

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04742

研究課題名(和文) 2つのRecAホモログによる組換えパートナー選択の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanism of partner choice for recombination by two RecA homologs

研究代表者

篠原 彰 (Shinohara, Akira)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：00252578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：DNA鎖の交換反応である相同組換えは、ゲノムの多様性の産生やDNAの2重鎖切断の修復を介してゲノム・染色体の安定化に必須の役割を果たす。組換えに中心的な役割を果たすRAD51タンパク質に結合する新規因子SWSAP1の機能を解析したところ、SWSAP1に結合する新しいアンチリコンビナーゼFIGNL1を同定した。FIGNL1はRAD51-DNA複合体を破壊する活性を持つこと、FIGNL1がその活性を抑制することが分かった。また、SWSAP1のノックアウト(KO)マウスを雄、雌共、不稔になり、実際にRAD51/DMC1の染色体局在が低下している。RAD51のみならずDMC1の集合も促進する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は相同組換えのアクセラレーターのSWSAP1と連携して機能する、ブレーキ役の新規タンパク質・遺伝子タンパク質・遺伝子(FIGNL1)を発見しました。SWSAP1、FIGNL1の2者のタンパク質の機能を明らかにすることで、生体内でのDNA同士の交換反応である相同組換えを適切に制御するメカニズムを解明しました。相同組換えの機能不全による発ガン率の上昇の原因解明や診断・治療方法の開発につながることを期待できます。また、今回発見した組換え因子を人工的に制御する技術の開発を通して、不妊の治療、ゲノム編集を介した遺伝子治療(置き換え)の最適化など幅広い貢献が期待できます。

研究成果の概要(英文)：Homologous recombination is essential for the maintenance of genome stability. RAD51 assembly on single-stranded (ss)DNAs is a crucial step in the recombination-dependent repair of DNA damage. The formation of the RAD51 filament is promoted by various RAD51-interacting proteins including RAD51 paralogues. However, the mechanisms underlying the differential control of RAD51 filament dynamics by these factors remain largely unknown. In this study, we report a new role for the human RAD51 paralog, SWSAP1, as a novel regulator of RAD51 assembly and disassembly. Swsap1-deficient cells show defects in DNA damage-induced RAD51 assembly during both mitosis and meiosis. Defective RAD51 assembly in SWSAP1-depleted cells is suppressed by the depletion of FIGNL1, which binds to RAD51 as well as SWSAP1. Purified FIGNL1 promotes the dissociation of RAD51 from ssDNAs. Taken together, our data suggest that SWSAP1 protects RAD51 filaments by antagonizing the anti-recombinase, FIGNL1.

研究分野：分子生物学

キーワード：相同組換え RAD51 減数分裂

## 1. 研究開始当初の背景

DNA 鎖の交換反応である相同組換えは、ゲノムの多様性を生み出す原動力になるばかりでなく、体細胞分裂期では DNA 損傷修復、特に染色体断裂に繋がる DNA 2 重鎖切断(DNA double-strand break; DSB)の正確な修復や、減数分裂期では相同染色体の分配と言ったゲノム・染色体の安定化に必須の役割を果たす。相同組換えの破綻は染色体/ゲノム恒常性の維持の異常-ゲノム不安定化-を誘発し、ヒトでは細胞の癌化や配偶子(精子、卵子)の欠損(不妊、流産)の原因になる。加えて、相同組換えは染色体上に起こる様々なゲノム安定化の機能と密接に連携している。例えば、相同組換えが、停止した複製フォークの再活性化に能動的に関わること、つまり DNA 複製(の進行)に必須の役割を果たすことや、テロメア合成酵素が欠損しているガン細胞でのテロメアの伸長維持にも関わること、近年では、相同組換えを介したゲノムの安定化が個体の長寿と密接な関連を持つことも見出され、個体の恒常性維持を担う染色体機能として再注目されているゲノムの動作原理の1つと言える。相同組換えの分子機構の解明はゲノム不安定化を介した細胞がん化の理解やその治療方法の開発と言った医学的側面に貢献することが期待されている。

細胞のゲノムを自在に操作する技術の中で、CRISPR/Cas9 の発見により、遺伝子をノックアウト(破壊)する技術に関しては高効率化が可能になっている。一方、標的部位に改変した DNA を導入するノックイン(遺伝子置換; precise editing)する方法の高効率化はまだ十分に達成されてなく、ゲノム編集を中心とした細胞制御技術の中で、その効率化は喫緊の課題になっている。究極の遺伝子治療である疾患遺伝子と正常遺伝子の置き換え、“ノックイン”は相同組換えに依存する反応であり、相同組換えの分子機構の理解は新規のゲノム編集の開発と言った技術革新にも大きく貢献することが予想されている。

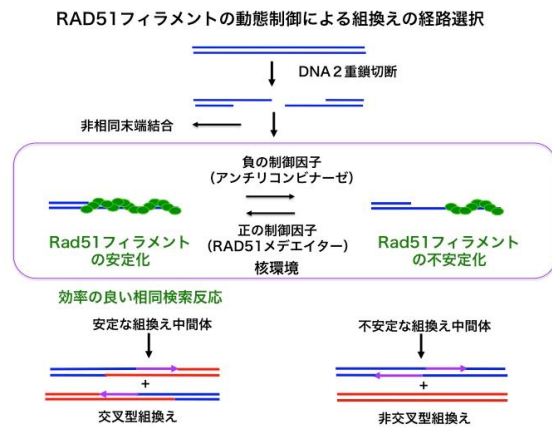
## 2. 研究の目的

DSB により誘発される相同組換えは、もう一つの DSB 修復経路である非相同末端結合との経路選択決定の後、一本鎖 DNA 形成により開始する。一本鎖 DNA 形成後の相同組換え経路は複数あり、例えば、親 DNA の相互交換を伴う交叉型組換えと、部分的な入れ替えのみに限定される非交叉型組換えが存在する。これら組換え経路の選択は厳密に制御されている。交叉型組換えは減数分裂期では必須であるため、高頻度に誘発され、かつ、数を保証するようにプログラム化されている。一方、体細胞分裂期では LOH(Loss of heterozygosity)の原因となる交叉型組換えを抑制して、非交叉型組換えが起きるように制御されている。また、2 倍体細胞では細胞周期によって制御を受け、S 期以降 G2 期では組換えに必要なパートナー(鋳型 DNA)は複製した姉妹染色体に加えて、相同染色体も鋳型となり得る。減数分裂期では相同染色体が、体細胞分裂期では姉妹染色体が交換する“組換えパートナー選択”と呼ばれる制御形態も存在する。細胞の中の様々な適応応答としての組換えの経路選択の仕組みと制御、分子メカニズムの詳細はこれまであまり明確にされていない。本研究では、ヒト及びマウスをモデルとして、DNA 鎖相同検索反応の分子メカニズムとその制御システムを、DNA 上に集合、離散するタンパク質複合体の動的変化の制御という点で理解することを大きな目的としている。

核内で空間的に離れて存在する 2 つの相同な DNA 間で起こる反応である相同組換えは様々な過程からなる多段階生化学反応であり、中でも、DNA 鎖相同検索反応と相同検索に依存した DNA 複製は、組換えの根幹をなす反応と言える。DNA 間の相同鎖検索に関わるタンパク質は一本鎖 DNA に多量体として結合して、その DNA 塩基配列の情報を利用して、同じ DNA 配列を持つ二本鎖 DNA を、核内に無数に存在する情報の異なる DNA 配列、あるいは類似した DNA 配列の中から区別・選別して、効率よく探し出すことが出来る(一本鎖 DNA の長さが 1000 ヌクレオチドの場合、ヒト細胞なら、最低でも 3 億種類の配列から 1 つを見つける反応)。この DNA 鎖の相同検索反応を原核生物では RecA タンパク質が担い、真核生物ではそのホモログ RAD51 が体細胞分裂期の検索反応に関わる。一方、減数分裂期の組換えには RAD51 に加え、減数分裂期特異的 RecA/RAD51 ホモログ DMC1 が働くことで、姉妹染色体間ではなく、物理的、空間的に離れた相同染色体間での DNA 鎖の交換を促進する。真核生物の組換え反応には多数のタンパク質/複合体が関わり、DNA 上にタンパク質超分子構造体を形成し、この構造体が内的、外的環境応答に応じて、動的に構造変化を受けることで機能的特異性、例えば、組換え経路の選択が行われると考えられている。そのために多数の正と負の因子が RAD51 タンパク質-DNA 複合体と一過的、あるいは安定に相互作用することで、あるいは核内環境と呼応することで、複合体の機能を変換、制御すると考えられる。DNA 鎖の相同検索反応のメカニズムやその制御の理解にはこれらの一本鎖 DNA 上で RAD51(や DMC1)に働く正と負のタンパク質群との連携と核内環境へ応答の理解が重要となる。

RecA ホモログ RAD51, DMC1 は、DNA 上に右巻きの螺旋構造を取り、その超分子構造体(フィラメント)が DNA 相同検索反応の分子マシナリーになることが知られている(右図)。興味深いことに、機能的に大きく違うにも関わらず、体細胞分裂型 RAD51, 減数分裂期型 DMC1 とともに構造的に類似の右巻きの螺旋構造を DNA 上に形成する。2つの RecA ホモログの機能的な分化は、RecA ホモログ自身の構造では単純に説明できない。上述したように、RecA ホモログは、一緒に働くタンパク質によってその機能が制御されている。その中には RecA ホモログの 1 本鎖 DNA 上の集合を助ける正の因子、解離を促すことで DNA 上の“不適当な”複合体形成を破壊、抑制する負の因子が存在することが知られている。

これまでの解析から RAD51 の集合にはヒトを含む高等真核生物では一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA, RAD52, 5つの RAD51 パラログ複合体(RAD51 と相同な配列を持つタンパク質群; RAD51B, -C, -D, XRCC2, -3), SFR1-SWI5 複合体や家族性乳がん原因因子 Brca2 といった多数の因子が RAD51 の集合を”正に”促進すること(RAD51 メディエーターと呼称される)が知られている一方、なぜ複数の因子が必要であるのかは分かっていない。さらに、RAD51 の集合を”負に”制御する因子も DNA ヘリケース型の RECQL5A, PAR1, BLM, FBH1 などのアンチリコンビナーゼが近年複数同定され、注目されているが、これら負の制御因子と、上述の正の制御因子との機能的連携については分かっていない。本研究はヒト RAD51 メディエーターの 1 つ SWSAP1 の細胞内での機能、個体での役割を明らかにすることを目的としている。

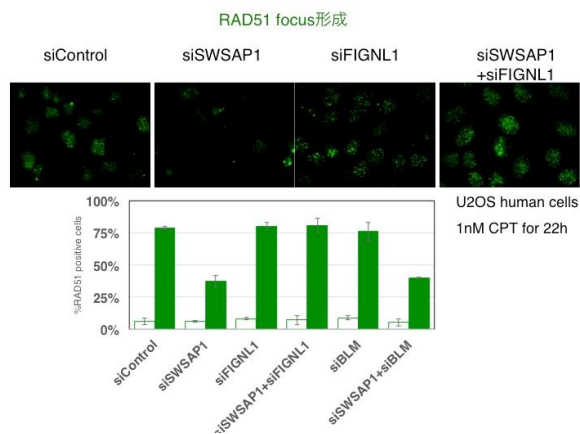


### 3. 研究の方法

ヒト RAD51 メディエーターの 1 つ SWSAP1 の細胞、個体内の機能を知るために、SWSAP1 に結合するタンパク質を探した。その結合因子と SWSAP1 をヒト細胞でノックダウンした時に DNA 損傷依存性 RAD51 focus 形成への影響とゲノム不安定化の影響を解析した。また、これらタンパク質を精製し、試験管内での活性を RAD51-DNA 複合体の安定性を解析した。SWSAP1 の個体内での機能を調べるために、SWSAP1 ノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析した。

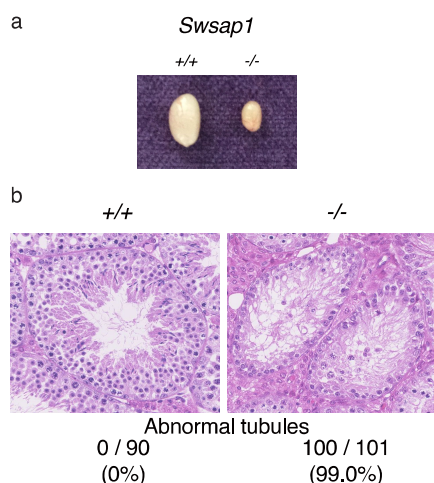
### 4. 研究成果

ヒトで RAD51 の集合を促進する RAD51 メディエーターの 1 つ SWSAP1 からなる複合体の解析を行っている。その結果、SWSAP1 と結合する新規因子として、AAA+ATPase ファミリーに属する FIGNL1 を新たに同定した(Matsuzaki et al, Nature Comms. 2019)。興味深いことに、ヒト細胞で SWSAP1 ノックダウンすると、DNA 損傷修復複合体として核内に検出できる RAD51 foci 形成が低下するが、FIGNL1 を同時にノックダウンすることで、RAD51 foci 形成が回復することが分かった(右下図)。この結果は、FIGNL1 が RAD51 構造体を壊す働きを持つアンチリコンビナーゼであること、SWSAP1 が FIGNL1 による RAD51 フィラメントを破壊する機能を抑えていることを示唆している。実際に精製した FIGNL1 はヒト RAD51 を一本鎖 DNA から解離させる活性を有し、この FIGNL1 の活性を精製した SWSAP1 が抑制出来ることも明らかにできた。また、swsap1 ノックアウトマウスを作成したところ、細胞レベルでは致死性を示さないが、減数分裂期に欠損を持ち、オス、メス共不妊になることが分かった。精巣は野生型に比べ、小さく(次ページ、右上図 a)、精子を全く作らない(次ページ、右上図 b)。精巣の減数分裂期の細胞の RAD51, DMC1 focus 形成を解析したところ、swsap1 ノックアウトマウスでは減数分裂期染色体上の DNA 2 重鎖切断により、誘発される RAD51, DMC1 focus 共にその数が低下して、それ以上の減数分裂期の過程が進まないことで、減数分裂期が停止することが分かった。この結果から SWSAP1 は RAD51 ばかりでなく、DMC1 の染色体結合を促進する因子であることが推察された。

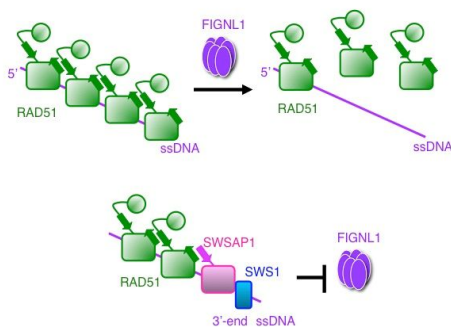


本研究成果は相同組換えのブレーキ役の新規タンパク質・遺伝子(SWSAP1)とこれを阻害するタンパク質・遺伝子(FIGNL1)を発見した。FIGNL1がRAD51-DNA複合体を壊す活性を持ち、SWSAP1がこの機能を阻害することで、RAD51フィラメントの動体を制御することで、**生体内でのDNA同士の交換反応である相同組換えを適切に制御すると考えられる(右下図)**。

今後、SWAP1やFIGNL1の機能を理解し、相同組換えの機能不全による発ガン率の上昇の原因解明や診断・治療方法の開発につながる事が期待できます。また、今回発見した組換え因子を人工的に制御する技術を開発することで、不妊の治療、ゲノム編集の最適化など幅広い応用が可能であると考えられる。



RAD51フィラメント形成の制御



## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Matsuzaki, K., Kondo, S., Ishikawa, T., and A. Shinohara, Human RAD51 paralogue, SWSAP1, fosters RAD51 filament by regulating the anti-recombinase, FIGNL1 AAA+ ATPase. *Nature Communications*, 10, 1407. 2019. 査読有
2. Sasanuma, H., Sabhan, H.M.S., Furihata, Y., Challa, K., Palmer, L. Gasser, S.M., Shinohara, M., and A. Shinohara, Srs2 helicase prevents the formation of aberrant DNA damage during late prophase I of yeast meiosis. *Chromosoma*, in press, 2019. 査読有
3. Challa, K., Shinohara, M., and A. Shinohara. Meiotic prophase-like pathway for cleavage-independent removal of cohesin for chromosome morphogenesis. *Current Genetics*, in press. 2109. 査読有
4. Challa, K., Fajish G.V., Shinohara, M., Klein, F., Susan M. Gasser, S.M., and A. Shinohara. Meiosis-specific prophase-like pathway controls cleavage-independent release of cohesin by Wapl phosphorylation. *PLoS Genetics*, 15, e1007851. 2019. 査読有
5. Bommi, J.R., Prasada Rao, HBDP., Challa, K., Higashide, M., Shinmyozu, K. Nakayama, J., Shinohara, M., and A. Shinohara Meiosis-specific cohesin component, Rec8, promotes the localization of Mps3 SUN domain protein on the nuclear envelope. *Genes-to-Cells*, 24, 94-106, 2019.
6. Tougan, T., Edula, J., Takashima, E., Morita, M., Shinohara, M., Shinohara, A., Tsuboi, T. and T. Horii. Molecular Camouflage of Plasmodium falciparum Merozoites by Binding of Host Vitronectin to P47 Fragment of SERA5. *Scientific Reports*, 8, 5052, 2018. 査読有
7. Mishima Y., Brueckne, L., Takahashi, S., Kawakami, T., Arita, K., Oka, S., Otani, J., Hojo, H., Shirakawa, M., Shinohara, A., Watanebe, M., and I. Suetake. RFTS-dependent negative regulation of Dnmt1 by nucleosome structure and histone tails. *FEBS J.* 284, 3455-3469. 2017. 査読有
8. Chakraborty, P., Ajith, VP., Chen, K., Duttta, A., Krishnaprasad G.N., Tekkedil, M.M., Shinohara, A., Steinmetz, L. M., and Nishant, K.T. Modulating crossover frequency and interference for obligate crossovers in *Saccharomyces cerevisiae* meiosis.

- G3(Bethesda)*, 7, 1511-1524. 2017. 査読有
9. Challa, KK., Lee, MS., Shinohara, M., Kim, K.M and A. Shinohara. Rad61/Wpl1(Wapl), a cohesin regulator, controls chromosome compaction during meiosis. *Nuclei. Acids Res.* 44, 3190-3203. 2016. 査読有
  10. Subramanian, V.V., MacQueen, A. J., Vader, G., Shinohara, M., Borde, V., Shinohara, A. and A. Hochwagen, Chromosome synapsis alleviates Mek1-dependent suppression of meiotic DNA repair. *PLoS Biology*, 14, e e1002369. 2016. 査読有
  11. Santosh, G. K., Patel, K.J., Colletti M.M., Sasanuma, H., Shinohara, M., Hochwagen, A., and A. Shinohara. The Paf1 Complex Shapes the Landscape of Double-strand Breaks along Meiotic Chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 202, 497-512, 2016. 査読有
  12. Minakawa, Y., Atsumi, Y., Shinohara, A., Murakami, Y., Yoshioka, K.I. Gamma-irradiated quiescent cells repair directly induced DSBs but accumulate persistent DSBs during subsequent DNA replication. *Genes-to-Cells*, 21, 789-797. 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

国際学会

1. Shinohara, A. Human RAD51 paralogue, SWSAP1, fosters RAD51 filament by regulating the anti-recombinase, FIGNL1 AAA+ ATPase. EMBO workshop on Meiosis, La Rochelle, France. August 25-30, 2019.
2. Shinohara, A. Human RAD51 paralogue, SWSAP1, fosters RAD51 filament by regulating the anti-recombinase, FIGNL1 AAA+ ATPase. FASEB meeting on recombination & genome rearrangement, Steamboat, USA, July 14-19, 2019
3. Shinohara, A. Symposium on “Emerging Concepts in Chromosome Biology”, IMP Vienna, Austria, March 6-8, 2019
4. Shinohara, A. RAD51 mediators and anti-recombinase. Chromosome stability meeting, December 14-18, Bangalore, India, 2018.
5. Shinohara, A. RAD51 mediators and anti-recombinase. Mini-symposium on Chromosome Biology, Taipei, Taiwan, December 11-2, 2018
6. Shinohara, A. Control of Rad51 and Dmc1 assembly and disassembly during meiosis. Gordon Research Conference on Meiosis, New London, USA, June 10-15, 2018
7. Shinohara, A. RAD51 mediators and anti-recombinase. Abcam meeting on Mechanism of recombination, London UK, May 19-23, 2018
8. Shinohara, A. RAD51 mediators and anti-recombinase. FASEB meeting on recombination & genome rearrangement, Steamboat, USA, July 16-22, 2017
9. Shinohara, A. Meiotic prophase-like pathway for cleavage-independent removal of cohesin for chromosome morphogenesis. Gordon Research Conference on Meiosis, New London, USA, June 3-8, 2016,
10. Shinohara, A. RAD51 mediators and anti-recombinase. Abcam meeting on Mechanism of recombination, Alicante, Spain, May 19-23, 2016

他、国内発表-4件、国際発表-1件(2018年度): 国内発表-7件、国際発表-1件(2017年度): 国内発表-7件、国際発表-1件(2016年度)

〔図書〕(計 1 件)

どうして心臓は動き続けるの? 蛋白質研究所(共著) 化学同人、p36-40, 2018

〔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

ゲノム-染色体機能研究室ホームページ

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/genome/index.html>

プレスリリース： 遺伝子の入れ替えをコントロールするメカニズムを解明

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/achievement/pressrelease190404>

プレスリリース： 世界初！ 配偶子の異数体形成を抑える仕組みを解明

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/achievement/pressrelease190111>

#### 6 . 研究組織

代表者のみのチームとなっている。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。