

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770212

研究課題名（和文） DNA 相同組換えにおける Rad51 フィラメントの新規制御機構

研究課題名（英文） Quality control of Rad51-nucleoprotein filaments in HR

研究代表者

黒川 裕美子 (Kurokawa Yumiko)

東京工業大学・情報生命博士教育院・特任助教

研究者番号：10381633

研究成果の概要（和文）：

正常な野生型細胞においては DNA 相同組換えの反応は非常に高い正確性をもって完了している。高度な反応制御機構の存在が期待されているが、詳細な分子メカニズムは未解明である。相同組換え反応において中心的役割を担う Rad51 タンパク質に着目し、反応促進・阻害に直接関わる制御タンパク質を数種加えた *in vitro* 再構成系を構築し解析した。生化学的解析の結果、未成熟な Rad51 フィラメントがヘリカーゼ・ユビキチン化の標的になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In wild type cells, homologous recombination (HR) is required for repair of double-stranded DNA breaks (DSBs). If not processed properly, DSBs could cause detrimental effects in cells such as chromosome rearrangement, cell death, tumorigenesis and so on. HR, therefore, must be tightly regulated. To clarify the molecular mechanism of regulating HR, we have characterized Rad51-mediated reactions *in vitro* with several factors (activators, mediators, helicases and ubiquitin systems).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：組換え

1. 研究開始当初の背景

生物のゲノム恒常性維持や多様性産出は高い正確性をもった DNA 相同組換え機構を必要とする。しかし、反応進行の不具合や不適切な組換え反応の誘発は逆に癌化や細胞死を引き起こす。そのため、正常な細胞内では不適切な組換え反応を認識し特異的に阻害するメカニズムが存在していると考えられるがほとんど未解明なままであった。そこで我々は相同組換えタンパク質 Rad51 が DNA 上に形成する Rad51 フィラメントの品質制御に着目した。真核生物の DNA 相同組換え・組換え修復は、Rad51 リコンビナーゼが二重鎖 DNA 切断部位に形成された単鎖 DNA に結合してフ

ィラメント構造をつくり、相同鎖検索、鎖交換を直接行なう。我々は *in vitro* において分裂酵母 Fbh1 DNA ヘリカーゼが未成熟な Rad51 フィラメントを単鎖 DNA から引き剥がすことで不適切な組換え開始反応のキャンセルに関わり、逆に、活性化因子 Sfr1-Swi5 によって安定化・活性化された Rad51 フィラメントは Fbh1 に耐性を示すことを見出していた。さらに、Fbh1 は *in vitro* で Rad51 をユビキチン化することも見出した。以上の背景から、Rad51 フィラメントの品質制御メカニズムに焦点を当て、分裂酵母相同組換えの *in vitro* 再構成系を駆使し、解析を進めていた。

2. 研究の目的

相同組換えの反応は非常に複雑であるが、正常な細胞では高い正確性をもって完了している。これは、品質の悪い組換え反応を選別して積極的に排除する品質管理機構の存在を思わせる。Rad51 と Sfr1-Swi5、さらに Fbh1 の関係性に注目し、これらがどのように働き合い、高度な反応の正確性を生み出すのか。分子メカニズムを明らかにすることで Rad51 フィラメントのクオリティコントロール（品質管理）機構の解明と普遍性を示したいと考えた。

遺伝学的解析から、分裂酵母において不適切な組換え反応の阻害に働くヘリカーゼは 3 種類（Srs2, Rqh1, Fbh1）存在する。Sfr1-Swi5 結合型の活性型 Rad51 フィラメントは Fbh1 のヘリカーゼ活性によるフィラメント解消に耐性を示すことを見出したが、この分子メカニズムを明らかにしたい。さらに分裂酵母では Sfr1-Swi5 経路と平行に働く Rad55-Rad57 経路が存在し、Rad55-Rad57 も Rad51 に結合し活性型にすると予想される。Rad55-Rad57 結合型 Rad51 フィラメントについても検証する。また Fbh1 だけでなく Srs2 や Rqh1 についても比較検討する。ヘリカーゼの使い分けが、最終的な相同組換え産物の違いを生み出すとも考えられており非常に注目される。

特に、分裂酵母 Fbh1 は他のヘリカーゼとは異なり、SCF 型ユビキチンリガーゼの構成因子であり、この活性によっても相同組換えの制御に働くことが予想される。我々は Fbh1 によるユビキチン化のターゲットタンパク質として Rad51 を見出したが、現段階で Rad51 のユビキチン化が組換え反応にどう影響するのか（分解系に進むのか機能変換に関わるのか）不明である。そこでまず遺伝学的解析を用いて細胞内での Rad51 のユビキチン化の意義を明らかにしたい。ユビキチン化部位変異の影響を解析する。Rad51 の機能変換に関わるのであれば、*in vitro* 系を用いてユビキチン化 Rad51 を調製、精製し、機能解析することでも明らかにできると考えた。

Fbh1 は分裂酵母だけでなくヒトにも高度に保存されている。このことから、分裂酵母 Fbh1 で見出された二段階（ヘリカーゼ活性とユビキチンリガーゼ活性による）の相同組換え制御機構は、ヒトにおいても保存されていると考えられる。ヒト Fbh1 とヒト Rad51 を用いた *in vitro* 系を準備し、Rad51 フィラメントに対するヘリカーゼ活性ならびにユビキチン化活性について検証したい。

3. 研究の方法

(1) Rad51 フィラメントが Sfr1-Swi5 によって Fbh1 に耐性（ヘリカーゼ活性・ユビキチ

ンリガーゼ活性の両方）となるメカニズムの解析：

Rad51 自身の変化（活性化）によって Fbh1 に耐性になるのなら、ATP アナログである AMPNP 存在下（Rad51 は活性化状態）では Sfr1-Swi5 非依存的に Fbh1 耐性となる可能性がある。この条件下で Rad51 フィラメントの解消実験や Rad51 ユビキチン化実験を行なう。解消実験のアッセイ方法はマグネットビーズを用いた単鎖 DNA プルダウン法を用いる。

(2) Rad51 フィラメントに対する Fbh1 と他のヘリカーゼ（Srs2, Rqh1）の活性比較や Sfr1-Swi5 と Rad55-Rad57 メディエーターの効果の違いの検討：

① Rad55-Rad57 タンパク質の大量発現・精製：

Sfr1-Swi5 との比較のために用意する。当時 Rad55-Rad57 を生化学的に解析した論文は P. Sung らによる出芽酵母の一報（1997 年）しかなかった。大腸菌からの精製が困難であり、彼らも大腸菌ではなく出芽酵母から苦労して精製している。今回、昆虫細胞発現系や分裂酵母から精製することも視野に入れ、まずは大腸菌で検討してみる。

② Srs2 タンパク質の大量発現・精製：

Fbh1 との比較のために用意する。Srs2 は出芽酵母からの精製例が報告されており、分裂酵母でも同様に精製できると期待される。一度大腸菌発現系を試してみ、その結果次第で昆虫細胞発現系、酵母発現系を用いることを予定している。

③ Rqh1 タンパク質の大量発現・精製：

Fbh1 との比較のために用意する。Srs2 同様、一度大腸菌発現系を試す。

④ Rad51 フィラメントの解消実験：

まず、Srs2, Rqh1 が単鎖 DNA 上の Rad51 を引き剥がせるかを検討する。Fbh1 同様に Rad51 フィラメントの解消がみられたら、次は Sfr1-Swi5 存在下で阻害されるかを検討する。また Sfr1-Swi5 のかわりに Rad55-Rad57 存在下ではどうか、比較実験をおこなう。

⑤ Rad51 ユビキチン化の阻害実験：

Fbh1 による Rad51 のユビキチン化は、Sfr1-Swi5 存在下では阻害された。これを Sfr1-Swi5 のかわりに Rad55-Rad57 存在下で試してみる。方法は *in vitro* ユビキチン化系を用いる。

(3) Rad51 のユビキチン化の意義を明らかにする：

① 分裂酵母における Rad51 ユビキチン化の遺伝学的解析：

分裂酵母内において実際に Rad51 がユビキチン化された場合、そのユビキチン化は分解系に進むのか、機能変換に進むのかを明らかにしたい。後述のユビキチン化リジンの同定

により、Rad51 変異体を作製、細胞内で発現させることで表現型を解析する。以上の細胞を用いた解析では、細胞内 Rad51 タンパク質の量的変化・修飾解析 (ウェスタンブロット)、細胞内局在解析 (蛍光顕微鏡)、DNA ダメージや薬剤感受性の解析手法を取り入れ、ユビキチン化の意義について検討する。

② ユビキチン化 Rad51 の生化学的解析 :

ユビキチン化が Rad51 の機能変換に働く場合、生化学的アプローチは非常に有効である。ラージスケールで Rad51 を *in vitro* ユビキチン化させ、ユビキチン化 Rad51 を精製・分離して生化学的に活性を測定する (DNA 結合能やタンパク質間相互作用、ATPase 活性など)。また、*in vitro* でユビキチン化させた Rad51 を用い、Rad51 のユビキチン化リジン残基を質量分析によって同定する。Rad51 のリジン残基全 15 カ所をそれぞれアルギニンに置換した変異体も作製済みであるので、それら変異体も用いる。

(4) 分裂酵母の結果が普遍的で保存されたものかを、ヒト Fbh1 とヒト Rad51 を用いて解析する :

① ヒト Rad51 タンパク質の大量発現・精製 : 大腸菌発現系を利用する。

② ヒト Fbh1 タンパク質とヒト Cul1-Rbx1 複合体の大量発現・精製 :

ヒト Fbh1 はこれまでに昆虫細胞発現系を用いて条件検討をおこなっている。分裂酵母 Fbh1 の場合と同様、ヒト Fbh1 も単体では発現が非常に不安定であり、Skp1 とのヘテロダイマーとして発現させることで比較的安定に精製できることがわかっている。そこで、Fbh1-Skp1 複合体として発現・精製する。またユビキチン化の反応においては分裂酵母の場合同様、ヒト Cul1-Rbx1 複合体と Fbh1-Skp1 複合体を混合して SCF ユビキチンリガーゼ複合体を形成させ、アッセイに加える。

③ ヒト Rad51 とヒト Fbh1 を用いた生化学的解析 :

分裂酵母の結果同様に、ヒトにおいても Rad51 フィラメントを Fbh1 は解消できるのか、さらに、Rad51 のユビキチン化を促進することができるのだろうか。普遍性を解析するため、同様の DNA プルダウンアッセイや *in vitro* ユビキチン化アッセイで検討する。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① Rad51 フィラメントが Sfr1-Swi5 によって Fbh1 に耐性 (ヘリカーゼ活性・ユビキチンリガーゼ活性の両方) となるメカニズムの解析 :

分裂酵母 Rad51 を AMPPNP 存在下で ssDNA

に安定に結合させ、Fbh1 によるフィラメント解消実験を行なった。結果ではフィラメントの解消は見られなかった。しかし Rad51 も Fbh1 も ATPase であることを考えると、本実験系には大きな問題がある。今後 Sfr1-Swi5 非依存的に Rad51 が活性型フィラメントを形成できるような Rad51 変異体タンパク質の取得が望まれる。一方、Rad51 ユビキチン化実験の結果、ssDNA 存在下では Fbh1 によるユビキチン化が著しく阻害されることがわかった。これは、フィラメント形成に伴う Rad51 の構造変化により、ユビキチン化サイトがマスクされた可能性、もしくは Fbh1 において DNA 存在下でのユビキチンリガーゼ活性の変化に起因する可能性があり、メカニズム解明のためには今後さらに検証が必要である。Sfr1-Swi5 は Rad51 に結合することで、Rad51 の構造変化 (フィラメント型) を引き起こすことが構造解析から最近明らかになってきた。この構造変化が Rad51 のユビキチン化制御に重要であると期待される。

② Rad51 フィラメントに対する Fbh1 と他のヘリカーゼ (Srs2、Rqh1) の活性比較や Sfr1-Swi5 と Rad55-Rad57 メディエーターの効果の違いの検討 :

分子メカニズムを試験管内アッセイ系を用いて明らかにするため、アッセイに必要なタンパク質群の大量発現・精製に重点を置いた。

(i) Rad55-Rad57 タンパク質の大量発現・精製 :

Rad51 の活性化に働くと期待される Rad55-Rad57 については文献等から精製が困難であると考えられていたが、今回発現条件を詳細に検討し、低温発現・共発現によって大腸菌でも発現・精製が可能であることがわかった。カラムクロマトグラフィーを駆使し、少量ながらも精製標品を得られたので相同組換えの生化学的アッセイ系に加えて解析を行うことができた。

(ii) Srs2 タンパク質の大量発現・精製 :

大腸菌発現系を試したが、可溶化が困難であることがわかった。少量は精製できたが、アッセイに加えるほどの純度が得られていない。昆虫細胞発現系の検討が必要である。

(iii) Rqh1 タンパク質の大量発現・精製 :

大腸菌での発現・精製が困難であることがわかった。昆虫細胞発現系を検討。

Fbh1 ヘリカーゼとの機能比較をする予定であった Srs2 と Rqh1 の発現・精製が完了していないこと、ならびに Rad55-Rad57 を用いた実験については ATPase 活性・DNA 結合能解

析・DNA鎖交換反応を含め解析中であることから、④⑤の実験計画については結論を出せていない。ただし、タンパク質精製に関して昆虫細胞での条件検討の結果、今後精製できる可能性が見出せたことは大きい。

③ Rad51のユビキチン化の意義を明らかにする：

(i) 分裂酵母におけるRad51ユビキチン化の遺伝学的解析：

分裂酵母Rad51はDNAダメージ後、細胞内タンパク質量が数倍に上昇することがウェスタンブロットで確認された。また、定常期では、タンパク質量が激減していることもわかった。転写レベルでの制御もしくはユビキチン化による分解制御の可能性を示唆している。今後、プロテアソーム変異株を用いた解析を進める。また、後述のユビキチン化リジンK86の同定からRad51変異株を作製した。今後表現型を解析することで、ユビキチン化の意義について解析できると期待している。

(ii) ユビキチン化Rad51の生化学的解析：

Rad51を*in vitro*でユビキチン化させ、電気泳動後にユビキチン化Rad51バンドを回収し質量分析した結果からはK86が候補に上がっている。Rad51 K86Rを大腸菌を用いて発現・精製した。*in vitro*ユビキチン化反応系に加えたが、ユビキチン化バンドの完全な消失は見られなかった。二次的サイトがあると考えられる。

*in vitro*でユビキチン化したRad51を精製し機能解析(活性測定)を予定していたが、ユビキチン化効率が低く、アッセイに加えるほどのタンパク質量を取得できなかった。今回、新たな知見としてRad51のユビキチン化が*in vitro*で促進される条件を見出すことに成功した。この条件を進展させることで予定していた活性測定が可能になると期待している。

④ 分裂酵母の結果が普遍的で保存されたものかを、ヒトFbh1とヒトRad51を用いて解析する：

(i) ヒトRad51タンパク質の大量発現・精製：
大腸菌発現系を用いた。低温発現条件を用いることでアッセイに必要な量のタンパク質を取得することに成功した。

(ii) ヒトFbh1タンパク質とヒトCul1-Rbx1複合体の大量発現・精製：

昆虫細胞発現系により、Fbh1-Skp1複合体として発現・精製した。ヒトCul1-Rbx1複合体についても昆虫細胞発現系を用いた。

(iii) ヒトRad51とヒトFbh1を用いた生化学的解析：

分裂酵母だけでなくヒトバージョンのタンパク質を用いてフィラメント解消実験・ユビキチン化に関する生化学的解析を行なった。普遍性に関する目標はほぼ達成できたと考えている。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

Rad51がDNAの組換え反応を直接行なうタンパク質であることを考えると、Fbh1によるRad51制御機構の持つ影響力と重要性は容易に想像できる。Rad51フィラメントの質の違いに着目できたことは革新的であり分野に新しい視点を与え発展性も高い。上述のヘリカーゼや活性化タンパク質の比較検討は相同組換え全体像の理解に結びつくポテンシャルを秘めているにもかかわらずこれまでほとんど解析されていない。加えて、DNA相同組換えにおけるユビキチン修飾の研究もこれから新分野開拓の可能性を十分秘めている。

相同組換えの機能不全は、不妊症、遺伝的高多発性癌(家族制乳癌など)やゲノム不安定症候群(Bloom, Werner症候群など)の疾病の直接的な原因になっている。Fbh1も疾患の原因である可能性もある。分裂酵母から出発する本研究の解析結果はヒトにも適用できる普遍性を有し、医学的にも大きく貢献しうるだろう。

(3) 今後の展望

Rad51フィラメント自体の活性/不活性とヘリカーゼ耐性の関係性は非常にユニークな発見であり、今後も引き続き注目していきたい。また、活性化因子は分裂酵母ではSfr1-Swi5の他に同活性が予想されるRad55-Rad57複合体の2種類存在し、さらに、ヘリカーゼは3種類(Fbh1と同活性が予想されるSrs2, Rqh1)存在する。ヒトではさらに多様化しておりヘリカーゼ(Fbh1, BLM, RecQLシリーズ, WRNなど)、Rad51活性化因子(Sfr1-Swi5, Rad51B, C, Dなど, XRCCシリーズなど)これらの関係性、複数の存在意義も全く不明である。この複雑な関係性を理解し整理することは、適切・不適切な組換えを説明する糸口になる。しかし、生化学的解析に必要な精製タンパク質の取得の困難さが大きな壁となっており、特にヘリカーゼは宿主細胞への毒性も高く、可溶化発現/高純度精製が難しい。この問題をクリアすることが今後の生化学的解析に必須だろう。

Fbh1は分裂酵母だけでなくヒトにも高度に保存されている。Fbh1によるユビキチン化がRad51の相同組換え反応をどう制御しているのかについても引き続き解析を行いたい。本研究によって、生物における普遍的なメ

カニズムの1つが明らかにできるのではないかと期待している。

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)

Y. Akai, Y. Kurokawa, N. Nakazawa, Y. Tonami, Murakami, Y. Suzuki, S. H. Yoshimura, H. Iwasaki, Y. Shiroiwa, T. Nakamura, E. Shibata and M. Yanagida
Opposing Role of Condensin Hinge against RPA in Mitosis and Interphase through Promoting DNA Annealing.

Open Biology

査読有、1巻、2011年、
doi:0.1098/rsob.110023

[学会発表] (計2件)

(1) 伊藤健太郎、筒井康博、真柳浩太、黒川裕美子、小甲裕一、池口満徳、山尾文明、岩崎博史
分裂酵母 Rad51 リコンビナーゼの His-315 ミ

ュータントの解析

日本遺伝学会、2012年09月26日、九州大学
医学部 (福岡県)

(2) 伊藤健太郎、黒川裕美子、筒井康博、
小甲裕一、池口満徳、山尾文明、岩崎博史
分裂酵母 Rad51 リコンビナーゼの His-315
ミュータントの解析

日本分子生物学会年会、2011年12月15日、
パシフィコ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒川 裕美子 (Kurokawa Yumiko)

東京工業大学・情報生命博士教育院・特任
助教

研究者番号: 10381633

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し