

DNA 介在反応に関与する DNA 結合因子の
構造および機能との関係

理化学研究所 Heddlе 国際主幹研究ユニット

松原 和子

目次

序論	2
第一章	
包括的な点変異体を用いたコアヒストン分子表面の機能解析	3
実験方法	5
結果	7
考察	18
第二章	
分裂酵母ヒストンシャペロンAsf1およびHip1Bドメイン /Cac2 C末端の複合体立体構造解析	22
実験方法	23
結果	25
考察	32
第三章	
バクテリオファージラムダRed β タンパク質とヒトRad52組換え酵素間 におけるオリゴマー形成および1本鎖DNA結合に必要な保存残基の同定	34
実験方法	36
結果	39
考察	46
略語一覧	48
総括	49
謝辞	51
参考文献	52

序論

DNA には遺伝情報がコードされており、そこに様々なタンパク質が結合することにより、転写、複製、修復、組換えといった反応が開始される。これらの DNA 介在反応は、どの生物においても共通に備えた機能であり、細胞増殖や細胞分化等の生命の維持に関与する根本的反応だけではなく、生物進化においても深く関与している。

ヒト DNA は 2 メートルの長さを有しているが、ヒストンタンパク質により規則正しく折り畳まれヌクレオソームを作り、また他のタンパク質とも結合してコンパクトな染色体構造を作ることによって核内に整然と収納されている。真核生物においてヌクレオソームは、DNA と 2 つの 2 量体ヒストン H2A-H2B、そして 4 量体ヒストン H3-H4 と結合することにより形成されている。したがって上述した DNA 介在反応の開始ならびに進行には、ヌクレオソームの立体構造変化を伴う必要がある。

必要な時に目的の DNA 介在反応を正確に行うために、様々なヌクレオソーム制御因子の存在が知られている。例えば、ヒストン化学修飾タンパク質として、アセチル化酵素、メチル化酵素、リン酸化酵素、ユビキチン化酵素などがある。ヒストンの N 末端テイルや C 末端部分において多くの化学修飾部位が研究されており、修飾および脱修飾、また異なる化学修飾により、反応特異的な制御が行われている。加えて、非化学修飾タンパク質として、ヒストンシャペロン、クロマチンリモデリング ATPase、ペプチジルプロリルイソメラーゼなどのようなタンパク質が、反応特異的にヌクレオソーム構造変化を制御していることが知られている。しかしながら、これらの反応は、多数のタンパク質がヌクレオソームに相互作用し、特異的な反応を複雑に制御しているため、ヌクレオソーム反応の全体像を把握することは容易ではない。また反応制御に関与するタンパク質間の相互作用を明らかにするためには、その一次構造ならびに二次構造のみならず、三次構造の観点からも解析する必要がある。

以上をふまえて本研究では、まずヌクレオソームの基本構成因子であるヒストンに着目し、包括的変異体解析により、転写、複製、修復に関与するヒストン機能表面残基を網羅的に解析するという新しい戦略により、ヌクレオソーム反応の解明を目指した。

続いて、ヌクレオソーム制御因子の 1 つであるヒストンシャペロン Asf1 タンパク質による複製依存ならびに非依存反応の特異的制御を、他のタンパク質との相互作用の観点から解析した。

さらには、組換え反応に関与するタンパク質の機能を進化の観点からも明らかにする目的で、バクテリオファージラムダ由来タンパク質「Red β タンパク質」に関して、真核生物における Rad52 タンパク質との構造ならびに機能比較を行った。

第一章

包括的な点変異体を用いたコアヒストン分子表面の機能解析

真核生物において遺伝情報を担う DNA は、8 量体のコアヒストンに巻かれたヌクレオソーム構造を形成している¹。コアヒストンは4量体の H3-H4 と、2つの2量体 H2A-H2B から構成される (Figure 1)。コアヒストンにおいては進化上高度に保存されており、例えばヒストン H4 は酵母からヒトに至るまでアミノ酸配列が 92%相同である。その為、コアヒストンの構造や機能を介した遺伝子機能の調節は、真核生物において非常に類似していると考えられる。ゲノム DNA はヌクレオソームにより負に制御されており、転写、複製、修復といった DNA を基質とする反応の際には様々なヌクレオソーム相互作用因子の標的となりヌクレオソーム構造を変化させる必要がある。

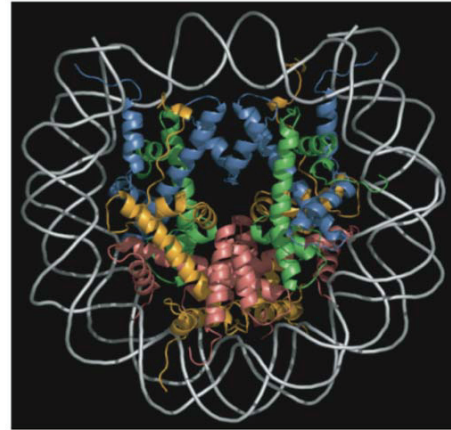


Figure 1. Structure of the nucleosome, showing DNA wrapped around histone proteins (in cartoon form). Each histone is colored according to type, in orange (H2A), pink (H2B), blue (H3), and green (H4).

これまでに3つのタイプのヌクレオソーム相互作用因子が同定されている。1) ヌクレオソーム集合ならびに脱集合を行うヌクレオプラスミンの代表される ATP 非依存ヒストンシャペロン²、2) SWI/SNF、NURF のようなヌクレオソームのスライディングを行うヌクレオソームリモデリング ATPase^{3,4}、3) ヒストンの機能を可逆的に制御するヒストンアセチル化、脱アセチル化酵素のようなヒストン化学修飾酵素^{5,6,7}である。これらのヌクレオソーム相互作用因子の機能的役割は転写調節において解明されているが、複製および修復におけるそれはほとんど解析されていない。

N 末端テイルにおける化学修飾は遺伝子発現の活性化や不活性化に重要であるため注目されており、多くの研究が行われている^{8,9}。また、ヒストンの化学修飾によりヒストンとヌクレオソーム相互作用因子との結合と解離が制御されるといったヒストンコードの概念が提唱され、ヒストン化学修飾のパターンが下流の生化学的または生物学的反応を制御すると考えられ

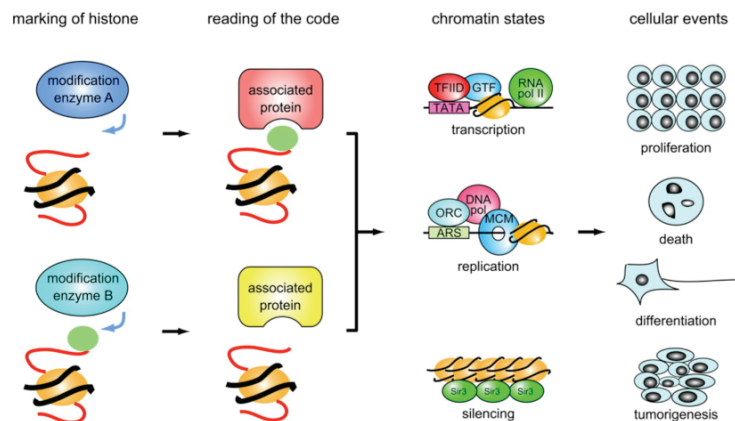


Figure 2. Concept of the histone code. Different modifications on histones regulate association or dissociation of specific histone binding factors and control various downstream reactions.

ている (Figure 2) ¹⁰。ヒストンのコア領域もまた、化学修飾を受けることや ¹¹、変異により転写活性化時にヌクレオソームをリモデリングする SWI/SNF 複合体を要求しなくなることや転写のサイレンシングを解除することが知られている ^{12,13,14}。これまでの研究の多くが、ヒストンの化学修飾残基やヌクレオソーム相互作用因子に着目し、機能的役割の解明がされてきた。そのため、いくつかの問題が残されている。1) ヒストンの機能解析は特定部位に限られていた。2) ヒストンが関与する転写以外の反応系への解析が進んでいない。3) 転写、複製、修復といった異なる DNA 介在反応に対してどのようにヒストン表面を使い分けしているのかについて解明されていない、である。

ヒストンとヌクレオソーム相互作用因子との結合は、様々なヌクレオソーム反応の基盤となる。したがって異なる DNA 介在反応において、非化学修飾残基を含めたヒストン全ての表面残基の役割を解明することが、これまで未解明だった問題を解決するために重要である。そこで本章ではヌクレオソーム反応の根本原理および 1 アミノ酸レベルでのヒストンの機能表面の全体像を解明するために、我々はコアヒストン分子表面に位置する全てのアミノ酸に変異を導入し、*in vivo* において様々な核内反応における点変異の影響を調査した。

実験方法

点変異導入

クンケル法を用いてアラニン置換を行った¹⁵。ヒストン *H2A* および *H2B* 遺伝子をのせたプラスミド (pRS313-*HTA1-HTB1*) は *HIS3* 遺伝子を選択マーカーとして持つ。ヒストン *H3* および *H4* 遺伝子をのせたプラスミド (pRS315-*HHT1-HHF1*) は *LEU2* 遺伝子を選択マーカーとして持つ。

酵母株とプラスミド

ヒストン *H2A* および *H2B* をコードする遺伝子を破壊した FY406 株 (*MAT α* Δ (*HTA1-HTB1*) Δ (*HTA2-HTB2*) *lys2-128* δ *his3* Δ 200 *ura3-52* pSAB6 [*URA3-HTA1-HTB1*]) を F. Winston 博士¹⁶より供与して頂き、使用した。ヒストン遺伝子を破壊することにより致死になるが、この遺伝子破壊株は、野生型ヒストン *H2A* および *H2B* 遺伝子をのせ、*URA3* 遺伝子を選択マーカーとして持つプラスミド (pSAB6) によりレスキューされる。*H2A* または *H2B* 遺伝子上に点変異を導入したものとコントロールとして野生型遺伝子を導入したプラスミド (pRS313-*HTA1-HTB1*) を用いて FY406 株を形質転換した。5-fluoroorotic acid (5-FOA) を含むプレート上に FY406 株を成育させると、*URA3* 遺伝子産物が 5-FOA を細胞内で毒に変換するため、*URA3* 遺伝子を発現するプラスミド (pSAB6) を選択的に排除することができ、これを利用して pRS313-*HTA1-HTB1* プラスミドのみを所有した株を作製した (Figure 3)。ヒストン *H3* および *H4* をコードする遺伝子を破壊した MSY748 株 (*MAT α* Δ (*HHT1-HHF1*) Δ (*HHT2-HHF2*) *his4-912* δ *lys2-128* δ *leu2-3, 112* *ura3-52* pMS329 [*URA3-HHT1-HHF1*]) は M. M. Smith 博士¹⁷より供与して頂いた。これらの遺伝子破壊は、野生型ヒストン *H3* および *H4* 遺伝子をのせた、*URA3* 遺伝子を選択マーカーとして持つ pMS329 によりレスキューされる。*H3* または *H4* 遺伝子上に点変異を導入したものとコントロールとして野生型遺伝子を導入したプラスミド (pRS315-*HHT1-HHF1*) を用いて MSY748 株を形質転換した。5-fluoroorotic acid (5-FOA) を含むプレート上にて pMS329 を選択的に排除し、pRS315-*HHT1-HHF1* プラスミドのみを所有した株を作製した (Figure 3)。

培地

Synthetic complete (SC) 培地は 0.67% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids、2% (w/v) glucose、2% (w/v) bacto agar、アデニン、ウラシル、その他必要なアミノ酸を含む。Spt 表現型解析においては、SC 培地にリジンを含むものと含まないものを準備した。6AU、HU、MMS 感受性解析においては、SC 培地に対して、それぞれ 1 mg/mL 6AU、100 mM HU、0.016% (v/v) MMS を添加したものを使用した (Figure 3)。

Spt 表現型および薬剤感受性解析

Spt 表現型解析においては、リジン含有ならびに不含 SC 培地を用い、また、薬剤感受性解析においては、SC 培地にそれぞれの薬剤を含むプレートを用いて、3 倍ずつ希釈した酵母をスポットした。それぞれのスポットにおいては、およそ 1×10^5 、 $3 \times$

10^4 、 1×10^4 、 3×10^3 、 1×10^3 、 3×10^2 、 1×10^2 、 3×10^1 の酵母を用いた。スポットしたプレートは Spt 表現型解析においては、 30°C で 3~4 日間、薬剤感受性解析においては 30°C で 3 日間静置した。実験は、2 サンプルずつ行い、複数回繰り返し再現性を確認した (Figure 3) 。

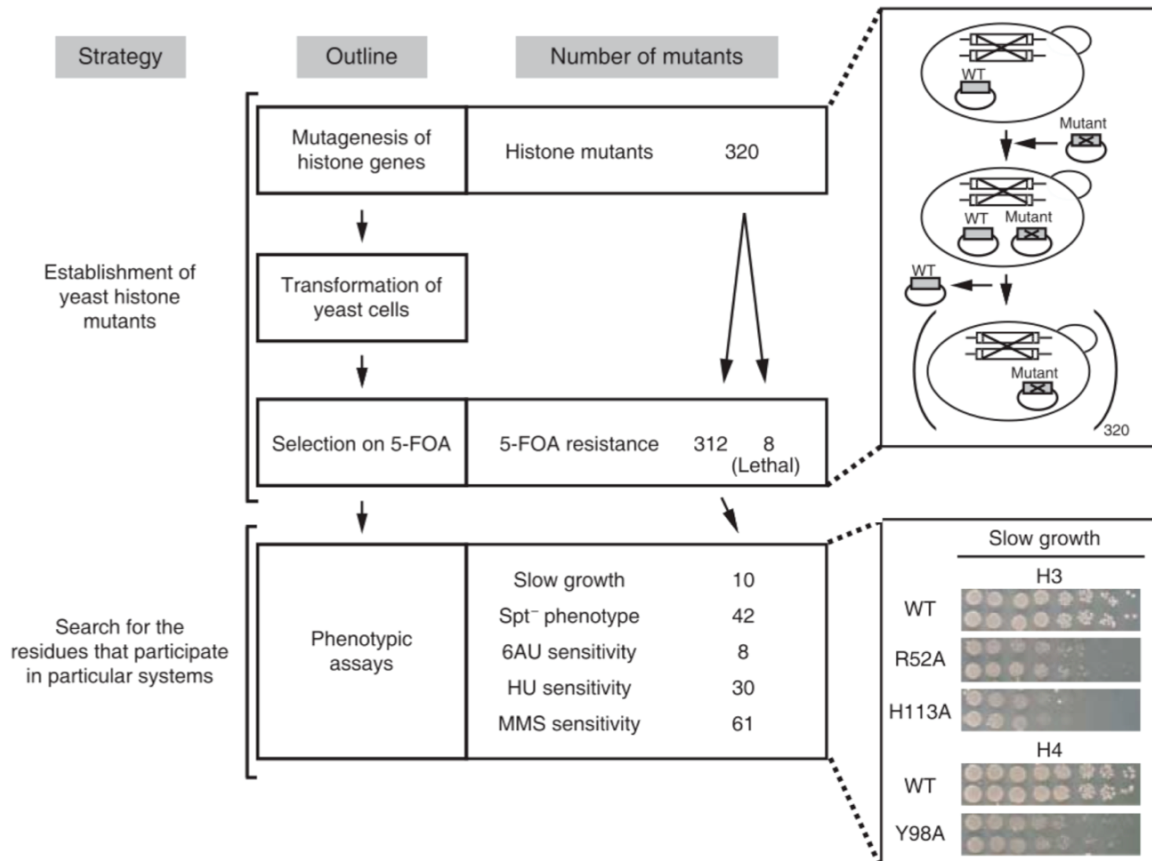


Figure 3. Experimental design of the construction of mutant strains.

結果

包括的変異体ライブラリーの作製

コアヒストンのそれぞれのアミノ酸が持つ機能的役割を明らかにするため、ヌクレオソームの立体構造解析データを元に、分子表面に位置するヒストン H2A、H2B、H3、H4 の 320 残基についてアラニン置換した (Figure 4)。ただし、分子表面に位置していても元々アラニンである残基は除いた。また、立体構造が解かれていない、N 末端テイルも含めて点変異を作製した。アラニンに置換した理由は、構造が小さいためヒストン単量体やヒストン 8 量体構造への影響を最小限にするためである。

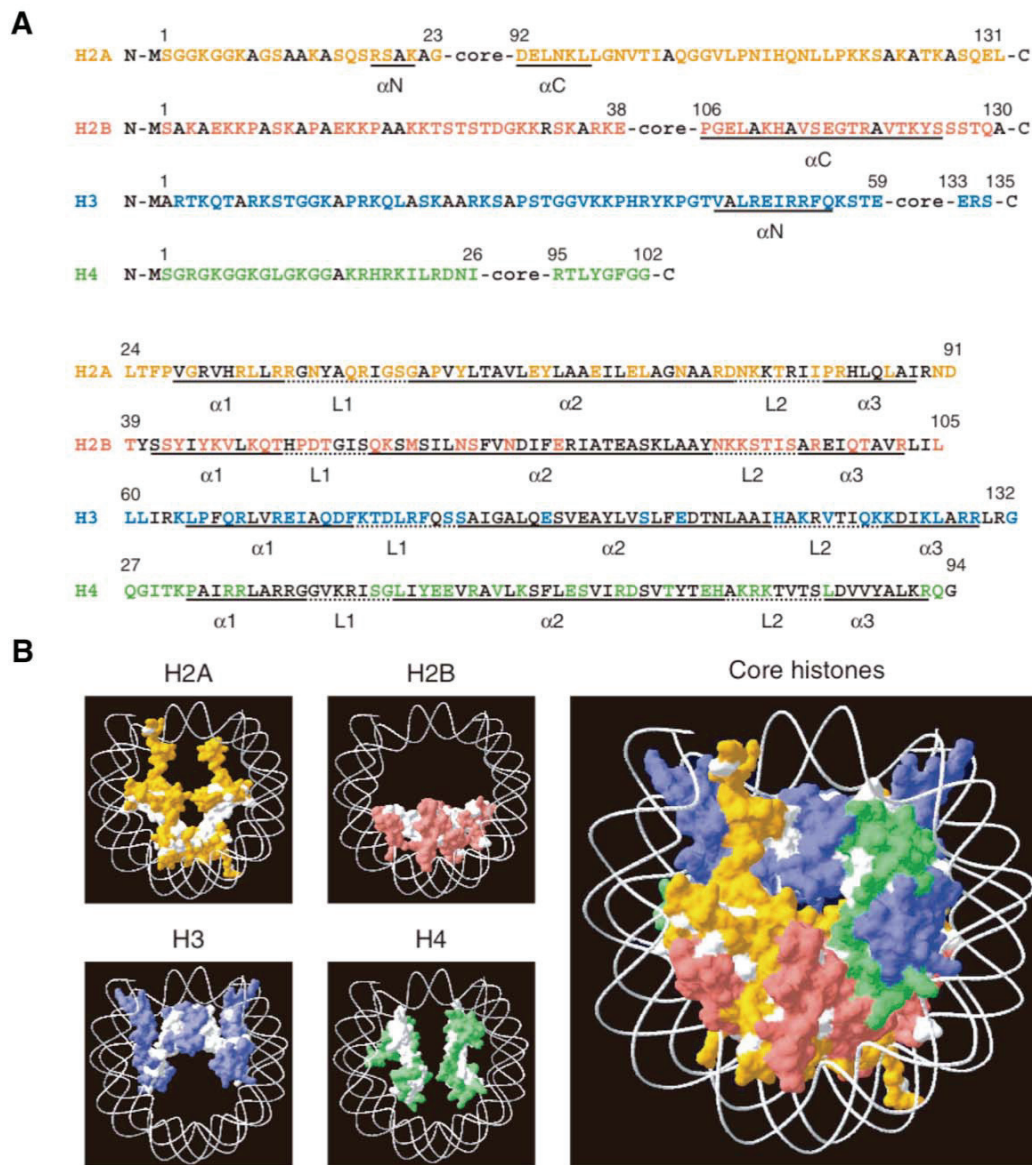


Figure 4. (A) Positions of point mutations in the primary structures of histones. Mutagenized residues are colored in orange (H2A), pink (H2B), blue (H3), and green (H4). α -helices and loops are indicated by thick and dashed lines, respectively. (B) A position map of point mutants in the electrostatic surface of each core histone and all of core histones. Mutagenized residues are colored as in A. The N and C-terminal regions are not shown because of lack of structural information.

ヒストン点変異体作製方法および解析までの流れについては Figure 3 に示した。点変異体を作製する際に、野生型ヒストンプラスミドを脱落させることにより、致死を示す点変異体の情報を最初に得た。ヒストンは様々な因子と結合する為、多くの点変異体が致死になると予想していたが、320 点変異体のうち 8 点変異体 (H2A-Y58A、E62A、R82A、D91A ; H2B-L109A ; H3-L48A、I51A、Q55A) のみであった。これらの残基はヌクレオソーム分子表面の 2 つの領域に位置していた (Figure 5 中央)。1 つの領域は H3-L48A、I51A、Q55A、H2A-R82A であり、これらはヌクレオソーム上を直線的に並んでおり (Figure 5 左)、ヌクレオソーム出入り口の維持や変換に関与していると推測された。もう 1 つの領域は、H2A-Y58A、E62A、D91A、H2B-L109A であり、酸性パッチ上に位置していた (Figure 5 右)。 *Xenopus* ヌクレオソームの結晶構造において、酸性パッチは隣のヌクレオソームにおけるヒストン H4 の N 末端テイルとの相互作用に関わる¹。また、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの LANA タンパク質とも相互作用する¹⁸。成育に必須であったこれらの残基は酵母と *Xenopus* の間で保存されていることから、酵母においても様々な因子の標的になっているだろうと考えられた。

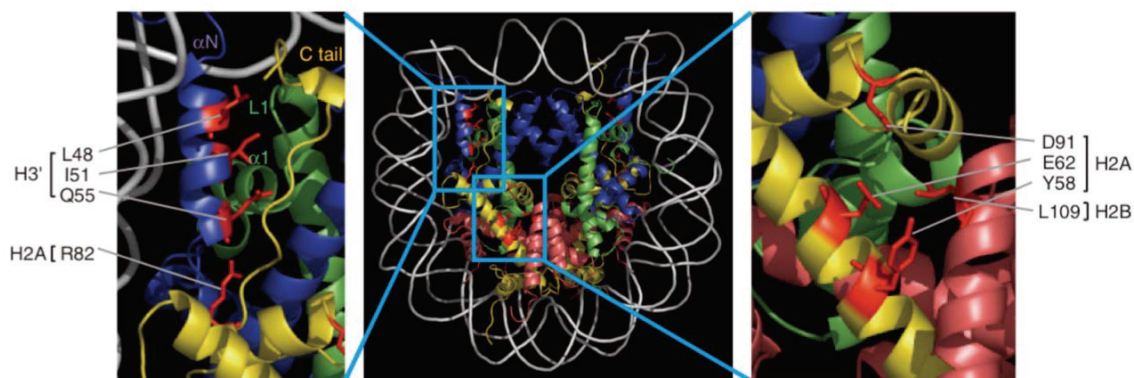


Figure 5. (Middle) Maps of residues responsible for the lethality in ribbon diagram for nucleosome. Histone residues whose mutations display a lethal phenotype are colored in red. Names of secondary structures of core histones and residues are shown. (Left and right) Enlarged view of the boxed in middle.

次に成育可能なヒストン点変異体を用い、転写解析として使われる suppressor of Ty (Spt) 表現型¹⁹、転写伸長解析に使われる 6-azauracil (6AU) 感受性²⁰、複製解析として使われる hydroxyurea (HU) 感受性²¹、修復解析として使われる methylmethanesulfonate (MMS) 感受性²²について検討した。これらの解析系は DNA を介在する反応解析をする上で広く使用されている。

Spt 表現型を示すコアヒストン分子表面の同定

Spt 表現型の解析は、転写への関与を調べるために使われる¹⁹。5' 領域におけるレトロトランスポゾン (可動遺伝因子の一種) の Ty エlement や δ 配列の挿入が、転写開始部位の変化を引き起こすことで、近接した遺伝子の転写を阻害することを利用した系である。我々の実験系においては *LYS2* 遺伝子の前に δ 配列が挿入されており、野生型においては *LYS2* 遺伝子の転写が阻害されリジン無しのプレートにおいて成育できない。一方 Spt 表現型を示す点変異体は、リジン無しのプレートにおいても成育できる (Figure 6)。これまでに TBP や Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase (SAGA) 複合体など転写やヌクレオソームに関わる様々な因子が Spt 検定により同定された

^{23,24}。加えて、ヒストン自身では H2A と H2B において、それぞれ *SPT11*、*SPT12* として取られており、11 カ所のヒストン点変異残基が Spt 表現型を示すことが報告されている^{25,17,26}。

ヒストン点変異体ライブラリーを用いて、Spt 表現型解析を行った結果、42 個の点変異体が Spt 表現型を示した (Figure 7A)。

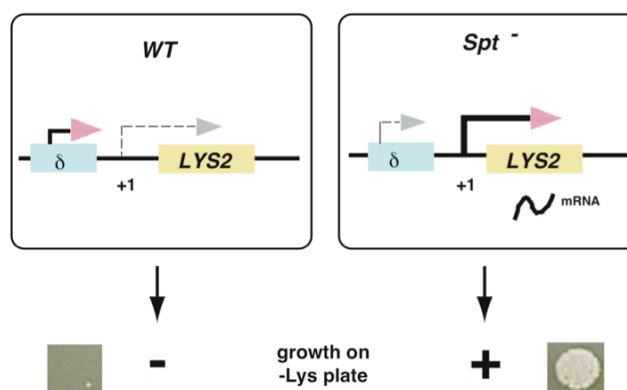


Figure 6. Explanation of the Spt assay. WT strain does not survive in the absence of lysine in the media because the *LYS2* gene does not express due to the insertion of the δ gene into the *LYS2* promoter. In contrast, Spt phenotype strains are able to grow in the absence of lysine.

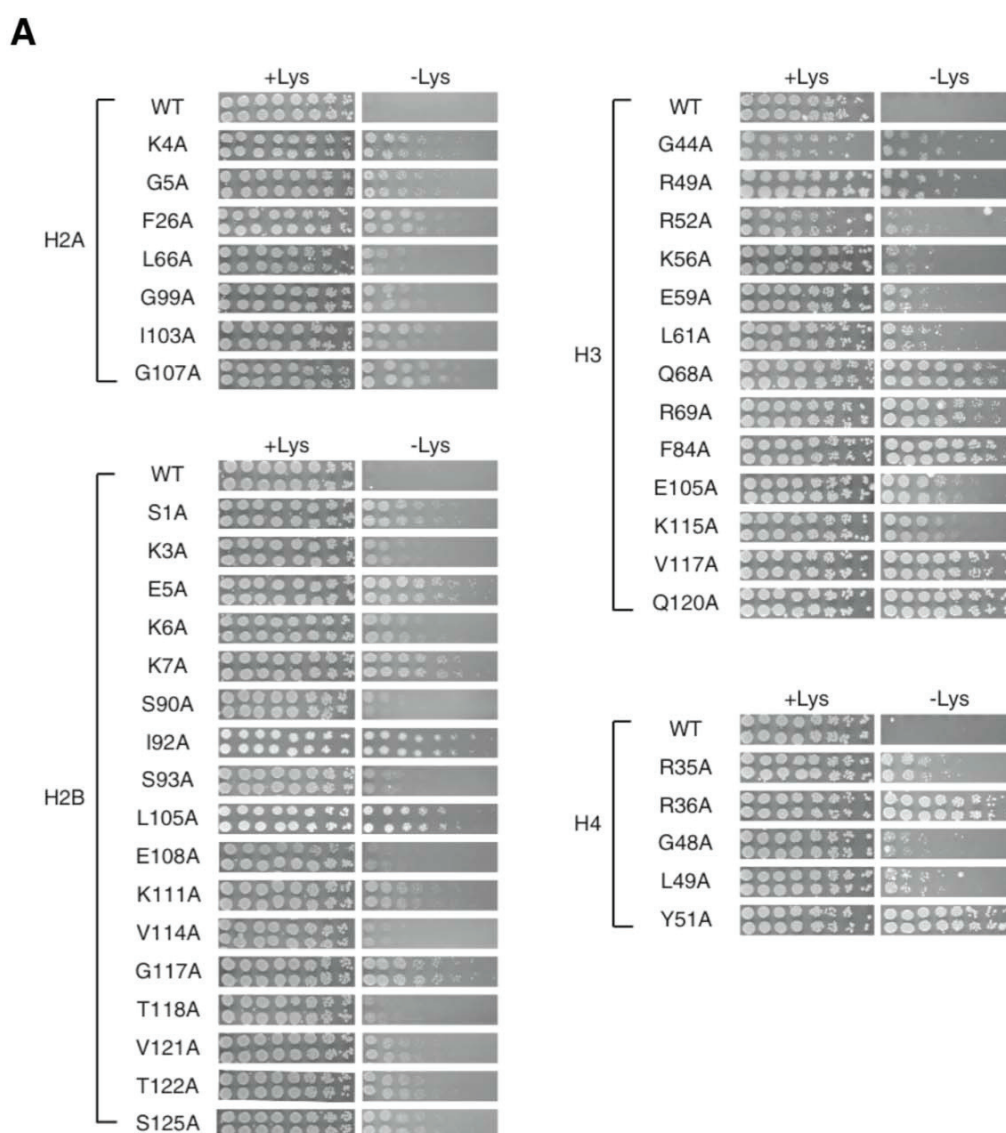


Figure 7. Spt phenotype of histone point mutants. (A) Results of the genetic screen. The point mutants showing greater than ten-fold sensitivity are displayed. WT, +Lys and -Lys stand for wild-type, the media with or without lysine, respectively.

ヌクレオソーム立体構造上にマップすると、3つの領域 (I、II、III) に集中して分布することがわかった (Figure 7B)。そのうち、SPT-I、II は DNA との相互作用に関与する領域として知られている²⁷。SPT-I は、ヒストン H3 α N から α 1 にかけてと、ヒストン H4 α 1 から α 2 であり、ヌクレオソームの出入り口付近から DNA に沿って並んでいる (Figure 7B~D)。SPT-I 領域において Spt 表現型を示す 13 個のアミノ

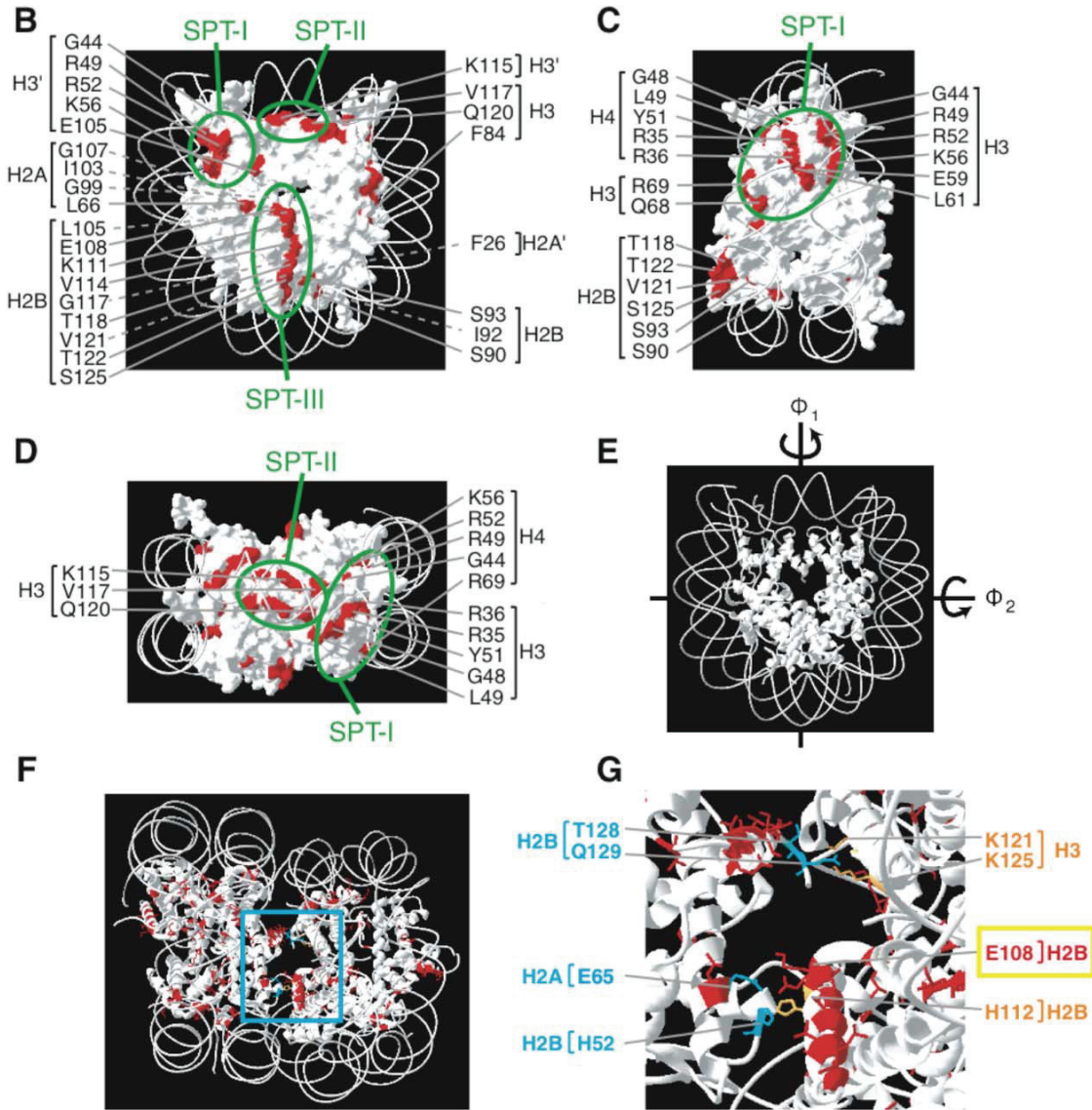


Figure 7. Spt phenotype of histone point mutants. (B) Locations of Spt phenotypic residues (red) in the electrostatic surface of the nucleosome core, looking down from the DNA superhelix axis. Residues of H2A-K4, -G5, H2B-S1, -K3, -E5, -K6 and -K7 in the N-terminal regions are not shown. The position of each residue which is visible, or is not directly visible, from the viewpoint of B is indicated by a solid or a dashed line, respectively. (C, D) Side (C) and top (D) view of the same structure as in B. (E) Ribbon diagram for the structure in B. Two vertical axes (Φ_1 , Φ_2) are indicated. (F) Crystal contacts between two adjacent nucleosomes. Nucleosomes on the left and right sides are obtained from E by a -90° rotation around axis Φ_1 and a $+90^\circ$ rotation around axis Φ_2 , and by a -90° rotation around axis Φ_1 and a -90° rotation around axis Φ_2 , respectively. (G) Enlarged view of the interacting region boxed in F. The residues involved in nucleosome–nucleosome interactions are colored in cyan for the nucleosome on the left and orange for the nucleosome on the right. The Spt phenotypic residue that interacts with an adjacent nucleosome is indicated in a yellow box.

酸のうち、プラス電荷を持つものが6個含まれていた。H3-L61WはSpt表現型を示すことがわかっており、我々のアラニン変異体でも同様にSpt表現型を示した²⁶。またSPT-IはH3-K56とL61を含み、SWI/SNFヌクレオソームリモデリング複合体サブユニットのSnf5のプロモーター上へのリクルートメントに関与する残基である^{26,28}。このことから、SPT-I領域はSWI/SNF複合体の標的となり、リモデリングによる制御を受けるかもしれない。加えて、SPT-Iに属する他のヒストン点変異体H4-R35、R36、G48、L49は、プロモドメイン因子Bdf1の結合領域でもあり、*BDF1*遺伝子変異によりSpt表現型も示す^{29,30}。SPT-Iは転写の際にBdf1の相互作用による制御も考えられる。

SPT-II領域はH3-L2上のH3-K115、V117、Q120の3つの残基がDNAに沿って分布している(Figure 7B、D)。この領域はヒトのヒストンシャペロンCCG1-interacting factor A (CIA)との相互作用領域として知られており³¹、*S. cerevisiae*ホモログであるAsf1の破壊においてはSpt表現型を示す³⁰。上述したSPT-IとIIは近接しており、SPT-IにはBdf1がSPT-IIにはAsf1が作用することが予想される。また、Bdf1とAsf1は相互作用する³⁰という知見を考え合わせると、両者は協調的にヌクレオソーム構造変換の調節に作用していると考えられる。

SPT-III領域に関して、H2B-C α ヘリックスの一端に並んだ9カ所のアミノ酸のいずれかに変異を導入することによりSpt表現型を示した(Figure 7B)。H2B-E108は隣接したヌクレオソームと結合するアミノ酸であることが立体構造からわかっており²⁷、SPT-IIIに近いことから、ヌクレオソーム同士の構造変換の制御に使われていることが予想される(Figure 7E~G)。

6AU感受性を示すヒストン分子表面の同定

6AUは細胞内のGTP生合成を阻害し、ヌクレオチドの濃度を低下させることで転写伸長を阻害する²⁰。FACT³²、S-II³³、Spt4-Spt5³⁴、RNAポリメラーゼII³⁵など多数の転写伸長因子において、遺伝子の変異により6AU感受性を示すことが知られている。ヒストン点変異体においてはH2B-K123が6AU感受性を示し³⁶、H3-K56が耐性を示すことが報告されている³⁷。

ヒストン点変異体を用いた解析で8カ所の6AU感受性部位が見つかった(Figure 8A)。ヌクレオソーム立体構造上にマップすると、左側に偏るという特徴があった(Figure 8B)。表現型を示した残基のうち、8個中7個がH2A/H2Bである(Figure 8A

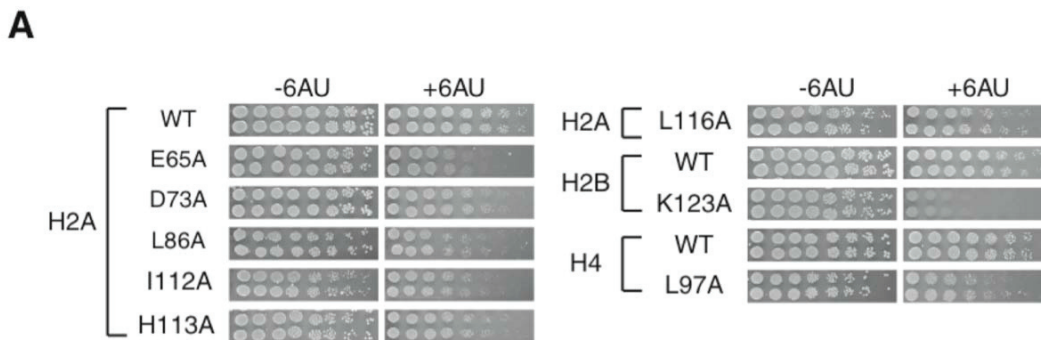


Figure 8. The 6AU sensitivity of histone point mutants. (A) Results of the genetic screen. WT, +6AU and -6AU stand for wild-type, the media with or without 6AU, respectively.

～D)。このことは、転写伸長時に H2A/H2B が解離すること³⁸や RNA ポリメラーゼ II は H2A-H2B のないヌクレオソームに結合し転写を促進する³⁹といった知見と矛盾しない。

6AU 感受性を非常に強く示した H2B-K123 と H2A-E65 のアラニン変異体に着目すると、これらの残基はヌクレオソーム結晶構造解析において、ヌクレオソーム同士の相互作用を介在すると言われている²⁷ (Figure 8E)。H2B-K123 のユビキチン化修飾酵素である *RAD6* 遺伝子の破壊で 6AU 感受性を示すことや⁴⁰、転写伸長因子が H2B-K123 のユビキチン化依存に相互作用することが証明されている³⁶。このことは H2B-K123 のユビキチン化がヌクレオソーム同士の相互作用を壊し、転写伸長に働くと考えられる。

更に、6AU と Spt 表現型で比較すると、2 者間では表現型残基が全く重ならないという特徴が見られた (Figure 8F, G)。Spt は転写開始を含む解析系なので、開始と伸長における反応機構の違いを意味しているのかもしれない。

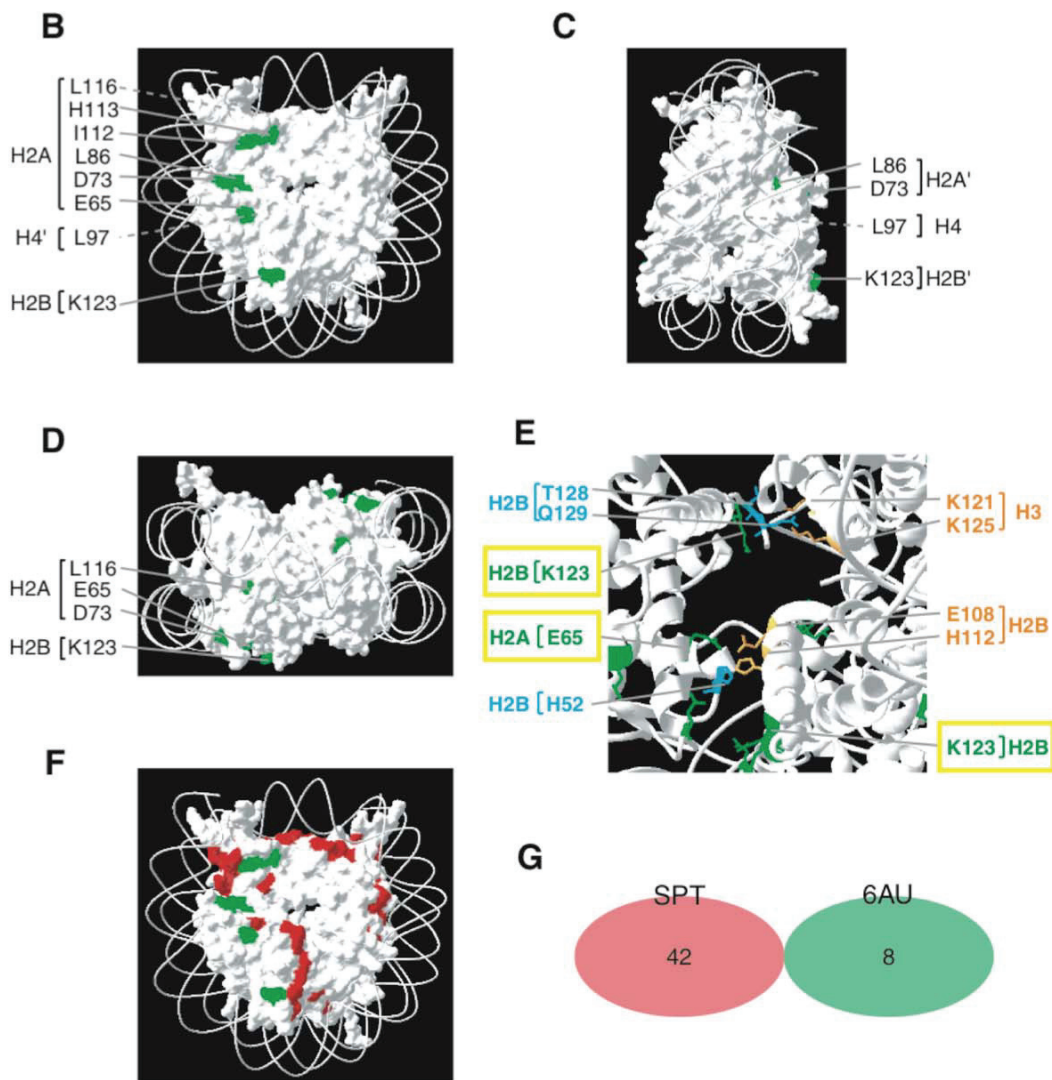


Figure 8. The 6AU sensitivity of histone point mutants. (B) Locations of 6AU-sensitive residues (green) in the electrostatic surface of the nucleosome core, looking down from the DNA superhelix axis. (C, D) Side (C) and top (D) view of the same structure as in B. (E) 6AU-sensitive residues that are predicted to be involved in interaction with an adjacent nucleosome are indicated in yellow boxes. Color of each position is the same as in Fig. 7G. (F) Contrast between the locations of Spt phenotypic (red) and 6AU-sensitive residues (green). (G) Venn diagram comparing the group of Spt phenotypic residues with that of 6AU-sensitive residues.

HU 表現型を示すヒストン分子表面の同定

HU はリボヌクレオチド還元酵素を阻害し、dNTP プールを枯渇させることで、複製を阻害する薬剤として用いられている²¹。これまでに DNA 複製に関わる *POL1*⁴¹、*MCM2*⁴²、*SNF2*²⁶ 遺伝子の変異により HU 感受性を示す事が知られている。また、ヒストン点変異体解析により 15 残基が HU 感受性を示す事がわかっている^{26,14,43}。我々の HU 感受性検定においては、30 の点変異体が HU 感受性を示した (Figure 9A)。

A

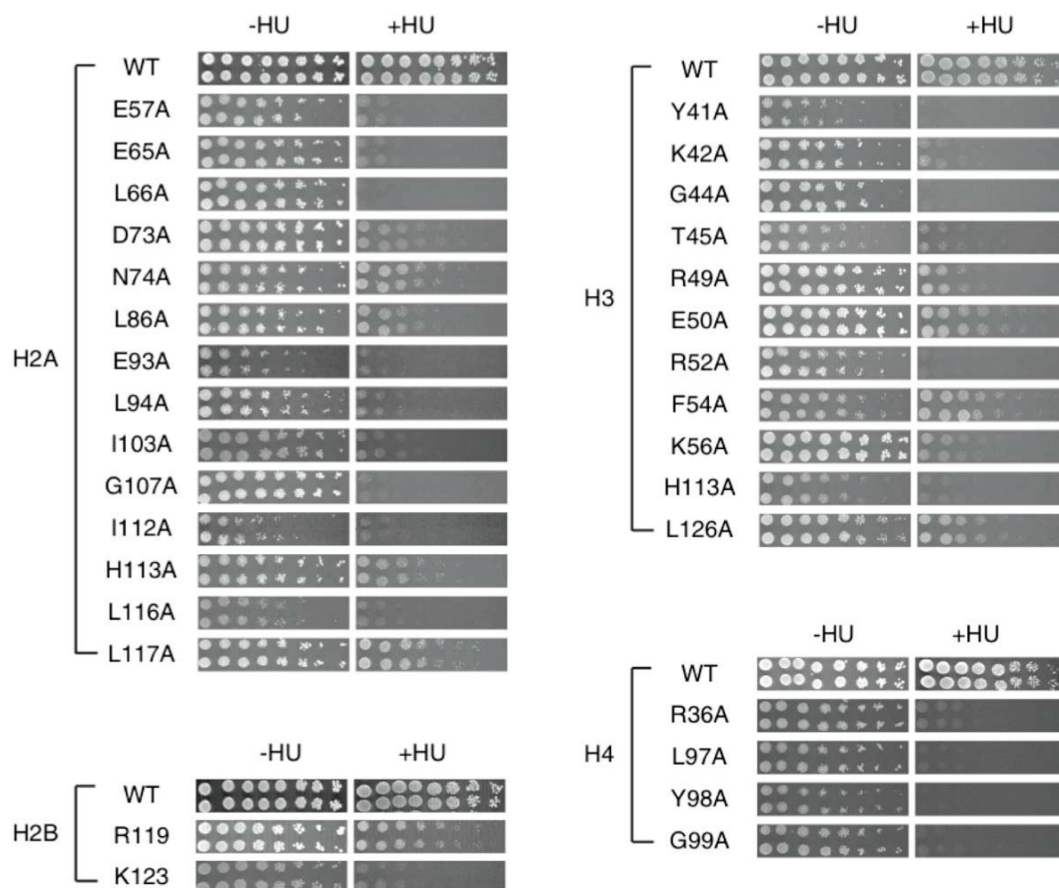


Figure 9. The HU sensitivity of histone point mutants. (A) Results of the genetic screen. WT, +HU and -HU stand for wild-type, the media with or without HU, respectively.

これら感受性残基は立体構造上の分布から3つのグループ (HU-I~III) に分けることができる (Figure 9B~D)。HU-IはほとんどSPT-Iと重なる (Figure 9E、G)。一方、HU-IIIは6AU感受性に関与する全ての残基を含む (Figure 9F、G)。これらの重複は転写と複製の際におけるヌクレオソーム反応の類似性を示唆するものである。この考えは、ISW2複合体やAsf1のように転写と複製の両方を制御するクロマチン因子が多数存在することと一致する。特に、ISW2複合体が結合するDNA領域は、HU-I、SPT-IのDNA結合領域と一致していた (Figure 9E)。加えてHU-Iは、複製に関わるヒストンシャペロンであるCAF-I⁴⁴と転写に関わるシャペロンであるBdf1²⁹の共通の

相互作用領域である。これらのことから、ヌクレオソーム出入り口の HU-I および HU-III は転写および複製の両方に関与する制御部位であると考えられる。

HU-II は、H3-H3 相互作用を担う領域の一部であり²⁷、H3-H113、L126が含まれる。HU-III は H2A の C 末および H2B αC のヌクレオソーム酸性領域に位置する (Figure 9B)。ヌクレオソーム酸性領域の機能は未知であったが、我々の結果より DNA 複製への関与が示唆された。

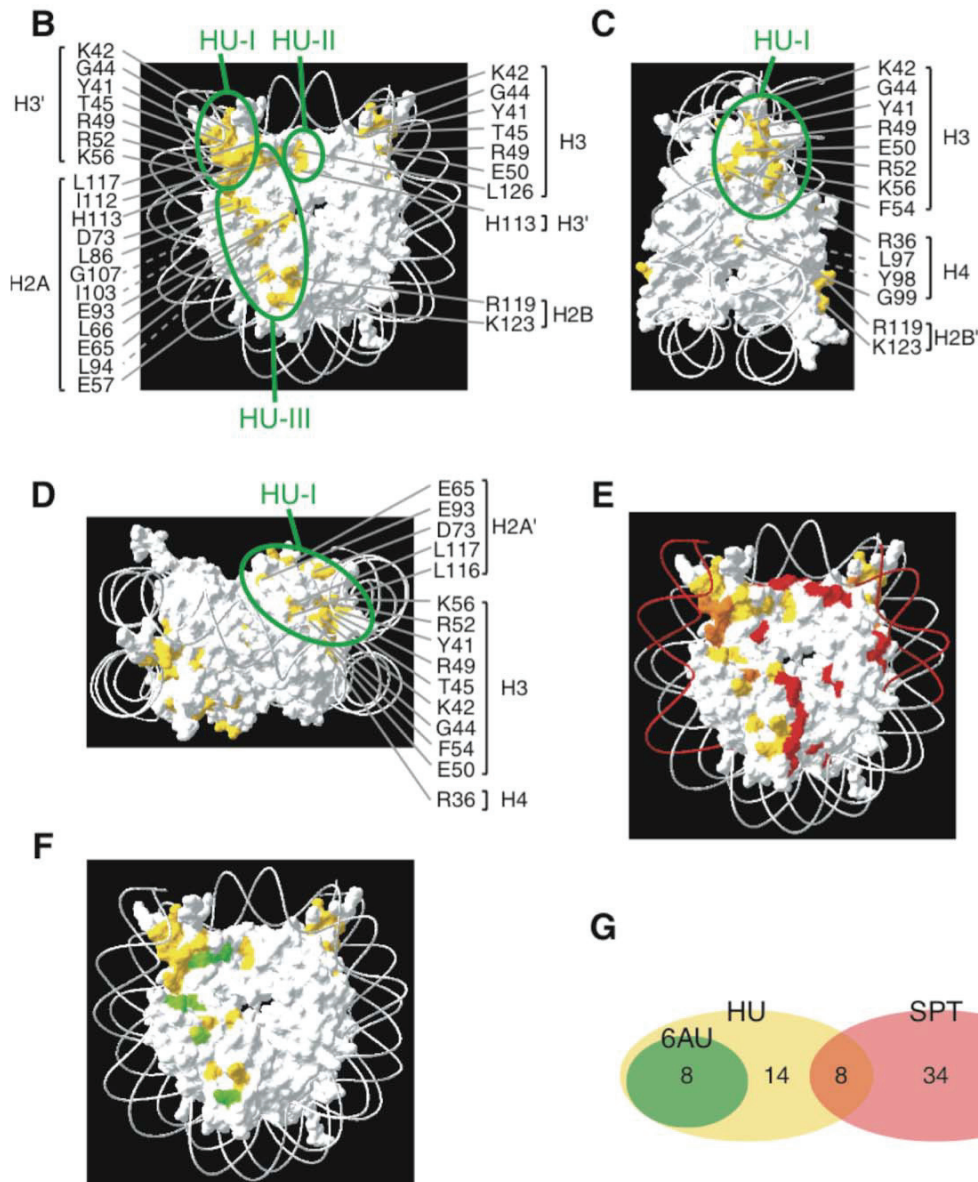


Figure 9. The HU sensitivity of histone point mutants. (B) Locations of HU-sensitive residues (yellow) in the electrostatic surface of the nucleosome core, looking down from the DNA superhelix axis. (C, D) Side (C) and top (D) view of the same structure as in B. (E) Comparison between locations of HU-sensitive (yellow) and Spt phenotypic residues (red). Overlapped residues (orange). (F) Similarity between locations of HU- (yellow) and 6AU-sensitive residues. Overlapped residues (light green) which cover all of 6AU-sensitive residues. (G) Venn diagram comparing the results of three genetic screens.

MMS 感受性を示すヒストン分子表面の同定

DNA アルキル化試薬である MMS は、DNA に二本鎖切断を誘導する²²。これまでに、修復因子では *Rad50*⁴⁵ や *Mre11*⁴⁶、クロマチン因子では *CIA*⁴⁵ などが遺伝子の変異により MMS 感受性を示すことが報告されている。ヒストン点変異体解析においては H2A-S121、

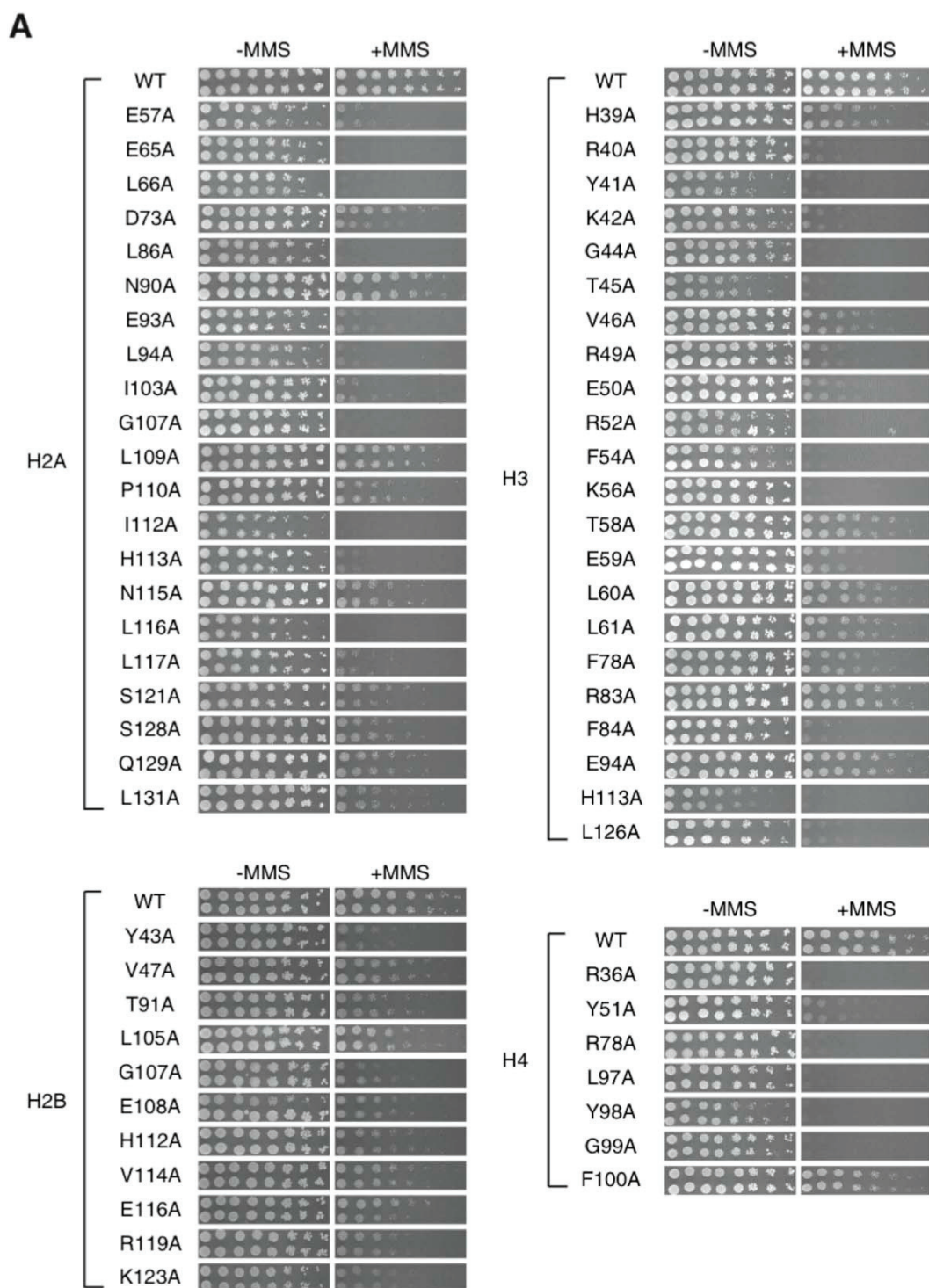


Figure 10. The MMS sensitivity of histone point mutants. (A) Results of the genetic screen. WT, +MMS and -MMS stand for wild-type, the media with or without MMS, respectively.

S128、Q129、L131、H4-K91 の 5 個の残基のみ明らかにされている^{47,48,43}。特に、H2A-S128、Q129、L131 は二本鎖 DNA 修復の際のリン酸化に関与することが示唆されている⁴⁷。我々の MMS 表現型検定の結果においては、MMS 感受性残基として知られている残基のうち 4 つを含む、計 61 の点変異体が感受性を示した (Figure 10A)。

感受性残基の立体構造上の分布に注目すると、感受性残基は三つの領域に集中していることが分かる (MMS-I~III) (Figure 10B~D)。驚くべきことに、MMS 感受性のグループは HU 感受性残基のグループを包含している (Figure 10E、F)。

HU 感受性残基が MMS 感受性を示すのは、1) DNA 複製に関与する因子が複製中にメチル化 DNA の修復に関係していること⁴⁹、2) Mec1 など多くの複製のチェックポイントに関わる因子が複製と MMS による DNA 損傷の修復を連携させていることが理由として考えられる⁵⁰。また、MMS による DNA 損傷の修復には相同組換えや非同末端結合など、DNA 複製以外の DNA を基質とした反応経路も必要であることが知られている。MMS 感受性残基には、これら複製以外の因子と相互作用に必要な残基も多く含まれているため、HU 感受性を示さない MMS 感受性残基があるのだと考えられる。

MMS-I はヌクレオソーム出入り口に位置し、Spt-I、HU-I と重なる (Figure 7、9、10)。MMS-I は、ヒストン H4 の Bdf1 相互作用領域²⁹と重なり、*BDF1* 遺伝子の破壊は Spt、HU、MMS 感受性を示す^{45,30}。MMS-II および HU-II において、MMS または HU 表現型を示した全ての残基は同じであった (Figure 9、10)。一方、SPT-II の残基は MMS-II (HU-II) と近接しているが全く異なる残基であった (Figure 7、9、10)。加えて、MMS-II はヒストン H3 と Asf1 が相互作用する領域と重なり^{31,51}、SPT-II 同様、*ASF1* 遺伝子破壊により Spt 表現型、MMS や HU 感受性を示す^{52,45,30}。これらの結果は、MMS-I (HU-I、SPT-I) および MMS-II (HU-II、SPT-II) が Bdf1 や Asf1 といったクロマチン因子が転写、複製、修復の際に共通の標的場所になることを示唆する。そして、Bdf1 や Asf1 に特定の反応に作用する因子が結合することにより、異なる反応を制御すると考えられる。

MMS-III は H2B-K123 が含まれている。前述の通り、H2B-K123 は隣接するヌクレオソームとの相互作用に関わること²⁷、転写の際に Rad6 によりユビキチン化されること⁵³、二本鎖 DNA 切断の修復⁵⁴に関与する事が知られており、今回の検定で H2B-K123 が 6AU、MMS 感受性を示したと一致する。また H2B-K123 が HU に対しても感受性を示していること、Rad6 は HU に感受性を示すことから⁵²、複製にも H2B-K123 のユビキチン化が関連していることが予想された。

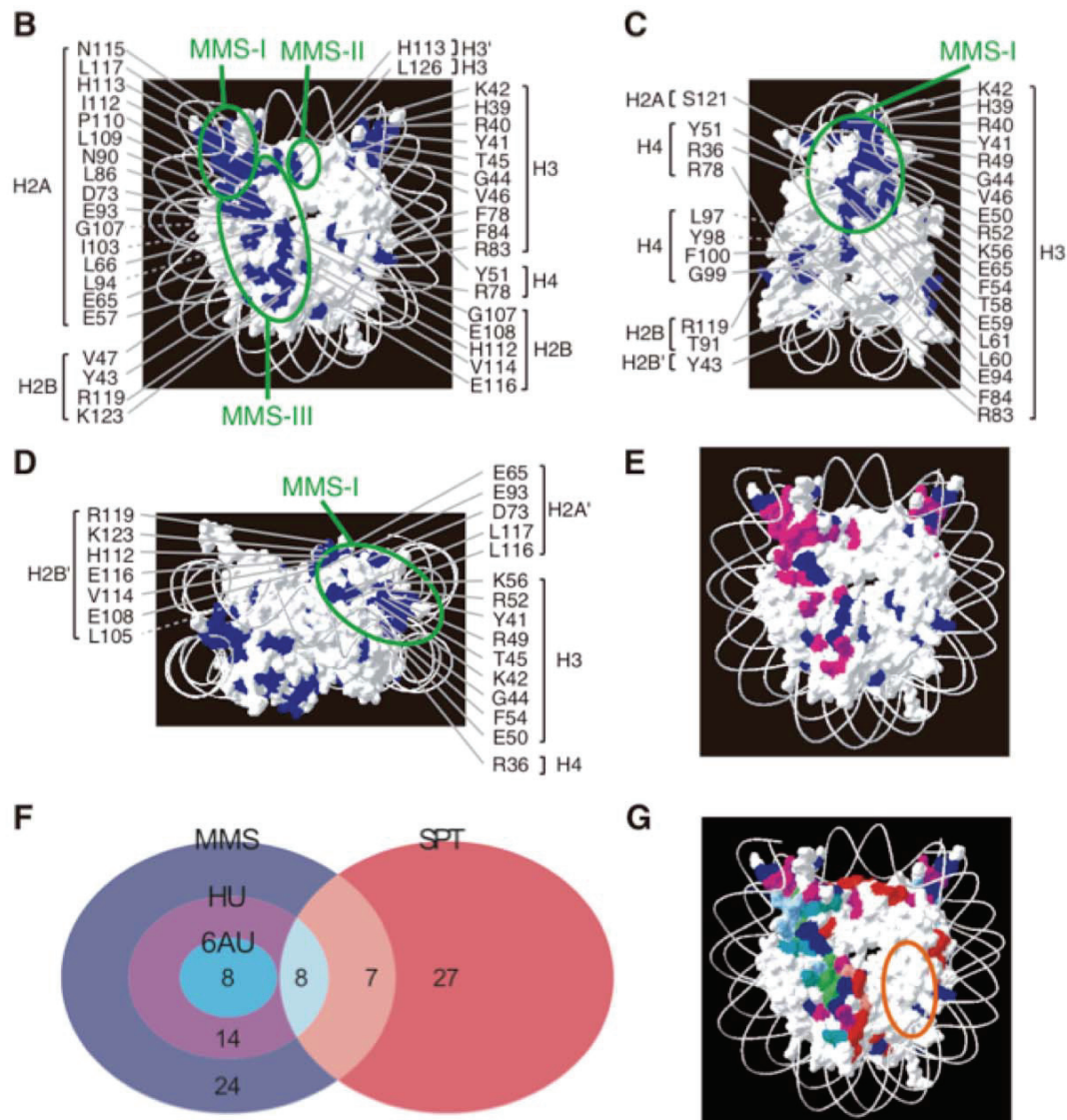
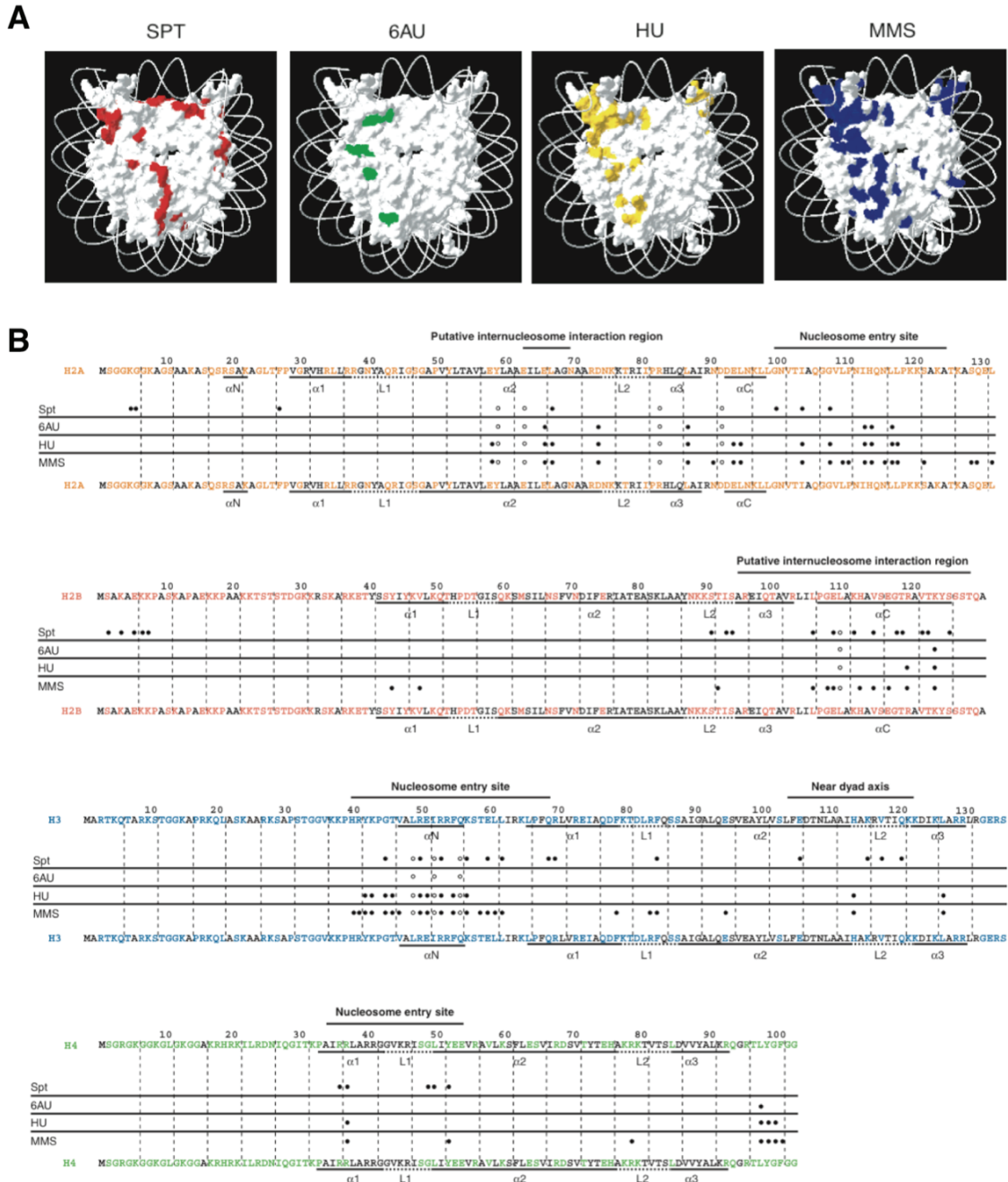


Figure 10. The MMS sensitivity of histone point mutants. B) Locations of MMS-sensitive residues (blue) in the electrostatic surface of the nucleosome core, looking down from the DNA superhelix axis. Residues of H2A-S128, -Q129 and -L131 in the C-terminal region are not shown. (C, D) Side (C) and top (D) view of the same structure as in B. (E) Comparison between locations of MMS- (blue) and of HU-sensitive residues. Overlapped residues (purple) which cover all of HU-sensitive residues. (F) Venn diagram comparing the group of Spt phenotypic, 6AU-, HU-, MMS-sensitive residues. MMS, blue; SPT, red; MMS and HU, purple; MMS and SPT, light red; MMS, HU and 6AU, cyan; MMS and HU, and SPT, light blue. (G) Comparison among locations of functional residues identified in this study. The left and right sides of the nucleosome indicated in the “Comparison of the functional surfaces” section are defined in this view of nucleosome. The region covered with the residues involved in transcriptional silencing is circled in orange line. Each functional surface is colored as in F. Residues responsible for the lethality are colored in white green.

考察

機能表面の比較

ヒストン点変異体解析により、様々な興味深い結果を見いだした。第一に、今回の表現型解析で明らかになった場所はヌクレオソーム左側の面に偏る (Figure 10G、11A)。これまでの研究において明らかになっている転写サイレンシング制御に関与す



る残基はヌクレオソーム右側の面に位置する^{13,55,14} (Figure 10G)。サイレンシング解析においては、ヌクレオソーム左側に位置するヒストン H2A、H2B については解析がされていないことも見落としとしてはならないが、DNA 反応の ON/OFF においてヌクレオソームの機能表面を使い分けている可能性も考えられる。

第二に、表現型を示した残基はアミノ酸配列上、いくつかの領域に集中していることがわかった (Figure 11B)。このことは、同じヒストン表面が関与する DNA 介在反応において、ヌクレオソーム構造および機能の基盤となっていることを示唆する。

第三に、DNA に近接するヒストン H3-L2 ループは Spt 表現型には必要であったが、HU ならびに MMS には感受性を示さなかった (Figure 12 左)。対照的にヒストン H3-H3 相互作用に関わる H3- $\alpha 3$ の残基は 4 量体 H3-H4 の形成に必要であり、HU や MMS に影響を及ぼすが Spt 表現型は示さなかった (Figure 12 左)。これらの結果から、複製と修復においては 4 量体 H3-H4 の形成部位が重要で、転写においては H3-DNA 相互作用部位が重要という違いがあることがわかる。これは両方で起こる反応が異なる作用機構にもとづいていることを示唆している。

最後に特徴的な場所は H2B- αC である。この領域はヌクレオソーム同士の相互作用に関与する²⁷。Spt、6AU、HU、MMS において少しずつ異なる残基が影響を及ぼした (Figure 12 右)。このことから、この領域においては転写、複製、修復の際に異なる因子が作用し、異なる反応機構でヌクレオソーム構造変換が起こることが予想される。

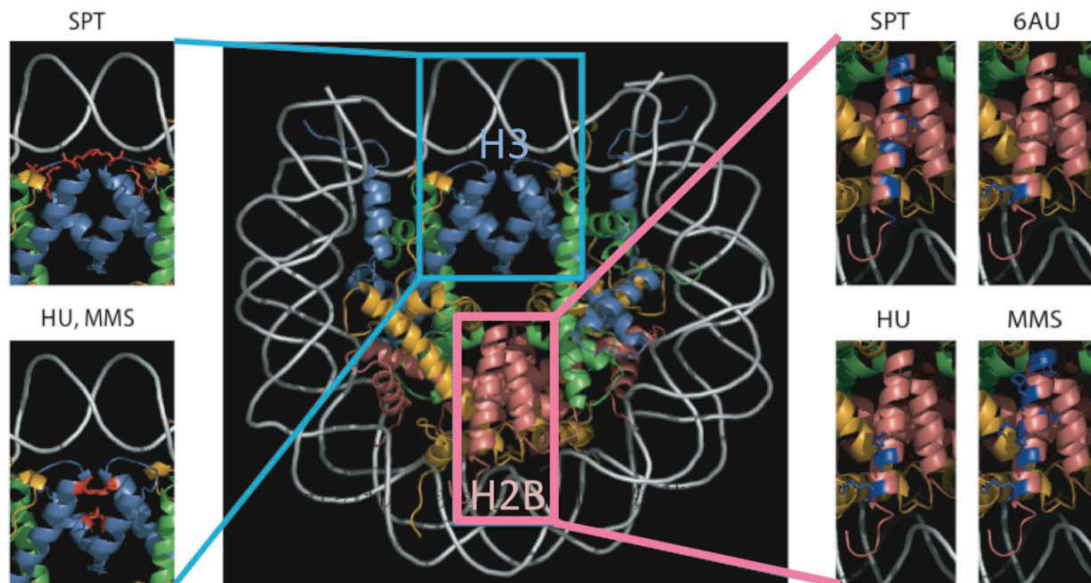


Figure 12. Similarity and diversity among the results of four genetic screens. (Middle) Front view of the nucleosome. Histone chains are colored orange (H2A), pink (H2B), blue (H3) and green (H4). (Left) Enlarged view of the boxed in middle. The Spt phenotypic, or HU- and MMS-sensitive residues are colored in red. (Right) Differences in distribution of residues (blue) responsible for Spt- phenotype and 6AU, HU or MMS sensitivity in the region boxed in middle.

包括的ヒストン点変異体ライブラリーの有用性

包括的なヒストン点変異体解析により、42 株の Spt 表現型、8 株の 6AU 感受性、30 株の HU 感受性、61 株の MMS 感受性を示し、合計 88 株のヒストン点変異体が何らかの表現型を *in vivo* において示した。これまでのヒストン点変異体表現型解析においては特定の残基しか解析されていなかったため、我々が今回報告した残基のうち約 1/9 しか明らかになっていなかった。また、表現型を示した多くの残基が異なる反応系に重複して関与していることを示した (Figure 10F)。

過去の研究で同定された機能残基のほぼ全てが我々の解析結果と一致していたが、3 つの残基については異なっていた。H3-R52A は致死を示すと報告されているが¹⁴、我々の結果では通常の条件においては成長に影響を及ぼさず、Spt 表現型、HU、MMS 感受性を示した (Figure 7A、9A、10A)。H2A-T125A は *LYS2* プロモーターにおいて Spt 表現型を示すと報告されているが⁵⁶、我々の結果では表現型を示さなかった。最後に、H3-K115A は 200 mM HU において感受性を示すと報告されているが¹⁴、我々の実験においては 100 mM HU の条件において影響を及ぼさなかった。これらの相違は、使用している株のバックグラウンドや実験条件の違いなどにより生じた可能性が考えられる。

薬剤を用いた表現型解析の結果は、転写、複製そして修復のそれぞれが連関していることを示唆している。なぜなら、感受性を示した残基は一部の領域に集中しており、またヒストンに相互作用するタンパク質の変異により生じる表現型と一致しているからである。更に、87 株中 37 株の残基が複数の解析系で感受性を示しており、ヌクレオソーム出入り口に位置する領域や隣のヌクレオソーム同士の相互作用に関与する領域であることもそれを示唆している。これらの領域はヌクレオソーム相互作用因子の標的になることや、転写、複製、修復の際にヌクレオソーム構造変換反応の際の要となっている部位であることが予想される。今後の解析によりそれぞれの反応系に関与していることは他の実験系においても証明していく必要があるが、本研究においてなされた様々な DNA 反応に関与するヒストンの包括的解析により、ヒストン表面がどのように異なる反応を制御しているのかという全体像が明らかにされた。

ヒストンは DNA 介在反応において 20 以上の機能的な化学修飾制御を受ける事が知られているが¹⁰、我々の表現型解析においては 5 つのアミノ酸残基 (H2A-K4、S121、S128、H2B-K123、H3-K56) のみが影響を及ぼした。このことはヒストンの多くの化学修飾残基が下流の反応において関与しており、必ずしも反応に必須ではないことを示唆する。実際、ヒストン H4 N 末端テイル複数におけるリジン残基の化学修飾は 4 カ所全てに変異を入れた時に強い MMS 感受性を示す⁵⁷。今回の研究において、ヒストン表現型を示した残基のうち、83 残基が化学修飾制御を受けないと考えられ、化学修飾以外による制御の重要性が示唆された。ヒストンは多くの化学修飾を受けることから、化学修飾残基についてよく研究されている¹⁰。しかし、我々の解析結果から、ヒストンは化学修飾制御以外にも Bdf1 や Asf1 などヌクレオソームを標的とする様々な因子と結合することにより³¹ヌクレオソーム構造変換や、機能を制御することの重要性が示された。

ヒストン点変異体ライブラリーの展望

今回の研究において、我々はヒストン点変異体ライブラリーを用いて4つの異なる *in vivo* 表現型解析を行った。これまでに、酵母においては70種類以上もの *in vivo* 解析法が確立しており、その中にはDNA組換えや遺伝子サイレンシングも含む。したがって、ヒストン点変異体ライブラリーを用いて、他の *in vivo* 解析系に關与する残基を幅広く同定することは今後の重要な課題である。また、今回の研究において表現型を示した一部のヒストン部位と Bdf1 や Asf1 が、機能的に關連性があるのではないかと考えられたが、これらの因子の過剰発現においてヒストン点変異体による表現型が抑圧するかどうかを調べることで、實際の關連性を調べていく必要がある。その他、表現型を示したヒストン88残基全てについて、表現型を抑圧する未知因子を探索することは、ヌクレオソーム相互作用因子とのネットワークを明らかにしていく上で重要である (Figure 13)。

ヒストン分子表面全てに点変異を導入したことにより、我々は様々な新しい結果を得る事ができ、クロマチン研究のための有益な財産を生み出した (Figure 13)。また、今回行ったようにタンパク質の機能的役割を1アミノ酸レベルにおいて理解するための手法として Global Analysis of Surfaces by Point mutation (GLASP) 法と名付けた。GLASP 法は、進化的に保存されたタンパク質や、細胞内ネットワークのハブとなるタンパク質の解析に最も適している。この戦略においては、分子表面残基の包括的機能の解明や多くの相互作用因子からなるネットワークの解析が可能となる。

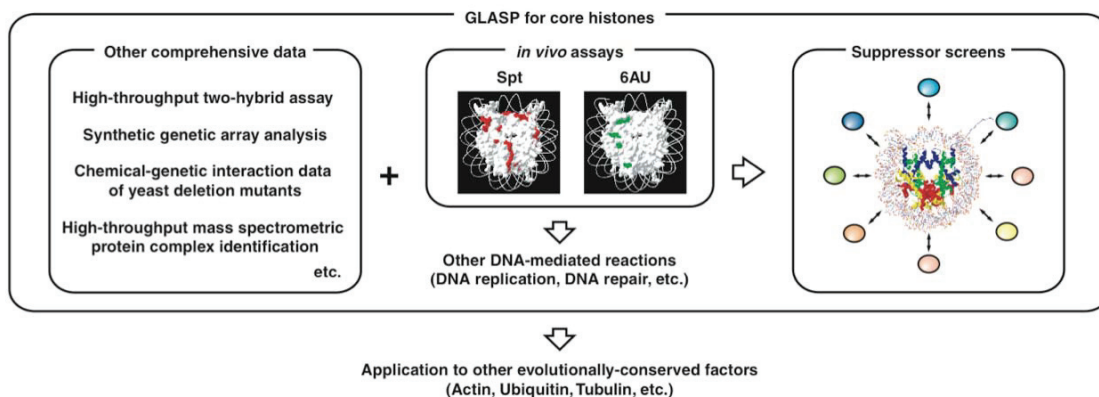


Figure 13. Utilization of the histone point mutant library and application of GLASP to other hub-like factors. The histone point mutant library is suitable for other assays for the characterization of DNA-dependent reactions such as DNA recombination and gene silencing. The mutants identified in the present study are valuable resources for isolating functionally interacting factors by suppressor screens. Any evolutionarily conserved factors can be analyzed through the application of GLASP.

第二章

分裂酵母ヒストンシャペロン Asf1 および Hip1B ドメイン/Cac2 C 末端の複合体立体構造解析

ヒストンシャペロンはコアヒストンに結合し、ヌクレオソームの集合または脱集合を促進するタンパク質である⁵⁸。多くのヒストンシャペロンが知られており、中でも Asf1 はアミノ酸配列が種を超えて保存されており^{59,60,31,61,62}、真核生物において機能も保存されている^{60,31,63,64,65}。Asf1 はヒストンシャペロン CAF-1^{66,67}、HIR^{64,68,69} といった様々なクロマチン相互作用因子と結合し、ヌクレオソームの集合や脱集合を促進する^{60,31,63,70,71}。その結果として、Asf1 は遺伝子発現^{69,70,30,72}、サイレンシング^{59,73,74,75}、DNA 修復^{60,67,76,77}、複製⁶⁰、組換え⁷⁸ といった様々な DNA 介在反応に関与する。

Asf1 はヒストン H3C 末端領域を介して 4 量体ヒストン H3-H4 に結合する^{79,80}。ヒトにおける Asf1 は ASF1A と ASF1B の 2 つのファミリーが存在する。ヒストン H3 は細胞周期 S 期に発現する H3.1 と細胞周期に関係なく発現する H3.3 の 2 つのファミリーが存在するが、ASF1A と ASF1B はいずれのヒストン H3 に対しても結合する。一方、Asf1 に相互作用するヒストンシャペロン CAF-I はヒストン H3.1 とだけ結合し、HIRA はヒストン H3.3 のみに結合する⁸¹。Asf1 は複製依存的に CAF-1 と、複製非依存的に HIRA と協調してヌクレオソーム脱集合に働き^{60,81,82}、核内反応におけるヌクレオソーム脱集合の中心的な役割を担っていることが示唆される。近年、ヒト Asf1 と HIRA の B ドメイン複合体の立体構造が明らかになった⁸³。加えて、Asf1 との相互作用に必要な HIRA の B ドメインと類似した配列がヒト CAF-1 複合体サブユニットの Cac2 の C 末端においても存在することが生化学的解析から示唆されている⁸³。しかしながら、Asf1 と CAF-1 複合体の構造は解明されておらず、また、酵母においてどのように Asf1 が HIRA と CAF-1 を認識してヌクレオソーム集合、脱集合に関与しているのかという問題は明らかになっていない。

今回の研究において、我々は分裂酵母 Asf1 (SpAsf1N;1-161) 単独とヒト HIRA の分裂酵母ホモログである Hip1 の B ドメイン (Hip1B) および分裂酵母の Cac2 の B ドメイン様 C 末端領域 (Cac2C) との複合体における結晶構造解析について報告する。これらの構造解析および生化学的解析結果から、3 種類のヒストンシャペロンタンパク質 (Asf1、Hip1、Cac2) における特異的な DNA 反応の制御様式について議論する。

実験方法

プラスミド構築と点変異導入

分裂酵母由来 *Asf1* の 1-161 残基 (*SpAsf1N*) を N 末端 6x ヒスチジンタグとトロンピン切断部位を付加した pET15b ベクター (ノバジェン) にサブクローニングした。GST を融合したタンパク質を発現するベクター pGEX-2T (GE ヘルスケア (株)) に *SpAsf1N* 領域をサブクローニングした。*Asf1* の点変異は pGEX-2T-*SpAsf1N* に対し、QuikChange II 点変異導入システム (ストラタジーン) を用いて作製した。全ての点変異は DNA 配列解析により確認した。

タンパク質発現と精製

pET15b-*SpAsf1N* を用いて大腸菌株 BL21 (DE3) (ノバジェン) を形質転換した。大腸菌は 37°C において増殖期になるまで培養し、終濃度 0.4mM isopropyl 1-thio- β -D-galactose pyranoside を添加した後、25°C にて一晚培養することで目的タンパク質を誘導した。大腸菌を遠心機にて回収した後、低イミダゾールバッファー (20 mM sodium phosphate pH7.4、0.5 M NaCl、20 mM imidazole、protease inhibitor) にて再懸濁し、破碎した。遠心機にて沈殿物を除き、上清をヒスチジンタグ付きタンパク質を結合させる HisTrap HP カラム (GE ヘルスケア (株)) に通した。低イミダゾールバッファーにてカラムを洗浄した後、高イミダゾールバッファー (20 mM sodium phosphate pH7.4、0.5 M NaCl、0.5 M imidazole) を用いて濃度勾配をかけながらヒスチジンタグ付きタンパク質を溶出した。次に Superdex 75 16/60 カラム (GE ヘルスケア (株)) を用い、ゲル濾過バッファー (20 mM Tris-HCl pH8.0、0.15 M NaCl、1mM dithiothreitol) にてゲル濾過精製した。不要なヒスチジンタグを切断するため、トロンピン (シグマ アルドリッチ) を添加し一晚反応させた後、ヒスチジンタグが切断された目的タンパク質と切れ残りのヒスチジンタグ付きタンパク質を分けるため、HisTrap HP カラムに通した。最後に再び Superdex 75 16/60 カラムを用いて精製した。

pGEX-2T-*SpAsf1N* を用いて大腸菌株 BL21 (DE3) を形質転換した。大腸菌は 37°C において増殖期になるまで培養し、終濃度 0.4mM isopropyl 1-thio- β -D-galactose pyranoside を添加した後 25°C にて一晚培養することで目的タンパク質を誘導した。GST タグ付きタンパク質を結合させる glutathione-Sepharose 4B カラム (GE ヘルスケア (株)) に通しバッファー (phosphate-buffered saline pH7.4、1mM dithiothreitol) にてカラムを洗った後、50 mM Tris-HCl pH8.0、10 mM reduced glutathione にて溶出した。次に Superdex 75 16/60 カラムを用いて精製した。

SpAsf1N の結晶化

ヒスチジンタグを除去した *SpAsf1N* の結晶化は 8.2 mg/ml の濃度で、24 穴プレートを用い、溶液 (32% PEG 6000、0.18 M ammonium sulfate、0.1 M Tris-HCl pH 8.0) の下、20°C において、シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて実施した。結晶は冷却する前に水分子の凍結による結晶破壊を防ぐ為 30% PEG 6000、0.18 M ammonium sulfate、0.1 M Tris-HCl pH 8.0、10% glycerol を含む溶液中に浸した後、窒素ガスにて瞬間冷却した⁸⁴。

SpAsf1N-Hip1B ペプチド複合体の調製と結晶化

ヒスチジンタグを除去した *SpAsf1N* 1 μ g および 5 倍のモル濃度の分裂酵母 Hip1B ペプチド (469~497; IPTKQVQKVTITKEGKRRVAPQLLTLSA、インビトロジェン) を混合し、室温で 1 時間反応した。複合体は Superdex 75 16/60 カラムを用いて精製した。精製

した複合体の結晶化は 4 mg/ml の濃度で、溶液 (25% polyethylene glycol 3350、170 mM NH₄F) の下、20°Cにおいて、シッティングドロップ蒸気拡散法で実施した。結晶は 10% glycerol を含む溶液中に浸した後、窒素ガスにて瞬間冷却した。

SpAsf1N-Cac2C ペプチド複合体の調製と結晶化

ヒスチジンタグを除去した SpAsf1N 1μg および 5 倍のモル濃度の分裂酵母 Cac2C ペプチド (493~512; RKVESKVSCKRIAPVYP、インビトロジェン) を混合し、室温で 1 時間反応した。複合体の結晶化は 4 mg/ml の濃度で、溶液 (1.8 M Na⁺/K⁺-Po₄⁻² pH8.0) の下、20°Cにおいて、シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて実施した。結晶は冷却する前に paratone-N オイル中に浸した後、窒素ガスにて瞬間冷却した。

データ収集および構造決定

SpAsf1N の回折データはビームライン BL26B1 (Spring-8、播磨) にて収集し、Hip1B 又は Cac2 との複合体においてはイメージングプレート X 線検出器 R-AXIS IV++ (リガク(株)) で収集した。全てのデータは低温条件下で行った。データは HKL2000 ソフトウェア⁸⁵ を用いて処理した。SpAsf1N の最初の構造決定は CCP4 ソフトウェア⁸⁶ 中の Molrep プログラムを用いて既知 ScAsf1 構造を検索モデルとして分子置換法により行った^{86,87}。複合体の構造は、解析した SpAsf1N の構造をモデルとして用い分子置換法により行った。その後、反復マニュアルでのモデル構築はプログラム 0 を使用し⁸⁸、最初の構造精密化は CNS ソフトウェアを使用した⁸⁹。最終的な構造精密化は CCP4 に組み込まれている Refmac5 を用いた。全ての構造に関する情報処理や精密化に関する統計値は Table 1 に記載した。構造の立体化学に関する評価は PROCHECK⁹⁰ を使用し、優れた結果を得た。全ての構造に関する図は PyMOL ソフトウェアを用いて作成した。

表面プラズモン共鳴結合解析

GST-SpAsf1N タンパク質と Hip1B/Cac2C ペプチドの間における結合はビアコア 3000 (GE ヘルスケア(株)) を用いて行った。実験は 25°C、CM5 センサーチップ、HBS-EP バッファー (10 mM HEPES pH7.4、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.005% surfactant P20) で行った。GST-SpAsf1N を CM5 センサーチップに結合し、ペプチドと HBS-EP バッファーを流速 20 μl min⁻¹ で流して結合を検出した。

結果

Hip1 および Cac2 のアミノ酸配列比較

分裂酵母 Asf1 (262 残基) は種間で保存性が非常に高い (Figure 14A)。ヒト HIRA タンパク質は、その B ドメインを介して Asf1 タンパク質と相互作用する^{91,92}。HIRA の

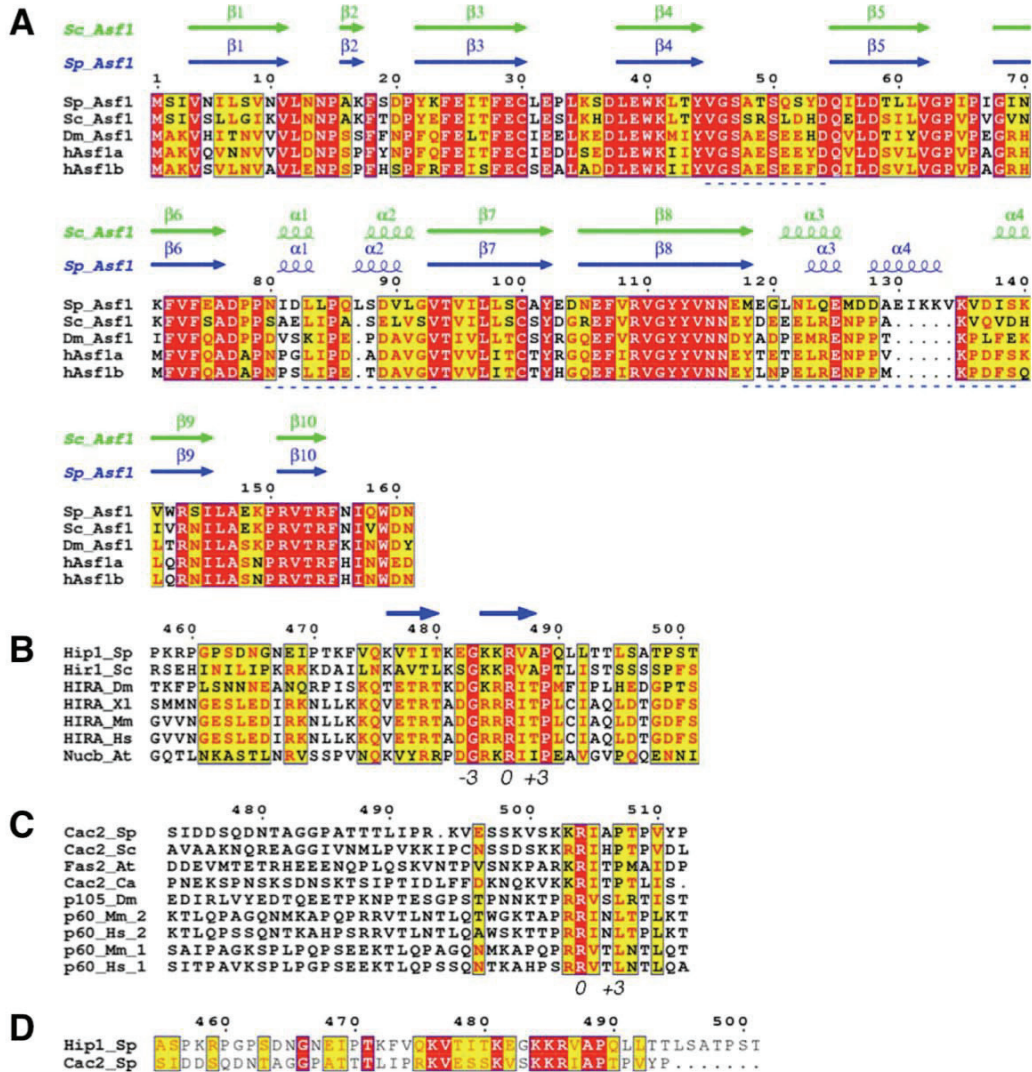


Figure 14. Sequence conservation of Hip1 and Cac2. The red and yellow boxes denote strictly and highly conserved residues, respectively. Numbers below the alignments pertain to the numbering scheme used in the text to denote conserved residue positions. (A) Sequence alignment of five Asf1N structural domains from *S. pombe* (*Sp_Asf1*), *S. cerevisiae* (*Sc_Asf1*), *Drosophila melanogaster* Asf1 (*Dm_Asf1*), human Asf1a (*h_Asf1a*), and human Asf1b (*h_Asf1b*). The secondary structural features from the budding yeast structure and the *S. pombe* structure (this study) are indicated above the alignments. Blue dashed lines below the alignments indicate the flexible L1, L2, and L3 helical/loop regions on *SpAsf1N*. (B) Sequence alignment of the B-domain regions of HIRA orthologues: Hip1/Hir1 from *S. pombe* (Hip1 Sp); Hir1 from *S. cerevisiae* (Hir1 Sc); HIRA from *D. melanogaster* (HIRA Dm), *Xenopus laevis* (HIRA Xl), mouse (HIRA Mm), and human (HIRA Hs); and nucleotide-binding protein from *Arabidopsis thaliana* (Nucb At). (C) Sequence alignment of B-domain-like regions from the C termini of CAF-1 Cac2/p60 orthologues: hypothetical protein SPAC26H5.03 from *S. pombe* (Cac2 Sp); Cac2 from *S. cerevisiae* (Cac2 Sc), and *Candida albicans* (Cac2 Ca); Fasciata2 from *A. thaliana* (Fas2 At); p105 from *D. melanogaster* (p105 Dm); and p60 from mouse (p60 Mm) and human (p60 Hs). The vertebrate p60 proteins have two overlapping B-domain-like sequences, denoted as 1 and 2. (D) Sequence comparison of the *S. pombe* Hip1 B-domain and the Cac2 orthologue C-terminal region.

分裂酵母 (*S. pombe*) ホモログは Hip1 (932 残基) であり、これは 8 個の WD40 繰り返しドメインを持つ。Hip1B ドメインと推測される領域は WD40 繰り返し配列の 6~7 番目 (450~500 残基) に位置する。Hip1B ドメイン推測領域を様々な生物種にて比較したところ、高い保存性を示した (Figure 14B)。種間で保存性のある共通配列は 483~489 残基の G-K/R-K/R-R-V/I-A/T/I-P である。

CAF-1 複合体の Cac2/p60 サブユニットも同様に Asf1 に結合することが知られている^{66,67,69}。様々な生物種の Cac2 の C 末端残基のアミノ酸配列アライメントを Figure 14C に示す。Cac2 の C 末端領域は HIRA の B ドメインと類似していた (Figure 14D)。また脊椎動物において示唆されている CAF-1 の B ドメイン配列アライメントと一致していた⁸³。

SpAsf1N の立体構造

出芽酵母において知られている Asf1 の機能ドメインと相同である分裂酵母における Asf1 (1-161 残基) の構造解析を目的として、タンパク質の発現および精製、結晶化、構造解析決定を行った。SpAsf1N の立体構造は出芽酵母^{64,93} およびヒト Asf1⁵¹ と類似しており、10 個の β シートは互いに 2 つの逆並行シートが向かい合った構造であった (Figure 15)。前面は β_4 、 β_5 、 β_7 、 β_8 、 β_{10} から成り、疎水性のくぼんだ形である。背面は β_1 、 β_3 、 β_6 から構成される。 β シートは種を超えて保存されているが、 β シート間をつなぐループ $\beta_4 \sim \beta_5$ 、 $\beta_6 \sim \beta_7$ 、 $\beta_8 \sim \beta_9$ は保存性が低く、疎水性くぼみの上方に位置し、動きに自由度がある。

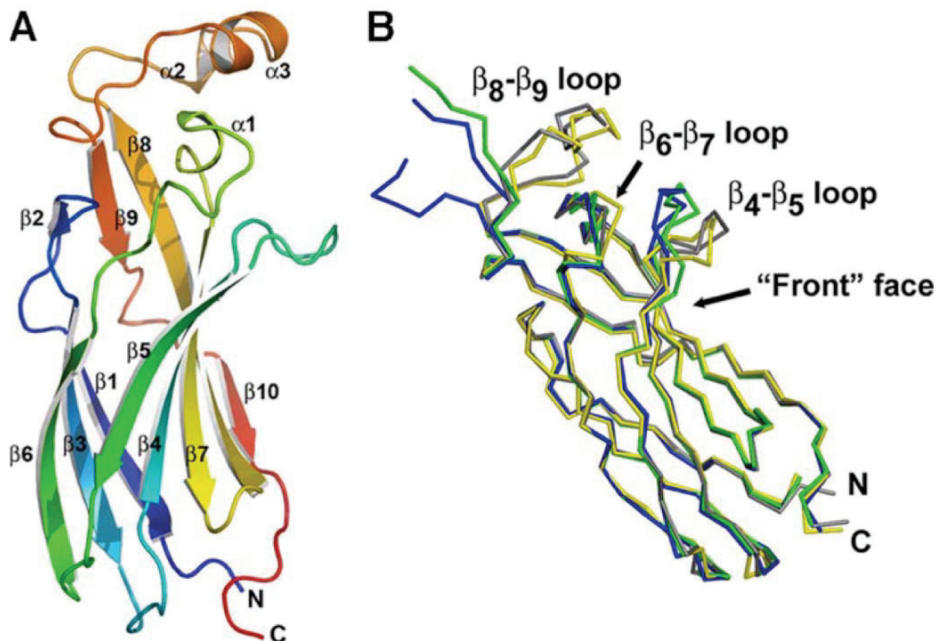


Figure 15. Overall tertiary structure of SpAsf1N in the apo-and complex forms. (A) Schematic representation of the apo-form of the SpAsf1N tertiary structure (blue to red). (B) The C trace of the SpAsf1N structure is colored in gray for the apo-form, blue for the Hip1 peptide complex (chain A), green for the Hip1 peptide complex (chain B), and yellow for the Cac2 peptide complex. The three flexible loop/helix regions are indicated: loop 4-5 (residues 48-53), loop 6-7 (residues 81-92), and loop 8-9 (residues 119-134). The N and C termini and the hydrophobic front face of SpAsf1N are also indicated.

SpAsf1N-Hip1B 複合体の立体構造

$P2_1$ スペースグループにおける結晶サンプルは、1 つの非対称ユニットに対し、2 つの Asf1N-Hip1B 複合体から成る (Table 1)。構造解析に用いた Hip1B (469~497 残基) のうち、1 つの分子 (protein data bank code 2Z34 の chain E) の電子密度は 474~494 残基において明確であり、もう一方の分子 (chain F) においては、475~496 残基において明確であった。ペプチドは β ヘアピン構造をとり、2 つの Asf1 の間にある溝に対してほぼ垂直に結合していた (Figure 16A)。

β ヘアピンの曲がり角は Hip1B ドメインの Glu482 と種間で保存性が高い Gly483 の間であった。476~480 残基および 484~488 残基の逆並行 β シート相互作用安定化は分子内部の 5 つの主鎖水素結合や、側鎖 Thr480 と主鎖窒素原子と側鎖 Glu482 の間における水素結合からなる。SpAsf1N-Hip1B 相互作用の特徴は以下に示す。Hip1B ドメインペプチドは SpAsf1N に対し、ファンデルワールス力、主鎖水素結合および極性結合からなる。保存性残基 Hip1B の Pro489 は Asf1N の β_5 、 β_6 からなる分子内部の疎水性の溝 (Val62, Pro64, Pro66, Phe72) に結合する。Hip1B の Val487 と Leu491 は更に疎水性の溝との結合安定化に寄与する。同時に、主鎖水素結合のネットワークが Hip1B の 485~487 残基と Asf1N61~63 残基との相互作用を、Hip1B の 490~493 残基と Asf1N69~71 残基との間の相互作用を促進する。極性結合も側鎖との間で見られており、Hip1B-Arg486 と Asf1N-Asp37 において顕著な塩橋が見られた。加えて、静電結合の可能性が Hip1B-Lys485 と Asf1N の酸性パッチ (Asp58, Glu75, Asp77) および Hip1B-Lys484 と Asf1-Glu39 の間であった。

SpAsf1N-Hip1B ドメインの認識様式はヒト Asf1N-HIRA 相互作用様式と類似していた。このことは、アミノ酸配列が高度に保存されていたことから予測した通りであった (Figure 14B、16B)。

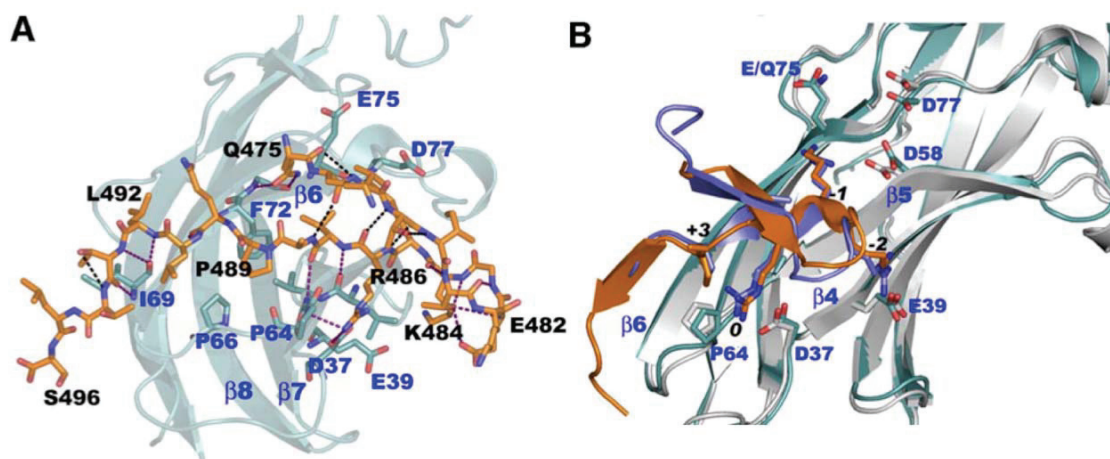


Figure 16. Interactions between SpAsf1N and the Hip1 B-domain peptide. (A) Binding of the Hip1 peptide (orange) to SpAsf1N (cyan). Relevant residues are labeled in black for the Hip1 peptide and blue for SpAsf1N. Intramolecular hydrogen bonds for the Hip1B peptide are shown by black dashed lines, and hydrogen bonds and salt bridge interactions between SpAsf1N and Hip1B are shown as pink dashed lines. (B) Comparison between the Hip1 B domain peptide binding to SpAsf1N and the human HIRA B-domain peptide binding to hAsf1a (Protein Data Bank ID: 2I32). The peptide and Asf1 structures are shown in orange and cyan, respectively, for *S. pombe* and in sky blue and dark gray, respectively, for human. Conserved peptide residues are labeled according to the numbering scheme in Figure 14 (in black), and relevant Asf1 residues are labeled in blue.

SpAsf1N-Cac2C 複合体の立体構造

$I4_1$ スペースグループにおける結晶サンプルは、1つの非対称ユニットに対し、8つのAsf1N-Cac2C複合体から成る (Table 1)。サブユニットは、2つのグループからなる4つのAsf1N-Cac2C複合体からなり、四角形のような形で、中央には $\sim 20 \times 15 \text{ \AA}$ の穴がある (Figure 17C)。電子密度は 2.7 \AA 程度であったが、8量体全てに対する強い電子密度が得られた。結晶中のパッキングにおいては変化が見られたにも関わらず、それぞれAsf1Nの構造は全て類似していた。

Table 1. Summary of data collection and refinements statistics.

Data collection parameters	Crystal		
	Native	Hip1B complex	Cac2C complex
Diffraction data			
Space group	$C2$	$P2_1$	$I4_1$
Unit cell parameters (\AA , °)	$a = 78.62, b = 41.30,$ $c = 67.21, \beta = 115.65$	$a = 62.01, b = 48.09,$ $c = 63.25, \beta = 99.25$	$a = b = 151.51,$ $c = 144.21$
Resolution (\AA)	1.80	2.30	2.6
Wavelength (\AA)	1.00	1.5418	1.5418
Measured reflections	62,387	51,572	3,07,285
Unique reflections	17,836	16,188	50,092
R_{merge} (%) ^{a,b}	7.6 (19.8)	6.9 (23.8)	7.2 (48.8)
Completeness (%)	97.7 (87.4)	97.6 (98.7)	99.9 (100)
Redundancy	3.5 (2.4)	3.2 (3.2)	6.1 (6.0)
Overall I/σ	28.2 (5.3)	19.6 (5.0)	25.2 (3.9)
Refinement statistics			
Resolution range	60–1.80	31–2.40	32–2.70
Working set	16,920	13,543	42,342
Test set (5.0%)	914	736	2,252
Total atoms			
Proteins (Asf1 + peptide)	1,274 (no peptide)	2,778	10,996
Ligands	10 (PEG) ^c		
Water molecules	248	129	312
R-factor (%) ^d	19.1	19.4	20.8
R_{free} (%) ^e	22.9	25.4	26.3
Mean B-factor (\AA^2)	26.9	29.6	39.0
r.m.s.d.			
Bond lengths (\AA)	0.025	0.021	0.022
Bond angles (°)	1.966	1.739	1.749
Ramachandran plot (%)			
Most favored regions	92.7	90.7	91.1
Allowed regions	6.6	8.9	8.5
Generously allowed regions	0.7	0.3	0.3
Disallowed regions	0.0	0.0	0.0

^a Numbers in parentheses are values in the highest resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle| / \sum I$ summed over all observations and reflections.

^c PEG, polyethylene glycol.

^d $R_{\text{cryst}} = \sum |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| / \sum |F_{\text{obs}}|$.

^e R_{free} was calculated with 5% of the data omitted from refinement.

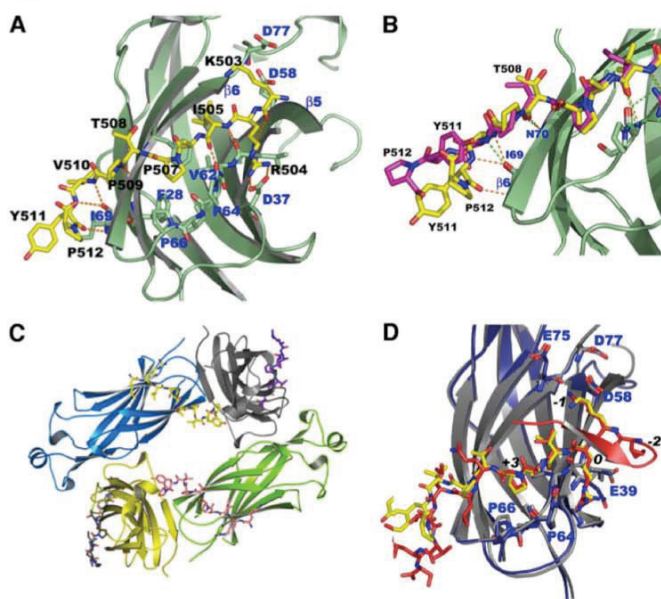


Figure 17. Binding of the CAF-1 Cac2 C-terminal peptide to SpAsf1N. (A) The Cac2C peptide (yellow) binds to the cleft formed between β_5 and β_6 sheets of SpAsf1N. Pertinent SpAsf1N residues are labeled in blue, and those in Cac2C are shown in black. Hydrogen bonding and salt bridge interactions are indicated by dashed lines. (B) Alternative conformations of residues 508–512 in the Cac2C peptide. Two peptide chains from the structure are superimposed in order to display the conformational differences: in yellow (chain N in Protein Data Bank code 2Z3F) and pink (chain P). Hydrogen bonds are indicated by dashed lines. (C) Crystallographic packing of the SpAsf1N-Cac2C complexes; two such tetramers are found in the asymmetric unit. The SpAsf1N subunits are rendered in schematic form, and the Cac2C peptides are shown as sticks. (D) comparison of the SpAsf1N-Cac2C and SpAsf1N-Hip1B binding interactions. The Hip1B peptide is shown in red, the Cac2C peptide in yellow, and the SpAsf1N structures for the Hip1B and Cac2C complex forms in gray and dark blue, respectively. The SpAsf1N protein in the Cac2C complex form is also rendered as a surface. The crucial peptide residues are numbered according to the scheme in Figure 14 (in black), and the pertinent SpAsf1N residues are labeled in blue.

Cac2C ペプチドは Asf1 β_5 と β_6 の間の溝に対して結合する (Figure 17A)。アミノ酸配列比較から予測されたように、Hip1B ペプチドと結合する Asf1 の結合サイトと共

通に使われていた。Cac2C ペプチドの C 末半分だけが電子密度マップにおいて明確に見る事ができ、493~502 残基は最終的な構造モデルに含まれていない。

主鎖水素結合は Asf1N の 61~63 残基と Cac2C の 503~505 残基の間および、Asf1N の 69~71 残基と Cac2C の 508~510 残基の間で見られた。Cac2C において、Pro507 は Asf1 の疎水性ポケット (Val62、Pro64、Pro66、Phe72) に埋まっている。Cac2-Arg504 は、Asf1-Asp37 と重要な塩橋を作り、Cac2-Lys503 は、Asf1-Asp58 と重要な塩橋を作る。Cac2 ペプチドは鎖の末端から 2 つの残基 (Tyr511、Pro512) において異なる構造モデルをとり、一方の構造モデルにおいては Cac2-Tyr511 と Asf1-Ile69 との間で水素結合が加わるという相違が見られた (Figure 17B)。

SpAsf1N-Hip1B 複合体と SpAsf1N-Cac2C 複合体の立体構造比較

Hip1B ペプチドと Cac2C ペプチドは Asf1N との相互作用様式が著しく類似していた (Figure 17D)。Hip1B 485~489 残基および Cac2C 503~508 残基の骨格は非常に接近して整列しており、側鎖 Hip1B-Lys485/Cac2-Lys503 (ポジション-1)、Hip1B-Arg486/Cac2-Arg504 (ポジション 0)、Hip1B-Pro489/Cac2-Pro507 (ポジション+3) も同様である。2 つの複合体構造における相違点は、Cac2C 末端配列は Hip1B のようなヘアピン構造をとらなかったことである。この原因はおそらく Cac2 においては β ターンを作る為に欠かせないグリシン (ポジション-3) を欠いている為だと考えられる。Asf1N と Hip1B/Cac2C ペプチドとの相互作用に参与する多くの残基が非常に近接して重なっていたが、例外として Asf1-Glu39 は Hip1 複合体における Hip1B-Lys484 の方へ向いているが、Cac2C 複合体においては Cac2C ペプチドから離れた方を向いていた。このことは、Cac2-Lys502 (ポジション-2) における電子密度が欠いていることと一致し、Cac2 ペプチドにおける N 末端半分が構造を不安定化していることを示唆する。

SpAsf1N 複合体と SpAsf1N 単独の立体構造比較

Asf1N と Hip1B ペプチドまたは Cac2C ペプチド複合体構造と Asf1N 単独構造を比較するといくつかの相違点が見られた。複合体 Asf1N においては $\beta_4 \sim \beta_5$ 、 $\beta_6 \sim \beta_7$ 、 $\beta_8 \sim \beta_9$ の間のループにおいて Asf1N 単独構造と比較して全体的に柔軟性が高く B ファクター (温度因子: 原子の揺らぎの大小を表す) が高いことと関係する (Figure 15B)。特に Asf1N-Hip1B 複合体構造においては、 $\beta_8 \sim \beta_9$ の間のループにおいてタンパク質の中心構造から大きく離れている。この構造変化は Gly120 と Lys135 の辺りを中心として旋回する。この変化が Hip1B ペプチドの結合により引き起こされたのか、単に結晶中におけるパッキングによるものであるのかは明確ではない。おそらく、柔軟性が高い為に Asf1N chain A の 127~130 および Asf1N chain B における 120~131 の電子密度が欠けており、この領域は最終的な Asf1N-HipB モデルにおいて欠如している。RMSD (root mean square deviation: タンパク質を構成するポリペプチドの $C\alpha$ 座標に定義される距離の平均値で値が小さいほど 2 つの構造がより類似していることを意味する) を算出した結果、2 種の Asf1N-Hip1B 複合体における Asf1N RMSD は 0.66 Å であり、柔軟性が高いループ領域を除くと 0.35 Å であった。また、Asf1N 単独と Asf1N-Hip1B 複合体中の Asf1N との比較においては RMSD 0.61 Å であった。対照的に 8 種ある Asf1N-Cac2C 複合体中の Asf1N は RMSD 0.29 Å で、Asf1N 単独と Asf1N-Cac2C 複合体中の Asf1N との比較においては RMSD 0.64 Å であった。

In vitro 結合解析

Asf1N と Hip1B/Cac2C ペプチドとの相互作用は表面プラズモン共鳴結合解析により行った。野生型および変異を導入した Asf1N タンパク質は GST タグ付きタンパク質として精製した。Asf1N タンパク質においては、立体構造解析結果よりペプチドとの相互作用に参与すると見られた次の残基に変異を導入した;D37A、E39A、D58A、L60A/V62A、E75A、D77A。また、ヒストン H3C 末領域との相互作用に参与する Val95 についてもコントロールとしてアラニン置換した。更に、Asf1N-Hip1B 非対称複合体において、反対の複合体の Asf1N-Asp104 は Hip1-Lys484 と極性結合することから D104A も作製した。

野生型および点変異導入 GST-Asf1N タンパク質は CM5 センサーチップに結合し、Hip1B ペプチド (469~497 残基) との相互作用解析を行った。野生型 Asf1N は Hip1B ペプチドに対し強く結合し、 K_D $0.80 \pm 0.01 \mu\text{M}$ であった (Figure 18A)。一方 Asf1N-D37A は完全に結合力を失った。つまり、Asf1N-D37A と Hip1-R486 の塩橋相互作用は重要であることを示した。同様に Asf1N L60A/V62A においてもほとんど結合力を失い、複合体形成におけるファンデルワールス力の重要性を示す。Asf1N-D58A は K_D $6.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$ 、Asf1N-E39A は K_D $2.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ であり、野生型と比較して結合力が低下した。つまり、Asf1N-D58A/Hip1-K485 および Asf1N-E39A/K484 相互作用は補助的な役割を果たしていると考えられる。Asf1N-E75A、D77A は Hip1B ペプチドに対し野生型と近い結合力を示し、これらの残基は Asf1N-D58 同様に Hip1B-K484 と結合すると立体構造において予測されたが、Asf1N-D58A においてのみ結合力が低下しており、これらの2つの残基は結合に重要な役割を果たしていないと考えられた。

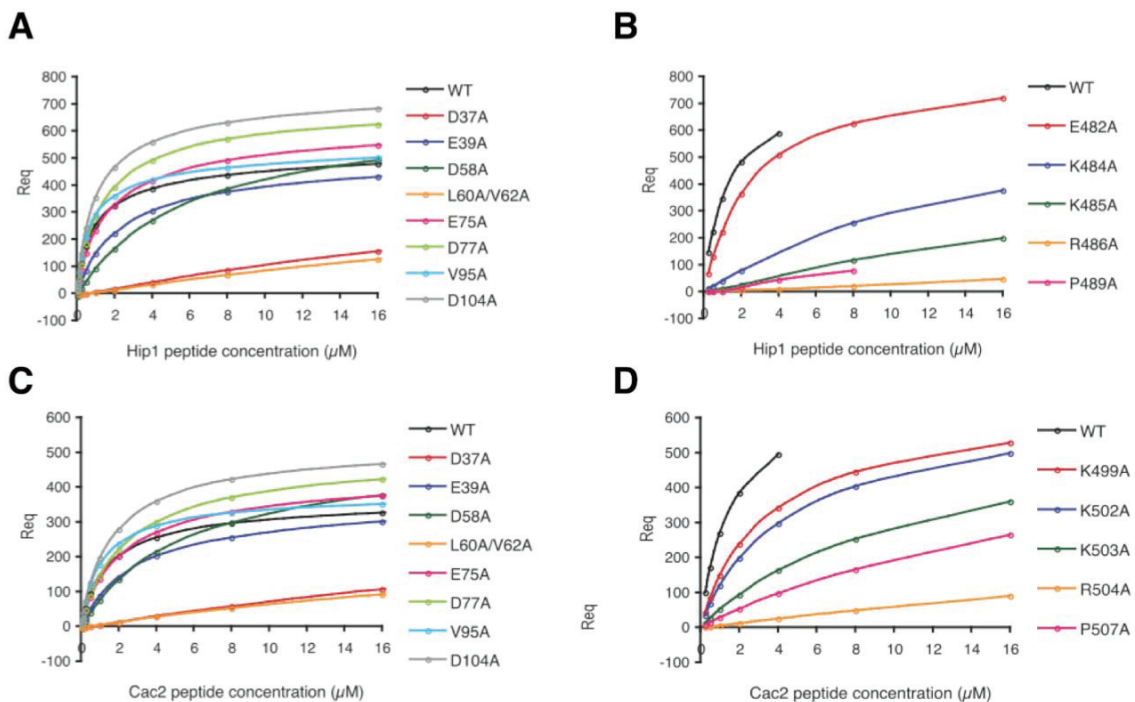


Figure 18 *In vitro* binding studies on WT/mutant *SpAsf1N* and Hip1B or Cac2C peptides. For each experiment, GST-Asf1N was immobilized on a CM5 sensor chip, and the analyte was injected at the indicated concentrations. Following fitting to a 1:1 interaction model, the apparent dissociation constants (K_D) were calculated. R_{eq} is a plateau value of each sensogram in resonance units. (A) WT/mutant Asf1N versus WT Hip1B peptide. (B) WT Asf1N versus mutant Hip1B peptides. (C) WT/mutant Asf1N versus WT Cac2C peptide. (D) WT Asf1N versus mutant Cac2C peptides.

野生型 GST-Asf1N に対し、変異を導入した Hip1B ペプチド (E482A、K484A、K485A、R486A、P489A) に対しても結合実験を行った (Figure 18B)。予想通り、Hip1-R486A、P489A は Asf1N に対しほとんど結合力を失った。また、Hip1-K484A は K_D $16.9 \pm 1.7 \mu\text{M}$ 、K485A は K_D $59 \pm 20 \mu\text{M}$ であり、これらの 2 つの残基も Asf1N の結合に重要であることを示した。一方、Hip1-E482A は Asf1N に対する結合が野生型と比べ大きな変化が見られなかった。

次に Cac2C ペプチドを用いて同様の実験を行った。野生型 Asf1N は Cac2C ペプチドに対して強く結合して K_D $1.46 \pm 0.01 \mu\text{M}$ であり、Hip1B ペプチドに対する結合と同程度であった。Asf1N-D37A、L60A/V62A は Cac2C ペプチドに対する結合が大きく低下した。加えて、Asf1N-D58A は K_D $5.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$ 、Asf1N-E39A は K_D $3.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$ であり、野生型と比較して結合が低下した。一方、Asf1N-E75A、D77A は Hip1B ペプチドに対し野生型に近い結合力を示した (Figure 18C)。

野生型 GST-Asf1N に対し、変異を導入した Cac2C ペプチド (K499A、K502A、K503A、R504A、P507A) を用いて結合実験を行った (Figure 18D)。Cac2C-R504 は Asf1N との結合を大きく失った。Cac2C-P507A は Hip1B-P489A に相当し、Hip1B-P489A においては Asf1N との結合に大きな影響を及ぼさなかったが Cac2C-P507A は Asf1N に対する結合が顕著に低下した。Cac2C-K503A は K_D $11.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ で Asf1N に対する結合が低下した。一方、Cac2C-K502A は Hip1B-K484A に相当し、Hip1B-K484A においては Asf1N との結合に大きな影響を及ぼしたが Cac2C-K502A は Asf1N に対する結合が保持され K_D $4.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ であった。このことは立体構造において、Cac2C-K502A は、Hip1B-K484A の Asf1N に対する極性結合を欠いていたことから予測通りであった。

考察

今回の研究において、我々は Asf1N 単独、Asf1N-Hip1B 複合体、Asf1N-Cac2C 複合体の結晶構造解析を行った。また、結合に関与する残基の同定も行った。Asf1N-Hip1B 複合体、Asf1N-Cac2C 複合体の相互作用様式は類似しており、いずれにおいても疎水性結合、主鎖水素結合、塩橋相互作用が見られた。Asf1N 疎水性ポケット (Phe28、Val62、Pro64、Pro66、Phe72) は Hip1B/Cac2C の疎水性残基と相互作用する。Asf1N-Asp37 は Hip1B-R486 および Cac2C-R504 と塩橋を作るための重要な残基であるが、Asf1N-Asp58、Glu75、Asp77 は補助的な役割である。結晶構造解析から得られた相互作用残基の知見は *in vitro* 相互作用解析においても確かめられた。

Asf1N-Hip1B 複合体および Asf1N-Cac2C 複合体の間においてわずかな違いが見られ、これは *in vivo* における機能調節の役割の重要性を示唆する。例えば、Asf1-D58A は Cac2C よりも Hip1B に対する結合により大きな影響を与える (Table 2)。複合体構造から Asf1-D58 は B ドメイン KKR モチーフの 2 番目のリジン (ポジション-1) と結合する。また、Hip1B-K485A は Cac2C-K503A と比較して野生型 Asf1N に対する結合が著しく減少した。更に、B ドメイン KKR モチーフの 1 番目のリジン (ポジション-2) の変異においては、Asf1N-Hip1B 複合体の方が Asf1N-Cac2C 複合体よりも大きな影響を及ぼした (Table 2)。これらの結果から、Hip1B および Cac2C におけるポジション-1、-2 に位置する残基は Asf1N に対する特異的相互作用を媒介することが考えられた。

Table 2. Calculated K_D values for binding between the WT and mutant forms of *SpAsf1N* and the Hip1 B-domain peptide or the Cac2 C-terminal peptide.

<i>SpAsf1</i>	K_D	
	WT Hip1 peptide	WT Cac2 peptide
	μM	
Wild type	0.89 ± 0.01	1.46 ± 0.01
D37A	ND ^a	ND
E39A	2.5 ± 0.1	3.3 ± 0.1
D58A	6.8 ± 0.2	5.9 ± 0.2
L60A/V62A	ND	ND
E75A	1.55 ± 0.04	2.1 ± 0.06
D77A	1.36 ± 0.03	2.4 ± 0.05
V95A	0.71 ± 0.02	1.2 ± 0.8
D104A	0.97 ± 0.02	1.59 ± 0.04
Hip1 peptide		WT <i>SpAsf1</i>
Wild type		1.2 ± 0.06
E482A		2.7 ± 0.07
K484A		16.9 ± 1.7
K485A		59 ± 20
R486A		ND
P489A		ND
Cac2 peptide		WT <i>SpAsf1</i>
Wild type		1.5 ± 0.04
K499A		3.4 ± 0.07
K502A		4.5 ± 0.1
K503A		11.5 ± 0.3
R504A		ND
P507A		ND

^a ND, not determined because of weak or absent interaction.

Hip1B と Cac2C は Asf1N に対して同じ結合部位を認識するため、結合は相互排他的に起こる。このことは、ヒストン H3-H4 複合体が DNA から脱落する異なる 2 つの経路 (DNA 複製依存および DNA 複製非依存) が並行して独立した経路で行われるという仮説と一致している⁸¹。認識様式は同じであるが反応に関与するタンパク質は異なり、複製依存経路においては、Asf1、ヒストン H3-H4 および CAF-1 が働く。一方、複製非依存経路においては、Asf1、ヒストン H3-H4 および HIRA (Hip1) が働く。

Hip1 および Cac2 の Asf1 に対する結合サイトは類似しているため、Hip1B ドメイン および Cac2C 末以外の領域においてもそれぞれの反応に特異的に作用する部位を究明する必要がある。例えば、Hip1 および Cac2 の全長における他の領域において結合する他のタンパク質によって反応特性を生み出しているのかもしれない。

Asf1N 単独、Asf1N-Hip1B 複合体、Asf1N-Cac2C 複合体構造の比較により、Asf1N の構造において特に 3 つのループの変化が明確に見られた。これらの 3 つの構造は異なる空間群から得られた結晶由来であるため、結晶のパッキングによる違いである可能性も考えられる。しかしながら、これらの 3 つのループはヒストン H3-H4 との相互作用に関与することが明らかになっており、Asf1 と H3-H4 ヘテロダイマー複合体の立体構造が酵母とヒトにおいて報告されている^{79,80}。これら全ての構造を重ね合わせると、H3-H4 ヘテロダイマーは Hip1B および Cac2C ペプチドとは全く別の場所で結合し、Asf1N に対して共通の結合残基を持たない (Figure 19)。しかし、注目すべき点として、Hip1 と結合した際において Asf1 の構造変化に影響を及ぼした領域はヒストン H3 相互作用に関わる領域の近傍である。一方、Cac2 が結合した際には Asf1 の H3 相互作用部位において、構造変化が見られなかった。また、第一章で行ったヒストン点変異体解析においてこの領域は転写および複製/修復の間で異なる残基が影響を及ぼしている (一章: Figure 12 左)。これらの結果は、Hip1 が相互作用した際と Cac2 が相互作用した場合とではヒストン H3-H4 複合体と Asf1 の結合様式が変わり、反応特異性を生み出していることを示唆している。

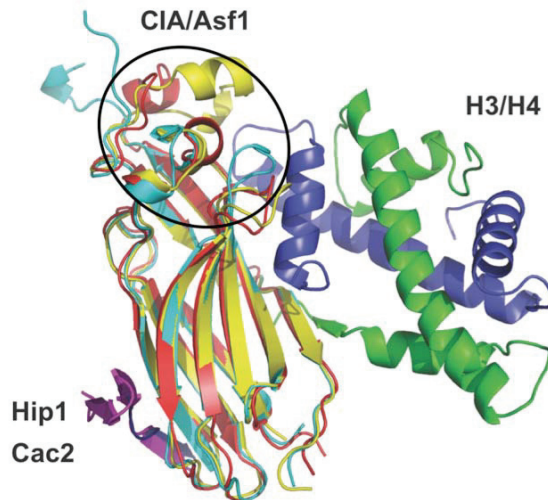


Figure 19. The structure of the *SpAsf1N*-Hip1B complex (PDB 2Z34) and the *SpAsf1N*-Cac2C complex (PDB 2Z3F) are superimposed on the human Asf1-H3/H4 complex (PDB 2I05) with respect to the core region of the Asf1 structures. Note that the Hip1/Cac2C peptide and the H3/H4 heterodimer bind to opposite faces of the Asf1 sandwich domain. The Asf1 structures are colored red (PDB 2I05), cyan (PDB 2Z34) and yellow (PDB 2Z3F), respectively. Histones H3 and H4 are colored blue and green, respectively. The Cac2C and Hip1B peptides are colored magenta and dark blue, respectively.

第三章

バクテリオファージラムダ Red β タンパク質とヒト Rad52 組換え酵素間におけるオリゴマー形成および1本鎖 DNA 結合に必要な保存残基の同定

相同組換えとは、相同な配列を持つ DNA の間で一部が入れ換わる機構である。これは、DNA 切断が起きた際に修復によりゲノム情報を保持するため、また、生物が遺伝情報の多様性を生み出すためにも備わった仕組みである^{94,95,96}。バクテリオファージラムダ Red (recombination deficient) の相同組換えは 3 つの遺伝子から構成され、exo 遺伝子は Red α タンパク質、bet 遺伝子は Red β タンパク質、gam 遺伝子は Red γ タンパク質をコードする。Red α は 5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を持ち、2 本鎖 DNA のうち 1 本を消化する。Red β はアニラーゼ活性を持ち、1 本鎖の DNA に結合し相同配列をアニーリングするおよそ分子量 30kDa のタンパク質である (Figure 20)⁹⁶。Red γ は宿主 RecBCD スクレアーゼを阻害することで DNA を保護する⁹⁷。Red 相同組換えは 1 本鎖 DNA が利用できる際には Red β タンパク質単独で介在することが可能である⁹⁸。

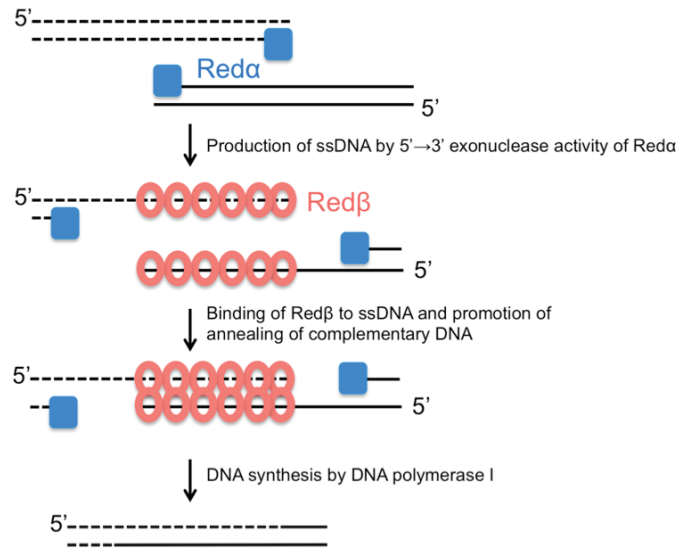


Figure 20. Model of Red homologous recombination.

Red 相同組換えを解析することの重要性は、1) ウイルスの組換えはウイルス自身および宿主の進化に関わること⁹⁹、2) リコンビニアリング: recombination-mediated genetic engineering (recombineering)¹⁰⁰ の技術改良に役立つことである。リコンビニアリングは Red 相同組換えを利用した新しいクローニング技術であり、従来の方法とは異なり、制限酵素やライゲーションを必要とせず、ノックアウト遺伝子など大きな目的遺伝子を BACs などにクローニングする際に活用されているが¹⁰¹、効率が悪いという問題が残されている。技術改良の為には Red 相同組換えの反応機構を詳細に解析する必要がある。

Red 相同組換えに関与する因子のうち、Red α タンパク質はよく解析されており^{102,103,104}、DNA と相互作用した複合体の立体構造も明らかになっている¹⁰⁵。それに対して Red β タンパク質に関する解析は進んでおらず、組換えにおけるアニーリング機構は明確になっていない。また、立体構造に関しては解像度が低い透過型電子顕微鏡: transmission electron microscopy (TEM)¹⁰⁶ や原子間力顕微鏡: atomic force microscopy (AFM)¹⁰⁷ を用いた解析から DNA が存在しない条件下では 11~12 量体のリング様構造を形成し、その一方で 1 本鎖 DNA 存在下においてはリング構造の崩壊、あるいはより大きなリング様構造を形成することが報告されている^{106,107}。

Red β タンパク質と同様に 1 本鎖 DNA をアニーリングするタンパク質 single stranded annealing protein (SSAP) は多数知られている。真核生物における Rad52 タンパク質もその 1 つであり、様々な機能や構造解析が研究されている。ヒト Rad52 タンパク質の全長は 418 アミノ酸残基からなり、分子量はおよそ 46kDa である。N 末端ドメイン(1~209 および 212)の結晶構造が報告されている^{108, 109}。Rad52 タンパク質の N 末領域は真核生物において保存されており¹¹⁰、点変異タンパク質を用いた 1 本鎖 DNA 結合解析の結果から Rad52 タンパク質のリング構造において塩基性に富む溝に沿って結合することが示唆されている^{108, 109}。

ファージ SSAP タンパク質の中で *Lactococcus lactis* ul36 はバイオインフォマティクス的手法を用いて Rad52 タンパク質と同じスーパーファミリーに属すると分類されており¹¹¹、機能解析においても Rad52 のホモログであると言われている^{112, 113}。対照的に Red β タンパク質は、Rad52 タンパク質とのアミノ酸配列相同性は見つからず、長い間異なるスーパーファミリーに属すると分類されていた¹¹¹。しかし、近年、Erler らにより これら両タンパク質の N 末 DNA 結合ドメイン配列の相同性が報告された¹⁰⁷。また Lopes らにより Sak、Red β 、Erf タンパク質が Rad52 タンパク質と同じスーパーファミリーに属するという報告がなされた¹¹⁴。しかしながら、2 つのグループで報告されたアミノ酸配列アライメント結果は全く異なり、Red β と Rad52 を同じスーパーファミリーとして分類してよいかどうかについては明確な議論と解析がなされていない。そこで、本章では Red β 、Sak、Rad52 間における関連性を解明するべく、相同性が見られた残基に点変異を導入し、1 本鎖 DNA 結合解析およびオリゴマー構造変化についての解析を行った。

実験方法

アミノ酸配列アライメント

全長 Red β およびヒト Rad52 のアミノ酸配列を用い、それぞれ NCBI 内の RefSeq データベースを利用し PSI-BLAST を行い、それぞれのタンパク質と相同性のある配列を抽出した。Red β 相同タンパク質および Rad52 相同タンパク質を別々に T-Coffee プログラムを用いてアミノ酸配列アライメントを行った。続けて 2 つのアライメントを Jalview を用いて統合し、N 末領域を Clustal module にて整列し、更に手動で整列した。

Red β 遺伝子の点変異作製

Red β 遺伝子はラムダファージゲノム DNA を鋳型とし、Pfx DNA ポリメラーゼおよびオリゴヌクレオチド (5' -TAAAACATATGAGTACTGCACTCGC-3' および 5' -TGCAGGATCCTGTCCGGTGTTCATGC-3') を用いて増幅した。PCR 産物を制限酵素 *NdeI* および *BamHI* により切断し、pGADT7 ベクターに挿入した後、DNA シークエンス解析により DNA 配列を確認した。次にこのクローンを *NdeI* および *BamHI* で切断し、タンパク質発現用ベクター pET14b (N 末にヒスチジンタグを付加するベクター) に挿入した。アラニン置換変異 Red β 遺伝子の作製においては Phusion high-fidelity PCR kit (サーモフィッシュサイエンティフィック (株)) を用いた。また、DNA シークエンス解析により目的の部位にのみアラニン置換がなされていることを確認した。

タンパク質精製

ヒスチジンタグ付き野生型および 13 個の点変異 Red β 遺伝子を用いて大腸菌株 BL21 (DE3) コンピテントセル (ニュー・イングランド・バイオラボ (株)) を形質転換した。大腸菌は 0.1mg/ml アンピシリンを含む LB 溶液の中において $A_{600nm} \sim 0.7$ に達するまで 37°C で前培養した。Red β タンパク質発現は終濃度 0.4 mM の isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside を添加することで開始し、3 時間経過後に大腸菌を回収した。回収した大腸菌を低濃度イミダゾールバッファー (20 mM Tris-HCl pH 8.0、0.5 M NaCl、30 mM imidazole) で再懸濁し、ソニケーションにより溶解した。溶解物を遠心分離し、得られた上清をヒスチジンタンパク質を結合する HisTrap FF カラム (GE ヘルスケア (株)) にアプライし、その後、高濃度イミダゾールバッファー (20 mM Tris-HCl pH 8.0、0.5 M NaCl、265 mM imidazole) によりヒスチジンタンパク質を溶出した。次いでアミコンウルトラ (分画分子量 10,000) スピнкаラム (メルクミリポア (株)) とバッファー A (20 mM Tris-HCl pH 8.0、0.5 M NaCl) を用いて高濃度イミダゾールを除いた。ヒスチジンタグを除く目的で、トロンビン 10 U (ナカライテスク (株)) を加え、16 時間、20°C で反応した。その後、HisTrap FF カラムとベンザミジン FF カラム (GE ヘルスケア (株)) を用いてタンパク質を精製した。精製したタンパク質はアミコンウルトラ (分画分子量 10,000) スピнкаラムを用い、バッファー B (20 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM DTT、10% glycerol) に置換するとともに、濃縮をしたサンプルを 4°C 保存し円偏光二色性分光法解析に用いた。また、バッファー C (20 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM DTT、50% glycerol) に置換し、濃縮したサンプルは-

20°Cに保存し他の全ての実験に使用した。13個の点変異タンパク質のうち、W82Aに関しては発現量が非常に少なく、実験に十分な量が得られなかった。

円偏光二色性分光法(Circular Dichroism; CD)

目的タンパク質の立体構造をCDスペクトル解析により検討した。精製タンパク質(0.1 mg/ml)を20 mM potassium phosphate pH6.0 バッファー中において波長500~190nmの間でJasco J-720 spectropolarimeter(日本分光(株))を用いて測定した。

Native-PAGE

Red β タンパク質(10 μ g)をローディングバッファー(終濃度62.5 mM Tris-HCl pH 6.8、10% glycerol、0.002% bromphenol blue)と混合し、5~20%ポリアクリルアミドゲル(アトー(株))中で電気泳動を行うことにより分離した。その後、ゲルはクマシーブリリエントブルーR250で染色した。

ゲル濾過クロマトグラフィー

Red β タンパク質溶液(4 mg/ml) 10 μ lをゲル濾過バッファー(20 mM potassium phosphate pH 6.0、10 mM MgCl₂、0.15 M NaCl)ならびにSuperdex 200 5/150カラム(GEヘルスケア(株))を用いることで分離した。分子量校正キット(GEヘルスケア(株))に含まれるフェリチン、アルドレース、コナルブミン、オバルブミンを用い検量線を作成し、それを用いて分子量を算定した。

1 本鎖 DNA 結合解析

Red β タンパク質(0~100 μ M)と、10nMの50ヌクレオチド1本鎖DNA(5'-TGCGGATGGCTTAGAGCTTAATTGCTGAATCTGGTGCTGTAGCTCAACAT-3'、5'末端をCy3により蛍光ラベルしたもの(オペロンバイオテクノロジー(株))を混合し、バッファー(50 mM potassium phosphate buffer pH 6.0、5 mM EDTA、5% glycerol、0.1 μ g/ μ l BSA)中で37°C、40分間反応させた。続けてグルタルアルデヒドを終濃度0.1%になるよう加え、更に37°C、20分反応することで複合体を安定化させた。その後、ローディングバッファー(キシレンおよびグリセロールを含む)を加え、6%ポリアクリルアミドゲル(ライフテクノロジーズ(株))中で、0.5x TBE バッファーを用いて電気泳動を行った。蛍光ラベルしたDNAはMolecular Imager FX(バイオラドラボラトリーズ(株))を用い検出し、ImageJにより定量化した。

透過型電子顕微鏡観察(TEM)

Red β タンパク質を、20 mM potassium phosphate pH 8.0 バッファー中で4°C、一晚、透析を行った。Red β タンパク質(10 μ M)を50ヌクレオチド1本鎖DNA(5 μ M)とバッファー(20 mM potassium phosphate pH 6.0、20 mM MgCl₂)中で37°C、40分間反応させた。その後グルタルアルデヒドを終濃度0.6%になるよう加え、更に37°C、20分反応した後、反応バッファーで5倍希釈した。炭素被覆した銅製のSTEMグリッド(STEM(株))にサンプルをのせ乾燥させた後、3% phosphotungstic acid pH 6.0を

用いてネガティブ染色し再度乾燥させた。用意した STEM グリッドは透過型電子顕微鏡を用いて観察した (JEOL JEM-1230 80 kV)。

結果

Rad52、Sak および Red β タンパク質の間におけるアミノ酸配列相同性

1 本鎖 DNA 結合タンパク質である Red β 、Sak、Rad52 タンパク質それぞれのファミリー間におけるアライメントを行った (Figure 21)。得られた結果は過去に報告され

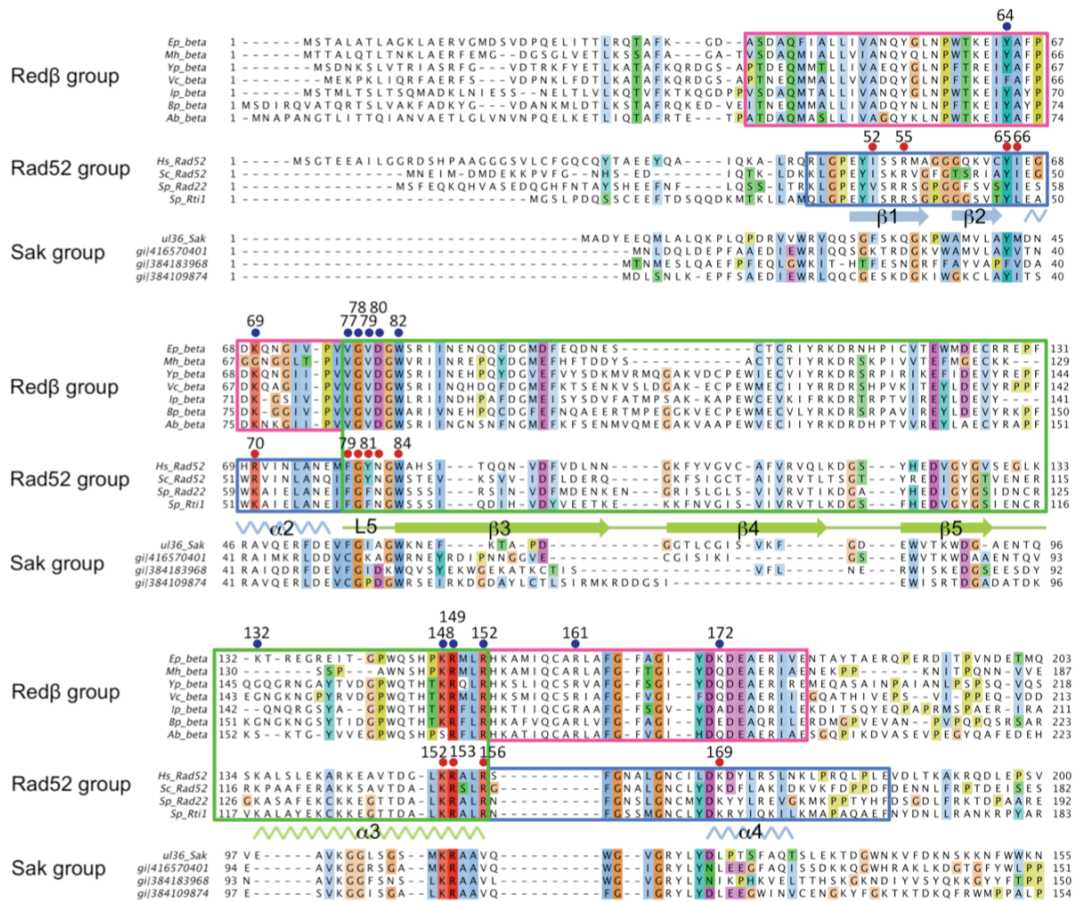


Figure 21. Comparison of Red β , Rad52 and Sak N-terminal domains. Conserved residues are highlighted and colored according to the Clustal X scheme, with color intensity denoting the degree of homology between the three SSAP groups. The green boxed region indicates the stem structure of Rad52; secondary structure elements (β - β - α) in this region are highlighted. The blue boxed regions correspond to the conserved part of the domed cap region in the hRad52 N-terminal structure, while pink boxed regions indicate alternative conserved stretches in Red β that flank the putative stem structure. Residues of Red β mutated to alanine in this study are marked with blue circles and numbered accordingly. Residues of hRad52 that have been experimentally shown to be involved in ssDNA binding are indicated by red circles. Sak SSAP from phage ul36 and related sequences are also shown. Abbreviations and UniProt accession numbers: *Ep_beta*, Red β from Enterobacteria phage λ (P03698); *Mn_beta*, bacteriophage recombinase from *Mannheimia haemolytica* (A7JWQ9); *Yp_beta*, DNA recombination protein from *Yersinia pestis* biovar Orientalis str. (A41UY1); *Vc_beta*, putative DNA recombination protein from *Vibrio cholerae* (Q8KQW0); *Ip_beta*, phage recombination protein from Iodobacteriophage ϕ PLPE (B5AX97); *Bp_beta*, putative phage recombination protein from *Burkholderia pseudomallei* strain 668 (A3NM00); *Ab_beta*, phage recombination protein Bet from *Acinetobacter baumannii*; *Hs_Rad52*, Rad52 homolog from *Homo sapiens* (P43351); *Sc_Rad52*, Rad52 from *Saccharomyces cerevisiae* (P06778); *Sp_Rad22*, Rad22 protein from *Schizosaccharomyces pombe* (P36592); *Sp_Rti1*, Rti1 protein from *S. pombe* (O42905); *ul36_Sak*, putative translation initiation factor from *Lactococcus* phage ul36 (Q9MC33_9CAUD). The three additional sequences in the Sak family are identified by GI accession numbers. The alignment display was generated using Jalview.

ている Erler らと類似していた¹⁰⁷。真核生物 Rad52 タンパク質の N 末ドメインはファミリー間で非常にアミノ酸配列が保存されており、1 本鎖 DNA アニール活性を持つ^{108,110}。また、X 線結晶構造も 2 つのグループから報告されており^{108,109}、マッシュルームに類似した 11 量体のリング構造である。中心の幹となる構造 (79~156 残基) はリングの基部となり、その隣接領域 (25~78 残基、157~208 残基) はドームの傘様の構造をしている (Figure 22A)。Red β タンパク質の N 末 1~206 残基においてはヒト Rad52 タンパク質と 15% の相同性であるが、構造の幹となっている領域 (Red β 77~152 残基、緑の囲み) (Figure 21, 22A) は 19.7% と保存性がより高い。注目すべきことに、構造の幹となっている領域内には Red β タンパク質 および Rad52 ファミリー間で共通の 2 つのクラスターが見つかった。1 つは疎水性が高い Red β 76~82 残基の hhGhDGW (h = 疎水性残基) であり、2 つ目は、塩基性が高い Red β タンパク質 148

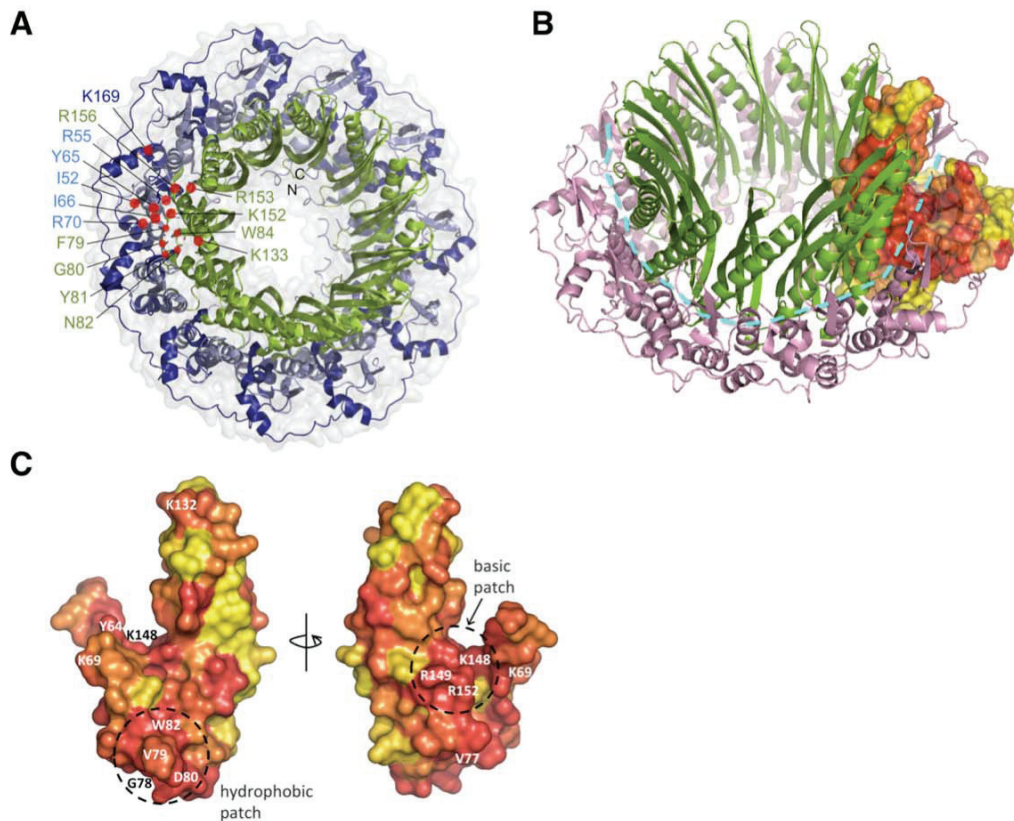


Figure 22. Comparison of hRad52 structure and homology model of Red β . (A) Structure of undecameric N-terminal hRad52₁₋₂₁₂ (PDB accession 1KN0) showing residues involved in ssDNA binding. The structure is colored as follows: residues 25-78 (part of the “domed cap”) in light blue, residues 79-156 (“stem structure”) in green, residues 157-220 (part of the “domed cap”) in dark blue. The N- and C- termini are also indicated. (B and C) Homology-based model showing sequence conservation between hRad52 and Red β . (B) The hRad52₁₋₂₁₂ oligomeric ring structure is shown, with the stem region in green, and the flanking regions in pink. One subunit is rendered in surface view and colored according to sequence conservation between Red β and Rad52 family proteins based on the alignment in Figure 21 (yellow to red, least to highest degree of conservation), with the aid of the ConSurf server. The basic groove predicted to bind ssDNA is indicated by a cyan dotted line. (C) Two views of a subunit of the 1KN0 structure (truncated to residues 25-177 for clarity) and colored according to the degree of conservation with respect to Red β as in (B). The two conserved patches and predicted locations of the Red β residues probed in this study are indicated. Residue V77 is buried and is therefore not displayed.

~152 残基 KRxLR (x = 全ての残基) である。これら 2 つのクラスターは Rad52 タンパク質において 1 本鎖 DNA 結合に必要であることが知られている^{109,115}。また、このクラスターは Sak タンパク質においても保存性が高かった。Rad52 タンパク質のいくつかのアミノ酸残基 (I52、R55、Y65、I66、R70、F79、G80、Y81、N82、W84、K152、R153、R156、K169) は 1 本鎖 DNA 結合に重要であることが明らかになっている^{109,115} (Figure 21、22A)。Red β と Rad52 の関連性を解明するため、Rad52 タンパク質とのアライメントで Red β タンパク質においても 1 本鎖 DNA 結合に関与すると予想されたアミノ酸残基 (Y64、K69、V77、G78、V79、D80、W82、K148、R149、R152) (Figure 21、22B) に関して、点変異を導入した。これらのうち 4 つの残基 (G78、V79、D80、W82) は Rad52 タンパク質の立体構造において疎水性領域に、また、K148、R149、R152 は塩基性領域に相当する (Figure 22C)。また、R161 をアラニン置換した。Red β において R161 は 1 本鎖アニーリングに関与することが *in vivo* で明らかにされている¹¹⁴。R161 は Red β ファミリーの間で保存されているが Rad52 ファミリーとの間に相同性は見られなかった (Figure 21)。さらに Rad52 タンパク質において 2 本鎖 DNA 結合、3 重複合体形成や D-ループ形成に関与することが知られている K133 と K169¹¹⁶ に相当する Red β K132 と K172 についてもアラニン置換した (Figure 21)。

Red β タンパク質の CD スペクトル解析

精製した 12 個の Red β アラニン置換タンパク質 (Y64A、K69A、V77A、G78A、V79A、D80A、K132A、K148A、R149A、R152A、R161A、K172A) の二次構造について CD スペクトル解析を野生型 Red β タンパク質と比較検討した。遠紫外領域である 190~260nm はアミドの吸収帯である。すなわち、タンパク質の主鎖のコンフォメーションを反映したスペクトルが得られる波長領域である。また、タンパク質の二次構造の含量を推定する際に使われる。野生型 Red β タンパク質においてはこれまで報告されているような典型的なアルファ α -ヘリックスタンパク質が表すスペクトルが確認でき¹¹⁷、全てのアラニン置換タンパク質において同様のスペクトル結果が得られた。このことから、点変異が導入された変異タンパク質においても、野生型と同様の二次構造が保持されていることを示した (Figure 23)。

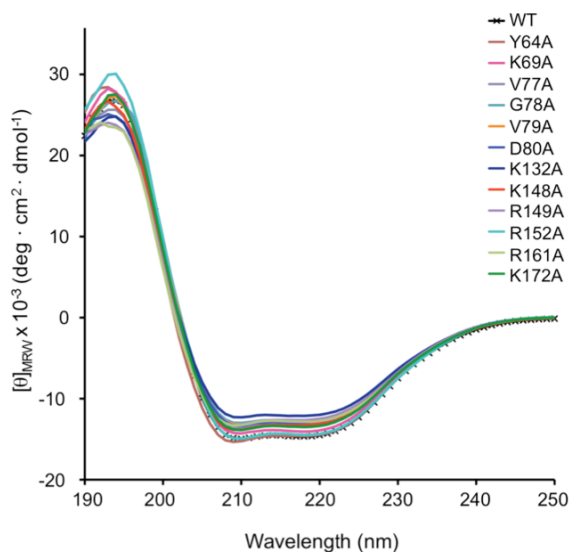


Figure 23. Far-UV CD measurements of Red β WT and mutant proteins.

点変異による 1 本鎖 DNA 結合の影響

野生型 Red β および 12 個の点変異タンパク質の 50 ヌクレオチド 1 本鎖 DNA に対する結合活性を electrophoretic mobility shift assay (EMSA) により解析した (Figure 24)。Red β -DNA 複合体はスミアなバンドとして検出され、電気泳動中に複合体が解離していることを意味する (Figure 24A)。野生型 Red β と比較して、Y64A、K69A 点変異タンパク質は同等の 1 本鎖 DNA 結合能を示した (Figure 24B、C)。一方、D80A、K132A、K148A、R149A、K172A 点変異タンパク質は DNA 結合活性の低下を示し、タンパク質 3 μ M において、1 本鎖 DNA に結合した割合は 40~90% であった (Figure

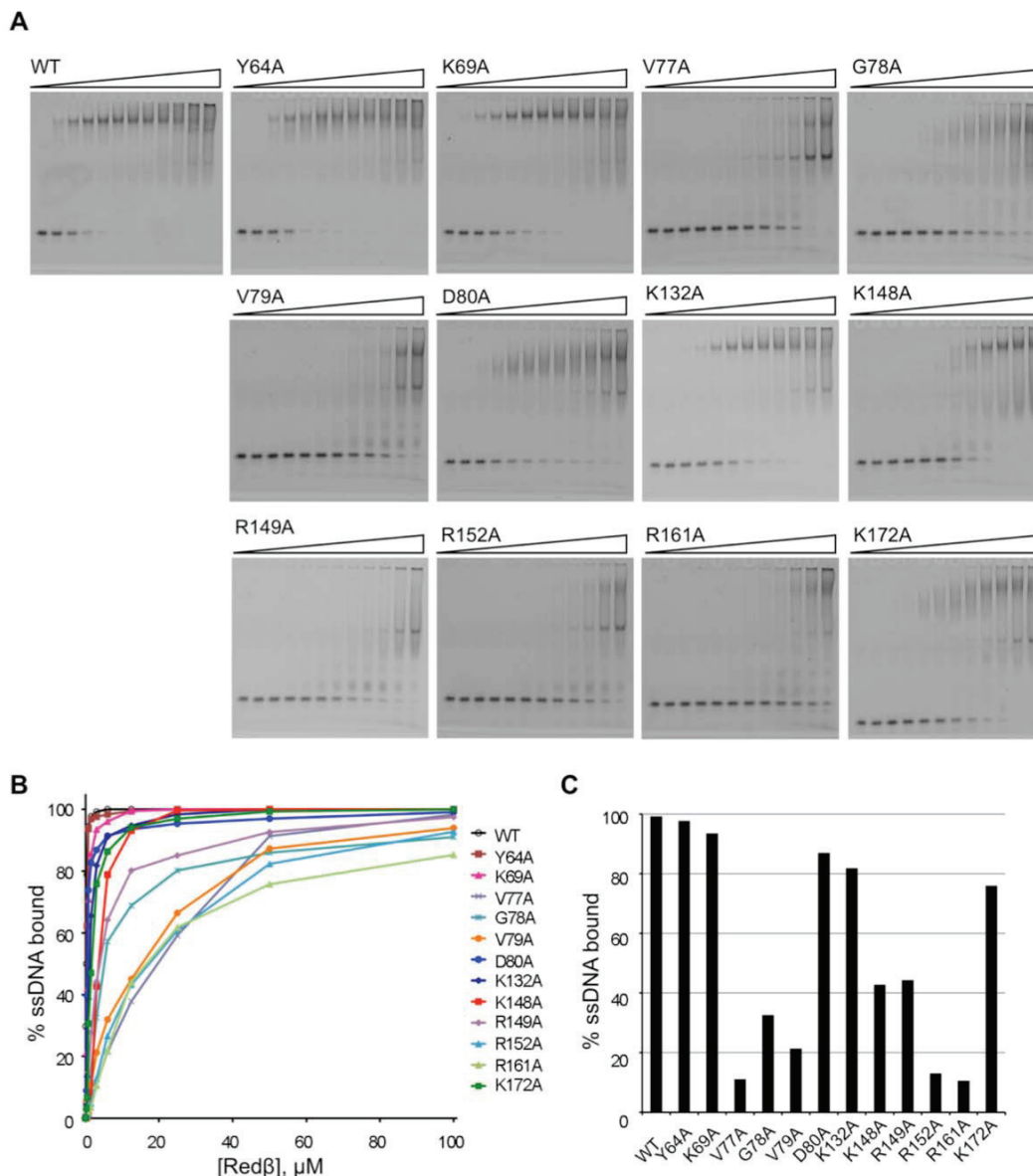


Figure 24. Binding of Red β WT and mutant proteins to ssDNA. (A) Gel retardation assays showing binding of Red β WT and mutant proteins to ssDNA. Varying concentrations of Red β (0, 0.09, 0.19, 0.38, 0.75, 1.5, 3, 6, 12.5, 25, 50, 100 μ M) were mixed with 10 nM 5' Cy3-labeled 50 mer oligonucleotide as described in the Materials and Methods. Samples were fixed with 0.1% glutaraldehyde prior to separation on 6% PAGE. (B and C) DNA binding analysis based on quantification of the gels in (A). The percentage ssDNA bound by Red β proteins at 3 μ M is presented as a bar graph in (C).

24C)。さらに V77A、G78A、V79A、R152A、R161A 変異は著しく影響を与え、タンパク質 3 μ M において、1 本鎖 DNA に結合した割合は 10~35% であった (Figure 24C)。

点変異タンパク質のサブユニット構造

野生型 Red β タンパク質と 1 本鎖 DNA 結合において、Red β タンパク質のリング構造が重要である可能性が考えられる。そこで点変異タンパク質におけるオリゴマー形成を Native-PAGE により検証した。Figure 25A に示すように野生型 Red β タンパク質および点変異タンパク質 (Y64A、K69A、V77A、G78A、V79A、D80A、K132A、R148A、R149A、R152A、R161A、K172A) は 1 本の幅広いバンドとして検出され電気泳動の移動度は同様であった。対照的に K148A、R149A に関しては、主要なバンドの移動が早く、より小さな複合体を形成していることが示唆された (Figure 25A)。R161A に関しては複数の薄いバンドが検出されたことから、様々な複合体を形成していることが示唆された。また、同量のタ

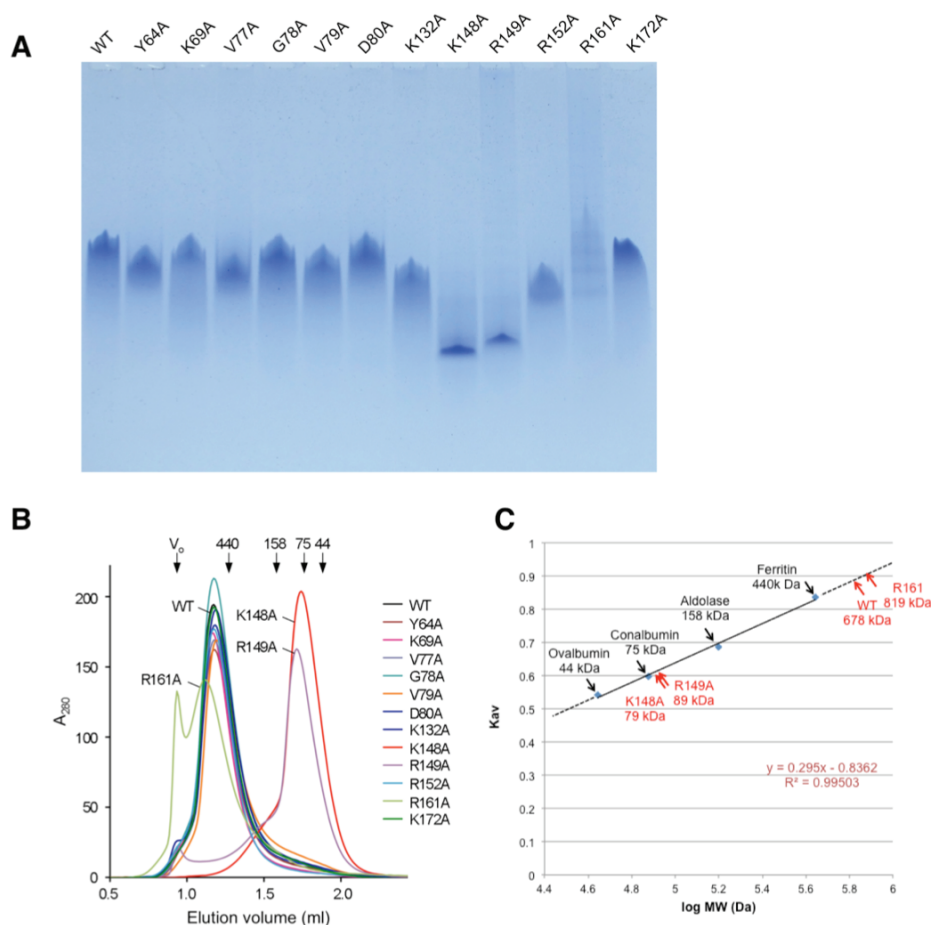


Figure 25. Characterization of the oligomeric structure of Red β mutant proteins. (A) Native PAGE analysis of Red β protein variants. Proteins (10 μ g per lane) were separated on a 5-20% gradient polyacrylamide gel and visualized by staining with Coomassie Blue. (B) Size-exclusion chromatography of Red β mutants. Proteins (10 μ l of 6 mg/ml) were applied to a Superdex 200 5/150 GL gel filtration column in 20 mM potassium phosphate pH 6.0, 10 mM MgCl₂, 0.15 M NaCl. Molecular masses were estimated by constructing a calibration curve from known molecular mass standards: ovalbumin (44 kDa), conalbumin (75 kDa), aldolase (158 kDa) and ferritin (440 kDa). (C) Standard curve for estimation of molecular weights using gel filtration chromatography. K_{av} values $[(V_e - V_0)/(V_e - V_0)]$ against log MW of the known protein standards. The generated linear equation and the R² values are also indicated. The dotted line indicates extrapolation of the standard curve used to estimate the molecular weights of the larger eluting species, such as Red β WT.

ンパク質を泳動しているにも関わらず、主要なバンドは検出されず、タンパク質が凝集あるいは不安定化が示唆された (Figure 25A)。

次にゲル濾過カラムを用いて、変異タンパク質の高次構造への影響を検討した。Native-PAGE の結果同様、野生型 Red β タンパク質および多くの点変異タンパク質 (Y64A、K69A、V77A、G78A、V79A、D80A、K132A、R152A、K172A) はおよそ分子量 650 ~680 kDa に分画され、22 量体から成ることが示唆された (Figure 25B)。これまでの研究から、1 つのリング構造が 11~12 量体であることが報告されており、2 つのリング構造から形成されることが考えられた (Figure 25C)。この構造は Red β タンパク質とアミノ酸配列相同性が見られたファージ ul36 Sak タンパク質においても同様の報告がされている^{112,113}。しかしながら、K148A および R149A 点変異タンパク質においては、3 量体から成る複合体であることが示唆され、native-PAGE の結果と一致するものであった。また、R161A に関しては、2 つの主要なピークが検出され、1 つは分子が大きすぎてカラムで分離できない位置に抽出されたことから、一部は凝集体を形成していることが考えられる。2 つ目のピークはおよそ分子量 800 kDa と見積もられ、野生型よりもより大きな複合体を形成していると考えられた。

TEM 解析

最後に、視覚的に Red β タンパク質の構造を観察するため、50 ヌクレオチド DNA の存在下ならびに非存在下において TEM 解析を行った (Figure 26)。これまでの TEM および AFM 解析において、Red β タンパク質は DNA 非存在下において約 11~12 量体から成るリング様構造を形成することが報告されている^{106,107}。我々の TEM 解析においては、Red β タンパク質単独においては過去に報告されているサイズと同様の直径 12 nm のリング構造を含む不均一な構造が観察された (Figure 26A)¹⁰⁶。ほとんどの点変異タンパク質においても同様のリング構造および不完全な非リング構造が多数観察された。R161A タンパク質に関しては、野生型同様のリング構造と共に多くのより大きなタンパク質凝集体が見られた。一方、K148A と R149A に関しては、リング構造は見られず小さな構造が観察され、native PAGE やゲル濾過解析の結果と一致していた。更に、野生型 Red β タンパク質と 1 本鎖 DNA との複合体は 15~18 量体のリング構造¹⁰⁶あるいは、リング構造が崩壊した不規則な構造をとる事が報告されている¹⁰⁷。我々の TEM 解析結果においては、直径 16nm のリング構造および厚さ 2.0~2.5 nm の繊維状の構造で、Red β 単独の時と比較し 1 本鎖 DNA が結合した際にはより大きな構造が確認された (Figure 26B)。それぞれの点変異タンパク質においても調べた結果、Y64A、K69A に関しては野生型と同様であった。D80A、K132A、K148A、K172A に関しては、多くが不完全のリング構造および繊維状の構造が観察された V77A、G78A、V79A、R149A、R152A、R161 に関しては、1 本鎖 DNA 無しの条件の際と構造がほぼ変化しないことからタンパク質-DNA 複合体が形成されていないことが示唆された。注目すべき点として、K148A に関しては DNA 無しの状態で完全にオリゴマー形成を保持できなくなっていたが、1 本鎖 DNA に結合する能力があることが EMSA および TEM 観察によって示された。

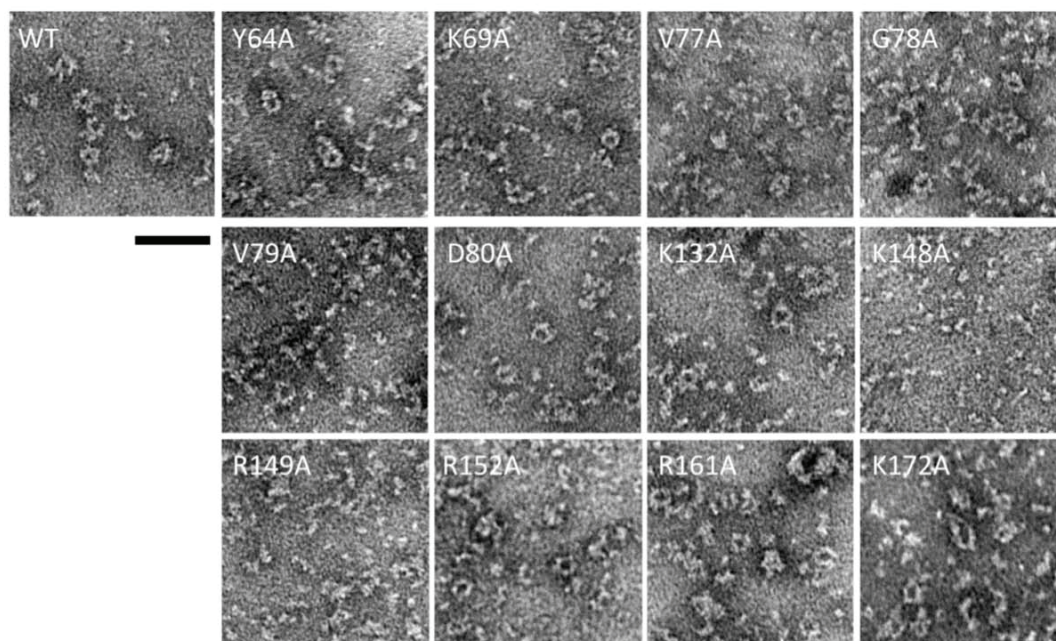
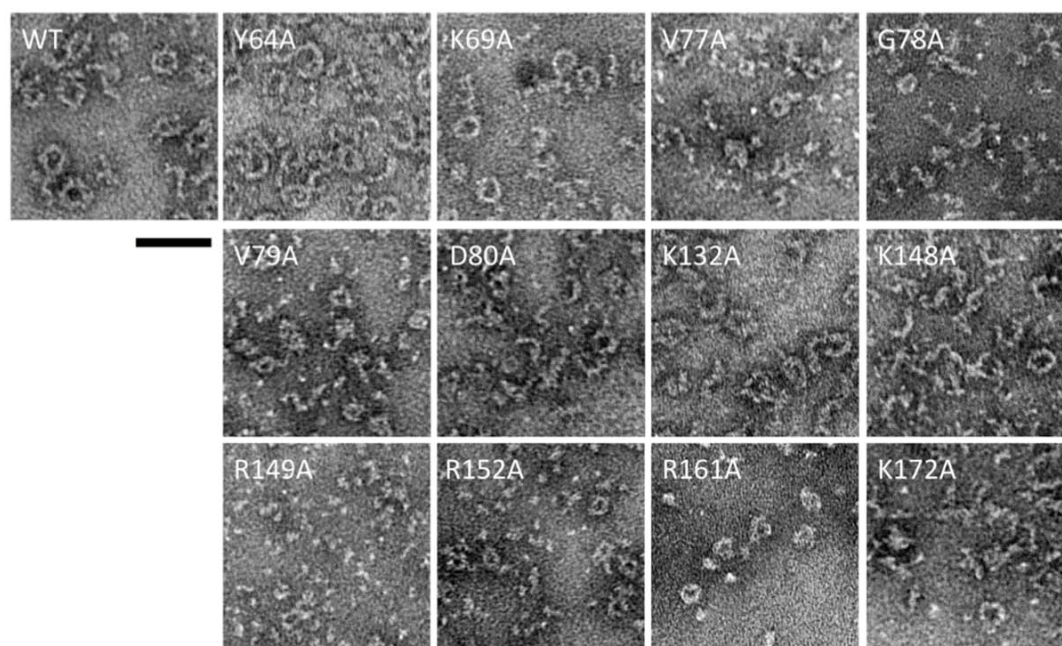
A**B**

Figure 26. Visualization of Red β WT and mutant protein oligomers by TEM. Images were obtained for proteins (2 μ M) alone (A) or in the presence of 1 μ M 50 nt ssDNA (B). The scale bars represent 50 nm.

考察

1 本鎖 DNA アニールリングタンパク質である Red β 、Sak ならびに Rad52 間の関連性を解明するべく、構造や機能があまり解析されていない Red β タンパク質に対して 12 個のアラニン点変異タンパク質 (1 本鎖 DNA 結合に影響を及ぼすと予測された残基を含む) を作製し、1 本鎖 DNA 結合能に対する影響を解析した。解析結果より、アミノ酸配列が保存されている 2 つのクラスターが 1 本鎖 DNA 結合に重要であることを同定した。1 つは疎水性クラスター (Red β 77~82 残基) であり、これはヒト Rad52 立体構造においてオリゴマー形成に関与し、分子内部に位置する。しかしながら、我々の実験結果においては、疎水性クラスターの点変異タンパク質は 1 本鎖 DNA 結合に強く影響が出たにも関わらず、オリゴマー構造に影響を及ぼさなかった (Figure 25)。注目すべきことに、全長ヒト Rad52 タンパク質においても同様の結果が報告されている¹¹⁵。おそらく疎水性クラスターの変異による 1 本鎖 DNA 結合への影響は間接的に及ぼしたと考えられ、DNA 結合に伴った Red β タンパク質の構造変化に関与していることが予想される。また、N 末端ドメインのみのヒト Rad52 においては点変異においてオリゴマー形成に影響を及ぼすことが報告されていることから¹¹⁵、C 末領域がオリゴマー形成に安定性をもたらす影響が強くてなかったことが考えられた。

塩基性クラスター (Red β 148~153 残基) に関して、ヒト Rad52 タンパク質の N 末端ドメインにおける立体構造においてリング構造を包囲するように 1 本鎖 DNA が結合するが示唆されており、Red β における点変異解析により特に R152A において強く影響が示された。更に K148A、R149A に関しては 1 本鎖 DNA 結合能に加え、オリゴマー形成にも影響が示された。R149 に関しては、ヒト Rad52 タンパク質の N 末ドメイン領域の立体構造に照らし合わせると分子内部相互作用に関与することも推測できたが、K148A に関しては、分子表面に位置していた。しかし、Rad52 の立体構造比較している領域は Red β 1~203 残基であり、Red β の全長は 261 残基なので C 末領域が DNA 結合表面を覆っており、塩基性クラスターは分子表面に位置していない可能性も考えられる。実際、C 末端領域を欠損した Red β はより強く DNA に結合する¹¹⁸。また、K148A に関しては、DNA が存在しない条件下ではオリゴマー構造が崩壊したが、1 本鎖 DNA の存在下においては不完全なリング構造や繊維構造が TEM 解析において観察された。このことから、リング構造は 1 本鎖 DNA 結合の際の前条件としては必須ではないことが言える。

Red β の根幹構造と隣接する領域の Y64A と K69A は、ヒト Rad52 の Y65、R70A に相当する。ヒト Rad52 Y65A と R70A は 1 本鎖 DNA 結合活性に変化が現れることが報告されているが、Red β Y64A ならびに K69A では、そのような変化はみられなかった^{109,115}。一方、Red β K132A、K172A に関しては Red β ファミリー内において保存性が低いにも関わらず 1 本鎖 DNA 結合活性に明確な影響が見られた。これらの残基はヒト Rad52 の K133 および K169 に相当し、2 つの残基ともに二本鎖 DNA 結合や D-loop 形成に関与することが知られており、Red β においても同様に関与する可能性が考えられた。

Red β R161A に関しては、1 本鎖 DNA アニールリング活性に影響を現れることが *in vivo* において報告されている¹¹⁴。しかしながら、我々のアミノ酸配列アライメント結果においては、Rad52 と相同性が見られない (Figure 25)。Native Page、ゲル濾過、TEM 解析の全ての結果が R161 点変異により大きな凝集体を形成することを示唆してい

た (Figure 25、26)。一部、TEM においてリング構造が見られたものの、点変異により機能が阻害された構造をとることが示され、構造および機能に重要な残基であることが考えられた。

ゲル濾過解析結果により野生型 Red β は 11 量体が 2 つ結合した 22 量体からなることが示唆された。この結果は Sak タンパク質においても同様であることが報告されているが¹¹³、Red β タンパク質においてはこれまで分子量を測定した例はなく、TEM や AFM の構造観察より 11~12 量体と推測されていた。また今回行った TEM 観察においてもこれまで報告されていたリングの大きさと同様であったことから、2 つのリングが上下に重なっていると推測された。しかしながら、全長の Rad52 においては異なり、不均一な大きさの構造体であることや 7 量体のリング構造として存在することも報告されている¹¹⁹。また、Rad52 の N 末端領域においては 11 量体のリング構造であることが立体構造解析で明らかになっており、全長の構造とは全く異なる。Rad52 においては C 末領域が長く、Rad51 や RPA といったタンパク質が結合するドメインを持ち、協調的に相同組換えに働く^{120,121}。このことから、全長の Rad52 においては Red β よりも複雑な反応機構および構造変換が伴い相同組換えが進行すると考えられる。

今回の研究において、1 本鎖 DNA アニールリングタンパク質の Red β 、Sak、Rad52 の間で保存されたアミノ酸が機能に重要な役割を果たしていることを Red β の点変異タンパク質を用いることにより実験的に証明した。また、1 本鎖 DNA 結合に必要な残基は、オリゴマー構造変化に重要な役割を果たす残基も含まれ、相同組換え機構を解明する上で進展をもたらした。

略語一覽

[第一章]

5-FOA	; 5-fluoroorotic acid
SC	; synthetic complete
Spt	; suppressor of Ty
6AU	; 6-azauracil
HU	; hydroxyurea
MMS	; methyl-methanesulfonate
SAGA	; Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase
CIA	; CCG1-interacting factor A
GLASP	; global analysis of surfaces by point mutation

[第二章]

RMSD	; root mean square deviation
------	------------------------------

[第三章]

Red	; recombination deficient
recombineering	; recombination-mediated genetic engineering
TEM	; transmission electron microscopy
AFM	; atomic force microscopy
SSAP	; single stranded annealing protein
CD	; circular dichroism
EMSA	; electrophoretic mobility shift assay
BAC	; bacterial artificial chromosome

総括

本研究において、我々は DNA 介在反応の制御に関与するタンパク質の機能に関して立体構造の点から解析した。

タンパク質はアミノ酸配列上、離れた位置であったとしても、折り畳まれることで立体構造上、近い場所に配置していることがある。また、異なるタンパク質同士が相互作用することで近接し、同じ反応を制御することがある。したがって目的タンパク質の機能を明らかにする上で立体構造解析は、従来の一次元あるいは二次元解析では得られない多くの有益な情報を与える。第一は、機能を司る部位について、三次元上の配置情報を与える点である。例えば、第一章に示したように 4 種類の異なるヒストンタンパク質に点変異を導入し、得られた表現型を示した残基をヌクレオソーム上にマップすることで、異なる反応間における共通の制御部位の存在を見出すことができる。またそれと同時に各反応系における特異的な制御部位を明らかにすることができる。

第二に、立体構造解析は反応機構の理解においても重要な知見を与える。第二章において、Asf1 に対して複製依存的あるいは非依存的に相互作用する 2 つの異なるタンパク質を例にして解析を行った。その結果、これらのタンパク質は、Asf1 に対して同様の様式で結合するにも関わらず、結合部位とは離れた場所において Asf1 に異なる構造変化を及ぼし、その結果、ヒストン構造変化に影響することが示唆された。

さらに、DNA 反応に関わるタンパク質の構造と機能との相関に関する解析は遺伝子工学の分野においても重要である。第三章で行ったバクテリオファージラムダ Red β タンパク質は、新しいクローニング技術として導入されたリコンビニアリングという手法に活用されている。リコンビニアリングは従来のクローニングのように制限酵素認識部位を必要としない、挿入したい DNA の長さに制限がないといった点が大きな特徴であり、モデル動物作製の際のバクテリア人工染色体 (Bacterial Artificial Chromosome; BAC) へのクローニングや大腸菌ゲノム改変の際に活用されている。しかしながら、クローニング効率が低いといった問題点も残されており、今回行った Red β タンパク質の機能解析結果は今後、リコンビニアリングの技術改良の際にも役立つことが考えられる。

このようにタンパク質の立体構造解析から得られる情報は多様であり、その利用は多くの分野における発展をもたらす。例えば、創薬研究においては標的タンパク質の立体構造を知ることによって、活性部位に適合する化合物の設計が可能となる。特に DNA 結合タンパク質やヌクレオソーム結合タンパク質は、様々な DNA 介在反応に関与すること、そして多くのタンパク質と相互作用し制御されていることから、その機能解析は医療への貢献が期待できる。例えば、ヒストンアセチル化ならびに脱アセチル化は癌抑制遺伝子の発現と関係している。そしてヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は、ある種の腫瘍増殖抑制効果があり、臨床の場において抗悪性腫瘍薬として使用されている。また、近年、塩基配列の変化を伴わず細胞分裂後も継承される遺伝子機能の変化“エピジェネティクス”が注目を集めている。エピジェネティクスは、核のリプログラミング、細胞分化、がんといった生命現象に深く関わっており、その中心はヌクレオソーム構造の変化に

ある。したがって、DNA 介在反応に関与する目的タンパク質の立体構造解析は、生命現象の新たな一面を明らかにすると予想できる。

DNA 結合因子による遺伝子発現制御は、従来、一次および二次構造の観点から解析されてきた。しかしながら DNA 介在反応の多くは、複数のタンパク質の相互作用により成立するため、そのような解析では理解に限界が見られた。上述したように本研究では、DNA 介在反応を高次元も含め解析することで、従来の解析では読み取ることができなかった多くの知見を得た。したがって本研究で得られた知見ならびに手法は、未だ不明な点が多い DNA 介在反応の詳細を分子レベルで明らかにするための一助となるものである。

謝辞

学位論文をまとめるにあたり、心よく指導教官を引き受けて下さり、丁寧にご指導頂きました日本大学薬学部の榛葉繁紀教授には深く感謝申し上げます。

第一章の研究を遂行するにあたり、東京大学分子細胞学研究所の堀越正美准教授にご指導を賜り、研究の立案、実験遂行、論文作成など研究者として生きるための基盤を築かせて頂き感謝申し上げます。また、佐野徳彦研究員は最後まで真剣に研究に取り組み、お互いに議論を積み重ねたからこそ成果を出す事ができ感謝申し上げます。

第二章の研究を遂行するにあたり、理化学研究所の横山茂之教授にご指導とご支援を賜り、素晴らしい研究設備の中、研究に専念できましたことを感謝申し上げます。また、梅原崇史博士は多くの研究指導やご支援を頂き感謝申し上げます。

第三章の研究を遂行するにあたり、理化学研究所の Jonathan Heddle 先生にご指導とご支援を賜り感謝申し上げます。また、Ali Malay 博士は多くのご指導と議論をして頂き多大な協力のおかげにより、成果を出す事ができましたこと感謝申し上げます。

本研究遂行にあたり、多くの研究室員の方から実験指導や議論をしていただき、成長していくことができましたこと、および秘書の方々においては研究に専念できるよう多くのご支援を頂き感謝申し上げます。

最後に、自分の信じる道に向かって突き進むよう育て、温かく見守って下さった両親、および、厳しい研究生生活を応援し続け、強い心の支えになってくださった夫と子供に深い感謝の意を表します。

参考文献

- 1 Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260 (1997).
- 2 Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D. & Finch, J. T. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* **275**, 416-420 (1978).
- 3 Cote, J., Quinn, J., Workman, J. L. & Peterson, C. L. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* **265**, 53-60 (1994).
- 4 Tsukiyama, T., Becker, P. B. & Wu, C. ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature* **367**, 525-532 (1994).
- 5 Kleff, S., Andrulis, E. D., Anderson, C. W. & Sternglanz, R. Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **270**, 24674-24677 (1995).
- 6 Brownell, J. E. *et al.* Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**, 843-851 (1996).
- 7 Taunton, J., Hassig, C. A. & Schreiber, S. L. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**, 408-411 (1996).
- 8 Turner, B. M., Birley, A. J. & Lavender, J. Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila polytene* nuclei. *Cell* **69**, 375-384 (1992).
- 9 Grunstein, M. Histone function in transcription. *Annu Rev Cell Biol* **6**, 643-678 (1990).
- 10 Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45 (2000).
- 11 Cosgrove, M. S., Boeke, J. D. & Wolberger, C. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nature structural & molecular biology* **11**, 1037-1043 (2004).
- 12 Kruger, W. *et al.* Amino acid substitutions in the structured domains of histones H3 and H4 partially relieve the requirement of the yeast SWI/SNF complex for transcription. *Genes & development* **9**, 2770-2779 (1995).
- 13 Park, J. H., Cosgrove, M. S., Youngman, E., Wolberger, C. & Boeke, J. D. A core nucleosome surface crucial for transcriptional silencing. *Nat Genet* **32**, 273-279 (2002).
- 14 Hyland, E. M. *et al.* Insights into the role of histone H3 and histone H4 core modifiable residues in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **25**, 10060-10070 (2005).
- 15 San Filippo, J., Sung, P. & Klein, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual review of biochemistry* **77**, 229-257, doi:10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255 (2008).

- 16 Hirschhorn, J. N., Bortvin, A. L., Ricupero-Hovasse, S. L. & Winston, F. A new class of histone H2A mutations in *Saccharomyces cerevisiae* causes specific transcriptional defects in vivo. *Molecular and cellular biology* **15**, 1999-2009 (1995).
- 17 Santisteban, M. S., Arents, G., Moudrianakis, E. N. & Smith, M. M. Histone octamer function in vivo: mutations in the dimer-tetramer interfaces disrupt both gene activation and repression. *Embo J* **16**, 2493-2506 (1997).
- 18 Barbera, A. J. *et al.* The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. *Science* **311**, 856-861 (2006).
- 19 Silverman, S. J. & Fink, G. R. Effects of Ty insertions on HIS4 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **4**, 1246-1251 (1984).
- 20 Exinger, F. & Lacroute, F. 6-Azauracil inhibition of GTP biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **22**, 9-11 (1992).
- 21 Rosenkranz, H. S. & Levy, J. A. Hydroxyurea: A Specific Inhibitor Of Deoxyribonucleic Acid Synthesis. *Biochimica et biophysica acta* **95**, 181-183 (1965).
- 22 Schwartz, J. L. Monofunctional alkylating agent-induced S-phase-dependent DNA damage. *Mutat Res* **216**, 111-118 (1989).
- 23 Eisenmann, D. M., Dollard, C. & Winston, F. SPT15, the gene encoding the yeast TATA binding factor TFIID, is required for normal transcription initiation in vivo. *Cell* **58**, 1183-1191 (1989).
- 24 Winston, F., Durbin, K. J. & Fink, G. R. The SPT3 gene is required for normal transcription of Ty elements in *S. cerevisiae*. *Cell* **39**, 675-682 (1984).
- 25 Clark-Adams, C. D., Norris, D., Osley, M. A., Fassler, J. S. & Winston, F. Changes in histone gene dosage alter transcription in yeast. *Genes & development* **2**, 150-159 (1988).
- 26 Duina, A. A. & Winston, F. Analysis of a mutant histone H3 that perturbs the association of Swi/Snf with chromatin. *Molecular and cellular biology* **24**, 561-572 (2004).
- 27 White, C. L., Suto, R. K. & Luger, K. Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *Embo J* **20**, 5207-5218 (2001).
- 28 Xu, F., Zhang, K. & Grunstein, M. Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell* **121**, 375-385 (2005).
- 29 Pamblanco, M. *et al.* Bromodomain factor 1 (Bdf1) protein interacts with histones. *FEBS Lett* **496**, 31-35 (2001).
- 30 Chimura, T., Kuzuhara, T. & Horikoshi, M. Identification and characterization of CIA/ASF1 as an interactor of bromodomains associated with TFIID. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 9334-9339 (2002).
- 31 Munakata, T., Adachi, N., Yokoyama, N., Kuzuhara, T. & Horikoshi, M. A human homologue of yeast anti-silencing factor has histone chaperone activity. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **5**, 221-233 (2000).
- 32 Formosa, T. *et al.* Spt16-Pob3 and the HMG protein Nhp6 combine to form the nucleosome-binding factor SPN. *Embo J* **20**, 3506-3517 (2001).

- 33 Hubert, J. C. *et al.* Complete sequence of a eukaryotic regulatory gene. *Embo J* **2**, 2071-2073 (1983).
- 34 Hartzog, G. A., Wada, T., Handa, H. & Winston, F. Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* **12**, 357-369 (1998).
- 35 Archambault, J., Lacroute, F., Ruet, A. & Friesen, J. D. Genetic interaction between transcription elongation factor TFIIIS and RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* **12**, 4142-4152 (1992).
- 36 Xiao, T. *et al.* Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* **25**, 637-651 (2005).
- 37 Kizer, K. O. *et al.* A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3 K36 methylation with transcript elongation. *Molecular and cellular biology* **25**, 3305-3316 (2005).
- 38 Gonzalez, P. J. & Palacian, E. Interaction of RNA polymerase II with structurally altered nucleosomal particles. Transcription is facilitated by loss of one H2A.H2B dimer. *The Journal of biological chemistry* **264**, 18457-18462 (1989).
- 39 Baer, B. W. & Rhodes, D. Eukaryotic RNA polymerase II binds to nucleosome cores from transcribed genes. *Nature* **301**, 482-488 (1983).
- 40 Robzyk, K., Recht, J. & Osley, M. A. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* **287**, 501-504 (2000).
- 41 Pavlov, Y. I., Shcherbakova, P. V. & Kunkel, T. A. In vivo consequences of putative active site mutations in yeast DNA polymerases alpha, epsilon, delta, and zeta. *Genetics* **159**, 47-64 (2001).
- 42 Araki, Y., Kawasaki, Y., Sasanuma, H., Tye, B. K. & Sugino, A. Budding yeast mcm10/dna43 mutant requires a novel repair pathway for viability. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **8**, 465-480 (2003).
- 43 Ye, J. *et al.* Histone H4 lysine 91 acetylation a core domain modification associated with chromatin assembly. *Molecular cell* **18**, 123-130 (2005).
- 44 Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R. & Stillman, B. Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Current biology : CB* **8**, 96-108 (1998).
- 45 Chang, M., Bellaoui, M., Boone, C. & Brown, G. W. A genome-wide screen for methyl methanesulfonate-sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 16934-16939 (2002).
- 46 Ajimura, M., Leem, S. H. & Ogawa, H. Identification of new genes required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **133**, 51-66 (1993).
- 47 Downs, J. A., Lowndes, N. F. & Jackson, S. P. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* **408**, 1001-1004 (2000).
- 48 Harvey, A. C., Jackson, S. P. & Downs, J. A. *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A Ser122 facilitates DNA repair. *Genetics* **170**, 543-553 (2005).
- 49 Sedgwick, B. Repairing DNA-methylation damage. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 148-157 (2004).

- 50 Tercero, J. A. & Diffley, J. F. Regulation of DNA replication fork progression
through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* **412**, 553-
557 (2001).
- 51 Mousson, F. *et al.* Structural basis for the interaction of Asf1 with histone H3
and its functional implications. *Proceedings of the National Academy of
Sciences of the United States of America* **102**, 5975-5980 (2005).
- 52 Bennett, C. B. *et al.* Genes required for ionizing radiation resistance in yeast.
Nat Genet **29**, 426-434 (2001).
- 53 Kao, C. F. *et al.* Rad6 plays a role in transcriptional activation through
ubiquitylation of histone H2B. *Genes & development* **18**, 184-195 (2004).
- 54 Yamashita, K., Shinohara, M. & Shinohara, A. Rad6-Bre1-mediated histone
H2B ubiquitylation modulates the formation of double-strand breaks
during meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the
United States of America* **101**, 11380-11385 (2004).
- 55 Thompson, J. S., Snow, M. L., Giles, S., McPherson, L. E. & Grunstein, M.
Identification of a functional domain within the essential core of histone H3
that is required for telomeric and HM silencing in *Saccharomyces cerevisiae*.
Genetics **163**, 447-452 (2003).
- 56 Wyatt, H. R., Liaw, H., Green, G. R. & Lustig, A. J. Multiple roles for
Saccharomyces cerevisiae histone H2A in telomere position effect, Spt
phenotypes and double-strand-break repair. *Genetics* **164**, 47-64 (2003).
- 57 Bird, A. W. *et al.* Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA
double-strand break repair. *Nature* **419**, 411-415 (2002).
- 58 Loyola, A. & Almouzni, G. Histone chaperones, a supporting role in the
limelight. *Biochimica et biophysica acta* **1677**, 3-11,
doi:10.1016/j.bbaexp.2003.09.012 (2004).
- 59 Le, S., Davis, C., Konopka, J. B. & Sternglanz, R. Two new S-phase-specific
genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1029-1042,
doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19970915)13:11<1029::AID-
YEA160>3.0.CO;2-1 (1997).
- 60 Tyler, J. K. *et al.* The RCAF complex mediates chromatin assembly during
DNA replication and repair. *Nature* **402**, 555-560, doi:10.1038/990147
(1999).
- 61 Sillje, H. H. & Nigg, E. A. Identification of human Asf1 chromatin assembly
factors as substrates of Tousled-like kinases. *Current biology : CB* **11**, 1068-
1073 (2001).
- 62 Umehara, T. & Horikoshi, M. Transcription initiation factor IID-interactive
histone chaperone CIA-II implicated in mammalian spermatogenesis. *The
Journal of biological chemistry* **278**, 35660-35667,
doi:10.1074/jbc.M303549200 (2003).
- 63 Umehara, T., Chimura, T., Ichikawa, N. & Horikoshi, M. Polyanionic stretch-
deleted histone chaperone cia1/Asf1p is functional both in vivo and in vitro.
Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms **7**, 59-73 (2002).
- 64 Daganzo, S. M. *et al.* Structure and function of the conserved core of histone
deposition protein Asf1. *Current biology : CB* **13**, 2148-2158 (2003).
- 65 Tamburini, B. A., Carson, J. J., Adkins, M. W. & Tyler, J. K. Functional
conservation and specialization among eukaryotic anti-silencing function 1

- histone chaperones. *Eukaryotic cell* **4**, 1583-1590, doi:10.1128/EC.4.9.1583-1590.2005 (2005).
- 66 Tyler, J. K. *et al.* Interaction between the Drosophila CAF-1 and ASF1 chromatin assembly factors. *Molecular and cellular biology* **21**, 6574-6584 (2001).
- 67 Mello, J. A. *et al.* Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO reports* **3**, 329-334, doi:10.1093/embo-reports/kvf068 (2002).
- 68 Sharp, J. A., Fouts, E. T., Krawitz, D. C. & Kaufman, P. D. Yeast histone deposition protein Asf1p requires Hir proteins and PCNA for heterochromatic silencing. *Current biology : CB* **11**, 463-473 (2001).
- 69 Sutton, A., Bucaria, J., Osley, M. A. & Sternglanz, R. Yeast ASF1 protein is required for cell cycle regulation of histone gene transcription. *Genetics* **158**, 587-596 (2001).
- 70 Adkins, M. W., Howar, S. R. & Tyler, J. K. Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes. *Molecular cell* **14**, 657-666, doi:10.1016/j.molcel.2004.05.016 (2004).
- 71 Adkins, M. W. & Tyler, J. K. The histone chaperone Asf1p mediates global chromatin disassembly in vivo. *The Journal of biological chemistry* **279**, 52069-52074, doi:10.1074/jbc.M406113200 (2004).
- 72 Zabaronick, S. R. & Tyler, J. K. The histone chaperone anti-silencing function 1 is a global regulator of transcription independent of passage through S phase. *Molecular and cellular biology* **25**, 652-660, doi:10.1128/MCB.25.2.652-660.2005 (2005).
- 73 Singer, M. S. *et al.* Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **150**, 613-632 (1998).
- 74 Osada, S. *et al.* The yeast SAS (something about silencing) protein complex contains a MYST-type putative acetyltransferase and functions with chromatin assembly factor ASF1. *Genes & development* **15**, 3155-3168, doi:10.1101/gad.907201 (2001).
- 75 Meijnsing, S. H. & Ehrenhofer-Murray, A. E. The silencing complex SAS-I links histone acetylation to the assembly of repressed chromatin by CAF-I and Asf1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* **15**, 3169-3182, doi:10.1101/gad.929001 (2001).
- 76 Emili, A., Schieltz, D. M., Yates, J. R., 3rd & Hartwell, L. H. Dynamic interaction of DNA damage checkpoint protein Rad53 with chromatin assembly factor Asf1. *Molecular cell* **7**, 13-20 (2001).
- 77 Hu, F., Alcasabas, A. A. & Elledge, S. J. Asf1 links Rad53 to control of chromatin assembly. *Genes & development* **15**, 1061-1066, doi:10.1101/gad.873201 (2001).
- 78 Prado, F., Cortes-Ledesma, F. & Aguilera, A. The absence of the yeast chromatin assembly factor Asf1 increases genomic instability and sister chromatid exchange. *EMBO reports* **5**, 497-502, doi:10.1038/sj.embor.7400128 (2004).

- 79 English, C. M., Adkins, M. W., Carson, J. J., Churchill, M. E. & Tyler, J. K. Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell* **127**, 495-508, doi:10.1016/j.cell.2006.08.047 (2006).
- 80 Natsume, R. *et al.* Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histones H3 and H4. *Nature* **446**, 338-341, doi:10.1038/nature05613 (2007).
- 81 Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. & Nakatani, Y. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**, 51-61 (2004).
- 82 Green, E. M. *et al.* Replication-independent histone deposition by the HIR complex and Asf1. *Current biology : CB* **15**, 2044-2049, doi:10.1016/j.cub.2005.10.053 (2005).
- 83 Tang, Y. *et al.* Structure of a human ASF1a-HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly. *Nature structural & molecular biology* **13**, 921-929, doi:10.1038/nsmb1147 (2006).
- 84 Umehara, T. *et al.* Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the histone chaperone cia1 from fission yeast. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* **61**, 971-973, doi:10.1107/S1744309105030927 (2005).
- 85 Otwinowski, Z. & Minor, W. *Methods in Enzymology (Carter, C.W., Jr., and Sweet, R.M., eds)* **276**, 307-326, Academic Press, Orlando, FL (1997).
- 86 4), C. C. c. P. N. *Acta Crystallogr. Sect. A* **47**, 110-119 (1994).
- 87 Vagin, A. & Teplyakov, A. *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 1022-1025 (1997).
- 88 Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta crystallographica. Section A, Foundations of crystallography* **47 (Pt 2)**, 110-119 (1991).
- 89 Brunger, A. T. *et al.* Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **54**, 905-921 (1998).
- 90 Laskowski, R. A., Moss, D. S. & Thornton, J. M. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *Journal of molecular biology* **231**, 1049-1067, doi:10.1006/jmbi.1993.1351 (1993).
- 91 Nelson, D. M. *et al.* Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity. *Molecular and cellular biology* **22**, 7459-7472 (2002).
- 92 Zhang, R. *et al.* Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Developmental cell* **8**, 19-30, doi:10.1016/j.devcel.2004.10.019 (2005).
- 93 Padmanabhan, B. *et al.* Structural similarity between histone chaperone Cia1p/Asf1p and DNA-binding protein NF-kappaB. *Journal of biochemistry* **138**, 821-829, doi:10.1093/jb/mvi182 (2005).
- 94 Vos, M. Why do bacteria engage in homologous recombination? *Trends Microbiol.* **17**, 226-232 (2009).
- 95 Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M. & Zhao, X. Homologous recombination and its regulation. *Nucl. Acids Res.* **40**, 5795-5818, doi:10.1093/nar/gks270 (2012).

- 96 Murphy, K. C. Phage recombinases and their applications. *Adv. Virus Res.* **83**, 367-414, doi:10.1016/B978-0-12-394438-2.00008-6 (2012).
- 97 Murphy, K. C. Lambda Gam protein inhibits the helicase and chi-stimulated recombination activities of Escherichia coli RecBCD enzyme. *J. Bact.* **173**, 5808-5821 (1991).
- 98 Ellis, H. M., Yu, D., DiTizio, T. & Court, D. L. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6742-6746, doi:10.1073/pnas.121164898 121164898 [pii] (2001).
- 99 Brüssow, H., Canchaya, C. & Hardt, W.-D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **68**, 560-602, doi:10.1128/mmbr.68.3.560-602.2004 (2004).
- 100 Sharan, S. K., Thomason, L. C., Kuznetsov, S. G. & Court, D. L. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nat. Protoc.* **4**, 206-223, doi:10.1038/nprot.2008.227 (2009).
- 101 Swaminathan, S. *et al.* Rapid engineering of bacterial artificial chromosomes using oligonucleotides. *Genesis* **29**, 14-21 (2001).
- 102 Subramanian, K., Rutvisuttinunt, W., Scott, W. & Myers, R. S. The enzymatic basis of processivity in λ exonuclease. *Nucl. Acids Res.* **31**, 1585-1596 (2003).
- 103 Little, J. W. An exonuclease induced by bacteriophage λ . II. Nature of the enzymatic reaction. *J. Biol. Chem.* **242**, 679-686 (1967).
- 104 Cassuto, E. & Radding, C. M. Mechanism for the action of lambda exonuclease in genetic recombination. *Nature New Biol.* **229**, 13-16 (1971).
- 105 Zhang, J., McCabe, K. A. & Bell, C. E. Crystal structures of λ exonuclease in complex with DNA suggest an electrostatic ratchet mechanism for processivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 11872-11877, doi:1103467108 [pii]10.1073/pnas.1103467108 (2011).
- 106 Passy, S. I., Yu, X., Li, Z., Radding, C. M. & Egelman, E. H. Rings and filaments of beta protein from bacteriophage lambda suggest a superfamily of recombination proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96**, 4279-4284 (1999).
- 107 Erler, A. *et al.* Conformational adaptability of Red β during DNA annealing and implications for its structural relationship with Rad52. *J. Mol. Biol.* **391**, 586-598, doi:10.1016/j.jmb.2009.06.030 (2009).
- 108 Singleton, M. R., Wentzell, L. M., Liu, Y., West, S. C. & Wigley, D. B. Structure of the single-strand annealing domain of human RAD52 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13492-13497 (2002).
- 109 Kagawa, W. *et al.* Crystal structure of the homologous-pairing domain from the human Rad52 recombinase in the undecameric form. *Mol. Cell.* **10**, 359-371 (2002).
- 110 Mortensen, U. H., Bendixen, C., Sunjevaric, I. & Rothstein, R. DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10729-10734 (1996).
- 111 Iyer, L. M., Koonin, E. V. & Aravind, L. Classification and evolutionary history of the single-strand annealing proteins, RecT, Redbeta, ERF and RAD52. *BMC Genomics* **3**, 8 (2002).

- 112 Ploquin, M. *et al.* Functional and structural basis for a bacteriophage
homolog of human RAD52. *Curr. Biol.* **18**, 1142-1146,
doi:10.1016/j.cub.2008.06.071 (2008).
- 113 Scaltriti, E. *et al.* Deciphering the function of lactococcal phage λ Sak
domains. *J. Struct. Biol.* **170**, 462-469,
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2009.12.021> (2010).
- 114 Lopes, A., Amarir-Bouhram, J., Faure, G., Petit, M.-A. & Guerois, R. Detection
of novel recombinases in bacteriophage genomes unveils Rad52, Rad51 and
Gp2.5 remote homologs. *Nucl. Acids Res.* **38**, 3952-3962,
doi:10.1093/nar/gkq096 (2010).
- 115 Lloyd, J. A., McGrew, D. A. & Knight, K. L. Identification of residues important
for DNA binding in the full-length human Rad52 protein. *J. Mol. Biol.* **345**,
239-249, doi:10.1016/j.jmb.2004.10.065 (2005).
- 116 Kagawa, W. *et al.* Identification of a second DNA binding site in the human
Rad52 protein. *J. Biol. Chem.* **283**, 24264-24273 (2008).
- 117 Mythili, E., Kumar, K. A. & Muniyappa, K. Characterization of the DNA-
binding domain of beta protein, a component of phage λ Red-pathway, by
UV catalyzed cross-linking. *Gene* **182**, 81-87 (1996).
- 118 Wu, Z. *et al.* Domain structure and DNA binding regions of β protein from
bacteriophage λ . *J. Biol. Chem.* **281**, 25205-25214,
doi:10.1074/jbc.M512450200 (2006).
- 119 Stasiak, A. Z. *et al.* The human Rad52 protein exists as a heptameric ring.
Current biology : CB **10**, 337-340 (2000).
- 120 San Filippo, J., Sung, P. & Klein, H. Mechanism of Eukaryotic Homologous
Recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 229-257,
doi:doi:10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255 (2008).
- 121 West, S. C. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat.*
Rev. Mol. Cell Biol. **4**, 435-445, doi:10.1038/nrm1127 (2003).