

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号：82118
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011~2012
 課題番号：23770105
 研究課題名（和文）
 相同組換えに関わる分裂酵母 Rad51-Swi5-Sfr1 複合体の構造生物学的研究
 研究課題名（英文）
 Structure-function relationships of Rad51-Swi5-Sfr1 complex for homologous recombination
 研究代表者
 桑原 直之 (KUWABARA NAOYUKI)
 大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・研究員
 研究者番号：70506253

研究成果の概要（和文）：

本研究では Swi5-Sfr1 複合体に注目し、この複合体および相互作用分子である Rad51 との超分子複合体の構造機能相関解析を行った。Swi5 と Sfr1 の C 末端側領域の複合体の結晶構造を明らかにし、この複合体が Rad51 の活性化に必須である事を明らかにした。さらに X 線小角散乱解析など複数の解析手法を組み合わせる事で、Swi5-Sfr1 複合体が Rad51 フィラメントの溝に入り込む事で活性化することと、Sfr1 の天然変性領域が活性化に重要である事を明らかにした。本研究により、これら複合体が行う相同組み換えによる鎖交換反応の分子機構モデルを構築できた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I made focus on the structure-function relationships of Swi5-Sfr1 complex that interacts Rad51. I revealed the complex structure of Swi5 and C-terminal region of Sfr1 by X-ray crystallography and found that this protein complex is essential for Rad51 activation. Furthermore, we showed that Swi5-Sfr1 complex enters the groove of Rad51 filament in the activation process, and intrinsically disorder regions of Sfr1 is important in the process. From these results, I proposed a model of Rad51 activating mechanism by Swi5-Sfr1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,860,000

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：相同組換え、DNA 修復、メディエーター

1. 研究開始当初の背景

相同組換えによる DNA 修復は遺伝情報の欠失を含まない DNA 修復経路であるため、正確性が高い DNA 修復機構である。真核生物では Rad51 と呼ばれる酵素が鎖交換反応を触媒し、相同組換えの中心的な役割を担っている。しかし Rad51 だけでは鎖交換反応を促進するこ

とはできず、メディエーターと呼ばれる相互作用因子を必要とする。これらメディエーターにより、相同組換え反応が調節され、細胞内で適切に DNA 修復が起こることが知られている。

研究協力者である岩崎博史により、分裂酵母に存在する Swi5, Sfr1 の二つの蛋白質複

合体を形成し、Rad51 と直接相互作用することで、鎖交換反応を促進することが明らかにされた。これまでに Rad51 による鎖交換反応機構および Rad51 とメディアーターによる活性調節機構の詳細は不明な点が多い。さらに Swi5-Sfr1 と Rad51 との相互作用機構は全く未知であった。

またさらに Rad51 の相同組換え機構は Rad51 単独や DNA との複合体での X 線結晶構造解析、NMR などの解析が進められている。鎖交換反応機構の詳細なメカニズムは明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) Swi5-Sfr1 複合体構造を明らかにする。Swi5 と Sfr1 は複合体になり初めて Rad51 を活性化できる。また Sfr1 は単独で不安定である。複合体構造を明らかにすることにより、Sfr1 の安定化機構を明らかにし、Rad51 活性化機構解明のための構造基盤を得る。

(2) Rad51-Swi5-Sfr1 の構造および Rad51 との複合体形成による構造変化を明らかにする。Rad51 は一本鎖 DNA に結合し、フィラメントを形成することで鎖交換反応を触媒することが知られている。そのフィラメントピッチが不活性・活性状態で変化していることが知られている。X 線小角散乱解析などの手法を用いることで、その構造変化における Swi5-Sfr1 の寄与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Sfr1 は N 末端側 (Sfr1N) と C 末端側 (Sfr1C) の機能が異なり、N 末端側の機能は未知であり、C 末端側は Swi5 との相互作用に必須であることがわかっている。そこで、Swi5-Sfr1C を大腸菌共発現系で大量発現、精製、結晶化し、結晶構造解析を行った。また Sfr1N はその配列から二次構造をとっていない天然変性領域であることが予想される。この領域と Swi5-Sfr1 全長の X 線小角散乱解析を行うことにより、低分解能溶液構造を明らかにした。

(2) X 線結晶構造解析および小角散乱解析により明らかにした構造をもとに、Rad51 の活性化に関与している領域を調べるために、変異体を作製し、生化学的手法を用いて調べた。

4. 研究成果

(1) Swi5 と Sfr1C 末端側領域 (Sfr1C) の結晶構造を 2.2 Å 分解能で明らかにした。Swi5-Sfr1C が複合体を形成すること、この複合体が Rad51 の活性化に必須である事を明らかにした。この複合体は Rad51 の活性化に必須であることと明らかにした分子形状から Swi5-Sfr1 複合体は Rad51 が形成するフィラ

メントの溝に入り込むことで Rad51 のフィラメントピッチを固定化し、活性化に寄与していることが示唆された。この仮説を検証するために複合体の電子顕微鏡解析、X 線小角散乱解析を行い、実際にフィラメントの溝に入り込んでいること、フィラメントピッチが活性化状態で固定化されていることを明らかにした。

さらに Sfr1 の N 末端側領域 (Sfr1N) はほとんど二次構造を保持していないことを X 線小角散乱解析、CD 測定により明らかにした。また変異体の生化学的解析により、Swi5-Sfr1C の機能を促進する働きをもち、DNA や Rad51 結合能を持つ事を明らかにした。これら結果を Structure 誌に報告した。

(2) 結晶構造解析では Sfr1N と Sfr1C を分けて解析していたため、Sfr1 の全体構造は明らかにできなかった。そこで Swi5-Sfr1 全長複合体の X 線小角散乱解析を行い、その低分解能溶液構造を明らかにした。Swi5-Sfr1 は細長い棒状の構造をしていたため、そのトポロジーを知るのは困難であったが、複数のモノクロナール抗体との複合体の SAXS を測定する事により、Swi5-Sfr1 複合体のトポロジーを明らかにし、X 線結晶構造解析では明らかにできなかった Swi5-Sfr1 の全体構造を明らかにした。この結果は抗体を用いることで、X 線小角散乱解析により分子の全体構造を明らかにする新規の手法である。また明にした構造から Rad51 と Swi5-Sfr1 のストイキオメトリーが複数対一分子であることが示唆された。このことはこれまでの機能解析および我々の結晶構造解析の結果と一致しており、Swi5-Sfr1 は複数の Rad51 プロトマーと同時に相互作用することで、Rad51 のフィラメントピッチの固定化に寄与していると予想される。これらの結果は the Journal of Biological Chemistry 誌に報告した。

(3) またさらに一連の変異体の機能解析を行うことで、DNA 結合領域と Rad51 結合領域の決定を行なった。その結果、それぞれ結合領域はとても小さく 10-20 残基程度であることを明らかにした。

この研究の過程で Sfr1N が天然変性領域である事を SAXS、CD、NMR、MS 解析により明らかにした。また SAXS と MS を組み合わせることにより天然変性領域の同定や解析を行った結果について The Analyst 誌に報告した。

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 5 件)

① Lisa Asano, Ichiaki Ito, Naoyuki Kuwabara, Tsuyoshi Waku, Junn Yanagisawa, Hiroyuki Miyachi, Toshiyuki Shimizu, Structural basis for vitamin D receptor agonism by novel nonsecosteroidal ligands. FEBS letters, 査読有, 587巻, 2013, 957-963
DOI: 10.1016/j.febslet.2013.02.028.

② Kazumi Saikusa, Naoyuki Kuwabara, Yuichi Kokabu, Yu Inoue, Mamoru Sato, Hiroshi Iwasaki, Toshiyuki Shimizu, Mitsunori Ikeguchi, Satoko Akashi, Characterisation of an intrinsically disordered protein complex of Swi5-Sfr1 by ion mobility mass spectrometry and small-angle X-ray scattering. The Analyst, 査読有, 138巻, 2013, 1141-1149
DOI: 10.1039/c2an35878f.

③ Naoyuki Kuwabara, Yasuto Murayama, Hiroshi Hashimoto, Yuichi Kokabu, Mitsunori Ikeguchi, Mamoru Sato, Kouta Mayanagi, Yasuhiro Tsutsui, Hiroshi Iwasaki, Toshiyuki Shimizu Mechanistic insights into the activation of rad51-mediated strand exchange from the structure of a recombination activator, the swi5-sfr1 complex. Structure, 査読有, 20巻, 2012, 440-449, DOI: 10.1016/j.str.2012.01.005

④ Naoyuki Kuwabara, Takuji Oyama, Daisuke Tomioka, Masao Ohashi, Jun Yanagisawa, Toshiyuki Shimizu, Hiroyuki Miyachi, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) have multiple binding points that

accommodate ligands in various conformations: phenylpropanoic acid-type PPAR ligands bind to PPAR in different conformations, depending on the subtype. Journal of medicinal chemistry, 査読有, 55巻, 2011, 893-902. DOI: 10.1021/jm2014293

⑤ Yuichi Kokabu, Yasuto Murayama, Naoyuki Kuwabara, T Oroguchi, Hiroshi Hashimoto, Yasuhiro Tsutsui, N. Nozaki, Satoko Akashi, Satoru Unzai, Toshiyuki Shimizu, Hiroshi Iwasaki, Mamoru Sato, Mitsunori Ikeguchi, Fission yeast Swi5-Sfr1 protein complex, an activator of Rad51 recombinase, forms an extremely elongated dogleg-shaped structure. The journal of biological chemistry, 査読有, 286 巻, 2011, 43569-43576, DOI: 10.1074/jbc.M111.303339

[学会発表] (計 4 件)

① Naoyuki Kuwabara, Dan Hu, Jun Hirabayashi, Ryuichi Kato
Structural basis of the broad carbohydrates specificity of a fungal galectin from *Agrocybe cylindricea*. 物構研サイエンスフェスタ, 2013年3月14日, 茨城県

② Lisa Asano, Ichiaki Ito, Naoyuki Kuwabara, Junn Yanagisawa, Hiroyuki Miyachi, Toshiyuki Shimizu, Structural basis for vitamin D receptor agonism by novel nonsecosteroidal ligands, AsCA 12, 2012年2月2-6日, オーストラリア アデレード

③ Naoyuki Kuwabara, Circular and Linear Dichroism analyses of Swi5/Sfr1/Rad51 complex, New frontier of the research in

Rad51 recombinase and its accessory proteins

2011年9月28日, フランス パリ

④ Naoyuki Kuwabara, Hiroshi Hashimoto,
Yuichi Kokabu, Mitsunori Ikeguchi, Mamoru
Sato, Kouta Mayanagi, Yasuto Murayama,
Hiroshi Iwasaki, Toshiyuki Shimizu,

Structural analysis of Swi5-Sfr1 complex,
mediators for homologous recombination.

第11回日本蛋白質科学会年会, 2011年6月
8日, 大阪府

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 直之 (KUWABARA NAOYUKI)
大学共同利用機関法人高エネルギー加速器
研究機構・物質構造科学研究所・研究員
研究者番号: 70506253

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

佐藤 衛 (SATO MAMORU)
横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学
研究科・教授
研究者番号: 60170784

池口 満徳 (IKEGUCHI MITSUNORI)
横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学
研究科・准教授
研究者番号: 60261955

岩崎 博史 (IWASAKI HIROSHI)
東京工業大学大学院生命理工学研究科・教授
研究者番号: 60232659

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