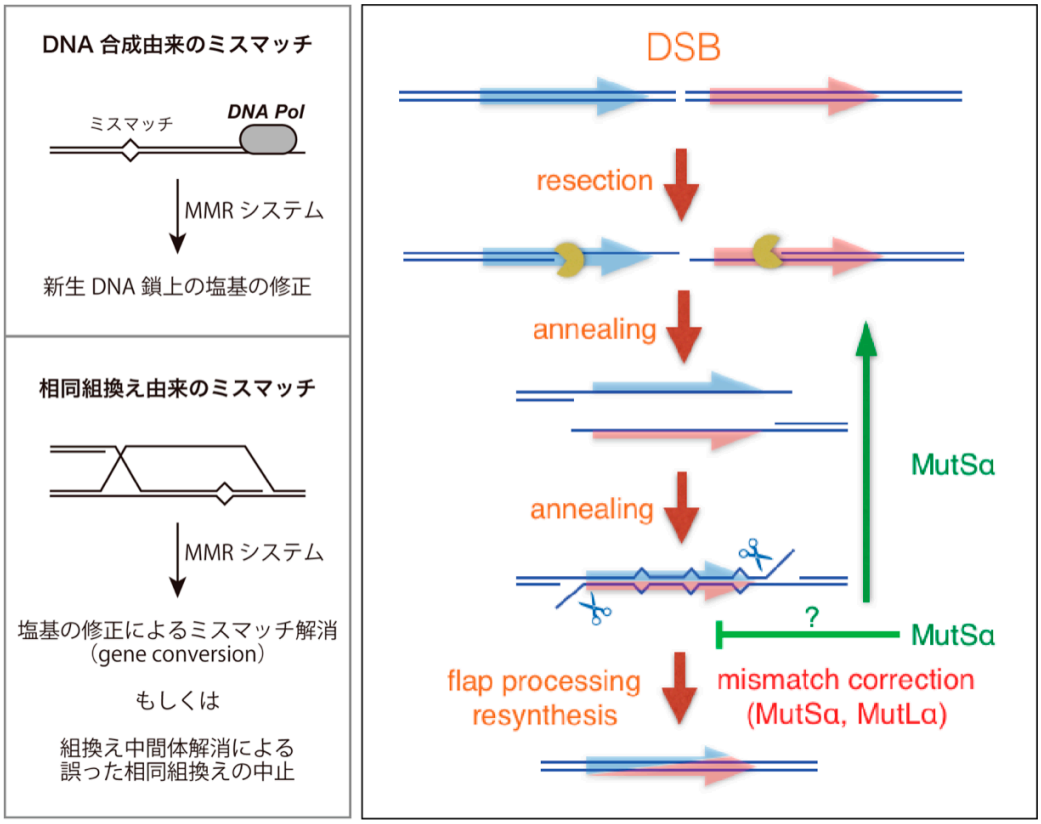
51　ミスマッチ修復系による相同組換え品質管理機構の解明	高橋　達郎

【目的】染色体上では、さまざまな原因により塩基ミスマッチが生じる。DNA 複製の誤りによって生じるミスマッチは、新生 DNA 鎖上の塩基を修正して解消される。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が生じるが、座位が異なる類似配列間での相同組換えは、転座や欠失、染色体再編の原因となる。このような類似配列間の相同組換えは、ミスマッチ認識センサーである MutS 複合体に依存した経路（ミスマッチ修復経路／MMR 経路）によって阻止されることが知られる。MMR 遺伝子の変異やサイレンシングは発がんの原因としてよく知られ、MMR 経路によるゲノム品質管理はヒトの健康と医療にも密接に関係している。本研究では類似配列間の組換えを MMR 経路が抑制する分子メカニズムの解明を目指した。

【方法】ツメガエル卵核質抽出液（NPE）は DNA 合成やミスマッチ修復、相同性依存的修復などさまざまな反応を試験管内で再現可能なモデル系である。本研究では、NPE 中で相同性依存的修復のひとつである一本鎖アニーリングを再現し、類似配列間の一本鎖アニーリング制御に対する MMR 因子の寄与を調べた。

【結果】類似配列間一本鎖アニーリングを試験管内再現することに成功した。一本鎖アニーリング反応は、リピート間の相同性が低下すると著しく減少し、この減少は MutSα ミスマッチ認識複合体に依存していた。類似配列間一本鎖アニーリングの中間体では反応の著しい遅延が見られ、反応中間体と考えられる DNA 分子種が蓄積していた。これらの結果から、MutSα は一本鎖アニーリング反応と拮抗して不正確なアニーリングを阻害しているものと考えられた。

ミスマッチ修復システムによる類似配列間一本鎖アニーリング反応の制御モデル



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で、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ので、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MutSαおよびMutSβ）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MutSα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、MutSα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℃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℃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 ng μl^{-1}となるように加えて22℃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MutSα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。非相同末端結合（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。

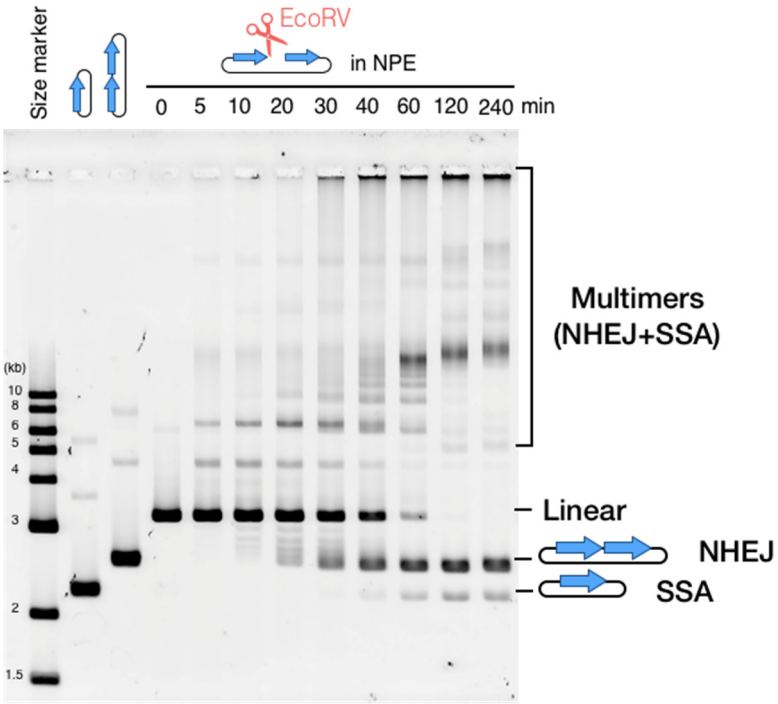


図1. SSAの試験管内再現

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 MutSα 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 MutSα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 MutSα複合体を系に加え戻すことで失われたことから、MutSα 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 MutSα 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 MutSα に依存することも分かった。これらの結果から、MutSα 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、MutSα 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、MutSα 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であることが分かっている。これとよく対応し、本研究者ら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。MutSα 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 MutSα 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、本研究者らもクロマチンリモデリング因子 Smarcad1 が MutSα 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］。Smarcad1 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 Smarcad1 は MutSα 相互作用因子である事も報告されている［10］。今後、Smarcad1 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 Smarcad1. 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 SMARCAD1 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.