

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22125003

研究課題名(和文) 分裂酵母の接合型変換におけるゲノムアダプテーションの分子基盤

研究課題名(英文) Molecular analysis of mating-type switching in fission yeast.

## 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) 92,000,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母の接合型変換の素過程は、接合型座(mat)における厳密な反応極性を有する遺伝子変換である。この極性制御は、matでのヘテロクロマチン形成(染色体コミュニケーション)とクリプトックなゲノム情報の世代を超えた発現(インプリンティング)が、深く関係している。本研究では、その反応機構の解明を目指し、特に、染色体の動態に注目して解析した。ChIP-Seq解析の結果、接合型の違いによって、mat領域でのSwi2蛋白質の局在が異なり、この違いは、Swi6蛋白質に依存することを明らかにした。また、3C法によって、接合型が異なる細胞間ではmat領域の染色体の空間配置が異なることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A fundamental reaction step of fission yeast mating-type (MT) switching is a gene conversion that is driven with a strict polarity. This polarity control is closely related to heterochromatin formation and genetic imprinting at the mat locus. In the research project, we aimed to understand molecular mechanism of MT switching mainly by analyzing chromosome dynamics at the mat locus. ChIP-Seq analysis has revealed that Swi2 localizations at mat locus are uniquely different between two different-MT cells. In addition, 3C analysis has also indicated that chromosome configurations are different in the two different-MT cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：接合型変換 ヘテロクロマチン 相同組換え DNA二重鎖切断 分裂酵母 Swi2-Swi5複合体 Rad51 ゲノムアダプテーション

1. 研究開始当初の背景

分裂酵母には2つの接合型 (P と M) が存在し、ホモタリクな野生株は、図1に示すよう、細胞分裂に伴って接合型を変換する (mating switch; MT)。分裂酵母の接合型変換のパターンは、出芽酵母のそれとは全く異なっており、「1-in-4」と「consecutive」と名付けられた2種類のルールに従う。

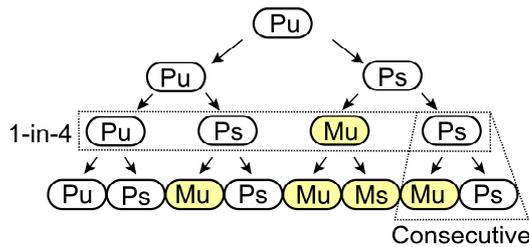


図1. 分裂酵母の接合型変換のパターン

図中の接合型 (P, M) の右横に小文字で記された s もしくは、u は、それぞれ、switchable と unswitchable に由来した記号で、当該細胞が細胞分裂時に接合型変換を起こすかどうかを示している。故に、最初の Pu は、接合型が同じ2種類の細胞を生じる。この2種類は、switchable な Ps と unswitchable な Pu であり、Ps 細胞は次の分裂時に M と P 細胞を生じる。よって、最初の Pu 細胞から2回の分裂によって生じる4個の細胞のうち、1個が M 細胞となるので、1-in-4 ルールと呼ばれている。一方、switchable 細胞は、分裂によって常に自身と異なる細胞を1個生じ (consecutive)、unswitchable 細胞は、常に自身と同じ接合型の細胞しか生じない。このような接合型変換のパターンは、日本人の発見者の名前から Miyata's role と呼ばれている。ここで注目すべきは、分裂酵母の細胞分裂は、形態上一見均等な細胞分裂に見えるが、接合型 (換言すると細胞機能) に注目すると、不均等細胞分裂であることである。特に、最初の Pu 細胞は常に Pu 細胞を生じ続け、また、最初の Mu 細胞は、常に Mu 細胞を生じ続けるというパターンは、多細胞生物における幹細胞の分裂パターンに類似し、幹細胞様細胞分裂のシンプルなモデル系と見做される。これまでの解析から、このような分裂酵母の接合型変換は、*mat1* 近傍のゲノム情報の世代を超えた発現 (インプリンティング) が深く関わっていることが示されている。

分裂酵母の接合型は、第二染色体上の *mat1* 遺伝子座で P 遺伝子が発現するか M 遺伝子が発現するかによって決定される。接合型変換は、アクティブな *mat1* と不活性遺伝子座位である *mat2-P*、もしくは、*mat3-M* との遺伝子変換によって起こっている (図2)。すなわち、*mat1* が P 遺伝子を発現しているときは必ず *mat3* 上の M と、

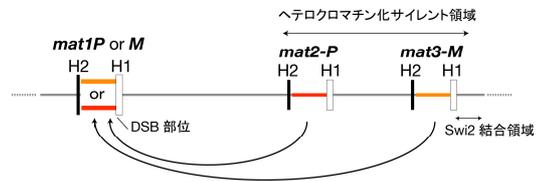


図2. 接合型変換における Rad51-Swi2-Swi5 依存的 DNA 鎖交換による遺伝子変換

*mat1* が M 遺伝子を発現しているときには必ず *mat2* 上の P との遺伝子変換がおこる。すなわち、P M または、M P への接合型変換の方向性が厳密に制御されている (directionality)。この directionality の制御は、P 細胞、M 細胞それぞれの細胞で、サイレントな座位である *mat2-P* から *mat3-M* 領域のヘテロクロマチン状態と深く関係していること (染色体コミュニケーション) が、米国の Grewal のグループによって示されている (Jia et al., *Cell*, 2004)。

接合型変換に関与する遺伝子として、10個の *swi* 遺伝子 (switching genes) が、同定されていた。これらのうち、唯一 *swi5* 遺伝子だけが相同組換え (修復) にも関与する。本計画代表研究者は、もともと分裂酵母の相同組換え機構に興味を持っていたため、*swi5* 遺伝子をクローニングし解析していた。そして、Swi5 タンパク質は Swi2 タンパク質と Swi6 タンパク質とで3者複合体を形成し (Swi5-Swi2-Swi6 複合体)、接合型変換における Rad51 依存的な DNA 鎖交換反応に関与することを示した (Swi6 はヘテロクロマチンタンパク質 1 [HP1] の分裂酵母ホモログである) (Akamatsu et al. *PNAS*, 2003)。さらに、Sfr1 タンパク質と複合体を形成した Swi5 タンパク質 (Swi5-Sfr1 複合体) は、接合型変換ではなく、相同組換え (修復) における Rad51 依存的な DNA 鎖交換反応に関与することを示した。Sfr1 タンパク質全長は Swi2 タンパク質の C 末端側約半分と一次構造上有為な相同性があることから、両者はパラログの関係にある (Akamatsu et al. *PNAS*, 2003)。

接合型変換の分子機構研究については、アメリカの Klar や Grewal、フランスの Arcangioli、イギリスの Dalgaard、デンマークの Thon 等のグループが先導してきた。これまでに、*mat1* の H1 配列近傍での複製フォークの停止に伴い DNA の二重鎖切断 (DSB) が導入され、このことが接合型変換開始の引き金となることが提唱されている (図2)。しかし、接合型変換の中心的な反応である *mat* 間の遺伝子変換の反応機構や、方向性 (極性) の分子制御機構はほとんど解明されていなかった。本申請研究では、1) 遺伝子変換の素反応解析と、2) *mat* 座位における染色体のダイナミクスや核内配置を解析することで、接合型変換の動的制御機構の分子の実態の解明を試みた。

## 2. 研究の目的

分裂酵母の接合型変換の素過程は、接合型決定座位 *mat1* とサイレントな座位 (*mat2*, *mat3*) との間での遺伝的組換え (遺伝子変換) である。しかし、一般相同組換えと異なり、厳密な反応極性 (directionality) を有する。この極性機構は、サイレントな遺伝子座位でのヘテロクロマチンによる高度な制御 (染色体コミュニケーション) と *mat1* 近傍のゲノム情報の世代を超えた発現 (インプリンティング) が、深く関係している。しかるに、分裂酵母の接合型変換は、体細胞分裂期のゲノムアダプテーションを理解する上で優れたモデル系である。本研究では、その反応機構を徹底的に解析して、ゲノムアダプテーションの分子反応メカニズムのパラダイムの確立を目指した。

## 3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、接合型変換の基幹反応であるリコンビナーゼ (Rad51、及び Dmc1) 依存的な DNA 組換えの分子メカニズムの解析や接合型変換における DNA 鎖交換反応を解析した。さらに、*mat* 座位における染色体のダイナミクスや核内配置を解析し、インプリンティングやヘテロクロマチンによる動的制御機構の分子の実態を解析した。また、接合型変換遺伝子を新たに同定、接合型変換の全体像の理解に勉めた。

### (1) *mat* 遺伝子座のクロマチンのダイナミクス

接合型変換の directionality は、サイレントな *mat2-mat3* 領域のヘテロクロマチン状態によって規定されていると考えられている。そこで、P 型もしくは M 型に固定された様々なヘテロタリック株を用いて、Swi6 や Swi2 の結合状態、ヒストンのメチル化・アセチル化等の修飾状態などについて、ChIP-chip や ChIP-seq 解析を行った。また、3C 法をもちいて *mat* 座の染色体の空間配置を決定した。

### (2) 接合型変換の試験管内再構成系の構築と DNA 鎖交換反応の素過程

接合型変換の分子機構について、精製したタンパク質を用いた *in vitro* 系を構築して解析した。また、相同組換えの反応の中心的な反応である DNA 鎖交換を理解するために、Rad51 や Dmc1 リコンビナーゼ依存的な鎖交換反応の分子反応機構を解析した。

### (3) 新規接合型変換遺伝子の同定

Bioneer 社の整列遺伝子欠失ライブラリーをもちいて、接合型変換に関与する遺伝子を網羅的に同定することを試みた。そのためには、Bioneer 社の分裂酵母株がヘテロタリックな  $h^{+N}$  株なので、これを  $h^{90}$  株に変換し、それぞ

れの  $h^{90}$  株に関して、multiplex PCR 法とヨウ素反応法を用いて、接合型変換の異常の有無を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) *mat* 遺伝子座のクロマチンの動態

ChIP-Seq によって、*mat* 領域の Swi2 蛋白質の局在を調べた (図 3)。その結果、P 細胞では、Swi2 蛋白質は L 領域左側、R 領域右側、*mat3* カセットの両側 (*REIII* と *SRE3*) に局在した。一方、M 細胞では、*mat3* カセットの両側の Swi2 の局在は低下し、新たに *SRE2* と L1 への蓄積の増加が見られた。この結果は、米国の Grewal のグループが ChIP で解析した 2004 年の結果と少し異なっている。彼等は、M 細胞では、特異的な Swi2 蛋白質の蓄積する領域は同定しておらず、そのことが、M 細胞と P 細胞の決定的な違いであるとしていた。

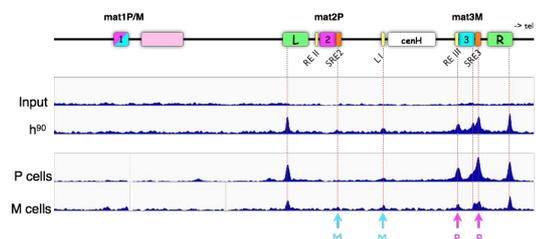


図 3. Swi2 の *mat* 領域の局在。ホモタリックな  $h^{90}$  株と、これと遺伝的背景を同じくするヘテロタリックな  $h^+$  株と  $h^-$  株を用いて、ChIP-Seq 解析を行った。

次に、3C 法により、*mat* 領域の染色体の配置を解析した (図 4)。用いたプライマー (F1~F7、及び、R1~R2) は、図 4 の上段に示す。 $h^9$  株では R3 と R4、R1 と R4、及び、F6 と F7 の領域がそれぞれ近接することが示唆された (図 4)。さらに、ヘテロタリックな細胞で、同様の 3C 解析を行った (図 5)。

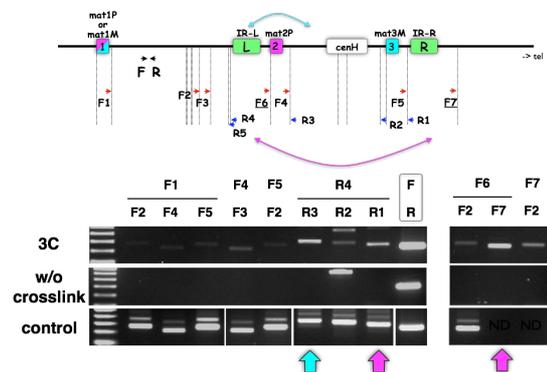


図 4. 3C による  $h^{90}$  株の *mat* 領域の染色体配置の解析。

その結果、M 細胞では、R3-R4 の相互作用が特異的に低下しており、一方、P 細胞では R1-R4 と F6-F7 の 2 カ所の相互作用の低下が観察された。この結果は、接合型が異なる細胞では、*mat* 領域の染色体空間配置が異なることを示唆している。

以上の ChIP-Seq と 3C 解析の結果をもとに、*mat* 領域の染色体配置に依存した接合型変換のモデルを提唱する(図 5)。M 細胞では、*mat2-mat3* 領域をカバーするように Swi2-Swi5 複合体が広く結合し、L と R 領域が結合したループ構造を取る。その結果、*mat1* と *mat2* が空間的に近い距離に配置され、*mat2* が遺伝子変換のドナーとして供される。一方、P 細胞では、Swi2-Swi5 複合体は主に *mat3* の両側に多く局在し、また、IR-L の L 領域と L1 領域が結合したループ構造を取る。その結果と、*mat1* と *mat3* が空間的に近位に配置され、*mat3* が遺伝子変換のドナーとして供される。このような Swi2-Swi5 複合体の局在や染色体コンフィギュレーションは、接合型特異的に観察され、接合型の変換に伴って、ダイナミックに変化する。

この変化はどのような分子機構によっておこっているのだろうか？すなわち、接合型はどのように認識され、染色体の空間配置に影響を及ぼしているのだろうか？Swi6 欠失株で、Swi2 の局在を ChIP-Seq 解析によって調べると、 $h^{90}$  細胞、M 細胞、P 細胞、いずれの細胞でも、Swi2 は *mat2-mat3* 領域に局

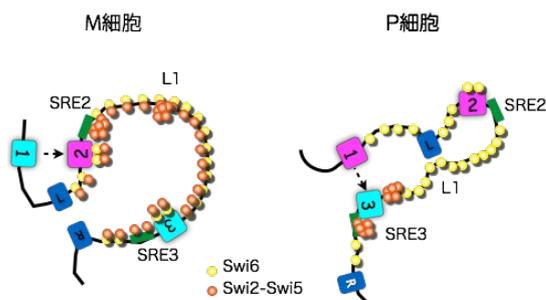


図 5. 接合型変換決定領域 (*mat* 領域) の染色体コンフィギュレーション。M 細胞では、*mat2-mat3* 領域にかけて Swi2-Swi5 複合体が広く結合し、L と R 領域が結合したループ構造を取っている。その結果、*mat1* と *mat2* が物理空間的に近い距離に配置される。一方、P 細胞では、Swi2-Swi5 複合体は主に *mat3* の両側に多く局在し、また、L と L1 が近位に存在することから、より小さいループをつくる。その結果、*mat1* と *mat3* が物理空間的に近い距離に配置される。このように、それぞれの細胞では、*mat1* 座とドナー座間との異なった空間配置がとられ、それが、接合型変換における方向性の特異性を決定する分子基盤であると予想される。

在しなかった。この事実は、*mat2-mat3* 領域への Swi2 の局在は、ヘテロクロマチンに依存することを示唆している。どのような分子機構で Swi6 依存的に Swi2 の分配が決定されるか、極めて興味深い問題である。

## (2) 接合型変換の *in vitro* 解析と遺伝子変換における DNA 鎖交換反応の素過程

Swi5-Sfr1 複合体は、Swi5-Swi2 複合体のパラログである。N 末端 180 アミノ酸の天然変性領域を欠失した Swi5-Sfr1C の X 線結晶構造を決定した。また、Swi5-Sfr1 複合体の全体構造を SAXS 法で決定した。

Dmcl リコンビナーゼによる試験管内 Holliday 構造形成反応に成功した。

Dmcl リコンビナーゼによる DNA 鎖交換反応は、Swi5-Sfr1 複合体で促進され、Rad52 で阻害されることを示した。

## (3) 接合型変換遺伝子の新規同定

接合型変換に関与する遺伝子を新たに単離する目的で、Swi2 蛋白質と相互作用する因子を酵母 2-ハイブリッド法によりスクリーニングし、陽性クローンを約 50 種分離した。これらの失株を作成し、接合型変換の異常の有無を調べた結果、Chp2 が接合型変換に関与することが分かった。

Bioneer 社の整列遺伝子欠失ライブラリーをもちいて、接合型変換に関与する遺伝子を網羅的に同定することを試みた。そのためには、Bioneer 社の分裂酵母株はヘテロタリックな  $h^{+N}$  株なので、これを  $h^{90}$  株に変換する必要がある。全約 3500 株のうち、これまでに約 95% を  $h^{90}$  株に変換した。また、変換した株を用いて、multiplex PCR とヨウ素反応法の 2 種類のアッセイ法を用いて、接合型変換の異常の有無を調べている最中である。これまでに、約 200 株につき、接合型変換異常の可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)すべて査読有り

Tsutsui Y, Kurokawa Y, Ito K, Siddique MS, Kawano Y, Yamao F & Iwasaki H: Multiple regulation of rad51-mediated homologous recombination by fission yeast fhl1. *PLoS Genet.* 28, e1004542, (2014) doi: 10.1371/journal.pgen.1004542.

Fornander LH, Renodon-Cornière A, Kuwabara N, Ito K, Tsutsui Y, Shimizu T, Iwasaki H, Nordén B & Takahashi M: Swi5-Sfr1 protein stimulates Rad51-mediated DNA strand exchange reaction through organization of DNA bases in the presynaptic filament. *Nucleic Acids*

*Res.* 42, 2358-2365, (2014). doi:  
10.1093/nar/gkt1257

Murayama Y, Kurokawa Y, Tsutsui Y & Iwasaki H. Dual regulation of Dmc1-driven DNA strand exchange by Swi5-Sfr1 activation and Rad22 inhibition. *Genes Dev.* 27, 2299-2304 (2013). doi:  
10.1101/gad.218693.113.

Saikusa K, Kuwabara N, Kokabu Y, Inoue Y, Sato M, Iwasaki H, Shimizu T, Ikeguchi M & Akashi S: Characterisation of an intrinsically disordered protein complex of Swi5-Sfr1 by ion mobility mass spectrometry and small-angle X-ray scattering. *Analyst.* 138, 1441-1449 (2013). doi: 10.1039/c2an35878f.

Kuwabara N, Murayama Y, Hashimoto H, Kokabu Y, Ikeguchi M, Sato M, Mayanagi K, Tsutsui Y, Iwasaki H & Shimizu T: Mechanistic insights into the activation of Rad51-mediated strand exchange from the structure of a recombination activator, the Swi5-Sfr1 complex. *Structure* 20, 440-449 (2012). doi: 10.1016/j.str.2012.01.005.

Akai Y, Kurokawa Y, Nakazawa N, Tonami-Murakami, Y, Yoshimura S H, Iwasaki H, Shiroywa Y, Nakamura T, Hibata E & Yanagida M: Opposing role of condensin hinge against replication protein A in mitosis and interphase through promoting DNA annealing. *Open Biol.* 1, e110023, (2011). doi: 10.1098/rsob.110023

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: The fission yeast Swi5-Sfr1 complex, an activator of Rad51 recombinase, forms an extremely elongated Dogleg-shaped structure. *J Biol Chem.* 286, 43569-43576 (2011). doi: 10.1074/jbc.M111.303339.

Kato Y, Kawasaki H, Ohyama Y, Morishita T, Iwasaki H, Kokubo T & Hirano H: Cells polarity in *Saccharomyces cerevisiae* depends on proper localization of the Bud9 landmark protein by the EKC/KEOPS complex. *Genetics* 188, 871-882 (2011). doi: 10.1534/genetics.111.128231.

Murayama Y and Iwasaki H: An *in vitro* assay for monitoring the formation and branch migration of Holliday junctions mediated by a eukaryotic recombinase. *Methods Mol. Biol.* 745, 385-405 (2011). doi: 10.1007/978-1-61779-129-1\_22.

Murayama Y, Tsutui, Y & Iwasaki H: The fission yeast meiosis-specific Dmc1 recombinase mediates formation and branch migration of Holliday junctions by preferentially promoting strand-exchange in a direction opposite to that of Rad51. *Genes Dev.* 25, 516-527 (2011). doi:  
10.1101/gad.1997511.

Hishida T, Hirade Y, Haruta N, Kubota Y & Iwasaki H: Srs2 plays a critical role in reversible G2 arrest upon chronic and low doses of UV irradiation via two distinct homologous recombination-dependent mechanisms in post-replication repair deficient cells. *Mol. Cell. Biol.* 30, 4840-4850 (2010). doi:  
10.1128/MCB.00453-10.

Kuwabara N, Hashimoto H, Yamada N, Unzai S, Ikeguchi M, Sato M, Murayama Y, Iwasaki H & Shimizu T: Purification and crystallization of Swi5 and Swi5-Sfr1 complex from fission yeast. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* F66, 1124-1126 (2010). doi:  
10.1107/S1744309110032239.

[学会発表] (計 47 件)  
招待講演のみ記載

Iwasaki H: Activation of Rad51-driven DNA strand exchange reaction by the Swi5-Sfr1 complex. Mechanisms of Recombination conference. May 19-24 (2014) Hotel Melia (Alicante, Spain)

Tsutsui Y, Kurokawa Y, Kawano Y, Yamao F & Iwasaki H: Multiple regulation of Rad51-mediated homologous recombination by fission yeast F-box DNA helicase Fbh1. Message from yeast to Epigenetics ~ Yeast clarifies the frontiers of life science ~ 9月2日-4日(2013) グランヴィア芳泉, (あわら市福井県)

Ito K, Tsutsui Y & Iwasaki H: Functional interactions between Rad51 recombinase and its activator Swi5-Sfr1 complex in fission yeast. The 7th International Fission Yeast Meeting. June 24-29 (2013) University of London, (London, UK)

Iwasaki H: Structure and function of the fission yeast Swi5-Sfr1 complex. The 8th 3R Symposium. 11月25日-28日 (2012) 淡路夢舞台国際会議場 (淡路市兵庫県)

Iwasaki H: Structure and Functions of the Fission Yeast Swi5-Sfr1 Complex, an Activator of Rad51 Presynaptic Filaments. EMBO workshop: Recombination

Mechanisms and Genome Instability (European molecular biology organization workshop). May 21-25 (2012) Barceló Jerez Montecastillo & Convention Center (Jerez de la Frontera, Spain)

Iwasaki H: Structure and Functions of the Fission Yeast Swi5-Sfr1 Complex, an Activator of Rad51 Presynaptic Filaments. ASBMB Annual Meeting (American society of biochemistry and molecular biology), Apr 21-25 (2012) San Diego Convention center (San Diego, USA)

Iwasaki H: Reconstitution of two DNA strand exchange reactions during homologous recombination. 第34回日本分子生物学会年会. 12月13日-16日 (2011) パシフィコ横浜 (横浜市神奈川県)

Iwasaki H: Regulation of Rad51 and Dmc1 recombinases in fission yeast. New frontier of the research in Rad51 recombinase and its accessory proteins. Sept 28-29 (2011) Institut de Biologie Physico Chimique. (Paris. France)

岩崎博史: 相同組換えにおけるDNA 鎖交換反応の制御機構. 日本遺伝学会第83回大会. 9月20日-22日 (2011) 京都大学農学部 (京都市京都府)

岩崎博史: 組換え修復の分子機構. 生化学若い研究者の会. 9月3日-4日(2011)八王子セミナーハウス (八王子市東京都)

Iwasaki H: Differential effects of Rad22 on the Rad51- and Dmc1-mediated DNA strand exchange reactions. The 6th international fission yeast meeting. June 25-30 (2011) Harvard Medical School (Boston, USA)

岩崎博史: 組換え修復とHolliday構造の分岐点移動反応の方向性. 第33回日本分子生物学会年会. 12月7日-10日 (2010) 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

Iwasaki H: Biochemical differences between Rad51 and Dmc1 recombinases from fission yeast. 3R Symposium. Oct 26-30 (2010) 富山国際会議場 (富山県富山市)

[ 図書 ] ( 計 2 件 )

Murayama, Y., Kurokawa, Y., Tsutsui, Y. & Iwasaki, H. ( iConcept ) DNA strand exchanging protein Dmc1 from fission yeast. DNA strand exchanging protein Dmc1 from fission yeast. Protein Purification - Principles and Trends. (2015 年発行予定) ISBN:

978-1-922227-40-9. Press.

Tsutsui Y, Kawasaki A, and Iwasaki, H. (InTech 出版) Human CtIP and its homologs: Team players in DSB resection games. in *DNA Repair - On the pathways to Fixing DNA Damage and Errors*. Ed Storici. (2011) 392 (169-184) DOI:10.5772/22223

[ 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・  
大学院生命理工学研究科・教授  
研究者番号 : 60232659

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し

(4) 研究協力者

筒井 康博 ( TSUTSUI, Yasuhiro )