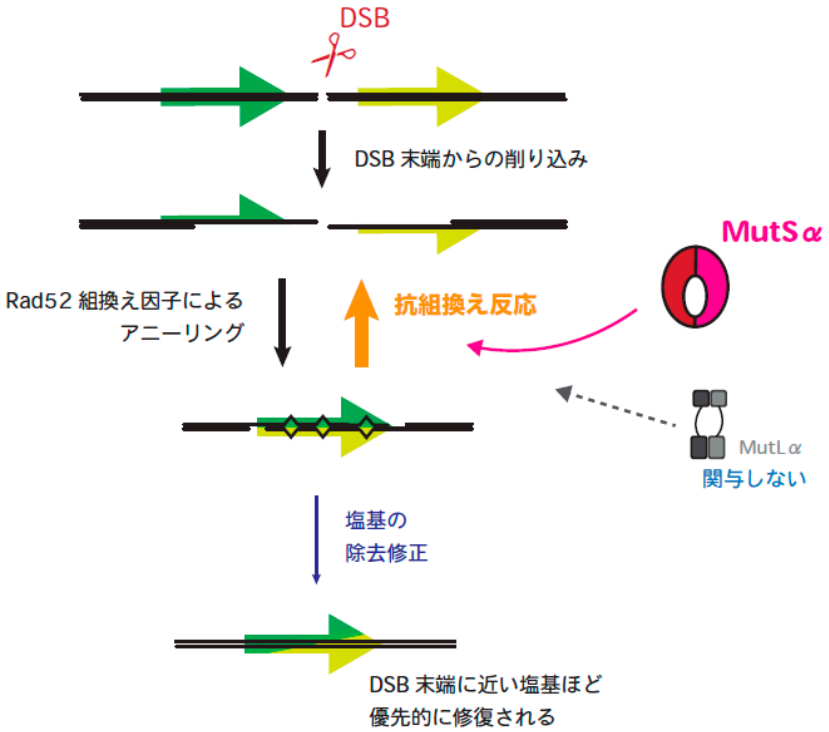
135　合成エラー修復／抗組換え反応の分岐機構の生化学解析	河添　好孝

【目的】細胞内では、さまざまな要因によって DNA の誤対合、ミスマッチが生じる。ミスマッチの生じる原因には、DNA 合成の誤り、もしくは類似するものの相同ではない配列間での組換え、という主に二つの反応が挙げられる。これら二つの反応によって生じたミスマッチは、ともにミスマッチ修復（mismatch repair：MMR）機構によって対処される。MMR 機構は、主要ながん抑制機構の一つであり、その機構の欠損はがん発生頻度の増加やがん細胞の悪性化に繋がる。MMR 機構はミスマッチを認識した後、ミスマッチが生じたそれぞれの原因に応じて異なった対応を取る。しかしながら、それら二つの反応がどのように制御されているのかは未だにわかっていない。本研究では、その制御機構を明らかにすることを目的として解析を行った。

【方法】ツメガエル卵核質抽出液（nucleoplasmic extract：NPE）は、MMR 反応や DNA 二重鎖切断（DNA double strand break：DSB）修復などのさまざまな DNA 修復反応を試験管内で再現する。本研究では NPE を用いて、DSB 修復経路の一つである一本鎖アニーリング（single-strand annealing：SSA）をモデル系として解析を行った。まず我々は、タンデムに配置した相同配列の片方の配列に塩基置換を導入することで相同性を低下させた基質を作製し、類似配列間での SSA を NPE 中で再現した。さらに、SSA による修復産物を精製してサンガー法によるシーケンス解析を行い、類似配列間に生じた DSB を SSA によって修復した産物の配列変化について解析した。

【結果】類似配列間での SSA は、NPE 中で大きく抑制されていた。さらに、その反応はミスマッチを認識する MutSα複合体に大きく依存しており、DNA 合成エラーの修復に必須の MutL エンドヌクレアーゼには依存していなかった。NPE 中で類似配列間の SSA は大きく抑制されていたものの、SSA 反応を完了させる分子も見られた。その分子の塩基配列を解析したところ、DSB 部位の 3′末端に近い塩基ほど優先的に塩基の除去修正を受けることがわかった。

ミスマッチ修復機構による相同組換え反応の正確性を維持する反応の制御モデル



135. 合成エラー修復／抗組換え反応の分岐機構の生化学解析

河添　好孝

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，DNA 二重鎖切断修復，相同組換え，ツメガエル卵抽出液，生化学解析

緒　言

遺伝情報の維持・継承を担う DNA 複製、組換え、修復は、全てワトソン・クリック塩基対を基盤として動作する。一方、細胞内では様々な要因によってワトソン・クリック塩基対の破綻（誤対合塩基、ミスマッチ）が生じる。これらは、ヒトにおいては発がんや遺伝病の原因となる。誤対合塩基は、DNA 合成のエラーや類似配列間での組換えという、大きく異なる二つの反応によって生じる。これら二つの反応を統御しているのはミスマッチ修復（mismatch repair：MMR）機構である［1，2］。MMR 機構は主要ながん抑制機構であり、MMR 因子のサイレンシングや変異などによって、その機能が失われると家族性大腸がんであるリンチ症候群や体質性ミスマッチ修復欠損の原因となる［3］。このように、MMR 機構は遺伝情報の安定維持に非常に重要な機構である。

DNA 合成のエラーによって生じたミスマッチに対する適切な対処は、誤った情報を含む新生 DNA 鎖を識別し、新生鎖を特異的に除去、再合成することである［1］。一方で、異所的な類似配列間における組換えによって生じたミスマッチに対しては、MMR 機構は異なる対処をとる。異所的な組換えは染色体の転座や欠失、染色体再編のリスクに繋がる。したがって、異所的な組換えによって生じたミスマッチに対する適切な対処は、その原因である誤った組換え反応を中止させることとなる。この反応は、anti-recombination もしくは抗組換え反応と呼ばれている。

上記二つの反応は、MutS 複合体（真核生物では認識する塩基の違いによって MutSα もしくは MutSβ が存在する）によるミスマッチの認識によって開始する。その後、MutS はスライディングクランプ型に変化し、DNA 上を移動しつつ、DNA 合成エラー修復のためにはヌクレアーゼを、抗組換え反応のためにはヘリカーゼを呼び込むと考えられている［1，2，4，5］。しかしながら、MMR 機構がこれら二つの反応をどのようにして使い分けられているのかについては、ほぼ理解されていない。これは、主に抗組換え反応の生化学的解析が欠落していることに起因している。

本研究では、ツメガエル卵核質抽出液（nucleoplasmic extract：NPE）を用いて、類似配列間での相同組換えを再現し、抗組換え反応を生化学的に解析した。類似配列間での組換えは MutSα に大きく依存して抑制された。一部の分子は誤った配列間においてもそのまま組換え反応を完了させており、それらの分子では類似配列間での組換え反応の過程で生じたミスマッチを除去、再合成していたことが明らかになった。

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 博士らの方法に従った［6］。ホルモン注射によってツメガエル卵を採取し、ゼリー層をシステインで還元して除去した後、遠心分離によって細胞質粗抽出液（low-speed supernatant：LSS）を得た。LSS にツメガエル精子核を加え、22℃、ATP 存在下で 90～120 分間保温した。形成された擬似核を遠心分離によって回収し、さらに、回収した疑似核を超遠心分離によって、クロマチンと核膜成分、核質タンパク質を分離した。核質タンパク質を回収し、分注後、液体窒素で凍らせ、－80℃で保存した。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（single-strand annealing：SSA）反応の試験管内解析

相同配列もしくは類似配列をタンデムに持つプラスミドを作製した。その配列間を制限酵素で切断、精製後、NPE に 20 ng/μL となるように加え、22℃で保温した。一定時間後にサンプリングし、Proteinase K 処理、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈澱によって DNA を精製した。精製後の DNA は TBE アガロースゲル電気泳動によって分離し、SYBR Gold（Thermo Fisher Scientific 社）で染色した。染色したアガロースゲルは、Amersham Typhoon scanner（Cytiva 社）で検出した。電気泳動の画像は Fiji（National Institutes of Health）を用いて解析した。

3. SSA 産物の配列解析

アガロースゲル電気泳動によって、SSA で修復された産物を分離した後、その断片を切り出し、Gel/PCR エクストラクションキット（日本ジェネティクス株式会社）を用いて精製した。精製産物を PCR で増幅後、増幅産物を pBlueScriptII KS（-）にクローニングし、サンガーシーケンス法で解析した。シーケンスはユーロフィンジェノミクス株式会社の DNA シーケンス受託サービスを利用した。

結　果

1. 類似配列間での SSA 産物の蓄積は NPE 中で大きく抑制される

SSA は DNA 二重鎖切断（DNA double strand break：DSB）が生じた際に、DSB 周辺の塩基配列の相同性を利用して DSB を修復する（相同組換え）経路の一つであり、以下の通りに進行する。二つの相同なリピート配列間に DSB が生じると、切断末端から 5′から 3′方向への塩基の削り込みが生じ、その領域を介したアニーリング、ライゲーションによって反応が進行する（図 1a）。比較的単純な反応が進行するために、良い生化学解析のモデル系となることが期待されるだけでなく、これまでに、出芽酵母を用いた抗組換え反応のモデル系として用いられてきた系でもある［5］。

我々は、類似配列間での SSA を NPE 中で再現するため、タンデムに配置した二つの領域の一方の配列の相同性を 8%低下させた基質を作製した。相同配列、もしくは類似配列を持つ基質のリピート配列間に制限酵素で DSB を導入し、その基質を NPE に加えて反応を開始させた。時間経過を追ってサンプリングした分子をアガロースゲル電気泳動によって分離した。相同配列を持つ基質を用いた解析結果を図 1b、c に示す。NPE 中で非相同末端結合（non-homologous end joining：NHEJ）によって結合された分子に加えて、NHEJ による修復産物よりもサイズの小さい分子の蓄積が 20 分以降から観察された（図 1b、レーン 5）。このサイズの小さい分子はリピート配列を一つ失った DNA 分子（SSA marker）と同じ位置に泳動されたことから、SSA による修復産物であることがわかった。複数の分子間で DSB を修復したと考えられる高分子側に泳動される分子が見られたので、それら分子の修復様式を明らかにするため、相同配列外側の制限酵素サイトで切断した（図 1c）。その結果、相同配列間の DSB は約 60%程度の分子で SSA によって修復されたことが明らかになった。次に、類似配列を持つ基質を NPE で反応させると、相同配列間での SSA 産物の蓄積と比較して、類似配列間での SSA 産物の蓄積量は大きく減少し、類似配列間での SSA は 20%以下に抑えられていた。

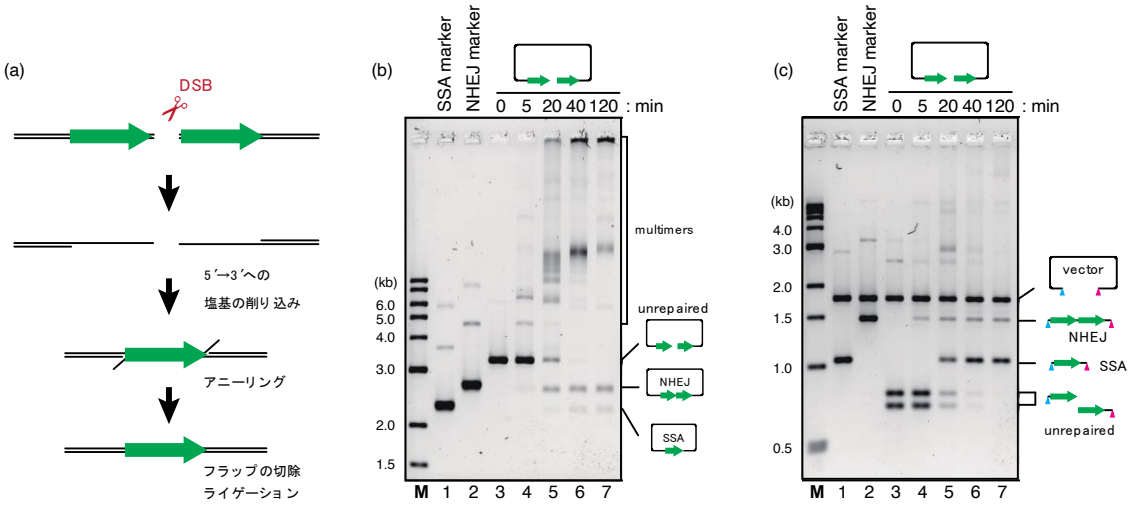


図 1. NPE を用いた SSA 反応の解析結果

a) SSA 反応の概略図。

b) 相同配列間に生じた DSB の修復様式の解析結果。二つの相同領域間に DSB を導入した基質を NPE に加え、22℃で反応させた。図に示す時間で回収後、DNA を精製し、アガロースゲル電気泳動によって分離した。SSA、NHEJ marker はそれぞれの修復様式によって修復された際に予測される DNA 分子のマーカーとして用いている（レーン 1、2）。反応開始後、5.0 kb 以上の位置に泳動される分子が観察され（multimers と表記）、分子間で DSB が修復されている分子の存在が示唆された。

c) b で泳動した DNA を相同配列の外側にある制限酵素サイトで切断し、アガロースゲル電気泳動によって分離した。NHEJ 産物は反応開始後 5 分で見られるのに対して、SSA 産物は 20 分以降に蓄積が見られた（レーン 4〜7）。

2. 類似配列間 SSA は MutSα 複合体によって抑制されるが、MutL 複合体は影響しない

出芽酵母を用いた解析から、類似配列間での組換えは MMR 機構依存的に抑制されることが示されている [5]。類似配列間における SSA の抑制が MMR 機構によるものか明らかにするため、まず MutSα を構成するサブユニットである Msh6 に対する特異的な抗体を用いて NPE から MutSα を免疫除去した。Msh6 を免疫除去すると、類似配列間 SSA の抑制が解除された。さらに、そこに精製 MutSα を加え戻すと類似配列間での SSA 反応の抑制が再び観察された。また、DNA 合成エラー修復に必須因子である MutLα 複合体の構成因子である Mlh1 に対する特異的な抗体を用いて NPE からの免疫除去を行った（真核生物には MutLα／β／γ の 3 種類の複合体が存在するが、すべての複合体で Mlh1 を共通してもつため、すべての複合体を NPE から除去している）。MutSα の場合と異なり、MutL を免疫除去しても、類似配列間の SSA は抑制されたままであった。以上の結果は、MutSα に依存するものの、MutL とは別経路の反応によって類似配列間の SSA が抑制されることを示す。

3. 類似配列間 SSA は生じたミスマッチ塩基を除去修正して反応を進行させる分子が存在する

類似配列間での SSA は大部分が抑制されたものの、一部の分子はそのまま反応が進行し SSA 産物が生じた。類似配列間における修復において、SSA によって修復された産物における塩基修正の効率を解析するために、SSA 産物のシーケンス解析を行った。我々の解析系では、類似配列間でのアニーリングによって 33 個のミスマッチが生じる。それらのミスマッチごとに、どちらの塩基が修復されたかを解析した。アニールしたヘテロ二重鎖では、DSB 部位の 3′ 末端に近い塩基ほど優先的に塩基修正を受ける傾向がみられた。この塩基修正は MutSα を NPE から免疫除去するとほとんど見られなくなったことから、類似配列間の SSA においても反応が進行した分子は、MMR 機構に依存した塩基除去修復を受けていたことがわかった。

考　察

MMR 機構による DNA 合成エラーの修復や誤った組換え反応の阻止は、大腸菌からヒトまで広く保存された遺伝情報の安定維持に非常に重要な機構である［1，2］。DNA 合成エラー修復の分子メカニズムの解明は、数々の試験管内再構成系や生化学解析系の構築によって詳細に解析が進められてきた［1，4］。一方で、誤った組換えを阻止する抗組換え反応については、出芽酵母を用いた遺伝学的解析が主であったために、理解が大きく立ち遅れている。これまでに、大腸菌での抗組換え反応の試験管内再構成の例はあるものの、真核生物での抗組換え反応においては、MutSαが類似配列間でのアニーリングによって生じたヘテロ二重鎖を認識する過程の試験管内再現にとどまっている［2，7～9］。本研究では、我々がこれまでに構築した生化学解析系を用いて、抗組換え反応の詳細な分子メカニズムの解明を行った。

NPE を用いて試験管内再現した類似配列間での SSA 反応は、MutSαに依存して大きく抑制されていた。一方で、DNA 合成エラー修復に必須因子である MutLαエンドヌクレアーゼは、類似配列間での SSA の抑制に対する関与は見られなかった。出芽酵母を用いた先行研究においても、MutLαのサブユニットである Pms1（真核生物における Pms2）は抗組換え反応に関与しない。一方で、大腸菌 RecQ ヘリカーゼホモログである Sgs1 ヘリカーゼが、抗組換え反応に重要であることが示されている［5］。我々の解析においても、類似配列間での組換え抑制に大きく寄与するヘリカーゼの特定に至っており、加え戻し実験や変異体を用いた解析による重要ドメインの特定にも成功している。これら解析から、MutSαによって呼び込まれるヘリカーゼによって、類似配列間でのアニーリングの結果生じたヘテロ二重鎖が引き剥がされることが、類似配列間での誤った相同組換えを抑制するために重要であると考えている。

類似配列間での SSA は NPE 中で大きく抑制された一方で、そのまま SSA が進行する分子も観察された。その分子の塩基配列を解析したところ、DSB 部位の 3′末端に近い塩基ほど優先的に塩基修正を受ける傾向がみられ、その反応は MutSαに大きく依存していた。今後は、SSA 産物の末端にアダプター配列などの人工的な認識配列を付加することで、生じたヘテロ二重鎖の両鎖を対応付けて解析したい。

本研究の解析結果から、NPE 中での反応過程において生じるなにかしらの要素が、DNA 合成エラー修復と抗組換え反応を制御すると予測される。配列解析の結果をふまえると、反応過程における組換え反応特有の DNA 構造やミスマッチの局在などが要素の候補として考えられる。実際、出芽酵母の解析では、3′末端の非相同領域が抗組換え反応を強く誘導することが示されており、DNA 構造は二つの反応を制御する有力な候補である［10］。今回、NPE を用いて類似配列間での SSA 反応、その抑制機構の再現とその配列解析の系が構築できたことで、今後は、DNA 構造などに着目しながら、反応過程において生じるどの要素が二つの反応を制御するのか明らかにしていきたい。

共同研究者・謝辞

本研究における共同研究者は、九州大学大学院理学研究院染色体機能学研究室の高橋達郎教授、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。また、本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く御礼申し上げます。

文　献

1） Jiricny J. Postreplicative mismatch repair. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5(4):a012633. Epub 2013/04/03. PubMed PMID: 23545421. DOI: 10.1101/cshperspect.a012633.

2） Spies M, Fishel R. Mismatch repair during homologous and homeologous recombination. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015;7(3):a022657. Epub 2015/03/04. PubMed PMID: 25731766. DOI: 10.1101/cshperspect.a022657.

3） Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. Nat Rev Cancer. 2015;15(3):181-94. Epub 2015/02/13. PubMed PMID: 25673086. DOI: 10.1038/nrc3878.

4) Constantin N, Dzantiev L, Kadyrov FA, Modrich P. Human mismatch repair: reconstitution of a nick-directed bidirectional reaction. J Biol Chem. 2005;280(48):39752-61. Epub 2005/09/29. PubMed PMID: 16188885. DOI: 10.1074/jbc.M509701200.
5) 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. PubMed PMID: 15199178. DOI: 10.1073/pnas.0305749101.
6) Sparks J, Walter JC. Extracts for Analysis of DNA Replication in a Nucleus-Free System. Cold Spring Harb Protoc. 2018. Epub 2018/05/18. PubMed PMID: 29769389. DOI: 10.1101/pdb.prot097154.
7) Worth L, Jr., Clark S, Radman M, Modrich P. Mismatch repair proteins MutS and MutL inhibit RecA-catalyzed strand transfer between diverged DNAs. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(8):3238-41. Epub 1994/04/12. PubMed PMID: 8159731. DOI: 10.1073/pnas.91.8.3238.
8) Tham KC, Hermans N, Winterwerp HH, Cox MM, Wyman C, Kanaar R, et al. Mismatch repair inhibits homeologous recombination via coordinated directional unwinding of trapped DNA structures. Mol Cell. 2013;51(3):326-37. Epub 2013/08/13. PubMed PMID: 23932715. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.07.008.
9) Honda M, Okuno Y, Hengel SR, Martin-Lopez JV, Cook CP, Amunugama R, et al. Mismatch repair protein hMSH2-hMSH6 recognizes mismatches and forms sliding clamps within a D-loop recombination intermediate. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(3):E316-25. Epub 2014/01/08. PubMed PMID: 24395779. DOI: 10.1073/pnas.1312988111.
10) Anand R, Beach A, Li K, Haber J. Rad51-mediated double-strand break repair and mismatch correction of divergent substrates. Nature. 2017;544(7650):377-80. Epub 2017/04/14. PubMed PMID: 28405019. DOI: 10.1038/nature22046.