

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20770008  
 研究課題名（和文） 分裂酵母 F-box ヘリカーゼによる相同組換え制御の分子機構  
 研究課題名（英文） Biochemical analysis of fission yeast Fbh1 involved in regulation of homologous recombination  
 研究代表者  
 筒井 康博（TSUTSUI YASUHIRO）  
 東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教  
 研究者番号：00390625

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、組換えの制御に働く分裂酵母 F-box ヘリカーゼ、Fbh1 の生化学的解析を行ない、Fbh1 のヘリカーゼ活性が未成熟な組換え中間体を解消すること、及び、ユビキチン化活性が組換えに直接働く因子 Rad51 のユビキチン化に働くことを明らかにした。Rad51 ユビキチン化の意義は不明であるが、質量分析計で同定したユビキチン化部位から、Rad51 の DNA 結合能が変化することが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

To reveal the Fbh1 (F-box DNA helicase) function in regulation of homologous recombination, we characterized Fbh1 biochemically. We showed that helicase activity of Fbh1 is required for dissociation of premature Rad51-filament. Our *in vitro* ubiquitination assay revealed that SCF<sup>Fbh1</sup> promotes ubiquitination of recombination protein Rad51, suggesting that ubiquitin ligase activity of Fbh1 could directly regulate homologous recombination.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

## 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：相同組換え、分裂酵母、F-box ヘリカーゼ、Rad51、ユビキチン、DNA 修復

## 1. 研究開始当初の背景

2本の相同な DNA 分子を交換する相同組換えは生物に普遍的な生命現象である。その反応産物の形状から、相同組換えは交叉型組換えと非交叉型組換えに分けられる。減数分裂期においては交叉型組換えが頻りに観察され、ゲノムの多様性に寄与するとともに、

染色体分配に必須であることが知られている。一方、体細胞分裂期では非交叉型組換えが主に観察される。交叉型組換えは厳密に抑制されており、もっぱら DNA 二重鎖切断の修復や崩壊した複製フォークの再生など、細胞にとって非常事態のみに働くように多重制御されている。出芽酵母を中心とした様々

な研究によって、体細胞分裂期の相同組換えの制御に関わる因子として、大腸菌 RecQ ホモログおよび Srs2 という 2 つの DNA ヘリカーゼが同定されている。両者は交叉型組換えの抑制に重要であり、それぞれ異なる組換え中間体の解消に働くことが明らかになりつつあるが、依然として不明な点も多く残されており、国内外の複数の研究室で盛んに解析が行なわれてきた。2005 年に、この 2 つのヘリカーゼとは独立して組換え中間体の解消に働く新規 DNA ヘリカーゼ Fbh1 を共同研究者のグループが同定した。Fbh1 は N 末端側に F-box、C 末端側にヘリカーゼモチーフをもつ。F-box はユビキチンリガーゼ E3 の一種である SCF 複合体の F-box サブユニットに共通してみられるモチーフであり、F-box サブユニットは標的タンパク質の認識を行ない、そのユビキチン化を促進する。分裂酵母 Fbh1 の F-box、ヘリカーゼモチーフの変異はいずれも DNA ダメージ感受性を示す。従って、Fbh1 はユビキチン化活性およびヘリカーゼ活性をもつことが予想されるため、これらの活性が組換え中間体の解消にどのように機能するかを生化学的に解析することとした。

本研究計画の予備実験として、バキュロウイルス発現系を利用し、Fbh1 リコンビナントタンパク質を精製したところ、単鎖 DNA 依存的 ATP 加水分解活性および 3' → 5' の方向性をもつ DNA ヘリカーゼ活性がみられた。次に、Fbh1 を含む分裂酵母 SCF<sup>Fbh1</sup> 複合体をバキュロウイルス発現系から精製し、ヒトユビキチン活性化酵素 E1 及びユビキチン結合酵素 E2 と組み合わせた試験管内ユビキチン化反応系を構築したところ、Fbh1 依存的に Rad51 がユビキチン化されることを見いだしていた。

## 2. 研究の目的

出芽酵母 Srs2 ヘリカーゼはそのトランスロケーション活性によって、Rad51 スクレオフィラメント（単鎖 DNA に Rad51 が結合したタンパク質-DNA 複合体）から Rad51 を一掃する活性を有している。ヘリカーゼモチーフの高い相同性やヒト Fbh1 の出芽酵母 *srs2Δ* 株の相補の結果などから、Fbh1 ヘリカーゼ活性も Srs2 と同様な機能を果している可能性が強く示唆される。一方、我々が予備実験にて観察した Rad51 のユビキチン化は完全に Fbh1 に依存していたが、限定的であった。このことは、我々の構築した試験管内 Rad51 ユビキチン化反応が生体内を十分に反映していない可能性が考えられる。Fbh1 においては、Rad51 スクレオフィラメントのトランスロケーションと同時にユビキチン化反応を行なうとすれば非常に合目的である。そこで、Fbh1 による組換え中間体の解消機構のモデルを立て、このモデルの検証を試みた。まず始めに、(1) Fbh1 が Rad51 スクレオフィラ

メントの解消に働くか、(2) 単鎖 DNA 存在下で Rad51 のユビキチン化が促進されるか、について解析を行なう。次に、(3) 組換え反応の粗過程におけるユビキチン化の役割を解析するために、分裂酵母においても近年確立された試験管内 DNA 鎖交換反応系 (Haruta *et al.*, 2006) と共役した試験管内ユビキチン化反応系を構築する。さらに、(4) Rad51 のユビキチン化に必須なリジン残基の同定や (5) 細胞内での Rad51 のユビキチン化の同定、について、生化学的解析と遺伝学解析を織り交ぜて詳細に検証し、Fbh1 による相同組換え制御の分子機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

前準備として、必要なリコンビナントタンパク質を大量調製した。ユビキチン E3 複合体 SCF<sup>Fbh1</sup> の昆虫細胞を宿主としたバキュロウイルス発現系はすでに構築していたため、精製条件を至適化した上でスケールアップして発現・精製を行なった。またヘリカーゼ活性との協調関係を調べるため、ヘリカーゼ活性に必要な Walker motif A の変異タンパク質の発現系もすでに構築していたため、同様に SCF<sup>Fbh1</sup> 複合体として発現・精製した。分裂酵母ユビキチン活性化酵素 E1 及びユビキチン化酵素 E2 に関しては大腸菌大量発現系を構築し、精製を行なった。これらの精製タンパク質を用いて、「目的」で掲げた項目について、それぞれ以下の方法で解析した。

(1) Fbh1 が Rad51 スクレオフィラメントの解消に働くか

以前報告されている出芽酵母 Srs2 による Rad51 スクレオフィラメントの解消は、単鎖 DNA から解離した Rad51 を二重鎖 DNA に結合させ、二重鎖 DNA に結合した量を測定するという間接的な評価系が用いられた。より直接的に評価するため、磁気ビーズに固定化した単鎖 DNA（以下、単鎖 DNA ビーズと呼ぶ）を調製し、これに結合している Rad51 の量を直接測定する系を構築した。単鎖 DNA の長さによる違いも考慮するため、約 80、600、1200 スクレオチドの 3 種類を作製した。Rad51 の結合条件を検討した後、Fbh1 添加によって、Rad51 が解離するかを測定する。単鎖 DNA ビーズに結合した画分（ビーズ画分）と結合しなかった画分（上清画分）を SDS-PAGE した後、CBB-G250 で染色し、Rad51 のバンドの強度を定量した。

(2) 単鎖 DNA 存在下で Rad51 のユビキチン化が促進されるか

上記 (1) の解析で作製したバイオチン化単鎖 DNA を用いて、Rad51 の全量が単鎖 DNA に結合する比を決定し、必要十分な量の単鎖

DNA を試験管内ユビキチン化反応系に添加し、Rad51 のユビキチン化量を調べた。定量は抗 Rad51 抗体による Western blot を行なったのちに、蛍光強度測定装置を使って定量した。

(3) 組換え反応の粗過程におけるユビキチン化の役割の解析

試験管内 DNA 鎖交換反応は、単鎖 DNA とそれと相同な二重鎖 DNA を基質として、Rad51 レコンビナーゼ、2 種類のタンパク質 (Swi5-Sfr1 及び RPA) を必要とする。そこで、各々のコンポーネントの Rad51 ユビキチン化への影響を調べた。

(4) Rad51 のユビキチン化に必須なリジン残基の同定

ユビキチン化反応後、SDS-PAGE による分離を行ない、銀染色してユビキチン化 Rad51 のバンドを切り出した。切り出したユビキチン化 Rad51 を含むゲル片をトリプシン消化し、その消化物を回収し、質量分析計 (LC-MS) によって、ユビキチン化部位を同定した。

上記実験によって同定された Rad51 ユビキチン化部位 (リジン残基) をアルギニンに置換した変異タンパク質を部位特異的 point mutation 導入法で作製した。大腸菌大量発現系で発現し、精製した。この変異タンパク質を用いて試験管内ユビキチン化反応系を行ない、ユビキチン化されるかどうかを調べた。

(5) 細胞内での Rad51 のユビキチン化の同定

カンプトテシンまたはブレオマイシン存在下や細胞周期を同調した細胞において、Rad51 のユビキチン化の検出を試みた。野生型と *fbh1* 欠損株で行ない、抗 Rad51 抗体による Western blot で、電気泳動の際の移動度の違いで評価した。

(6) ユビキチン化の生物学的意義

以下の 2 つの解析によって、生体内における Rad51 ユビキチン化の役割の考察を試みた。

精製したユビキチン化 Rad51 を用いて、Rad51 の活性がどのように変化するかを調べるため、Rad51 ユビキチン化の反応条件の最適化を行なった。

研究の方法 (4) によって作製したユビキチン化部位変異を分裂酵母野生型株に導入し、得られた変異株の DNA ダメージ感受性を野生型株と比較し、組換え修復能を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) ~ (6) について、以下の成果を得た。(3) は予想と異なる結果が得られたために、申請時の計画を変更した。

(1) について

約 80、600、1200 ヌクレオチドの 3 種類の単鎖 DNA ビーズを使って、Rad51 ヌクレオフィラメントの形成効率を調べ、約 600 ヌクレオチドの単鎖 DNA ビーズを選択した。この磁気ビーズで Rad51 フィラメントを作製し、Fbh1 を添加したところ、Fbh1 のヘリカーゼ活性依存的に Rad51 が単鎖 DNA から乖離することが観察できた。興味深いことに、メディエータである Swi5-Sfr1 タンパク質複合体存在下では、その Rad51 の乖離は起こらなかった。すなわち、Fbh1 が未成熟な Rad51 フィラメントは解消するが、成熟した (活性型) Rad51 フィラメントは解消できないことが明らかとなった。

(2) について

Rad51 が結合するのに必要十分な量の単鎖 DNA を試験管内ユビキチン化反応系に添加し、ユビキチン化させたところ、意外なことに、Rad51 のユビキチン化は阻害された。考えられる理由の一つとして、Fbh1 が高い単鎖 DNA 依存的 ATPase 活性を有しており、ユビキチン化にも必要な ATP を消費してしまうことが挙げられる。ヘリカーゼ欠損タンパク質を使った解析は試みたが、この可能性を検証することはできなかった。

(3) について

試験管内 DNA 鎖交換反応は、単鎖 DNA とそれと相同な二重鎖 DNA を基質として、Rad51 レコンビナーゼ、2 種類のタンパク質 (Swi5-Sfr1 及び RPA) を必要とし、さらに、これらコンポーネントを添加する順序を厳密に制御することが鎖交換反応に必須である。前述の理由から、DNA 鎖交換反応系と共役した *in vitro* ユビキチン化反応の構築は困難であったため、鎖交換反応の各ステップに必要なコンポーネントの存在下で Rad51 ユビキチン化の変化を調べることにした。その結果、メディエータである Rad22 存在下で Rad51 のユビキチン化は著しく促進される一方、同じくメディエータである Swi5-Sfr1 タンパク質複合体存在下では阻害された。Rad22 による促進効果は単鎖 DNA 存在下でもみられるため、Rad22 によって Rad51 フィラメントが形成されるステップがユビキチン化の標的であり、Rad51 フィラメント形成が進んで Swi5-Sfr1 タンパク質複合体が含まれた活性型フィラメントは標的とならないことが示唆された。

(4) について

ユビキチン化反応後、SDS-PAGE による分離を行ない、銀染色してユビキチン化 Rad51 のバンドを切り出した。切り出したユビキチン化 Rad51 を含むゲル片をトリプシン消化し、

その消化物を回収し、質量分析計 (LC-MS) によって、少なくとも 1 カ所のユビキチン化部位 (8 6 番目のリジン残基) を同定した。このリジン残基は Rad51 の HhH モチーフ内に存在するが、HhH モチーフは DNA 結合に重要と考えられているため、ユビキチン化により Rad51 の DNA 結合能の変化が示唆された。

同定した Rad51 の K86 をアルギニンに置換した変異体を作製し、タンパク質を精製した。この変異タンパク質を用いて試験管内ユビキチン化反応系を行なったところ、ユビキチン化の程度は低下したが、完全には消失しなかったため、ユビキチン化部位は複数存在することが示唆された。

#### (5) について

カンプトテシンやブレオマイシンを処理した細胞において、Rad51 のユビキチン化の検出をウェスタンブロットによって試みたが、これまでのところユビキチン化の検出は出来ていない。プロテアソームの変異株での解析を行なう準備を進めたが、最終年度内に解析することはできなかった。

#### (6) について

ユビキチンおよび Rad51 に付加したエピトープタグを利用して、ユビキチン化 Rad51 の精製を計画したが、Rad51 のユビキチン化効率が悪く、十分なタンパク量を得られなかった。ユビキチン化反応条件の検討をしたものの、劇的に反応性を高めるには至らなかった。

(4) で同定したユビキチン化部位の変異株 (K86R) を作製し、DNA ダメージ感受性を調べたが、顕著な感受性はみられなかった。これは変異タンパク質を用いたユビキチン化反応の結果から予想される通り、ユビキチン化部位が複数存在する可能性を示していると考えられた。

### 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 3 件)

- ① Natsume T, Tsutsui Y, Toda T, Dunleavy EM, Pidoux AL, Iwasaki H, Shirahige K, Allshire RC and Yamao F. A DNA polymerase  $\alpha$  accessory protein, Mcl1, is required for propagation of centromere structures in fission yeast. *PLoS One* 3: e2221, 2008 (査読有)
- ② Akamatsu Y, Murayama Y, Yamada T, Nakazaki T, Tsutsui Y, Ohta K and Iwasaki H. Molecular characterization of the *Schizosaccharomyces pombe nip1<sup>+</sup>/ctp1<sup>+</sup>* gene in DNA double strand break repair in

association with the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Mol. Cell. Biol.* 28: 3639-3651, 2008 (査読有)

- ③ Roseaulin L, Yamada Y, Tsutsui Y, Russell P, Iwasaki H and Arcangioli B. Mus81 is essential for sister chromatid recombination at broken replication forks. *EMBO J.* 27: 1378-1387, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 14 件)

- ① Analysis of F-box DNA helicase Fbh1 involved in regulation of homologous recombination in fission yeast, Yasuhiro Tsutsui, International Conference on Radiation and Cancer Biology at Nagasaki 2010, Nagasaki, Japan 2010 年 2 月 17-20 日 (口頭発表)
- ② 相同組換えの制御に関与する分裂酵母 Fbh1 の生化学的解析、筒井康博、黒川裕美子、岩崎博史、山尾文明、第 27 回染色体ワークショップ、静岡県御殿場市、2010 年 1 月 20-22 日 (ポスター発表)
- ③ Biochemical analysis of fission yeast F-box DNA helicase involved in regulation of homologous recombination, Yasuhiro Tsutsui, Yumiko Kurokawa, Hiroshi Iwasaki, Fumiaki Yamao, 第 32 回日本分子生物学会年会、神奈川県横浜市、2009 年 12 月 9-12 日 (ポスター発表)
- ④ Fission yeast Rhp51 is ubiquitinated by F-box DNA helicase in vitro, Yasuhiro Tsutsui, Yumiko Kurokawa, Hiroshi Iwasaki, Fumiaki Yamao, The International Symposium on "Chromosome cycle and genome dynamics", Nasu, Tochigi, Japan, 2009 年 11 月 10-12 日 (口頭発表)
- ⑤ Fission yeast Mcl1, a DNA polymerase  $\alpha$  accessory protein, interacts with SHREC complex in vivo, Yasuhiro Tsutsui, Toyooki Natsume, Takashi Sutani, Hiroshi Iwasaki, Katsuhiko Shirahige, Fumiaki Yamao, The International Symposium on "Chromosome cycle and genome dynamics", Nasu, Tochigi, Japan, 2009 年 11 月 10-12 日 (ポスター発表)
- ⑥ 相同組換えに働く分裂酵母 Rad22 (Rad52 ホモログ) の SUMO 化修飾の生化学的解析、

- 黒川裕美子、村山泰斗、筒井康博、山尾文明、岩崎博史、2009年度複製・組換え・修復ワークショップ、滋賀県彦根市、2009年11月1-3日（共著者、口頭発表）
- ⑦ 相同組換えの制御に関する分裂酵母 Fbh1 の機能解析、筒井康博、黒川裕美子、岩崎博史、山尾文明、2009年度複製・組換え・修復ワークショップ、滋賀県彦根市、2009年11月1-3日、（口頭発表）
- ⑧ BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF FISSION YEAST FBH1, A DNA HELICASE WITH F-BOX INVOLVED IN HOMOLOGOUS RECOMBINATION, Yasuhiro Tsutsui, Yumiko Kurokawa, Hiroshi Iwasaki, Fumiaki Yamao, The 5th International Fission Yeast Meeting, Tokyo, Japan, 2009年10月26-31日（ポスター発表）
- ⑨ 分裂酵母 F-box ヘリカーゼによる相同組換え制御の分子メカニズムの解析、黒川裕美子、筒井康博、岩崎博史、山尾文明、日本遺伝学会 第81回大会、長野県松本市、2009年9月16-18日（共著者、口頭発表）
- ⑩ セントロメアクロマチン構造の維持に関する分裂酵母 Mcl1 の解析、筒井康博、夏目豊彰、須谷尚史、白髭克彦、岩崎博史、山尾文明、第26回染色体ワークショップ、兵庫県姫路市、2009年1月26-28日（ポスター発表）
- ⑪ Biochemical characterization of Fbh1, a DNA helicase with F-box involved in homologous recombination in fission yeast, Y. Tsutsui, Y. Kurokawa, T. Hishida, T. Morishita, H. Shinagawa, F. Yamao, H. Iwasaki, 3R Symposium 2008, Shizuoka, Japan, 2008年10月27-30日（ポスター発表）
- ⑫ A DNA POLYMERASE  $\alpha$  ACCESSORY PROTEIN, MCL1, IS REQUIRED FOR PROPAGATION OF CENTROMERE STRUCTURES IN FISSION YEAST, Y. Tsutsui, T. Natsume, T. Sutani, E. M. Dunleavy, A. L. Pidoux, H. Iwasaki, K. Shirahige, R. C. Allshire, F. Yamao, Asia-Pacific Regional S. pombe Meeting 2008, Singapore. 2008年7月25-27日（口頭発表）
- ⑬ A DNA POLYMERASE  $\alpha$  ACCESSORY PROTEIN, MCL1, IS REQUIRED FOR PROPAGATION OF CENTROMERE STRUCTURES IN FISSION YEAST, Y. Tsutsui, T. Natsume, T. Sutani, E. M. Dunleavy, A. L. Pidoux, H. Iwasaki, K. Shirahige, R. C. Allshire, F. Yamao, International Symposium on Chromosome Dynamics in Ise, Mie, Japan, 2008年5月28-30日（ポスター発表）
- ⑭ BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF FBH1, A DNA HELICASE WITH F-BOX INVOLVED IN HOMOLOGOUS RECOMBINATION IN FISSION YEAST, Y. Tsutsui, Y. Kurokawa, T. Hishida, T. Morishita, H. Shinagawa, F. Yamao, H. Iwasaki, 第3回遺伝国際シンポジウム、静岡県三島市、2008年5月26-27日（口頭発表）
- 〔図書〕（計1件）
- ① 筒井康博、岩崎博史「相同組換えによる DNA 修復の分子機構」生体の科学 59 巻、pp388-389、2008（医学書院）
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
筒井 康博 (YASUHIRO TSUTSUI)  
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教  
研究者番号：00390625
- (2) 研究分担者  
無し
- (3) 連携研究者  
無し