

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25250023

研究課題名(和文) クロマチンにおける相同組換えの分子機構に関する研究

研究課題名(英文) Studies for homologous recombination in chromatin

研究代表者

胡桃坂 仁志 (Kurumizaka, Hitoshi)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：80300870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、クロマチン構造によって凝縮されている染色体ゲノムDNA上で、相同組換えがどのように行われているか、その分子機構を解明することである。本研究では、*in vitro*相同組換え反応系とクロマチン再構成系とを独自に融合させることで、高次クロマチン上における相同組換え反応機構を明らかにした。また、ヒストンバリエントによって形成される多様なクロマチン構造が、相同組換え反応を制御することを見出した。さらに、相同組換えの中心酵素であるRAD51とDMC1の機能差異について重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the molecular mechanism of homologous recombination reactions in the higher-ordered chromatin. In this study, we established the homologous pairing assay in nucleosomal template *in vitro*, and clarified the mechanism of homologous pairing reactions in the higher-ordered chromatin. In addition, we found that the chromatin structure containing histone variants regulates the homologous pairing activities. Furthermore, we also found the functional differences of RAD51 and DMC1, which are key enzymes in homologous recombination.

研究分野：生化学、構造生物学、分子生物学

キーワード：ゲノム維持修復、ゲノム多様性、ゲノム進化・再編、遺伝情報複製・再編、ゲノム機能、活性発現の分子機構、染色体構築・機能・分配、生体高分子構造・機能

1. 研究開始当初の背景

相同組換えは、放射線や活性酸素によって生じた DNA 二重鎖切断損傷を正確に修復する機構である。また相同組換えは、減数分裂期において、雌雄のゲノム DNA 間での遺伝的組換え(減数分裂期組換え)の中心反応であり、ゲノム DNA の多様性の創出に働く。そのため、相同組換え機構の破綻は、DNA 二重鎖切断損傷修復の不具合による発がんや、遺伝的組換えの欠損にともなった減数分裂期の染色体不分離による不妊症など、様々な疾患の原因となる。

RAD51 及び DMC1 は 50% 以上のアミノ酸相同性を持つタンパク質であり、相同組換えの中心反応である相同的対合反応を触媒する。RAD51 は体細胞と減数分裂期の細胞の両方で機能するのに対し、DMC1 は減数分裂期特異的に発現して機能する。しかし、減数分裂期組換えにおける両者の機能分担は未だ明らかではない。

一方で、真核生物のゲノム DNA はクロマチン構造を形成し、核内に収容されている。クロマチンは、ヒストン 8 量体(H2A、H2B、H3、H4 がそれぞれ 2 分子)に DNA が巻きついたヌクレオソームを基本単位として、それらヌクレオソームがリンカー DNA によって数珠状に連結することで形成される構造体である。さらに、クロマチンは、リンカーヒストン H1 が結合することによって、さらに高次に折り畳まれ、高次のクロマチン構造が形成される。クロマチンの基本単位であるヌクレオソームは、RAD51 の相同的対合反応に対して阻害的に働くことが知られている。この障壁は、クロマチン構造変換因子 RAD54 が機能することで解消される。しかし、リンカーヒストン H1 が結合した高次のクロマチン上で、どのように相同組換えが触媒されているのかに関して、その分子機構は明らかになっていない。

2. 研究の目的

RAD51 および DMC1 による相同的対合反応に関しては、これまで裸の DNA を用いた生化学的解析を中心に展開してきた。そのため、クロマチン構造中でのこれらの相同組換え酵素の反応機構の解明は、重要な課題である。特にリンカーヒストンが結合した高次のクロマチンでの相同的対合反応に関しては、全く報告がなされていなかった。そこで本研究では、ヌクレオソームとリンカーヒストンによって形成される高次のクロマチン構造における、RAD51 および DMC1 依存的な相同組換え反応の分子機構を、試験管内再構成系を用いた生化学的手法と出芽酵母を利用した分子生物学・遺伝学的手法によって解明することを目的とした。

3. 研究の方法

当研究室が独自に開発してきた、*in vitro* 相同組換え反応系とクロマチン再構成系を

融合させることで、相同組換えの中心反応である相同的対合反応をクロマチン基質上で解析することが可能になった。具体的には、大腸菌にてリコンビナントタンパク質として発現精製したヒトのヒストンやリンカーヒストンを用いて、ヌクレオソーム、ポリヌクレオソーム、ポリヌクレオソームとリンカーヒストンとの複合体などを試験管内で再構成した。そして、ヒトの RAD51、DMC1、および相同組換えにおいて働くクロマチン構造変換因子である RAD54 をリコンビナントタンパク質として調製し、それらによる相同的対合反応を、再構成したクロマチン基質として行った。またリンカーヒストンバリエーション群として、H1.0、H1.1、H1.2、H1.3、H1.4、H1.5、H1T などを精製し、それらリンカーヒストンの相同的対合反応における差異についても検討した。また相同的対合反応を *in vivo* で解析する系を構築するために、出芽酵母ミニクロモソームを用いたクロマチン形成機構の解析を行った。

4. 研究成果

(1) リンカーヒストン H1 を含む高次クロマチン上での相同組換え反応機構の解明

高次クロマチン上における相同組換え反応機構を明らかにするために、RAD51 及び RAD54 が触媒する相同的対合反応の解析系を確立した。まず、ヒトのヒストンをリコンビナントタンパク質として精製し、塩透析法によって 5S DNA のリピート配列を含むプラスミド DNA 上にヌクレオソームを再構成した。得られたポリヌクレオソームに、ヒトのリンカーヒストン H1.2 を、ヒストンシャペロンである Nap1 の存在下で結合させることで、リンカーヒストンを含む高次クロマチンを試験管内で再構成することに成功した。再構成したリンカーヒストンを含む高次クロマチン構造は、相同組換え酵素である RAD51 とクロマチン構造変換因子である RAD54 の存在下でも、相同的対合反応に対して阻害的であることが明らかになった。

ヒストンシャペロン Nap1 は、リンカーヒストンのクロマチンへの結合を促す一方で、過剰に存在するとリンカーヒストンのクロマチンからの脱落を促進することが知られていた。そこで、リンカーヒストンを含む高次クロマチンでの、RAD51 および RAD54 依存的な相同的対合反応を、過剰量の Nap1 存在下で検討した。その結果、Nap1 がリンカーヒストン H1 を含む高次クロマチンでの相同的対合反応を、著しく促進することを明らかにした。実際に Nap1 は、高次クロマチンからリンカーヒストン H1 を除去することで、RAD54 によるクロマチン構造変換を誘導することで高次クロマチンを弛緩し、相同的対合反応を促進することが明らかになった。以上の研究成果は、リンカーヒストンを含む高次クロマチン上での相同組換え反応の機構を世界に先駆けて解明したものであ

り、相同組換え修復反応におけるクロマチン動態制御について重要な知見を与えた。

(2) 高次クロマチンの構造多様性が相同組換え反応に与える影響

細胞核内のクロマチンには、ヒストンバリエーションや、リンカーヒストンバリエーションが存在し、それらが多様なクロマチン構造を形成している。そこで、リンカーヒストンバリエーションが相同組換え反応に与える影響を試験管内において解析した。そのために、リンカーヒストンバリエーション群 H1.0, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5, H1T をリコンビナントタンパク質として発現・精製を行った。これらのリンカーヒストンバリエーション群を含む再構成クロマチンを試験管内で調製し、RAD51 および RAD54 によって触媒される相同的対合反応系により評価した。その結果、体細胞に発現するリンカーヒストン H1 は相同組換え効率を著しく阻害するのに対して、生殖細胞特異的に発現するリンカーヒストン H1T はその阻害効果が著しく低いことが明らかになった。さらに、リンカーヒストン H1T を含む高次クロマチンの性状解析を、分析超遠心法による沈降速度解析によって行ったところ、体細胞型のリンカーヒストン H1 を含むクロマチンと比較してより弛緩した高次のクロマチン構造を形成していることがわかった。これらの結果は、リンカーヒストン H1T が結合したクロマチンの高次構造は、体細胞型のリンカーヒストン H1 が結合したクロマチン構造とは異なり、相同組換えを誘導し易い特殊な構造であることを示唆した。以上の研究成果は、リンカーヒストンバリエーション群によって形成される多様な高次クロマチン構造が、相同組換え反応の制御に重要な役割を果たしていることを示した。

(3) クロマチン構造上における RAD51 と DMC1 の機能差異

減数分裂期の細胞では、RAD51 に加えて、DMC1 が発現して機能している。しかし、減数分裂期組換えにおいて、なぜ RAD51 と DMC1 といった 2 種類の相同的対合酵素が必要であるかについては明確にされていない。そこで、RAD51 および DMC1 依存的な組換え反応を、上述した再構成クロマチンを用いた反応系によって解析した。その結果、驚いたことに、減数分裂期特異的な DMC1 と RAD51 とは、クロマチン構造を形成した基質 DNA 上での相同的対合活性が著しく異なっていることが明らかになった。そこで、RAD51 と DMC1 と、ヌクレオソームとの結合を解析した結果、RAD51 はヌクレオソームに効率よく結合するのに対して、DMC1 はヌクレオソームへの結合が著しく低いことがわかった。さらに、部分的にヌクレオソームが形成された基質に対しては、DMC1 は、ヌクレオソームが形成されていない DNA 領域で、優先的に相同的対合反応を触媒することが

明らかになった。ヌクレオソームが形成されていない染色体領域は、減数分裂期の組換えホットスポットに存在する。そのためこれらの結果は、DMC1 が組換えホットスポットでの組換えに特化した機能をもつことを示唆した。以上の研究成果は、減数分裂期組換えの分子機構に重要な知見を与えるものである。

(4) 細胞内でも DNA 配列のクロマチン構造形成への影響

高次クロマチン構造の相同組換えへの影響を細胞内で検討するために、出芽酵母のミニクロモソームを用いたクロマチン構造解析を行った。まず、相同組換えが高頻度で起こることが想定される、テロメア配列を含む DNA を、出芽酵母ミニクロモソームに導入し、そのクロマチン構造への影響をマイクロコッカルヌクレアーゼを用いたヌクレオソームマッピング法によって解析した。その結果、テロメア DNA 配列は、出芽酵母内ではヌクレオソームの形成を阻害する働きを持つことが明らかになった。同様な実験を、ヌクレオソーム形成が負に調節されると考えられる DNA 配列を用いて行った。その結果、ヌクレオソーム形成を阻害する DNA 配列は、遺伝子の発現を活性化することが明らかになった。これらの事実から、ヌクレオソーム形成を負に制御する DNA 配列は、ミニクロモソームを用いた細胞内での相同組換えを活性化することが考えられた。現在、相同組換え因子群とミニクロモソームとの相互作用や、それらのクロマチン構造への影響について、出芽酵母を用いて解析中である。

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 24 件)すべて査読あり

1. Kakumu E, Nakanishi S, Shiratori HM, Kato A, Kobayashi W, Machida S, Yasuda T, Adachi N, Saito N, Ikura T, Kurumizaka H, Kimura H, Yokoi M, Sakai W, Sugawara K. (2017) Xeroderma pigmentosum group C protein interacts with histones: regulation by acetylated states of histone H3. *Genes Cells.*, 3, 310-327.
2. Osakabe A, Arimura Y, Matsumoto S, Horikoshi N, Sugawara K, Kurumizaka H. (2017) Polymorphism of apyrimidinic DNA structures in the nucleosome. *Sci Rep.*, 7:41783.
3. Kujirai T, Horikoshi N, Xie N, Taguchi H, Kurumizaka H. (2017) Identification of the amino acid residues responsible for stable nucleosome formation by histone H3.Y. *Nucleus*, 1-10.

4. Koyama M, Nagakura W, Tanaka H, Kujirai T, Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kurumizaka H. (2017) In vitro reconstitution and biochemical analyses of the *Schizosaccharomyces pombe* nucleosome. *Biochem Biophys Res Commun.*, 482, 896-901.
5. Sato K, Shimomuki M, Katsuki Y, Takahashi D, Kobayashi W, Ishiai M, Miyoshi H, Takata M, Kurumizaka H. (2016) FANCI-FANCD2 stabilizes the RAD51-DNA complex by binding RAD51 and protects the 5' -DNA end. *Nucleic Acids Res.*, 44, 10758-10771.
6. Saotome M, Saito K, Onodera K, Kurumizaka H, Kagawa W. (2016) Structure of the human DNA-repair protein RAD52 containing surface mutations. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 72(Pt 8), 598-603.
7. Ichikawa Y, Morohashi N, Tomita N, Mitchell AP, Kurumizaka H, Shimizu M. (2016) Sequence-directed nucleosome-depletion is sufficient to activate transcription from a yeast core promoter in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 476, 57-62.
8. Machida S, Sekine S, Nishiyama Y, Horikoshi N, Kurumizaka H. (2016) Structural and biochemical analyses of monoubiquitinated human histones H2B and H4. *Open Biol.*, 6.
9. Horikoshi N, Arimura Y, Taguchi H, Kurumizaka H. (2016) Crystal structures of heterotypic nucleosomes containing histones H2A.Z and H2A. *Open Biol.*, 6.
10. Kobayashi W, Takaku M, Machida S, Tachiwana H, Maehara K, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Chromatin architecture may dictate the target site for DMC1, but not for RAD51, during homologous pairing. *Sci Rep.*, 6, 24228.
11. Machida S, Hayashida R, Takaku M, Fukuto A, Sun J, Kinomura A, Tashiro S, Kurumizaka H. (2016) Relaxed Chromatin Formation and Weak Suppression of Homologous Pairing by the Testis-Specific Linker Histone H1T. *Biochemistry*, 55, 673-646.
12. Osakabe A, Tachiwana H, Kagawa W, Horikoshi N, Matsumoto S, Hasegawa M, Matsumoto N, Toga T, Yamamoto J, Hanaoka F, Thoma NH, Sugasawa K, Iwai S, Kurumizaka H. (2015) Structural basis of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct recognition by UV-DDB in the nucleosome. *Sci Rep.*, 5, 16330.
13. Osakabe A, Adachi F, Arimura Y, Maehara K, Ohkawa Y, Kurumizaka H. (2015) Influence of DNA methylation on positioning and DNA flexibility of nucleosomes with pericentric satellite DNA. *Open Biol.*, 5, 150128.
14. Takahashi D, Sato K, Hirayama E, Takata M, Kurumizaka H. (2015) Human FAN1 promotes strand incision in 5'-flapped DNA complexed with RPA. *J Biochem.*, 158, 263-270.
15. Ichikawa Y, Nishimura Y, Kurumizaka H, Shimizu M. (2015) Nucleosome organization and chromatin dynamics in telomeres. *Biomol Concepts*, 6, 67-75.
16. Kato D., Osakabe A., Tachiwana H., Tanaka H., and Kurumizaka H. (2015) Human tNASP promotes in vitro nucleosome assembly with histone H3.3. *Biochemistry*, 54, 1171-1179.
17. Kobayashi W., Sekine S., Machida S., and Kurumizaka H. (2014) Green fluorescent protein fused to the C-terminal end of RAD51 specifically interferes with secondary DNA binding by the RAD51-ssDNA complex. *Genes Genet. Syst.*, 89, 169-179.
18. Sato K., Ishiai M., Takata M., and Kurumizaka H. (2014) Defective FANCI binding by a Fanconi anemia-related FANCD2 mutant. *PLoS ONE*, 9, e114752.
19. Taguchi H., Horikoshi N., Arimura Y., and Kurumizaka H. (2014) A method for evaluating nucleosome stability with a protein-binding fluorescent dye. *Methods*, 70, 119-126.
20. Takahashi D., Sato K., Shimomuki M., Takata M., and Kurumizaka H. (2014) Expression and purification of human FANCI and FANCD2 using *Escherichia coli* cells. *Prot. Exp. Purif.*, 103, 8-15.
21. Machida S., Takaku M., Ikura M., Sun J., Suzuki H., Kobayashi W., Kinomura A., Osakabe A., Tachiwana H., Horikoshi Y., Fukuto A., Matsuda R., Ura K., Tashiro S., Ikura T., and Kurumizaka H. (2014) Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1. *Sci Rep.*, 4, 4863.
22. Ichikawa Y., Morohashi N., Nishimura Y., Kurumizaka H, and Shimizu M. (2014) Telomeric repeats act as nucleosome-disfavouring sequences in vivo. *Nucleic Acids Res.*, 42, 1541-1552.
23. Kagawa W., Arai N., Ichikawa Y., Saito, K., Sugiyama S., Saotome M., Shibata T., and Kurumizaka H. (2014)

Functional analyses of the C terminal half of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad52 protein. *Nucleic Acids Res.*, 42, 941-951.

24. Morozumi Y., Ino R., Ikawa S., Mimida N., Shimizu T., Toki S., Ichikawa H., Shibata T., and Kurumizaka H. (2013) Homologous pairing activities of two rice RAD51 proteins, RAD51A1 and RAD51A2. *PLoS ONE*, 8, e75451.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. H. Kurumizaka, Structural studies for functional chromatin, Chromatin Structure and Dynamics, Swiss, 2017 年 1 月
2. 胡桃坂仁志、エピジェネティクスを制御するクロマチン構造と機能、第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 12 月
3. H. Kurumizaka, Altered structures and characteristics of nucleosomes containing cancer-associated histone mutations, Cold Spring Harbor Asia Conference DNA METABOLISM GENOMIC STABILITY & DISEASES, China, 2016 年 6 月
4. H. Kurumizaka, Histone contributions to chromatin dynamics, Cold Spring Harbor Asia Conference, Chromatin, Epigenetics & Transcription, China, 2016 年 5 月
5. 胡桃坂仁志、天然変性ハブとしてのクロマチン構造、横浜 NMR 研究会、横浜、2016 年 1 月
6. H. Kurumizaka, Structural basis of chromatin dynamics, 4th International Symposium of the Mathematics on Chromatin Live Dynamic, 広島、2015 年 12 月
7. 胡桃坂仁志、クロマチン構造による DNA 機能のエピジェネティック制御、第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会、神戸ポートアイランド、2015 年 12 月
8. 胡桃坂仁志、クロマチン構造とダイナミクスの分子機構、国際高等研究所 クロマチン・デコーディング、2015 年 12 月
9. H. Kurumizaka, Histone Contributions in Chromatin Dynamics, International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics and Function, Japan, 2015 年 8 月
10. H. Kurumizaka, Biochemical studies for homologous recombination reaction in chromatin, The 9th 3R Symposium, Japan, 2014 年 11 月
11. H. Kurumizaka, BIOCHEMICAL ANALYSES OF RICE DNA RECOMBINASES RAD51 AND DMC1, Plant Genome Stability and Change

2014, アシロマカンファレンスセンター
アメリカ、2014 年 7 月

12. H. Kurumizaka, Structures and physical properties of nucleosome isoforms with histone variants, EMBO meeting on Histone Variants, France, 2014 年 6 月
13. H. Kurumizaka, Structure and dynamics of the nucleosome isoforms, 高等研カンファレンス 2014 「クロマチン・デコーディング」, Japan, 2014 年 5 月
14. 清水光弘、転写調節とクロマチン構造制御に關与する天然変性タンパク質 2014 「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」第 3 回公開シンポジウム、2014 年 2 月
15. H. Kurumizaka, Homologous recombination reaction in higher ordered chromatin, The 3rd International conference New Frontier of the Research on RecA-family recombinases and their accessory proteins, France, 2013 年 10 月

〔図書〕(計 1 件)

1. 高久誉大、町田晋一、胡桃坂仁志「がん基盤生物学(担当: 相同組換え関連因子を標的にしたがん治療薬研究)」179-185、南山堂、2013 年

〔その他〕

ホームページ等

胡桃坂研究室:

<http://www.eb.waseda.ac.jp/kurumizaka/>

清水研究室:

<http://www.hino.meisei-u.ac.jp/chem/LBT/Shimizu01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

胡桃坂 仁志 (KURUMIZAKA Hitoshi)
早稲田大学 理工学術院・教授

研究者番号: 80300870

(2) 研究分担者

清水 光弘 (SHIMIZU Mitsuhiro)
明星大学 理工学部・教授

研究者番号: 80231364