

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770005

研究課題名(和文) 相同組換えに関与する Rad51 の新規メディエーター蛋白質 Shu 複合体の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Shu complex, a new mediator of Rad51 protein in recombination

研究代表者

笹沼 博之 (SASANUMA HIROYUKI)

大阪大学・蛋白質研究所・特任研究員

研究者番号：00531691

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、DNA への傷を修復する経路の一つである相同組換え機構に関与する Shu 複合体蛋白質の機能解析を行った。その結果、Shu 蛋白質複合体は、相同組換えに中心的な役割を持つ Rad51 蛋白質の働きを助ける重要な機能を持っていることが分かった。さらに研究計画通り、Shu 複合体の蛋白質立体構造の決定し、構造生物学的な観点からも Rad51 蛋白質との関係性を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Homologous recombination is essential mechanism to repair DNA damage, such as double strand breaks. In this grant period, I found that Shu complex assists the role of Rad51 protein, which plays a central role in homologous recombination. Based on research proposal, I also successfully determined the crystal structure of Shu complex, thereby could clarified the structural relationship between Rad51 and Shu protein complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：分子遺伝、Rad51, Dmc1, 減数分裂

1. 研究開始当初の背景

減数分裂期組換え反応は、細胞が自らの DNA に二重鎖の切断(DSB)を導入することが端緒となる。DSB は、ともすれば遺伝情報の欠失などをもたらす細胞にとって極めて危険な反応である。この反応は、素過程において体細胞分裂期に起こる偶発的な DNA 損傷と同様な機構によって修復されると考えられており、減数分裂期組換え反応の研究は、体細胞分裂期での組換えの理解につながると考え

られている。現在までに組換え反応の中核をなす Rad51 蛋白質を含め、この反応に関与する多くの因子が単離されているにもかかわらず、それらの分子作用機序は未知な部分が多い。本研究課題では、組換えに関与することは分かっているが、機能未知な部分が多い 4 つの因子 Psy3, Csm2, Shu1, Shu2 (以後 PCSS と呼ぶ)に注目して、解析を行った。

2. 研究の目的

DSB 形成後、Rad51 蛋白質がその場所に正しく結合するためには、メディエーターと呼ばれる多くの因子が順序良く機能することが必要である。私は、組換え反応に関与する新規因子として同定されていた遺伝子、PCSS 遺伝子に着目し解析を行っていたところ、予備実験として PCSS 蛋白質が、Rad51 蛋白質のメディエーターとして機能している可能性が示唆されていた。そこで、減数分裂期の機能解析を通して、Shu 蛋白質がどのように Rad51p の組み換え部位への結合を制御しているのかを解明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

PCSS 蛋白質の機能解析をするにあたり、次の 2 点に着目して解析を行った。

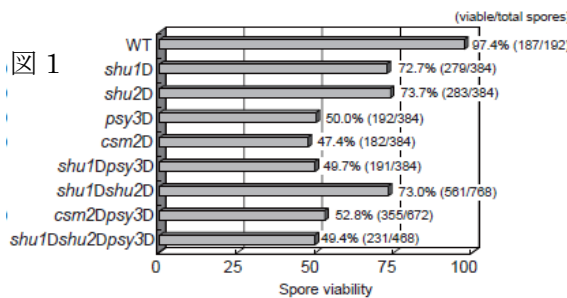
(1) PCSS 蛋白質の細胞内分子挙動

免疫沈降、クロマチン免疫沈降、質量分析などを用いて、PCSS 間相互作用、新規相互作用蛋白質の同定を行った。

(2) PCSS 蛋白質の生化学的特性、構造解析
精製蛋白質を準備し、PCSS 複合体としての分子特性や結晶構造解析を行った。構造解析に関しては、蛋白質研究所内の中川敦史研究室と共同研究を行った。

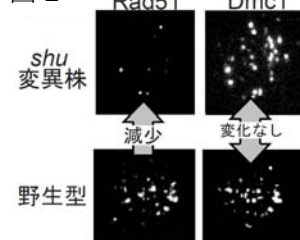
4. 研究成果

まず、出芽酵母細胞を用いて PCSS 遺伝子欠損細胞を作成し、減数分裂期における表現型を解析した。4 つの変異株すべてにおいて、(1)減数分裂期の進行遅延、(2)配偶子の生存率の低下が観察された。4 つの中で *psy3* と



csm2 遺伝子欠損の表現型は、*shu1*, *shu2* 変異株より上述の 2 点において強いことが分かった (*shu1*, *shu2* 変異株 ~ 70%、*psy3*, *csm2* 変異株 ~ 50% 孢子生存率、図 1)。間接蛍光抗体法により *pcss* 変異株を用いて、Rad51 と Dmc1 蛋白質 (減数分裂期に働くもう一つのリ

図 2



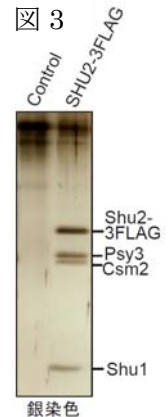
コンビナーゼである) の染色体上への結合を調べた (図 2)。その結果、**(1)PCSS 蛋白質が欠損しても、Dmc1 蛋白質の染色体上への結合には影響を与えない、(2)Rad51 蛋白質の結合のみが影響を受けることが分かった。**さらにこのことは、同じような活性をもつ Rad51 と Dmc1 蛋白質が独立した制御を受けて結合している可能性を示唆している。

次に既知の Rad51 メディエーター蛋白質との関係性をクロマチン免疫沈降と間接蛍光抗体法により調べた。その結果、*rad55* 変異株でも PCSS は DSB が起こった場所に結合することができることが分かった。また PCSS 蛋白質が欠損しても、Rad52 蛋白質の染色体上への結合は正常であることが分かった。これらのことは、**今まで知られている既知の Rad51 メディエーターとは独立して PCSS が機能していることを示唆している。**

減数分裂期組換えが起こっている時間から調整した細胞抽出液から PCSS 複合体構成因子である Shu2 蛋白質を精製すると *Psy3:Csm2:Shu1:Shu2* が 1:1:1:1 の比で結合していることが明らかになった。またこの画分をゲルろ過カラムによって分画すると 4 量体に相当する分子サイズ (約 100kDa) にそれぞれの蛋白質が検出されることから、PCSS 蛋白質は 1:1:1:1 の化学量比を持つ 4 量体を形成して機能していると考えられる (図 3)。

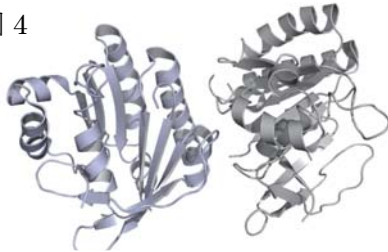
次に研究計画に準じて、PCSS 蛋白質の精製を試みた。まず 4 つの遺伝子を様々な組み合わせで大腸菌内で発現させたが生化学的な解析に用いるだけの十分な発現量を得ることができなかった。そこで遺伝子欠損の表現型を基に *Shu1/Shu2*, *Psy3/Csm2* の組み合わせで大腸菌を用いて精製を行った。その結果、結晶化に十分な量の蛋白質を取得することができた。これらの蛋白質を用いて DNA 結合活性を調べた結果、*Psy3/Csm2* 二量体のみに DNA 結合活性があり、*Shu1/Shu2* 二量体にはないことが分かった。この結果は、*Shu1* 蛋白質の DSB サイトへの結合に *Psy3* 蛋白質を必要とするクロマチン免疫沈降実験の結果に一致するものである。次に阪大蛋白質研の中川敦史研究室と共同研究により、これらの蛋白質を用いて結晶構造解析を試みた。その結果 *Psy3Csm2* 二量体の結晶化と構造解析に成功した。驚くべきことに *Rad51* 蛋白質と *Psy3* も *Csm2* も構造的に非常に似た蛋白質であることが分かった。アミノ酸配列上、*Psy3/Csm2* は全く *Rad51* 蛋白質の相同性はない。図 4 にすでに報告がある *Rad51* 蛋白質の二量体構造を示す。

クロマチン免疫沈降実験の結果、PCSS 蛋白質



の欠損により Rad51 蛋白質の DSB サイトへの結合が全く見られないことから、PCSS 蛋白質複合体が、まず DSB サイトに結合し目印となることで、既知のメディエーターとは別に、Rad51 蛋白質を正しい位置に呼び込んでいる可能性が考えられる。

図 4



Psy3/Csm2 と構造が似ている
Rad51 蛋白質の二量体構造

Conway AB., *et al*, Nat Struct Mol Biol

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 6 件)

1. Kugou, K., Fukuda, T., Yamada, S., Ito, M., Sasanuma, H., Mori, S., Katou, Y., Itoh, T., Matsumoto, K., Shibata, T., *et al.* (2009). Rec8 Guides Canonical Spo11 Distribution along Yeast Meiotic Chromosomes. *Mol Biol Cell*, **345**, 1939-4586.
2. 笹沼博之、太田邦史、タイトル『減数分裂期特異的 DNA 二重鎖切断機構』(2009 年), 蛋白質核酸酵素・特集号『染色体サイクル』459-465
3. Sasanuma, H., Hirota, K., Fukuda, T., Kakusho, N., Kugou, K., Kawasaki, Y., Shibata, T., Masai, H. and Ohta, K. (2008) Cdc7-dependent phosphorylation of Mer2 facilitates initiation of yeast meiotic recombination. *Genes Dev*, **22**, 398-410.
4. Fukuda, T., Kugou, K., Sasanuma, H., Shibata, T. and Ohta, K. (2008) Targeted induction of meiotic double-strand breaks reveals chromosomal domain-dependent

regulation of Spo11 and interactions among potential sites of meiotic recombination. *Nucleic Acids Res*, **36**, 984-997.

5. Sasanuma, H., Murakami, H., Fukuda, T., Shibata, T., Nicolas, A. and Ohta, K. (2007) Meiotic association between Spo11 regulated by Rec102, Rec104 and Rec114. *Nucleic Acids Res*, **35**, 1119-1133.
6. Kugou, K., Sasanuma, H., Matsumoto, K., Shirahige, K. and Ohta, K. (2007) Mre11 mediates gene regulation in yeast spore development. *Genes Genet Syst*, **82**, 21-33.

[学会発表] (計 8 件)

1. Hiroyuki Sasanuma, Maki Tawaramoto, Miki Shinohara and Akira Shinohara, “PCSS complex facilitates the loading of Rad51 recombinase onto meiotic chromosomes”, 3R symposium, Toyama (October, 2010)
2. Hiroyuki Sasanuma, Maki Tawaramoto, Miki Shinohara and Akira Shinohara, “PCSS complex facilitates the loading of Rad51 recombinase onto meiotic chromosomes”, Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells, Fukuoka, Japan (November, 2010)
3. Miki Shinohara, Hiroyuki Sasanuma, Mohamad Bani and Akira Shinohara, “Roles of histone modification enzymes, Set1 and Dot1, and the PAF transcription elongation complex during meiosis”, Fukuoka, Japan (November, 2010)
4. 笹沼博之、俵元麻貴、篠原美紀、篠原 彰、 “Rad51 蛋白質の活性を制御する二つの因子、PCSS 複合体と Srs2 蛋白質の解析”, 核ダイナミクス研究会, 静岡(2010 年、5 月)
5. Hiroyuki Sasanuma, Maki Tawaramoto, Miki Shinohara, and Akira Shinohara

“Shu complex promotes the assembly of Rad51 on meiotic chromosomes”, IUBMB, Shunghai, China (August, 2009)

6. 笹沼博之、俵元麻貴、篠原美紀、篠原彰, “減数分裂期組換えに関与する Shu 蛋白質の機能解析”, 静岡 (2009 年、5 月)

7. Hiroyuki Sasanuma, Miki Shinohara, and Akira Shinohara

“Shu complex promotes the assembly of Rad51 on meiotic chromosomes”

Shizuoka, Japan, (October, 2008)

8, 笹沼博之、三田理恵、俵元麻貴、篠原美紀、篠原 彰, “減数分裂期における Shu 複合体の機能解析”, 酵母遺伝学フォーラム, 北海道 (2008 年、9 月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹沼 博之 (SASANUMA HIROYUKI)

大阪大学・蛋白質研究所・特任研究員

研究者番号 : 00531691