

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22370045

研究課題名（和文） 相同組み換えを制御する新規メディエーターの構造科学的研究

研究課題名（英文） Structural studies of a novel mediator regulating homologous recombination

研究代表者

清水 敏之（SHIMIZU TOSHIYUKI）

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：30273858

研究成果の概要（和文）：

リコンビナーゼである Rad51 は相同組み換えにおいて中心的な働きをする。生体内で組換えが起こるときは Rad51 に加え、メディエーターと呼ばれる補助因子を必要とする。Swi5-Sfr1 複合体はメディエーターとして同定され、その後の研究によってリコンビナーゼの活性化因子として働くことが示された。この因子の構造科学的な知見を得るため X 線結晶解析により構造決定したところ、ブーメラン様の構造をとっており、Rad51 フィラメントの溝に入り込めるような形状をしていた。Swi5-Sfr1 はフィラメントの溝に入り込み、フィラメントを安定化していることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Rad51 has a central role in recombination, assembling onto single-stranded DNA as a nucleoprotein filament and catalyzing the invasion and exchange of homologous DNA sequences. Generally, Rad51 requires the assistance of mediators to overcome the inhibition by RPA. The Swi5-Sfr1 complex has been identified as a mediator, and recent studies have shown that it can activate recombinases directly, and thus this complex is the first molecule for the recombinase activator.

We describe the crystal structure of the C-terminal half of Sfr1 in complex with Swi5 from *S. pombe*. Swi5 and Sfr1 form a parallel coiled-coil heterodimer, joined firmly together by formation of two newly identified leucine-zipper motifs and a bundle. Remarkably, the coiled-coil is sharply kinked, generating an elongated and curved shape. This molecular shape is suitable for binding within the reconstituted helical groove of the Rad51 filament, causing the activation of Rad51 filament by stabilizing it as an active form with a longer helical pitch. Biochemical analysis shows that the C-terminal region of Sfr1 complexed with Swi5 possesses the essential function of Swi5-Sfr1 for a recombination activator, while the N-terminal region of Sfr1 plays a role for the efficient recruitment of the Swi5-Sfr1 complex. Swi5-Sfr1 is conserved from yeast to humans, and therefore the phenomena presented here would be prevalent among all eukaryotic organisms.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2011 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学 構造生物化学

キーワード：相同組み換え、メディエーター、リコンビナーゼ、X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

相同組換えに依存した遺伝情報の再編成は生命の基本現象の一つであり、種の多様性を付与する進化のドライビングフォースである。また、損傷 DNA を正確に修復することによってゲノムの安定性を維持する。このように相同組み換えは DNA 損傷の修復、崩壊した複製フォークの回復、減数分裂期における正常な染色体分配など広範な生理機能に関わっている。

相同組み換えは DNA 二重鎖切断によって開始され、引き続き Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN)複合体を中心とした高次タンパク質複合体によって3'末端が突出した単鎖 DNA (ssDNA)が生成される。生じた ssDNA 領域に、ssDNA 結合タンパク質 RPA が速やかに結合する。その後、RPA が除去されながら Rad51 リコンビナーゼ (分裂酵母の場合 Rhp51) が、ssDNA 上に presynaptic filament を形成する。これらの過程は原核生物でも真核生物でも基本的には同じであると考えられている。しかしながら真核生物の Rad51 は活性が弱く、さらに Rad51 は RPA が結合した一本鎖 DNA に対して弱い結合活性しか示さずフィラメント形成ができない。

このため真核生物では Rad51 フィラメントの形成を仲介するメディエーターを必要とする。これまでメディエーターはいくつか同定されており、最初に同定された Rad52 (分裂酵母の場合は Rad22) は Rad55-Rad57 ヘテロ二量体と協調的に働く。その後、Rad51 の補助因子として Swi5-Sfr1 複合体が同定された。Swi5-Sfr1 複合体は、Rad55-Rad57 ヘテロ二量体と同様な働きをしながら、しかし、独立して Rad51 依存的修復経路で働くことが明らかとなった (PNAS 2003; EMBO 2007)。さらに、減数分裂特異的なリコンビナーゼである Dmc1 に対しても、Swi5-Sfr1 複合体が DNA 鎖交換を促進することも報告された (NatureSMB 2006)。両方のリコンビナーゼに機能できるメディエーターは世界で最初の例でありこの日本で発見されたユニークな Swi5-Sfr1 メディエーターに注目する。

2. 研究の目的

二本鎖切断がシグナルとなって相同組換えは開始され、リコンビナーゼによって触媒される DNA 鎖交換反応が素過程となる。即ち、リコンビナーゼが単鎖 DNA 上の数珠状に螺旋を形成して結合したヌクレオプロテインフィラメントがこの反応構造体として機能

し、相同な二重鎖 DNA の検索と鎖交換を触媒する。加えて、真核生物の相同組換えに特徴的なことは、リコンビナーゼの鎖交換活性が低く活性化因子を必要とすることである。

Swi5-Sfr1 複合体は日本で発見されたリコンビナーゼ活性化因子であり、遺伝学及び生化学的な解析でも日本が大きくリードする。本研究では Swi5-Sfr1 複合体によるリコンビナーゼ活性化機構をモデル系として、相同組換えの中心的イベントである鎖交換反応の分子構造基盤を原子レベルで確立することを目標にした。

この研究目標を達成するためには Swi5-Sfr1 複合体、さらには Swi5-Sfr1・リコンビナーゼ・DNA というシグナルに適応した超分子複合体の構造解明が必須である。このために申請者は多方面からのアプローチによって研究を遂行する。まずはこれら超分子複合体の X線結晶解析を行い原子レベルでの構造解明を行う。さらに平行して電子顕微鏡単粒子解析、X線小角散乱法による低～中分解能解析を行いながら最終的には併せて生化学的な実験を行いこれまで未知であった DNA 鎖交換反応の実体を明らかにする。研究対象とするタンパク質はそのホモログが酵母からヒトまで存在しており、ここで得られた知見は真核生物における相同組み換えの普遍的な原理になるといえる。

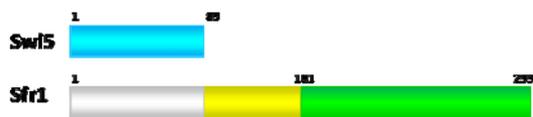
3. 研究の方法

本研究では分裂酵母由来 Swi5, Sfr1, Rad51(Rhp51),に注目し多方面からのアプローチによって構造解析を進めていく。Sfr1 には N 末側半分が天然変性領域だと考えられ、この部分を削った Sfr1C と Swi5 の複合体構造を X線結晶構造解析によって解明する。またこの複合体が全長の Swi5-Sfr1 と比べメディエーターとしての活性を保持しているかどうかを確認する。さらに Rad51 のフィラメント構造が Sfr1-Swi5 を添加することによりどのように変化するか電子顕微鏡により観察する。X線小角散乱による低分解能構造解析も平行して行う。

具体的に以下のような実験を行う。

(1) Swi5-Sfr1C の鎖交換反応

分裂酵母由来 Swi5 は 85 アミノ酸からなる比較的小さなタンパク質である。同じく分裂酵母由来の Sfr1 は 299 アミノ酸からなるタンパク質である (下図参照)。C 末側はどの種でも保存されている領域 (緑は保存性が高く黄色はやや保存性が低い) であるが、N 末側 180 残基は天然変性領域であり保存性は低い



(図のグレイの領域)。そこでこの領域を欠失させた Sfr1C (図の緑の領域) を作成し、この領域が全長と同様な鎖交換反応を促進させる活性を有するかどうか確認する。

(2) Swi5-Sfr1C の X 線結晶構造解析
Swi5 単独および Swi5-Sfr1C の X 線結晶構造解析を行い、この領域の立体構造を決定する。

(3) Swi5-Sfr1 の添加による Rad51 フィラメントの構造変化

Rad51 フィラメントが Swi5-Sfr1 の添加によってどのように変化するか、電子顕微鏡および X 線小角散乱法により観察する。

(4) Sfr1 の N 末端側の役割
Sfr1 の N 末端側がどのような役割を担っているか、生化学的に検討する。

4. 研究成果

(1) Swi5-Sfr1C の鎖交換反応

Swi5 と Sfr1C は全長同士と同様 1 : 1 の複合体を形成することを超遠心分析により決定した。これまで化学量比が 2 : 1 だとされてきたが、実は 1 : 1 であることがわかった。Swi5-Sfr1C は全長 Swi5-Sfr1 とほぼ同等の最大活性をもつが、そのためには約 10 倍程度の量が必要であることがわかった。

(2) Swi5-Sfr1C の X 線結晶構造解析

Swi5 単独では一本の長い α ヘリックスを形成していたが、Swi5-Sfr1C 複合体では 3 つの α ヘリックスに分かれていた。一方 Sfr1 も 3 本の α ヘリックスコイルドコイル構造を作っていることがわかった (下図)。コイルドコイル構造の疎水コアを形成しているアミノ酸は種を超えて保存されているため、Swi5-Sfr1 はこれと同様な構造をもつことが考えられる。また全体の形として鋭く屈曲している。この屈曲構造は Rad51 リコンビナーゼが形成するフィラメント構造の溝に

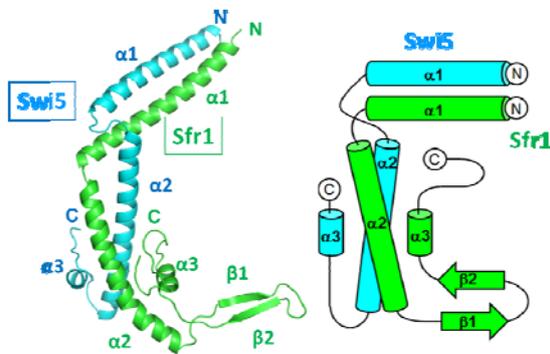
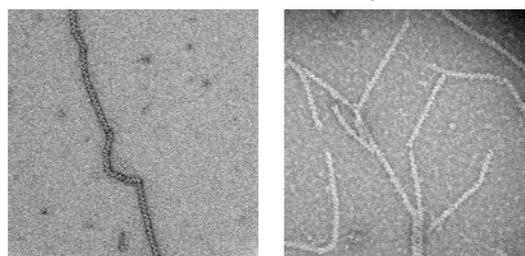


図 Swi5-Sfr1C のリボン図および模式図

ようにあてはまることから、Swi5-Sfr1 のメデイエーターとしての働きは Rad51 の溝に入り込むことでフィラメントを安定化することが強く示唆された。

(3) Swi5-Sfr1 の添加による Rad51 フィラメントの構造変化

Rad51 のフィラメント単独および Swi5-Sfr1 を混合した電子顕微鏡像をみると、単独では Rad51 のフィラメントが観測されるが、混合後はフィラメントの溝が消失していることがわかった。このことは Swi5-Sfr1 がフィラメントの溝に結合し、その結果溝が観測されなくなったためと考えられる。



10 μ M human Rad51 90 μ M dsDNA + 10 μ M Swi5-Sfr1C

図 左 Rad51 フィラメントの電顕像
右 Swi5-Sfr1 添加後の電顕像
左は溝が観測されるが、右では溝が観測されていない。

(4) Sfr1 の N 末端側の役割

今回構造解析されなかった領域である Sfr1 の N 末端領域 (Sfr1N) の役割について検討した。Sfr1N の X 線小角散乱および CD スペクトルを測定したところ予想通り、明確な構造をとっておらず、この領域は天然変性状態であることがわかった。Sfr1N は Swi5 と結合することはできず、鎖交換反応も有していなかった。

一方、Sfr1N は DNA や Rad51 フィラメントに対し親和性を有することがわかった。興味深いことに Swi5-Sfr1C は DNA や Rad51 フィラメントに対する親和性は極めて弱い。

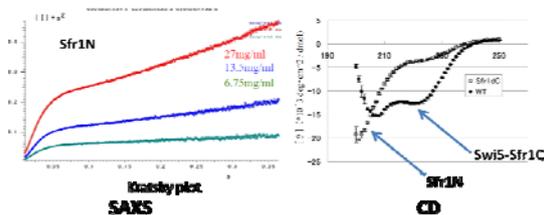
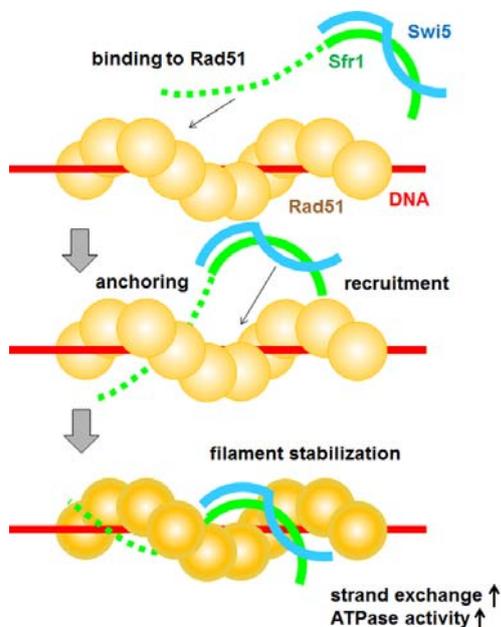


図 Sfr1N の X 線小角散乱データにより得られたクラツキープロット (左) と CD スペクトル (右)

以上のことから Swi5-Sfr1 による活性化機構は、次のように考えられる。天然変性領域である Sfr1N が Rad51 フィラメントにまず結合する。Swi5-Sfr1C はフィラメントへの親

和性は弱いので Sfr1N が必要である。その後 Swi5-Sfr1C がフィラメントの溝の入り込みフィラメントを安定化する。しかし、結合した状態のままでは鎖交換反応を起こせないため、結合したり解離したりを繰り返すものと考えられた。Sfr1N はアンカーのような働きをしていると思われる。

図 Swi5-Sfr1によるRad51フィラメントの



活性化モデル

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)

※全て査読有

1. Characterisation of an intrinsically disordered protein complex of Swi5-Sfr1 by ion mobility mass spectrometry and small-angle X-ray scattering (2013)

Saikusa K, Kuwabara N, Kokabu Y, Inoue Y, Sato M, Iwasaki H, Shimizu T, Ikeguchi M, Akashi S.

Analyst. 138, 1441-1449

2. Mechanistic insights into the activation of rad51-mediated strand exchange from the structure of a recombination activator, the swi5-sfr1 complex (2012)

Kuwabara N, Murayama Y, Hashimoto H, Kokabu Y, Ikeguchi M, Sato M, Mayanagi K, Tsutsui Y, Iwasaki H, Shimizu T.

Structure 20, 440-449.

3. Crystal Structure of Human β -Galactosidase: The Structural Basis of GM1 Gangliosidosis and Morquio B Diseases (2012)

Ohto U, Usui K, Ochi T, Yuki K, Satow Y and Shimizu T

J. Biol. Chem. 287, 1801-1812

4. The fission yeast Swi5-Sfr1 complex, an activator of Rad51 recombinase, forms an extremely elongated Dogleg-shaped structure. (2011)

Kokabu Y, Murayama Y, Kuwabara N, Oroguchi T, Hashimoto H, Tsutsui Y, Nozaki N, Akashi S, Unzai S, Shimizu T, Iwasaki H, Sato M, Ikeguchi M.

J Biol Chem. 286, 43569-76

5. Crystal Structures of Mouse and Human RP105/MD-1 Complexes Reveal Unique Dimer Organization of the Toll-Like Receptor Family (2011)

Ohto U, Miyake K, Shimizu T.

J Mol Biol. 413, 815-825

6. Kokabu Y, Murayama Y, Kuwabara N, Oroguchi T, Hashimoto H, Tsutsui Y, Nozaki N, Akashi S, Unzai S, Shimizu T, Iwasaki H, Sato M, Ikeguchi M.

J Biol Chem. 286, 43569-76

Expression, Purification and crystallization of Swi5 and the Swi5-Sfr1 complex from fission yeast (2010)

7. Kuwabara, N., Hashimoto, H., Yamada, N., Unzai, S., Ikeguchi, M., Sato, M., Murayama, Y., Iwasaki, H. and Shimizu, T. Acta Crystallogr. F66, 1124-1126

The structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications (2010)

8. Oda, T., Hashimoto, H., Kuwabara, N., Akashi, S., Hayashi, K., Kojima, C., Wong, H.L., Kawasaki, T., Shimamoto, K., Sato, M., and Shimizu, T.

J.Biol.Chem. 285, 1435-1445

[学会発表] (計 4 件)

1. Symposium on Structure and Folding of Disease Related Proteins

Seoul National University, Korea July 8, 2011

“Mechanistic insights into the activation of the Rad51-mediated strand exchange from the structure of a recombination activator, the Swi5-Sfr1 complex” Toshiyuki Shimizu

2. New frontier of the research in Rad51 recombinase and its accessory proteins

Institut de Biologie Physico Chimique, France

Sep. 27-28, 2011

“Crystal structure of recombination activator, Swi5-Sfr1 complex, from fission yeast”

Toshiyuki Shimizu

3. 'Program for Young Researcher Symposium in Europe'

SGC Oxford, Oxford, UK, Jun 8, 2012

“Mechanistic insights into the activation of the Rad51-mediated strand exchange from the structure of recombination activator, Swi5-Sfr1 complex”

Toshiyuki Shimizu

4. New frontier of the research in RecAfamily recombinases and their accessory proteins (RecA family 2012)

Kyoto Royal Hotel & Spa, Kyoto, Japan

Nov. 28 – 30, 2012

“Structural study of recombination activator, Swi5-Sfr1 complex”

Toshiyuki Shimizu

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kouzou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 敏之 (SHIMIZU TOSHIYUKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：30273858