

機関番号：12608

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010年度

課題番号：21770007

研究課題名 (和文) 分裂酵母の接合型変換組換え反応の試験管内再構成系による機能解析

研究課題名 (英文) Reconstitution analysis of mating type switching recombination of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*

研究代表者 村山 泰斗 (Yasuto Murayama)

(東京工業大学・大学院生命理工学研究科・グローバル COE 研究員)

研究者番号：60531663

研究成果の概要 (和文)：

接合型変換は、ゲノム上の *mat* 領域で起こる相同組換えに起因するが、その反応機構は不明である。分裂酵母 Swi2-Swi5 複合体は、この相同組換え反応に関与することが知られていた。そこで、本研究は、Swi2-Swi5 複合体を精製し、その生化学的機能をあきらかにし、接合型変換の試験管内再構成系を構築して解析することによって、その反応メカニズムを解明することを目的とした。その結果、Swi2-Swi5 複合体は、それ自体単体で D-loop 形成活性を有することを発見した。Swi2 には、AT フックドメインを含む N 末端部位と、この配列を含まない C 末端側の 2 つの DNA 結合ドメインがあるが、実際に 2 つのドメインのそれぞれが DNA 結合能を有することを証明し、さらに、C 末端側のドメインに D-loop 形成活性があることを示した。これらの結果は Swi2-Swi5 複合体が接合型変換時の組換えに直接関与することを強く示唆するものである。

研究成果の概要 (英文)：

In fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, mating type switching occurs at *mat* locus by using a mechanism of homologous recombination. The Swi2-Swi5 protein complex is considered to play an important role in the initiation of gene conversion during mating type switching. To reveal the biochemical function of the complex, I purified the Swi2-Swi5 protein complex, analyzed its biochemical activities and brought two important findings from the study. The first, Swi2 has at least two DNA binding domains; one is located at the N-terminal region which contains AT hook motif, and the other is located at the C-terminal region. The second, the Swi2-Swi5 complex promotes D-loop formation, which is an essential activity for initiation of strand exchange reaction. An N-terminal truncated Swi2 protein complexed with Swi5, which lacks the N-terminal DNA binding domain, promotes still D-loop formation, indicating that The C-terminal region of Swi2 has the essential domain for the D-loop activity. These results strongly suggest that Swi2-Swi5 directly involved in strand exchange reaction during mating type switching.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態

キーワード：接合型変換、相同組換え、遺伝子変換、Swi2-Swi5 複合体、分裂酵母、試験管内再構成、D-loop 形成、生化学

1. 研究開始当初の背景

酵母における接合型変換は、細胞分裂を経るたびに、ある一定の割合で母細胞とは逆の接合型が出現する現象である。分裂酵母には P 型と M 型の接合型があり、2 番染色体上の mat1 部位から発現する遺伝情報によって決定される。mat1 の近傍には、それぞれの接合型に必要な遺伝子がコードされている mat2-P 及び mat3-M カセットが存在する。このカセット部位は、通常ヘテロクロマチン化状態にあり、その発現が抑制されている。接合型変換は mat1 部位が相同組換えによって、別のカセット配列に置き換わることに起因する。それぞれの mat カセットには H1 という相同配列が存在し、これを利用して相同組換えが行われる。この反応の特徴は、元の接合型とは逆のカセットが選択されることである。

接合型変換には、相同組換え必須タンパク質に加え、Swi5 タンパク質が必須である。研究代表者が所属する研究グループは、Swi5 は Sfr1 タンパク質と複合体を形成し、DNA 相同組換え修復に働くことを示した。また、生化学的解析から、Swi5-Sfr1 複合体は、相同組換えの中心反応である DNA 鎖交換反応を触媒する Rad51 リコンビナーゼの活性を上昇させることを見いだした。

一方、Swi5 は Sfr1 以外に Swi2 と物理的に直接相互作用する。Swi2 は、N 末端側に DNA 結合ドメインである AT フックが存在する。また、Swi2 は、N 末端側でヘテロクロマチン化に関わる HP1 ホモログの Swi6 と、C 末端側で Swi5 と物理相互作用する。興味深いことに Swi2 の C 末端は Sfr1 と相同性を有し、Rad51 との物理的相互作用する。これらのタンパク質物理相互作用とアミノ酸配列の相同性に加え、遺伝学的解析から、Swi5 は、相同組換え修復では Sfr1 と、接合型変換組換えでは Swi2 とそれぞれ複合体を形成して働くことを示唆されていた。初期の接合型変換欠損変異株の遺伝学的解析から、Swi2 はドナーカセット (mat2-P、mat3-M) の選択に関与することが報告されている。2004年に、Grewal (米国) のグループは、Swi2 が mat3-M の直近に存在する SRE 領域に局在すること、さらに、この領域を起点として、P 型細胞と M 型細胞で異なった染色体局在をすることを報告した。これらの事実から、接合型依存的な Swi2 の染色体局在パターンがドナー選択に密接に関わっていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、Swi2-Swi5 タンパク質複合体の発現・精製系を確立し、試験管内再構成系を構築して解析することによって、接合型変換の反応機構を明らかにするとともに、特に当該タンパク質の接合型変換における機能の解明を目指した。

3. 研究の方法

接合型変換組換えは mat1 の H1 部位で起こる DNA 二重鎖切断によって開始され、細胞がもつ本来保有する相同組換え機能を利用した遺伝子変換によって起こると考えられている。一般に、相同組換え反応では、DNA 2 本鎖切断部はプロセッシングを受けて、単鎖 DNA 領域が形成され、それがドナーとなる相同な二重鎖 DNA へ侵入し、D-loop を形成する反応が引き金となって、遺伝子変換が起こる。Sfr1 とのアナロジー、及び、Grewal 等の報告した mat3-M 部位での局在から、接合型変換組換えにおいて、Swi2-Swi5 は、次のような機能が予想された。すなわち、1) Swi2 の DNA 結合能を介した SRE 領域への Swi2-Swi5 の局在、2) mat1 の H1 配列に結合している Rad51 のリクルート、3) Rad51 の活性化による mat3-M での DNA 鎖交換反応の促進、である。これらの仮説を踏まえ、次の実験を計画した。

(1) Swi2-Swi5 タンパク質の多量発現系と精製法の確立

swi2⁺ と swi5⁺ 遺伝子を一つのプラスミド上に導入し、大腸菌を用いた T7 発現系による共発現系を構築した。菌体を超音波破碎後、超遠心分離にて S100 分画を得た。この粗抽出液を、各種クロマトグラフィー (陽イオン交換、ヘパリン、ゲル濾過、陰イオン交換) を用いて、精製した。また、Swi2 高密度 truncate 変異体タンパク質は、His タグ付きタンパク質として、大腸菌を用いた T7 発現・精製した。この場合、swi2⁺ と Swi5⁺ 遺伝子は、それぞれ別のプラスミドにサブクローニングし、2 種類のプラスミドを発現用大腸菌に導入して、発現させた。

(2) モデル DNA 基質

mat3-M 及び SRE 領域を pBluescript IISK(+) にサブクローニングしたプラスミド作成した。このプラスミドの covalently closed circular DNA (cccDNA) フォームを、塩化セシウム密度勾配超遠心法にて分離精製し、2 種類の D-loop 反応基質の一つをした。もう一方の基質である H1 配列を持つ単鎖 DNA (ssDNA) は、合成オリゴヌクレオチド

を使用した。

(3) D-loop反応

mat3-M 及び SRE 領域を含む cccDNA と H1 配列を持つ単鎖 DNA 基質を用いて、mat3-M 領域の接合型変換組換えの初期反応を模する D-loop 反応の試験管内再構成を行った。この実験系では相同組換えの必須反応である単鎖 DNA 侵入反応をモニターした(図. 1)。また、truncated Swi2-Swi5 複合体を用いて、D-loop 活性を検討した。

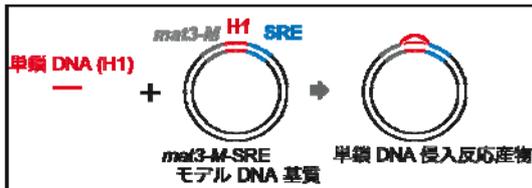


図.1 再構成実験方法

4. 研究成果

これまでの予備的な実験から、AT フックを含む Swi2 の N 末端部位は、それ単独で発現可能なこと、DNA 結合能を有することを明らかにしていた。そこで 1-400 (Swi2N1-400)、及び 81-320 (Swi2N81-320) アミノ酸部位を発現・精製し、DNA 結合能についてゲルシフトアッセイ法により解析した。SRE 領域 (454 bp) の配列を基質として用いたところ、Swi2N1-400 濃度依存的に DNA のシフトが見られた。また、Swi2N1-400 は SRE 配列を持つ DNA に対して 2 ~ 3 倍程度親和性が高かった。同様に Swi2N80-320 も同程度の結合力で DNA に結合した。次に、より短い DNA断片を用いて解析したところ、Swi2N1-400 は SRE 配列内のどの部分にも一様の結合を示す事が示唆された。以上の結果は AT フックを含む Swi2 の N 末端領域が SRE 配列の局在に関与することを示唆している。

全長 Swi2 は単独で発現させることが困難であり、Swi5 との共発現によって、組み換えタンパク質として発現可能なことがわかってきた。この性質を利用して、Swi2 (全長 722 アミノ酸) を 20 アミノ酸ずつ欠失させていった Swi2 高密度 truncation ライブラリーを作製し、Swi5 との結合に必要な領域を探索した。その結果、Swi2 の C 末端部分 621 ~ 722 アミノ酸部位が Swi5 との結合に必須であることが判明した。また、この解析を通じて、Rad51 との結合部位を含む Swi2 の 361-722 アミノ酸部位 (Swi2C361-722) を Swi5 との複合体として精製し、以降の再構成実験に用いた。

研究当初、全長 Swi2 タンパク質 Swi5 との共発現で発現可能であったが、その発現量は少ない上に分解が著しく、精製が困難であった。様々な発現・精製方法を検討した結果、試験管内再構成実験を実行可能な量の全長

Swi2-Swi5 タンパク質複合体の精製法を確立した。

モデル DNA 基質と Rad51 を用いて、mat3-P 領域での単鎖 DNA 侵入実験を行ったところ、いずれの条件においても、Swi2-Swi5 による Rad51 の促進効果は観察されなかった。また、Swi5-Sfr1 複合体は Rad51 の DNA 結合能を上昇させるが、Swi2-Swi5 では、その効果は観察されなかった。

しかし、意外なことに、Swi2-Swi5 単体で単鎖 DNA 侵入反応を触媒する活性があることが判明した(図 2)。また、この反応は Swi2-Swi5 が先に mat3-P-SRE を含む 2 本鎖の DNA 基質と結合している条件でのみ観察された。このモデル DNA 基質内には mat3-M-SRE とは無関係の配列が存在するので、H1 と同じ長さの単鎖 DNA を用いて、同様の反応を行った。この場合、Swi2-Swi5 による単鎖 DNA 侵入反応産物は検出されなかったことから、Swi2-Swi5 による単鎖 DNA 侵入反応は配列特異的に起こる可能性を示唆している。Swi2C361-722-Swi5 複合体においても、同様に単鎖 DNA 侵入活性が検出された。このことは Swi2 の C 末端部位が Swi2-Swi5 の単鎖 DNA 侵入活性に重要であり、Swi2 は N 末端と C 末端の少なくとも 2 箇所の DNA 結合ドメインがあることを意味している。Swi2 の 361 ~ 722 アミノ酸は Sfr1 と相同性を有する部分である。Swi5-Sfr1 複合体では、この活性は検出されないことから、この活性は Swi2 に特異的であると考えられる。これらの結果は、Swi2-Swi5 複合体が接合型変換組換えにおいて H1 単鎖 DNA 侵入反応に直接関与していることを強く示唆している。

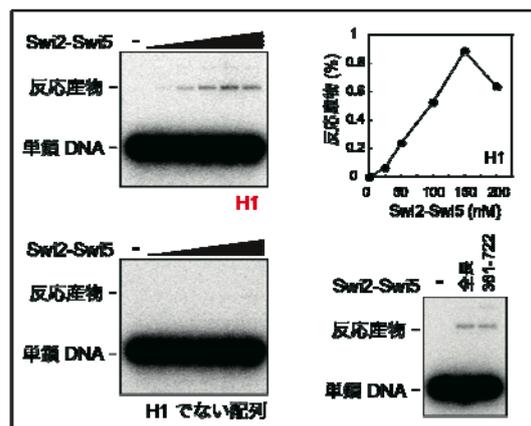


図 2 Swi2-Swi5 による単鎖 DNA 侵入反応

接合型変換は、古くから知られた現象で、酵母類に広く保存された現象である。最もよく解析されているのは、出芽酵母における接合型変換の機構であり、いわゆる textbook standard として、様々な分子生物学の教科書に取り上げられている。しかし、モデル生物としてもう一つの代表的な酵母である分

裂酵母の接合型変換の機構は、出芽酵母のそれとは、全くといってよいほど異なっており、その分子機構は極めて興味深い。この知見について、極めて乏しい。本研究は、これまでほとんど未知であった分裂酵母の接合型変換の分子機構においてSwi2-Swi5 タンパク質が、D-ループ活性を有することを初めて示したもので、予想外の発見に至った。このことは、当初目的を大きく超える極めて高い成果を達成することができたものと判断される。

分裂酵母の接合型変換組換えには、Rad51 リコンビナーゼのほか、多数の補助タンパク質も働いており、今後は、Rad51や、これらの補助タンパク質と Swi2-Swi5 の関わりを解析することが重要であると考えられる。

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1件)

1. Yasuto Murayama, Yasuhiro Tsutsui, and Hiroshi Iwasaki. The fission yeast meiosis-specific Dmcl1 recombinase mediates formation and branch migration of Holliday junction by preferentially promoting strand exchange in a direction opposite to that of Rad51. GENES and DEVELOPMENT 誌、査読有、in press.

[学会発表] (計3件)

1. Yasuto Murayama, Yumiko Kurokawa, Hiroshi Iwasaki. Regulation of Dmcl1 recombinase by recombination mediator proteins. International Symposium on "Chromosome cycle and genome dynamics". 2009年11月10日。ホテルサンバレー那須(栃木)

2. 村山 泰斗、黒川 裕美子、岩崎 博史。相同組換えメディエーターによる Dmcl1 リコンビナーゼの正と負の制御第20回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ。2009年11月3日。琵琶湖コンファレンスセンター(滋賀)

3. Yasuto Murayama, Yumiko Kurokawa, Hiroshi Iwasaki. Biochemical characterization of regulation of Dmcl1 recombinase by recombination mediator proteins. The Fifth International Fission Yeast Meeting Pombe 2009. 2009年10月27日。国立オリンピック記念青少年総合センター(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村山 泰斗 (東京工業大学・大学院生命理工学研究科・グローバルCOE研究員)

研究者番号: 60531663