

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年5月29日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21247027

研究課題名（和文）分裂酵母の遺伝的 DNA 再編成の分子メカニズムの解析

研究課題名（英文）Molecular mechanism of genetic DNA rearrangements in fission yeast

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、生物が生来有している遺伝情報の再編成現象（例えば、相同組換え）について、分裂酵母をモデル実験系として、その分子機構の解明を試みた。特に、いくつかのタンパク質の機能について重点的に解析したが、なかでも、減数分裂期組換えの鍵酵素 Dmc1 リコンビナーゼの解析において大きな成果をあげた。すなわち、Dmc1 依存的 Holliday 構造形成における試験管内反応に初めて成功し、その方向性が 5'-3'であることを示した。これは、バクテリア RecA と同じ方向、Rad51 とは逆の方向であり、減数分裂期に交叉型組換えが高頻度でおこるメカニズムを議論する上で、極めて重要な知見となるものである。

研究成果の概要（英文）：

We are very much interested in molecular mechanism of genetic DNA rearrangements (e.g. homologous recombination), and thus during this proposed research period we tried to elucidate some functions of proteins involved in genetic rearrangements in fission yeast, which was used as a model biological system. Among several approaches we took for this aim, we had a great achievement for analysis of Dmc1 recombinase that works for meiotic recombination. We demonstrated fission yeast Dmc1-mediated Holliday junction formation in vitro. The directionality is 5'-3', which is the same as that by bacterial RecA but the opposite by Rad51 recombinases. Our finding is very important to understand for molecular mechanisms of meiotic recombination that accompanies high level of crossover products.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2010年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2011年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
年度			
年度			
総計	35,200,000	10,560,000	45,760,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、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、分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の再編成は、相同組換えを代表例として、免疫グロブリンの多様性の獲得や酵母の接合型変換など、興味深く、且つ重要な生命現象の基盤的反応の一翼を担っている。特に、相同組換えは、種の多様性を付与する進化のドライビングフォースであり、また、損傷 DNA を正確に修復することによってゲノムの安定性を維持する重要な遺伝的メカニズムとしても機能する。このように根源的な生命機能にも関わらず、研究開始当初は、その反応の複雑さ故に、相同組換えの分子メカニズムの理解は極めて遅れていた。

相同組換えは、時空間的に高度に制御された連続反応であり、3つのステップ（前・中・後期：図1）に分かれる。

相同組換えの前期過程は、DNA 二重鎖切断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化学変異原投与）があるが、生じた DNA 二重鎖切断末端からは、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) が生成される。我々は網羅的検索を行い、新たに多数の組換え遺伝子を同定しているが (Tsutsumi et al. *Genetics*. 2000)、なかでも、*nbs1^Δ* 遺伝子は、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で、初期過程で最も重要な MRN 複合体の構成因子の一つである (Ueno et al. *MCB*. 2003)。2008年には、*nbs1* の多コピーサプレッサーとして *nip1^Δ* (別名 *ctp1^Δ*) 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)。これは、ヒトの癌抑制遺伝子産物 CtIP のホモログである。

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、RPA が除去されながら Rad51 リコンビナーゼ（分裂酵母の場合、Rhp51 と呼ばれることもあるが、本申請研究では Rad51 で統一する）が、ssDNA 上に presynaptic filament を形成する（中期過程）。この過程では、メディエーターと呼ばれる Rad52（分裂酵母の場合は、Rad22 もしくは別名 spRad52：以後 spRad52 で統一する）と 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 (Rhp57 と呼ばれることがあるが、以後

Rad57 で統一する) を最初に同定した (Tsutsumi et al. *Genetics* 2000)。その後、Rad51 の補助因子として Swi5-Sfr1 複合体を同定した。Swi5-Sfr1 複合体は、Rad55-Rad57 ヘテロ二量体とは、同様な働きをしながら、しかし、独立して Rad51 依存的修復経路で働くことを明らかにしている (Akamatsu et al. *PNAS*. 2003, *EMBO J.* 2007)。

分裂酵母 *swi5^Δ* 遺伝子は、元々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、Swi5 は、Swi2 と Swi6 と 3 者複合体を形成し接合型変換における鎖交換反応に特異的に関与することを示した (Akamatsu et al. *PNAS* 2003)。尚、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。

我々は、2006年に、Swi5-Sfr1 複合体が Rad51 による試験管内 DNA 鎖交換反応を促進することを発見した。さらに、減数分裂特異的なリコンビナーゼである Dmc1 に対しても、Swi5-Sfr1 複合体が DNA 鎖交換を促進することを見出した (Haruta et al. *Nature SMB*. 2006)。2008年には、Swi5-Sfr1 複合体、spRad52, RPA, Rad51 リコンビナーゼからなる DNA 鎖交換反応系を構築することに成功した。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問的意義が高い (Kurokawa et al. *PLoS Biol.* 2008)。この研究では、Rad51 の補助因子として位置づけられていた spRad52 と Swi5-Sfr1 複合体について、両者の機能的差異を明らかにした。すなわち、mediator として定義されていた Rad52 は、Rad51 を RPA でコートされた ssDNA 上にリクルートする分子シャペロンであり、また、Swi5-sfr1 複合体は、Rad51 presynaptic filament による DNA 鎖交換反応を活性化するトランスアクチベーターの役割を果たしていることを示唆した。

また、真核生物のリコンビナーゼで、初めて in vitro での Holliday 中間体の形成に成功した (Murayama et al. *Nature* 2008)。

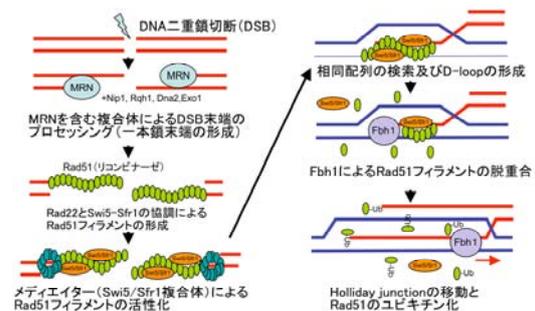


図1. 相同組換えのモデル.

中後期過程は、組換え中間体である D-loop や Holliday 構造がプロセッシングされて解消される過程である。原核生物では、RuvABC リゾルバゾームがその役割を担っているが、真核生物では未だ決定的な機能ホモログが見つかっていなかった。上述の網羅的探索により、我々は、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 (Morhisita et al. *MCB*. 2005)。

なお、申請者は、RuvAB Holliday 分岐移動反応触媒酵素 (Iwasaki et al. *Genes Dev.* 1992) と RuvC Holliday 分岐切断エンドヌクレアーゼ (Iwasaki et al. *EMBO J.* 1991) を発見し、これらのタンパク質による Holliday 構造のプロセッシングの分子機構を解析してきたので、中後期過程の解析にはノウハウを有していた。

2. 研究の目的

組換えにおけるそれぞれの過程は、複数のタンパク質の集合とそれに伴う各々の因子の質的変換によって進行するが、概念となる基本的な反応素過程 (集合と質的变化) は、他の複雑な生命反応にも共通の基本的特徴であり、それゆえ、相同組換え反応機構の根本的な解明・理解はパラダイムとして生命科学の大きな進展につながる。

我々は、分裂酵母を生物モデル系としていくつかの新しい組換え因子 (Nip1、Swi5-Sfr1 複合体、Fbh1 ヘリケースなど) を独自に発見・解析し、これらの因子が、反応素過程で極めて重要な役割を担っていることを、独自に構築した試験管内 DNA 鎖交換反応系を用いて示し、世界的にも大きな成果を挙げていた。本申請研究では、フロントランナーとして、各ステップの再構築やステップ間の連携機構を解明し、パラダイムの構築を目指した。

3. 研究の方法

相同組換えにおける 3 つの反応過程において、それぞれ次の方法を用いた。

(1) 初期過程

MRN 複合体、Ctp1 (別名 Nip1、以下 Ctp1 として統一) 初期過程に関与するタンパク質の多量発現・精製方法を検討した。また、Ctp1 の生化学的なキャラクタリゼーションとリン酸化反応について解析した。

(2) 中期過程

(2-i) Swi5-Sfr1 複合体について、X 線結晶構造解析及び X 線小角散乱法 (SAXS) を行った。

(2-ii) Dmc1 依存的 DNA 鎖交換反応における spRad52 と Sfr1-Swi5 複合体の影響を、精製したタンパク質を用いて、試験管内で解析した。

(2-iii) Dmc1 による Holliday 構造形成能について、試験管内反応系を構築して検討した。

(2-iv) Rad55-Rad57 ヘテロ二量体の多量発現・精製方法を検討した。

(3) 中後期過程

Fbh1 ヘリケースについて、生化学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 初期過程

Ctp1 がいくつかのキナーゼによってリン酸化されることは、P. Russell や我々のグループが報告している。しかし、どのキナーゼによるリン酸化が、どのような効果を引き出すかは不明であった。我々は、リン酸化模倣ミュータントの取得に成功し、これを用いることで、Ctp1 がリン酸化されることが DNA 修復における活性型であることを証明した。さらに、このリン酸化にはカゼインキナーゼ II (CKII) が関与することから、これを用いて Ctp1 の *in vitro* リン酸化反応系を確立した。さらに、この反応系の解析から、Ctp1 がリン酸化されると Nbs1 と結合することを証明した (投稿準備中)。

(2) 中期過程

(2-i) SAXS 法を用いて、Swi5-Sfr1 複合体の全体構造を決定した (図 2、Kokabu et al., 2011)。また、N 末端 180 アミノ酸を欠いた Sfr1 と Swi5 とのタンパク質複合体 (Swi5-Sfr1C 複合体) の X 線立体構造を高分解能 (解像度 2.8 Å) で決定した (Kuwabara et al 2010)。構造機能相関解析を行い、Sfr1 の N 末端領域が、Rad51 との初期結合に重要であること、一方、Swi5-Sfr1C 複合体は、Rad51 との結合は弱いものの、DNA 鎖交換反応の活性化能 (トランスアクチベーション活性) に直接関わるドメインであることを示した。これらをもとに、2012 年には、Swi5-Sfr1 による DNA 鎖交換活性のモデルを提唱した。

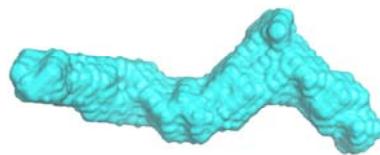


図2. SAXS による Swi5-Sfr1 複合体の全体構造。

(2-ii) Dmc1 依存的 DNA 鎖交換反応における spRad52 と Sfr1-Swi5 複合体の影響。2006 年発表の論文では、Swi5-Sfr1 複合体による Dmc1 の DNA 鎖交換反応の活性化は、小さいものであった (Haruta et al., 2006)。本計画研究期間中、詳細に反応条件を検討したところ、極めて高い効率で活性化がおこることがわかった。この条件では、RPA による DNA 鎖交換の阻害活性をほぼ完全に解消することができる。そういう意味では、Swi5-Sfr1 複合体は、Dmc1 に対して分子シャペロン且つトランスアクチベーターとして機能し、古典的なメディエーターの定義に合致する因子である。一方、Rad52 は、この反応を阻害した。2つのリコンビナーゼに対する Rad52 の異なる制御機構については、新しい概念である (投稿準備中)。

(2-iii) Dmc1 による Holliday 構造形成能。分裂酵母 Dmc1 が Holliday 構造を試験管内で形成可能なことを示した。興味深いことに、この反応の方向性は 5' → 3' 方向であった。すなわち、Rad51 の逆、RecA と同方向であった。この方向性の違いは、ほとんど大きな生化学的な活性の違いが見られなかった Rad51 と Dmc1 間で、最も顕著な特性であり、今後、減数分裂のメカニズムを明らかにしていく上で極めて重要な情報となった (Murayama et al., 2011)。

(2-iv) Rad55-Rad57 ヘテロ二量体の多量発現・精製方法の検討。大腸菌での発現系とバキュロウイルスを用いた昆虫細胞系での発現系を検討してきた。検出可能なタンパク質発現量があるものの、生化学的解析に十分耐えうる量が可溶性画分に回収できなかった。さらに、条件を検討しているところである。

(3) 中後期過程

Fbh1 ヘリケースが、Rad51 フィラメントを displace する活性があることを見出した (投稿準備中)。現在、この生理的意義について、解析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 9 件) すべて査読有り

- ① Akai Y, Kurokawa Y, Nakazawa N, Tonami-Murakami, Y, Yoshimura S H, Iwasaki H, Shiroiwa Y, Nakamura T, Shibata E, Yanagida M. Opposing role of condensin hinge against replication protein A in mitosis and interphase through

promoting DNA annealing. *Open Biol.*

(2011) 1. e110023 doi: 10.1098/rsob.110023

- ② 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.* (2011) 286:43569-76.
- ③ 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* (2011)188:871-882.
- ④ 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.* (2011) 745:385-405.
- ⑤ Murayama Y, Tsutui, Y and 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.* (2011) 25:516-527.
- ⑥ Hishida T, Hirade Y, Haruta N, Kubota Y and 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.* (2010) 30: 4840-4850.
- ⑦ Kuwabara N, Hashimoto H, Yamada N, Unzai S, Ikeguchi M, Sato M, Murayama Y, Iwasaki H and Shimizu T. Purification and crystallization of Swi5 and Swi5-Sfr1 complex from fission yeast. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* (2010) F66: 1124-1126.
- ⑧ Williams RS, Dodson GE, Limbo O, Yamada Y, Williams JS, Guenther G, Classen S, Glover JN, Iwasaki H, Russell P and Tainer JA. Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair. *Cell* (2009) 139: 87-99.
- ⑨ Hishida T, Kubota Y, Carr AM, and Iwasaki H. RAD6-RAD18-RAD5 pathway-dependent tolerance to chronic

low-dose UV light. *Nature* (2009) 457: 612-615.

[学会発表] (計9件) 主なもののみ記載

- ① 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 (招待講演) 2011.12.13-16. パシフィコ横浜
- ② Iwasaki H. Regulation of Rad51 recombinase in fission yeast. Japan-France conference on the RecA family recombinases: New Frontier of the research on Rad51 recombinases and its accessory proteins (Meeting organizer) 2011.9.26-28. Institut de Biologie Physico Chimique, Paris, France
- ③ 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 (招待講演) 2011.9.20-23 京都大学農学部・農学研究科
- ④ Iwasaki H. Differential effects of Rad22 on the Rad51- and Dmc1-mediated DNA strand exchange reactions. 6th international fission yeast meeting (招待講演) 2011.6.25-30. Harvard Medical School, Boston, USA.
- ⑤ Iwasaki H. Molecular mechanism of DNA strand exchange reaction, a central reaction of homologous recombination mediated by recombinases. China-Japan Symposium on Cancer Research (招待講演) 2011.5-19-20. 深圳, 中国
- ⑥ 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. 日本分子生物学会生化学会合同年会 (BMB2010) (招待講演) 2010.12.7-10.神戸ポートアイランド
- ⑦ Iwasaki H. Biochemical differences between Rad51 and Dmc1 recombinases from fission yeast. 3R Symposium (招待講演) 2010.10.26-30 富山国際会議場
- ⑧ Iwasaki H. Biochemical analysis of fission yeast recombinases and their auxiliary proteins. 5th international fission yeast meeting (招待講演) 2009.10.25-31. 国立オリンピック記念青少年総合センター、東京
- ⑨ Iwasaki H. Regulation of strand exchange reactions by mediator proteins. FASEB Summer Research Conference (招待講演) 2009.8.2-6 Snowmass Village, Colorado, USA

[図書] (計1件)

Tsutsui Y, Kawasaki A and Iwasaki H. InTech社. Human CtIP and its homolog: Team players in DSB resection games. In *DNA repair – On the pathways to Fixing DNA Damage and Errors*. Ed Storici. 2011 総頁数 380頁中、16頁を担当。

[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