

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24247033

研究課題名(和文) 試験管内再構成系を用いた相同組換え反応における時空間ダイナミズムの分子機構研究

研究課題名(英文) Studies on temporospatial regulation of homologous recombination

研究代表者

岩崎 博史 (Iwasaki, Hiroshi)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：60232659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,900,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、分裂酵母を主要な生物モデル系として、申請代表者らによって独自に発見された因子を中心に、これらの因子がどのように組換え反応に関与するのか詳細に解析した。特に、以下の2点において大きな成果を得ることができた。1) Swi5-Sfr1タンパク質複合体のX線立体構造を決定し、Rad51依存的DNA鎖交換反応の活性化機構についてモデルを提唱した。2) ヘリカーゼ活性とユビキチンE3活性をもつFbh1が、それぞれの活性を利用して、Rad51リコンビナーゼに対して正負の制御をして、組換え反応のクオリティコントロールをしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We studied the molecular functions of previously identified proteins to elucidate the conserved mechanism of homologous recombination in fission yeast, a eukaryotic model organism. This led to several substantial accomplishments, with the following two discoveries having the highest importance. 1) We determined the crystal structures of the Swi5-Sfr1 complex. Based on the structure, together with biochemical analysis of the structure-function relationship, we have proposed a molecular model for the activation of Rad51-dependent DNA strand exchange. 2) We showed that the helicase and ubiquitin E3 ligase activities of Fbh1 plays a critical role in dual regulation of Rad51-dependent DNA strand exchange. We propose that Fbh1 contributes to the quality control aspect of homologous recombination (DNA repair) in mitosis.

研究分野：分子生物学

キーワード：相同組換え DNA二重鎖切断 DNA修復 DNA鎖交換反応 Rad51 分裂酵母 Swi5-Sfr1 Fbh1

1. 研究開始当初の背景

相同組換え (修復) は、大きく3つの反応ステップ (初・中・後期: 図1) に分かれる。相同組換えの初期過程は、DNA二重鎖切断 (DNA double-strand break: DSB) の導入と切断末端のプロセッシングのステップである。DNA二重鎖切断は、プログラムされたもの (減数分裂期や接合型変換) や、偶発的な場合 (例えば、電離放射線の暴露や変異原投与) がある。いずれも 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) に変換される。我々は網羅的検索から多数の組換え関連遺伝子を同定しており、そのなかの一つとして、ヒトのナイミーヘン症候群の原因遺伝子の分裂酵母ホモログ *nbs1⁺* 遺伝子がある。Nbs1タンパク質は、MRN複合体と協働する因子の一つである (Ueno et al. MCB. 2003)。2008年には、*nbs1-S10* 変異の多コピーサプレッサーとして *nip1⁺* (別名 *cpl1⁺*: 以降 *cpl1⁺* に統一) 遺伝子を同定し、この遺伝子産物が、MRN複合体の制御因子である可能性を示した (Akamatsu et al. MCB. 2008)。なお、Ctp1は、ヒトの癌抑制遺伝子産物 CtIP のホモログである。

引き続き、P. Russell 及び、J. Tainer のグループと共同して Nbs1 の X線立体構造を決定した。さらに、Ctp1 の SXT 配列を含むリン酸化オリゴペプチドが Nbs1 の FHA ドメインと結合することを示した (Williams et al. Cell 2009)。

MRN複合体によって生じた 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、ssDNAから RPA が除去されながら Rad51 リコンビナーゼが結合し、presynaptic filament が形成される (中期過程)。

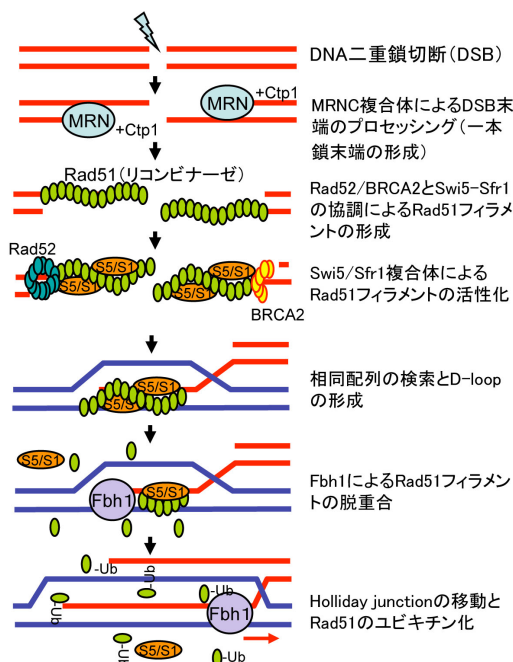


図1. 相同組換えのモデル

この過程では、メディエーターと呼ばれる Rad52 や Rad55-Rad57 ヘテロ二量体が協調的に働く。我々は、分裂酵母の Rad57 ホモログ (Tsutsui et al. Genetics 2000) や、Swi5-Swi2-Swi6、及び、Swi5-Sfr1複合体を同定していた (Akamatsu et al. PNAS. 2003; EMBO J. 2007)。元々 Swi5 は、ドイツのグループによって接合型変換に関与する遺伝子として同定されたものであるが、我々は、Rad51の補助因子として、Swi5-Swi2-Swi6複合体は接合型変換に、また、Swi5-Sfr1は相同組換えに、それぞれ特異的に働くことを明らかにした (Akamatsu et al. PNAS. 2003; EMBO J. 2007)。

2006年には、Swi5-Sfr1複合体が Rad51 による *in vitro* DNA鎖交換反応を促進することを発見した。 (Haruta et al. Nat. SMB. 2006)。2008年には、Swi5-Sfr1複合体、Rad52、RPA、Rad51 リコンビナーゼからなるDNA鎖交換反応系を構築した。これは、世界で初めての組換え中期過程の試験管内完全再構成系として学術的意義が極めて高い (Kurokawa et al. PLoS. Biol. 2008)。また、Rad51を用いて、真核生物のリコンビナーゼで初めて試験管内反応によるHolliday構造形成に成功した (Murayama et al. Nature 2008)。また、2011年には、減数分裂特異的リコンビナーゼ Dmc1を用いて、Holliday構造形成反応に成功した (Murayama et al. Genes Dev. 2011)。

Swi5-Sfr1複合体の構造解析に着手し、2011年には、分析超遠心エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) にて、Swi5と Sfr1が 1:1の複合体を形成していることを明らかにした。同時に、Swi5-Sfr1複合体の溶液中での摩擦比 (F/F_0) が 2.0 ± 0.2 と、極めて大きい値をとることが分かった。さらに、Swi5-Sfr1複合体、及び、Sfr1に対するモノクローナル抗体との複合体 (Swi5-Sfr1-Fab複合体) のX線小角散乱 (SAXS) 解析をし、Swi5-Sfr1複合体が“く”の字型構造 (dogleg-shaped structure) をしていることを示した。Swi5-Sfr1複合体は、ATP結合型Rad51フィラメントの溝に配置し、DNA鎖交換反応を活性化するというモデルを提唱した (図2. Kokabu et al. 2011)。

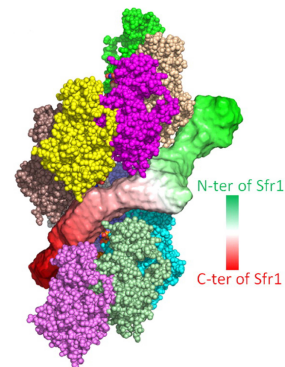


図2. Swi5-Sfr1とRad51フィラメントとの複合体モデル

中-後期過程は、組換え中間体であるD-loopやHolliday構造が解消される過程である。原核生物では、RuvABC リゾルバゼームがその役割を担っている。上述の網羅的検索により、Fbh1 ヘリケースを同定し、遺伝学的解析から、組換え中間体のプロセッシングに働くことを示唆していた (Morishita et al. MCB. 2005)。

(引用文献)

- Akamatsu et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 15770-15775.
 Akamatsu et al. (2007) *EMBO J.* 26: 1352-1362.
 Akamatsu et al. (2008) *Mol. Cell. Biol.* 28: 3639-3633
 Haruta et al. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13: 823-730.
 Kokabu et al. (2011) *J. Biol. Chem.* 286: 43569-43576
 Kurokawa et al. (2008) *PLoS Biol.* 6: e88.
 Morishita et al. (2005) *Mol. Cell. Biol.* 25:8074-8083.
 Murayama et al. (2011) *Genes Dev.* 25:516-527.
 Murayama et al. (2008) *Nature* 451: 1018-1021.
 Ueno et al. (2003) *Mol. Cell. Biol.* 23: 6553-6563.
 Williams et al. (2009) *Cell* 139: 87-99.

2. 研究の目的

相同組換えは、最も重篤な DNA 損傷である二重鎖切断を正確に修復する機構として機能する。それゆえ、ゲノムの安定性を維持する重要な遺伝的メカニズムの一端を担い、発ガン抑止機構の一つとしても働く。相同組換え(修復)は、大きく3つの反応ステップ(初・中・後期:図1)に分かれるが、本申請研究では、分裂酵母を主要な生物モデル系として、申請代表者らによって独自に発見された因子(Ctp1、Swi5-Sfr1複合体、Fbh1ヘリケースなど)を中心に、各ステップを再構築し、これらの因子がそれぞれの反応過程にどのように関与するのかについて分子レベルで解明することを目的とした。一部は、ヒトタンパク質ホモログを用いて、その普遍性を確認することとした。さらに、中-後期間の連続反応を再構成し、ステップ間の連携機構の解明を目指した。これらのアプローチより、染色体動態における時空間的ダイナミズの分子反応論機構論の確立を目指した。

3. 研究の方法

本申請研究では、遺伝学的解析の他、精製したタンパク質を用いた生化学的解析、生物物理学的解析、構造生物学的解析、遺伝学的解析など、様々な解析方法により、多面的なアプローチを取った。

4. 研究成果

(1) Swi5-Sfr1複合体の構造機能解析

Sfr1のN末端を切除したSfr1C(181-299aa)とSwi5との複合体の結晶化に成功し、2.2Åの解像度で構造を決定した。Swi5のヘリックス1(α1)とSfr1のα1、及びSwi5のα2とSfr1のα2がそれぞれcoiled-coil構造を形成し、Swi5のα3とSfr1のα3が2つのα2から成るcoiled-coil構造を挟むように配置されている。2つのcoiled-coil構造ともロイシンジッパーで強固に結びつけられ、2つの二次構造は、約130度折れ曲がっている。この折れ曲がり構造は、多数の相互作用によって安定に維持されている(図3)。

構造機能相関解析により、1) Sfr1のN末端(1~180aa)は、天然変性領域を形成し、Rad51との最初のインターフェースであること。2) Swi5-Sfr1C複合体は、Rad51フィラメントと弱い結合をして、DNA鎖交換反応を活性化すること、を明らかにした。さらに、Sfr1のC末端側に位置する飛び出したβ-シートは、DNA鎖交換反応には寄与しないことが分かった。

これらの解析結果をもとに、Swi5-Sfr1複合体がDNA鎖交換反応を活性化する分子機構について、モデルを提唱した。すなわち、フレキシブルなSfr1N末端領域(1-180aa)は、最初にRad51フィラメントと結合し、これがアンカーとなって、Swi5-Sfr1C複合体とRad51フィラメントの溝との相互作用を仲介する。Swi5-Sfr1C複合体は、Rad51フィラメントの活性型を維持するように働き、これによってRad51フィラメント安定化することでDNA鎖交換反応が促進されるというモデルである(図4)。以上の成果は、「5. 主な発表論文等」〔雑誌論文〕の5に発表した。

SAXSと新しく開発した electrospray ionization ion mobility mass spectrometry (ESI-IM-MS)を用いて、結晶化困難なSfr1全長からなるSwi5-Sfr1複合体の立体構造を解析した。その結果、気相ではSwi5-Sfr1複合体は、極めてコンパクトな構造をしていることが判明した。この成果は、「5. 主な発表論文等」〔雑誌論文〕の4に発表した。

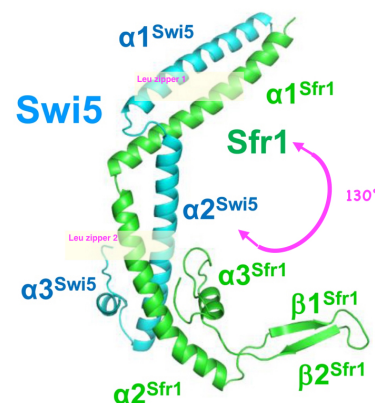


図3. Swi5-Sfr1CのX線立体構造モデル

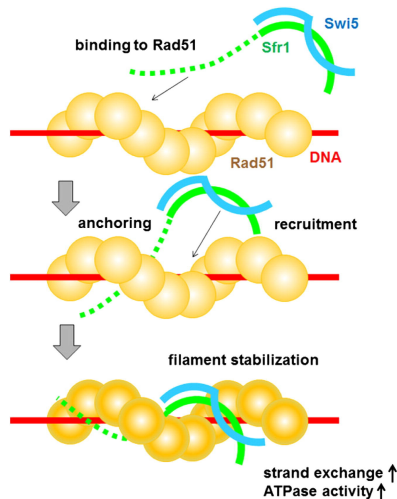


図 4. Swi5-Sfr1 複合体による Rad51 依存的 DNA 鎖交換反応活性化のモデル

線形偏光二色性分光法を用いて、Rad51 フィラメントに対するSwi5-Sfr1複合体の効果を解析した。その結果、Swi5-Sfr1複合体が存在すると、ssDNAの塩基が、フィラメント軸に対してより垂直に近い形で配置 (coplanar alignment) されることが分かった。この効果は、DNA結合能を欠いたSwi5-Sfr1C複合体でも同様に観察された。このことから、Swi5-Sfr1複合体によるDNA鎖交換反応の活性化は、DNAではなく、主にRad51 に作用して引き起こされるものであると予想された。Ca²⁺もRad51依存的鎖交換反応を活性化するが、Swi5-Sfr1 複合体と同様に、coplanar alignmentを誘導した。興味深いことに、Ca²⁺の効果とSwi5-Sfr1 複合体の効果とは相加的では無かった。以上のことから、Swi5-Sfr1 複合体やCa²⁺で誘導される coplanar alignmentが相同な二重鎖DNAとのペアリングに重要な働きをすることで促進効果をひきおこしていると考えられる。この成果は、「5. 主な発表論文等」〔雑誌論文〕の2に発表した。

(2) Dmc1リコンビナーゼ依存的DNA鎖交換反応の制御機構

Dmc1リコンビナーゼ依存的DNA鎖交換反応に対するRad22 (spRad52)とSwi5-Sfr1複合体の効果について、生化学的解析を行った。その結果、Swi5-Sfr1複合体はDmc1リコンビナーゼ依存的DNA鎖交換能を劇的に上昇させることが分かった。すなわち、Dmc1はRPAが結合したssDNA上に効率的にリクルートされ、Swi5-Sfr1複合体がDmc1のフィラメント形成を促進するとともに、そのDNA鎖交換能を活性化することを明らかにした。

一方、Rad52は、Dmc1のssDNA結合を阻害した。これは、Dmc1はRad52と結合能がなく、Rad52がRPAに結合することで、Dmc1のRPAに対する結合が阻害されることが原因となっていた。すなわち、Rad52による阻害効果は、RPAに対する競争的阻害であった。以上の結果は、Dmc1のDNA鎖交換反応は、Swi5-Sfr1複合体による促進とRad52による抑制の2つの制御を受けていることを示唆している。さらに、Rad52に関しては、Rad51依存的DNA鎖交換については活性化、Dmc1依存的DNA鎖交換については抑制効果を示し、2種類のリコンビナーゼに対して正負の制御、すなわち、全く逆の作用を示すことを明らかにした。この成果は、「5. 主な発表論文等」〔雑誌論文〕の3に発表した。

(3) Fbh1ヘリカーゼによるRad51プレシナプティックフィラメントの品質管理

これまでの様々な解析から、F-boxを有するヘリカーゼ分裂酵母 Fbh1は、相同組換えを調節すると考えられていた。我々は、HO エンドヌクレアーゼで誘発した DSB の修復スペクトラムを解析し、Fbh1 は交差型組換え体の形成を抑制することを見出した。一方、交差型組換え体生成における Srs2 や Rqh1 ヘリカーゼの寄与は極めて限定的であり、出芽酵母の知見とは異なっていた。

Fbh1 タンパク質を Skp1との複合体とすることで精製に成功した。精製した Fbh1-Skp1 複合体は、Rad51 プレシナプティックフィラメントから Rad51を引き剥がし、この活性によって Rad51 依存的 DNA 鎖交換反応が阻害された。この引き剥がし反応は Swi5-Sfr1 複合体によって緩和された。さらに、Fbh1-Skp1 複合体と Pcu1-Rbx1 複合体から再構成された SCF^{Fbh1} 複合体は、ユビキチンリガーゼ E3 活性を示し、Rad51をユビキチン化した。

さらに、定常期では、Fbh1 依存的に Rad51 のタンパク量が低下することがわかった。この現象は、Fbh1のF-boxに依存的で、ヘリカーゼドメインに非依存的であった。上記の結果は、一見無関係に見える 2 種類の活性、すなわちDNAヘリカーゼ/トランスロカーゼ反応とユビキチンリガーゼ反応を介して、Fbh1がRad51 依存的相同組換えを負に調節することを示唆している。

一方、Fbh1-Skp1複合体は、一旦Rad51 依存的 DNA 鎖交換が開始された後には、DNA 鎖交換反応を促進することが判明した。このことは、Rad51-Fbh1を介した中-後期ステップでの連続的な共役反応を示唆する。さらに、この結果は、*in vivo* においては、Fbh1 は組換え促進活性を持っている可能性を示唆する。すなわち、Fbh1 は、Rad51 依存的組換えにおいて、正負の制御機能を果たす組換えのレギュレーターとして機能している可能性を強く示唆した (図5)。

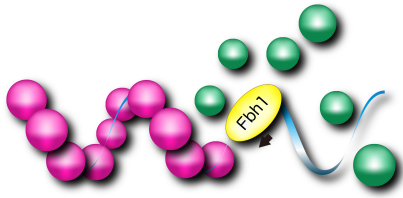


図 5. Fbh1 の作用モデル。Fbh1 は ssDNA 上を移動しから Rad51 を引き剥がす。
青:ssDNA. 赤:ssDNA 上の Rad51.
緑:引き剥がされた Rad51

これら一連の成果は、「5. 主な発表論文等」〔雑誌論文〕の1に発表した。

(4) その他

初期過程に関与する Mre11、Rad50、Nbs1、Ctp1 などが関与する。これらの発現精製系を構築し、それぞれのタンパク質の生化学的解析を行っている。

Swi5-Sfr1 複合体と遺伝学的に平行して機能する Rad55-Rad57 複合体の多量発現系の構築に成功した。

また、Swi5-Sfr1 複合体や Rad55-Rad57 複合体が Rad51 と相互作用するのに重要な働きをしているアミノ酸残基を同定する目的で、Rad51 の表面に位置すると予想されるアミノ酸残基のアラニンスキャニングを行った。その結果、数カ所の候補残基を同定した。

ヒト Rad51 の精製方法を改良して安定供給を可能とした。また、ヒト Swi5 及びヒト Sfr1 の発現系を構築した。Brca2 の発現精製系を検討し、改良しているところである。

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) 全て査読あり

1. Tsutsui Y, Kurokawa Y, Ito K, Siddique MS, Kawano Y, Yamao F and Iwasaki H. Multiple regulation of rad51-mediated homologous recombination by fission yeast fbh1. *PLoS Genet.* (2014) 28. e1004542. doi: 10.1371/journal.pgen.1004542.
2. Fornander LH, Renodon-Cornière A, Kuwabara N, Ito K, Tsutsui Y, Shimizu T, Iwasaki H, Nordén B and Takahashi M. Swi5-Sfr1 protein stimulates Rad51-mediated DNA strand exchange reaction through organization of DNA bases in the presynaptic filament. *Nucleic Acids Res.* (2014) 42: 2358-2365. doi: 10.1093/nar/gkt1257

3. Murayama Y, Kurokawa Y, Tsutsui Y and Iwasaki H. Dual regulation of Dmc1-driven DNA strand exchange by Swi5-Sfr1 activation and Rad22 inhibition. *Genes Dev.* (2013) 27:2299-2304. doi: 10.1101/gad.218693.113.
4. Saikusa K, Kuwabara N, Kokabu Y, Inoue Y, Sato M, Iwasaki H, Shimizu T, Ikeguchi M, and Akashi S. Characterisation of an intrinsically disordered protein complex of Swi5-Sfr1 by ion mobility mass spectrometry and small-angle X-ray scattering. *Analyst.* (2013) 138:1441-1449. doi: 10.1039/c2an35878f.
5. Kuwabara N, Murayama Y, Hashimoto H, Kokabu Y, Ikeguchi M, Sato M, Mayanagi K, Tsutsui Y, Iwasaki H and Shimizu T. Mechanistic insights into the activation of Rad51-mediated strand exchange from the structure of a recombination activator, the Swi5-Sfr1 complex. *Structure* (2012) 20:440-449. doi: 10.1016/j.str.2012.01.005.

〔学会発表〕 (計 52 件)

1. 岩崎博史. 分裂酵母 Rad51 リコンビナーゼとその活性化因子 Swi5-Sfr1、及び、Rad55-Rad57 複合体との相互作用. 日本遺伝学会第 87 回大会. 2015 年 9 月 25 日 東北大学川内キャンパス (宮城県・仙台市)
2. Hiroshi Iwasaki (Keynote address). Genetic dissection of the Rad51 Interfaces to recombinase activator proteins. 2015 International RecA and chromosome biology conference. September 15-17, 2015. Academia Sinica. Taiwan
3. Hiroshi Iwasaki, Kentaro Ito (Invited). Molecular dissection of Rad51 recombinase interfaces to recombinase activator, Rad55-Rad57 and Swi5-Sfr1 protein complexes. The 8th international fission yeast meeting (Pombe 2015). June 22, 2015. 生田神社 (兵庫県・神戸市)
4. Hiroshi Iwasaki. (Keynote address) Regulation of RecA and Rad51. The 4th International conference (New Frontier of the Research on RecA-family recombinases and their accessory proteins). October 5-8, 2014. Busan (South Korea)
5. Hiroshi Iwasaki. (招待講演) Activation of Rad51-driven DNA strand exchange reaction

by the Swi5-Sfr1 complex, Mechanisms of Recombination conference: 50th Anniversary Meeting of the Holliday Model. May 19-23, 2014. Alicante (Spain)

6. Hiroshi Iwasaki. (Keynote address) Introduction for the Swi5-Sfr1 protein complex, as a recombinase activator. The 3rd International conference: New Frontier of the Research on RecA-family recombinases and their accessory proteins October 3-5, 2013. Nantes (France)
7. Kentaro Ito, Yasuhiro Tsutsui, and Hiroshi Iwasaki (invited). Functional interactions between Rad51 recombinase and its activator Swi5-Sfr1 complex in fission yeast. The 7th International Fission Yeast Meeting (Pombe 2013). June 24-29, 2013. London (UK)
8. Hiroshi Iwasaki (keynote address). A short history of study on the Swi5-Sfr1 complex from fission yeast. The 2nd International conference on new frontier of the research in RecA-family recombinase and its accessory proteins. November 29, 2012, 京都ロイヤルホテル&スパ (京都府・京都市)
9. Hiroshi Iwasaki (Invited). Structure and function of the fission yeast Swi5-Sfr1 complex. The 8th 3R Symposium, November 25-28, 2012. 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県・淡路市)
10. Hiroshi Iwasaki (Invited). Structure and functions of the fission yeast Swi5-Sfr1 complex, an activator of the Rad51 presynaptic filament. 2012 EMBO workshop: Recombination Mechanisms and Genome Instability. May 21-25, 2012. Jerez de la Frontera (Spain)
11. Hiroshi Iwasaki (Invited). Structure and functions of the fission yeast Swi5-Sfr1 complex, an activator of Rad51 presynaptic filaments. 2012 ASBMB (American society of biochemistry and molecular biology) Annual Meeting. April 21-25, 2012. San Diego (USA)

他 41 件

〔図書〕 (計 1 件)

1. Murayama Y, Kurokawa Y, Tsutsui Y & Iwasaki H. DNA strand exchanging protein Dmc1 from fission yeast. Protein Purification - Principles and Trends. ISBN: 978-1-922227-40-9. iConcept Press.

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.iwasakilab.bio.titech.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し