 日～30 日. つま恋リゾート. 静岡
3. Stimulation of Rhp51- (Rad51-) and Dmc1-mediated DNA strand exchanges by the Swi5-Sfr1 complex. Iwasaki H. The 1<sup>st</sup> GCOE symposium on “Chromosome

Biology”. 2008 年 10 月 24 日～25 日. 東京工業大学. 東京

4. 相同組換えにおけるDNA鎖交換の反応機構. 岩崎博史. 2008 年度日本遺伝学会大 80 回大会Workshop 11 染色体機能とDNA トランスアクション. 2008 年 9 月 3 日～5 日. 名古屋大学工学部
5. DNA strand exchange reactions mediated by the fission yeast recombinase Rhp51 (spRad51) and its mediators, Rad22 (spRad52) and Swi5-Sfr1. Iwasaki H. EMBO Conference Series on Recombination Mechanism. 19-23 May, 2008. Il Ciocco, Italy.
6. The fission yeast *nip1*<sup>+</sup> gene, which is involved in DNA double strand break repair together with the Mre11-Rad50-Nbs1 complex, is a functional counterpart *Saccharomyces Sae2/Com1* and mammalian CtIP. Akamatsu Y, Murayama Y, Yamada T, Tsutsui Y, Ohta K and Iwasaki H. Keystone symposia on DNA replication and Recombination. February 10-15, 2008. Santa Fe, New Mexico, USA
7. 分裂酵母Rhp51 リコンビナーゼによるDNA鎖交換反応のメカニズム. 岩崎博史. 日本分子生物学会日本生化学会合同年会. 4S17 シンポジウム 進化的視点からとらえる相同組換え修復. 2007 年 12 月 11 日～15 日. パシフィコ横浜
8. Biochemical analysis of DNA strand exchange reactions mediated by fission yeast recombinase Rhp51. Iwasaki H. 2<sup>nd</sup>

International symposium of Chromosome and Genome Stability & Instability. 2007 年 11 月 7 日-8 日. 千里ライフサイエンスセンター、大阪.

9. The Swi5-Sfr1 protein complex, a novel recombination mediator in fission yeast. Iwasaki H. The 4<sup>th</sup> International Fission Yeast Meeting. June 11-16, 2007 Copenhagen, Denmark

10. Reconstitution of Rhp51 (spRad51)-dependent DNA strand exchange reaction during HR repair in fission yeast. Iwasaki H. The 3rd US-Japan DNA repair meeting. 2007 年 5 月 7 日～11 日秋保, 宮城

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岩崎 博史 (IWASAKI HIROSHI)  
横浜市立大学大学院  
生命ナノシステム科学研究科  
生体超分子科学専攻  
教授  
研究者番号 : 60232659

##### (2) 研究分担者

無し

##### (3) 連携研究者

無し