

51. ミスマッチ修復系による相同組換え品質管理機構の解明

高橋 達郎

九州大学 大学院理学研究院 染色体機能学講座

Key words : ミスマッチ修復, 相同組換え, DNA 二重鎖切断損傷, ツメガエル卵抽出液

緒言

ワトソン・クリック塩基対は、遺伝情報の複製や DNA 損傷修復を支える、生命の必須動作基盤である。ところが染色体上では、さまざまな原因によりワトソン・クリック塩基対の破綻、すなわち塩基ミスマッチが生じる。興味深いことに、塩基ミスマッチに対する適切な対応は、それらが生じた原因によって大きく異なる。DNA 複製の誤りによって生じるミスマッチは、新生 DNA 鎖上の塩基を修正することで正しく解消される。一方、類似するが同一ではない配列間での組換えによってもミスマッチ塩基が生じるが、これに対する適切な対応は複雑である。たとえば対立遺伝子座間の正しい組換えにおいても、多型由来の少数のミスマッチが生じることがある。この場合、組換えそのものは適切な遺伝子座で起こっているのに、多型に由来するミスマッチを修復することにより、組換えを完了させることが適切である。ところが、配列が類似するが座位が異なる領域間での組換えは、転座や欠失、染色体再編のリスクを伴う。この場合、そもそも組換え試行自体が誤っているため、組換えの中間体を解消し、正しい遺伝子座間での組換えを再試行するのが適切な対応となる。

ミスマッチに対するこれらの異なった応答は、主としてミスマッチ修復 (MMR) システムが統御していることが分かっている [1]。MMR の最初の反応は、MutS 複合体 (真核生物では MutS α および MutS β) によるミスマッチ塩基の認識である。その後、MutS はスライディングクランプに変化し、DNA 上を移動しつつ、DNA 複製エラー修復や組換え時のミスマッチ修正のためにはヌクレアーゼを、誤った組換えの抑制のためにはヘリカーゼを呼び込むと考えられている [2~4]。MMR 遺伝子の変異やサイレンシングは 10~40% 程度の孤発性がんに見られ、また MMR 遺伝子の遺伝性欠損は家族性高発がん症候群であるリンチ症候群を引き起こす [5]。従って、MMR システムによるゲノム品質管理は生物学的興味の対象であるにとどまらず、ヒトの健康と医療にも密接に関係している。

本研究では、ツメガエル卵核質抽出液を利用して一本鎖アニーリング (SSA) 経路による相同性依存的修復を試験管内再現することに成功し、類似配列間での SSA が MutS α に依存して抑制される事を示した。この抑制は、アニーリング反応の著しい速度低下を伴っていたことから、MutS α は相同性依存的なアニーリング反応と拮抗して類似配列間の SSA を抑制しているものと考えられた。

方法

1. ツメガエル卵核質抽出液の作製

ツメガエル卵核質抽出液 (NPE) の作製は Walter らの方法 [6] に従った。以下に概要を簡潔に述べる。ツメガエル卵を採卵し、ゼリー層をシステインによって還元して除去した後、遠心分離によって細胞質粗抽出液 (LSS) を得た。LSS にツメガエル精子核を加え、ATP 存在下で 90 分から 120 分、22°C で保温して疑似核を形成させた。疑似核を遠心分離によって集めて回収し、さらに超遠心分離によってクロマチン、核膜成分と核質タンパク質を分離し、核質タンパク質層 (NPE) を回収、液体窒素によって凍らせ、-80°C に保存した。ツメガエルの飼育および扱いについては、九州大学の動物実験規定に従った。

2. 一本鎖アニーリング (SSA) 反応の試験管内再現系

相同領域をタンデムに持つプラスミド DNA を作製し、これを NPE に $20 \text{ ng } \mu\text{I}^{-1}$ となるように加えて 22°C で保温した。一定時間後にサンプリングし、Proteinase K 処理および Phenol/Chloroform 抽出によって DNA を精製した。精製 DNA は TBE アガロースゲル電気泳動によって分離し、SYBR Gold によって染色した後 Amersham Typhoon imager を用いて解析した。電気泳動像解析には Image J ソフトウェアを使用した。

結果

1. SSA の試験管内再現

SSA は相同性依存的修復の一経路であり、相同領域がタンデムに存在する場合、相同領域の間での二重鎖切断損傷を修復する際に起こる。出芽酵母においては、類似配列間の SSA が MutS α 依存的に抑制される事が知られており [3]、類似配列間の相同性依存的修復モデル系としての有用性が実証されている。また、ツメガエル卵抽出液中で SSA を再現した報告がある [7]。そこで 420 bp の相同領域をタンデムに持つプラスミド DNA を作製し、リピートの間で切断した後 NPE に加え、DNA に起こる変化を観察した。結果の一例を図 1 に示す。非同末端結合 (NHEJ) によって再結合された分子に加え、もとの分子よりも分子量の小さい分子が観察された。この分子はリピートを一個失っていることから、SSA によって生じたものと考えられた。詳細な解析から、このモデル基質の修復経路の約 60% 程度が SSA によるものであることが分かった。

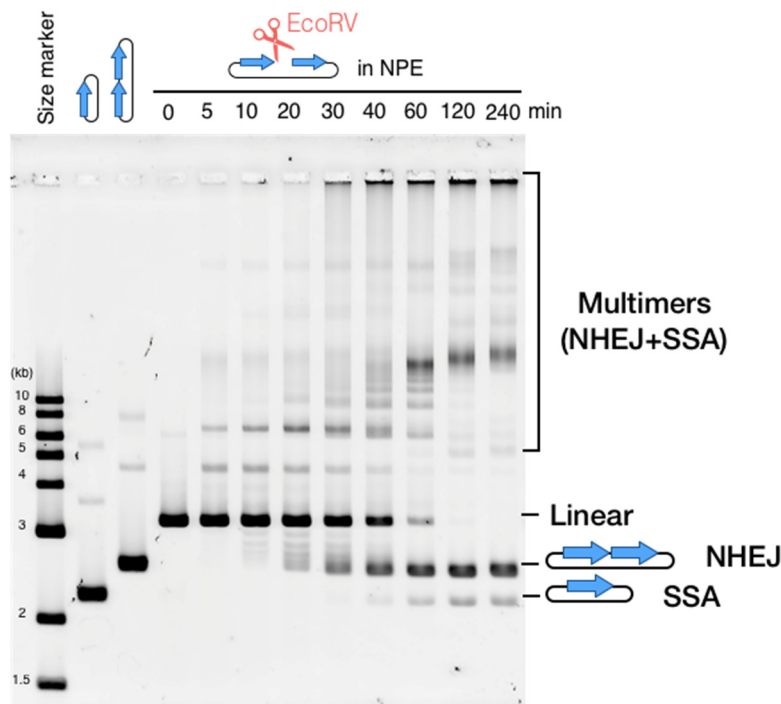


図 1. SSA の試験管内再現

EcoRV 制限酵素サイトをはさんで 420 bp のリピートを有する 3.2 kb のプラスミド DNA を EcoRV で切断し、NPE に加えて保温した後、DNA を精製し、アガロースゲル電気泳動によって解析した。末端再結合によって生じた分子が観察され、分子量からその一部は SSA によるものと推定された。

2. 類似配列間の SSA は MutS α によって抑制される

類似配列間の SSA を再現するため、リピートのひとつにつき約 8% の塩基置換を導入したところ、SSA 効率の大幅な減少が観察された。この減少が単に相同性の低下による SSA 効率の低下によるものか、それともミスマッチ修復システムの制御下にあるものかを区別するため、NPE から Msh6 特異的抗体を用いて MutS α 複合体を免疫除去したところ、類似配列間 SSA の効率が回復した。この回復は昆虫細胞で発現、精製した組換え MutS α 複合体を系に加え戻すことで失われたことから、MutS α に依存した反応によって類似配列間の SSA が抑制されていることが示された。

3. 類似配列間の SSA 抑制は反応の大幅な速度低下を伴う

この反応の分子メカニズムを解析するため、SSA 産物 DNA を制限酵素によって処理し、抑制中に生じる DNA 分子種を解析した。SSA の抑制が起こっている反応中では、SSA の完成産物よりもアガロースゲル電気泳動でわずかに遅く泳動される分子種が特異的に蓄積していた。この産物は一本鎖特異的エンドヌクレアーゼに感受性であったことから、構造の主要部分に一本鎖 DNA を含む、組換え中間体であると考えられた。またこの分子種の出現は MutS α に依存していた。これと対応し、SSA 完成産物の出現は同一配列間の SSA と比して著しく遅れること、この遅れは MutS α に依存することも分かった。これらの結果から、MutS α は SSA の、特にアニーリング反応と拮抗して類似配列間 SSA を抑制するものと考えられた。

考 察

類似配列間の相同組換えがミスマッチ修復経路によって阻害されることは、特に出芽酵母の遺伝学的解析から解明されてきた。一方で、その分子メカニズムはほとんどわかっておらず、この主たる理由として類似配列間の組換え抑制を再現する試験管内系が無かったことが挙げられる。本研究では、ツメガエル卵抽出液中での一本鎖アニーリングをモデル系に、MutS α に依存した類似配列間 SSA の抑制反応を初めて試験管内再現し、その分子機構を解析した。

中間体解析から、類似配列間 SSA 抑制が起こる際には組換え中間体の蓄積と組換え反応の大幅な速度低下が観察された。このことは、MutS α に依存した経路によってアニーリング反応が拮抗的に阻害を受けるというモデルでうまく説明できる。出芽酵母においては RecQ ヘリカーゼである Sgs1 が類似配列間組換えの抑制に必要なことが分かっている。これとよく対応し、本研究者も類似配列間組換えを抑制するヘリカーゼ候補を既に得ている。MutS α は DNA ヘリカーゼを SSA 中間体に呼び込み、鎖の引きはがし反応を促進すると考えると、観察結果を整合性よく説明することができる。

ミスマッチ修復因子 MutS α はさまざまな因子の足場となっていることが既に分かっており、本研究者もクロマチンリモデリング因子 Smarcd1 が MutS α によって DNA 上にリクルートされ、クロマチン上での MMR を促進することを既に発見、報告している [8]。Smarcd1 は相同組換え反応の促進因子としても報告されており、クロマチン上で二重鎖切断末端の削り込みを促進すると考えられている [9]。出芽酵母 Smarcd1 は MutS α 相互作用因子である事も報告されている [10]。今後、Smarcd1 を含め、どのような因子が類似配列間の SSA 阻害に寄与するのかを解明すると共に、それらの因子が中間体蓄積にどのような役割を果たすかを明らかにすることで、MMR 系による相同組換え品質管理メカニズムの全貌が見えてくると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院理学研究院染色体機能学研究室の河添好孝博士、坂詰彩大学院生、および大阪大学大学院理学研究科分子遺伝学研究室の升方久夫名誉教授、中川拓郎准教授、織田里美大学院生である。

文 献

- 1) Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):335-46. doi: 10.1038/nrm1907. PubMed PMID: 16612326.
- 2) Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell.* 2006;126(2):297-308. doi: 10.1016/j.cell.2006.05.039. PubMed PMID: 16873062.
- 3) Sugawara N, Goldfarb T, Studamire B, Alani E, Haber JE. Heteroduplex rejection during single-strand annealing requires Sgs1 helicase and mismatch repair proteins Msh2 and Msh6 but not Pms1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(25):9315-20. Epub 2004/06/17. doi: 10.1073/pnas.0305749101. PubMed PMID: 15199178; PubMed Central PMCID: PMCPMC438974.
- 4) Gorman J, Wang F, Redding S, Plys AJ, Fazio T, Wind S, et al. Single-molecule imaging reveals target-search mechanisms during DNA mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(45):E3074-83. Epub 2012/09/27. doi: 10.1073/pnas.1211364109. PubMed PMID: 23012240; PubMed Central PMCID: PMCPMC3494904.
- 5) Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(3):181-94. doi: 10.1038/nrc3878. PubMed PMID: 25673086.
- 6) Lebofsky R, Takahashi T, Walter JC. DNA replication in nucleus-free *Xenopus* egg extracts. *Methods Mol Biol.* 2009;521:229-52. Epub 2009/07/01. doi: 10.1007/978-1-60327-815-7_13. PubMed PMID: 19563110.
- 7) Yan H, McCane J, Toczylowski T, Chen C. Analysis of the *Xenopus* Werner syndrome protein in DNA double-strand break repair. *J Cell Biol.* 2005;171(2):217-27. Epub 2005/10/26. doi: 10.1083/jcb.200502077. PubMed PMID: 16247024; PubMed Central PMCID: PMCPMC2171202.
- 8) Terui R, Nagao K, Kawasoe Y, Taki K, Higashi TL, Tanaka S, et al. Nucleosomes around a mismatched base pair are excluded via an Msh2-dependent reaction with the aid of SNF2 family ATPase Smarcd1. *Genes Dev.* 2018;32(11-12):806-21. Epub 2018/06/15. doi: 10.1101/gad.310995.117. PubMed PMID: 29899141; PubMed Central PMCID: PMCPMC6049510.
- 9) Costelloe T, Louge R, Tomimatsu N, Mukherjee B, Martini E, Khadaroo B, et al. The yeast Fun30 and human SMARCD1 chromatin remodellers promote DNA end resection. *Nature.* 2012;489(7417):581-4. Epub 2012/09/11. doi: 10.1038/nature11353. PubMed PMID: 22960744; PubMed Central PMCID: PMCPMC3493121.
- 10) Goellner EM, Putnam CD, Graham WJt, Rahal CM, Li BZ, Kolodner RD. Identification of Exo1-Msh2 interaction motifs in DNA mismatch repair and new Msh2-binding partners. *Nat Struct Mol Biol.* 2018;25(8):650-9. Epub 2018/08/01. doi: 10.1038/s41594-018-0092-y. PubMed PMID: 30061603.