

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14671

研究課題名(和文) ミスマッチ修復による合成エラー修復と誤った相同組み換え抑制の統一的理解

研究課題名(英文) A unified understanding of replication error correction and antirecombination mediated by the mismatch repair system

研究代表者

高橋 達郎 (Takahashi, Tatsuro)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：50452420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミスマッチ修復はDNA合成エラーを修復して複製正確性を上げるのみならず、類似配列間の組換えを抑制して相同組換えの正確性を高めるDNA修復機構である。組換え抑制のメカニズムと二つの反応の分岐制御を知るため、本研究では類似配列間の組換え抑制を再現する試験管内系を構築した。本実験ではまずツメガエル卵抽出液にDNA基質を加え、一本鎖アニーリングによる修復を再現した。さらにアニーリング領域間に配列の不一致を導入するとアニーリング反応が著しく抑制され、この抑制にはミスマッチ認識複合体とRecQ型ヘリカーゼが必要であった。今後は本実験系を発展させ、反応過程の解析、および機能する因子の解析を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：The mismatch repair system not only increases the replication fidelity by correcting replication errors but also improves the recombination fidelity by preventing illegitimate recombination. To study how these reactions are branched and how illegitimate recombination is inhibited, we established an in vitro model system that recapitulates the inhibition of recombination between divergent sequences. We induced single-strand annealing repair of DNA double-strand breaks by adding DNA substrates into nucleoplasmic extracts of *Xenopus* eggs and found that sequence divergence between the annealing units significantly reduces the annealing reaction. We also found that the mismatch-recognition complex and a RecQ-family helicase prevent annealing of divergent sequences. This system will be useful to study the recombination intermediates and factors that are involved in the inhibition of illegitimate recombination.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ミスマッチ修復 相同組換え ツメガエル卵抽出液 無細胞系 DNA二重鎖切断損傷

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ミスマッチ修復 (MMR) は、DNA 合成エラーを修復して遺伝情報の複製正確性を高める DNA 修復経路である。高等動物においては突然変異率の上昇が個体の発がんに直結するため、MMR 機構は重要な発がん抑制経路でもある。MMR は DNA 合成エラーの修復に加え、類似するが同一でない配列間での相同性依存的修復を抑制するためにも機能する。この場合、類似 DNA 間の鎖交換によってミスマッチ塩基対 (ヘテロ二重鎖) が生じ、このミスマッチ塩基対が組換えを抑制する起点となると考えられている。この反応は抗組換え反応 (antirecombination) として知られ、バクテリアからヒトまで保存されている。抗組換え反応は、DNA 合成エラー修復と平行して遺伝情報の安定維持に重要な役割を果たす。

(George et al., 2012, Jiricny, 2013)

(2) MMR 経路におけるミスマッチ塩基の修復は、ミスマッチセンサーである MutS 複合体がミスマッチ塩基を認識、結合することで開始する。大腸菌では、MutS の下流で MutL 複合体、UvrD ヘリカーゼなどが機能してエラーを含む DNA 鎖を除去する。また抗組換え反応にも同じセットの因子、MutS、MutL、UvrD が機能する事が知られる。

(3) 真核生物では、MutS ホモログである MutS  $\alpha$  および MutS  $\beta$  の二つのミスマッチ認識複合体が MMR 経路に機能する。DNA 合成エラーの修復経路では、MutS  $\alpha$  (または MutS  $\beta$ ) の下流で MutL  $\alpha$  エンドヌクレアーゼ、Exo1 エキソヌクレアーゼが機能し、エラーを含む DNA 鎖を除去する。大腸菌と異なり、真核生物ではこの過程に DNA ヘリカーゼの寄与は必須でない。一方で抗組換え反応においては、二つの MutS ホモログ複合体の下流で RecQ 型ヘリカーゼが機能し、類似配列間での相同性依存的修復を抑制すると考えられている (Sugawara et al., 2004)。ヒト細胞は 5 つの RecQ ホモログヘリカーゼを持つが、どれが抗組換え反応に機能するかはまだ明確にされていない。

(4) 真核生物において、DNA 合成エラー修復に必要な因子と抗組換え反応に必要な因子が MutS ホモログ以外で異なることは、すなわち二つの反応経路が MutS ホモログの下流で分岐することを意味する。この分岐機構は、MMR が関わる二つの反応の制御機構であり、二つの反応それぞれの素過程に深く関わっているであろう。しかしながら、この制御がどのようなメカニズムで達成されるかについては、ほとんど分かっていない。また、抗組換え反応がどのような反応機構を経て機能するかもよくわかっていない。抗組換え反応の試験管内再現系は確立しておらず、これは上記二つの重要な問題が解決していない理由の一つである。

## 2. 研究の目的

(1) これらの背景を踏まえ、本研究では抗組換え反応の動作原理、および抗組換え反応と DNA

合成エラー修復の分岐機構の解明を目指した。(2) 具体的には、まず抗組換え反応を試験管内でモデル化し、反応中間体や関与する因子の解析を可能とすることを目標とした。

(3) DNA 合成エラー修復反応の試験管内再現系は既に確立されており、本研究者らも独自にこれを再現する試験管内系を構築済みである。そこで次に、DNA 合成エラー修復と抗組換え反応を同時に再現可能な系を確立し、これを用いて二つの反応の分岐機構を明らかにすることを目標とした。

## 3. 研究の方法

(1) ツメガエル卵の核質抽出液 (NPE) は、試験管内で効率よく DNA 合成や修復を再現する実験系である。これまでに、NPE 中で相同組換え因子 Rad51 に依存した相同組換えが起こることも報告されている (Long et al., 2011)。そこで本研究では NPE に制限酵素で切断した DNA 基質を加え、相同性依存的修復の試験管内モデル化を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 類似配列間の相同性依存的修復を試験管内再現するためのモデル系として、本研究では一本鎖アニーリング (SSA) 経路による DNA 二重鎖切断修復に注目した。SSA は DNA 二重鎖切断部位を挟んで両側に相同領域が存在する場合にはたらく相同性依存的修復経路であり、DNA 末端の削り込み、相同部分のアニーリング、DNA 末端のプロセッシングとライゲーションによって進行する (参考: 図 1)。SSA の組換え産物はリピート配列を一つ以上失うため、オリジナルの DNA と容易に区別可能である。また、反応経路が比較的単純であるため、中間体の解析も容易であると考えられた。これに加え、出芽酵母の遺伝学的解析から、SSA 経路による DNA 二重鎖切断修復は、相同領域間に配列の違いが存在する場合、MMR 経路による抑制を受ける事も示されている。

(2) SSA を再現するため、図 1 に示すように 420 bp の相同領域を持たせたプラスミド DNA 基質を作成した。これをリピートの間で切断して NPE に加え、一定時間インキュベートした後、回収してゲル電気泳動により解析した結果を図 2 に示す。導入した DNA 二重鎖切断損傷は、非相同末端結合 (NHEJ) および SSA によって修復されることが期待される。実際に、NHEJ 産物と思われる、もとのプラスミドと同じ大きさの産物は容易に確認された。さらに、SSA 産物と思われる、もとのプラスミド基質よりも小さい DNA 産物が時間経過と共に蓄積していく様子が観察された。これらの産物に加え、分子間での NHEJ あるいは SSA によると思われる多量体 DNA が観察された。これらの産物のうち、どれが NHEJ 産物でありどれが SSA 産物であるかを鑑別する目的で、繰り返し部分を制限酵素により切断して解析したところ、NHEJ と SSA 産物を特定し、産物蓄積の経時変化を追うことができた。NHEJ は DNA 二重鎖切

断修復の第一選択経路と考えられており、非常に速い反応であることが知られる。これと対応し、NPE においても 5 分以内の早い段階から NHEJ 産物が観察された。一方で SSA 産物の蓄積は 20 分頃から始まっており、SSA は NHEJ に比べて遅い反応であることが示された。さらに最終的な産物の量を比べると、NHEJ 産物よりも SSA 産物の方が優勢であることが、再現よく確かめられた。従って、SSA を主たる修復経路とする相同性依存的修復の試験管内再現系を確立することができた。

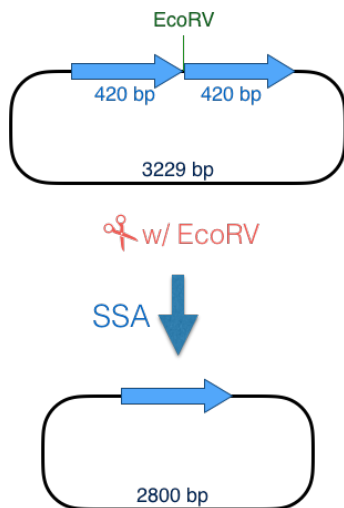


図 1:SSA を再現するための DNA 基質

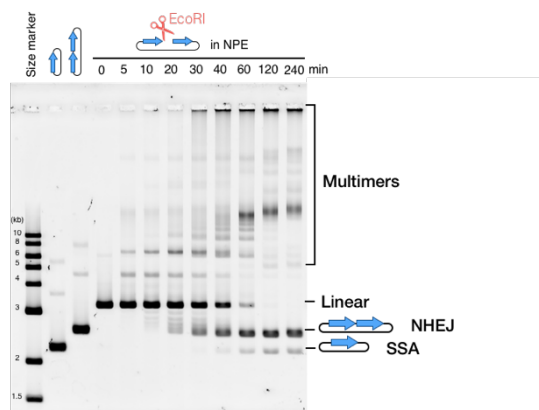


図 2:NPE 中で起こる SSA 反応

(3) 次の重要な問題は、プラスミドの相同領域間に配列の違いを導入した場合、SSA がどのような影響を受けるかであった。これを調べるため、繰り返し配列の一方に、約 4% および 8% の変異を導入した。この DNA を切断して NPE に加えたところ、SSA 産物が顕著に減少することが分かった。さらに、SSA の量が減るだけでなく、SSA 産物の生成が大きく遅れており、早い段階ではアニーリング中間体と思われる DNA 断片も観察された。アニーリングに対する影響は、8% の配列変異を導入した方が顕著

に大きかったため、8% 変異を以下の実験の標準条件と定めた。

(4) もし MMR 機構が機能することでヘテロ二重鎖間の SSA が阻害されるのなら、MMR 因子を除去した NPE においてはヘテロ二重鎖間の SSA が回復するはずである。これを調べるため、鍵となる MMR 因子である、MutS 複合体の免疫除去を行った。真核生物の MutS ホモログには MutS $\alpha$  (Msh2-Msh6) および MutS $\beta$  (Msh2-Msh3) の二つの複合体が存在するが、本研究者が作成した基質の場合は一塩基ミスマッチが生じるため、一塩基ミスマッチを優先的に認識する MutS $\alpha$  が主たる認識複合体として機能すると予想された。そこで、Msh6 に対する抗体を用いて MutS $\alpha$  複合体を NPE から除去したところ、ヘテロ二重鎖間での SSA が、産物の最終的な量、産物生成のタイミング共に顕著に回復した。さらに、バキュロウイルスと昆虫細胞を用いて作成した組換え MutS $\alpha$  複合体を反応に戻したところ、ヘテロ二重鎖間の SSA が再度抑制された。これらの結果は、NPE 中で観察されたヘテロ二重鎖間の SSA は、MutS $\alpha$  の機能によって抑制される事を示している。本実験によって、類似配列間の相同性依存的修復を MMR 機構が抑制する反応 (抗組換え反応) を再現する試験管内系が確立した。(5) 出芽酵母では、RecQ タイプヘリカーゼである Sgs1 ヘリカーゼが抗組換え反応に機能する事が報告されている (Sugawara et al., 2004)。ツメガエルでは RecQ1 から RecQ5 までの 5 つの RecQ ホモログが存在し、そのうちの RecQ1、RecQ2 (Bloom)、RecQ3 (Werner) については、ヒトにおいて MutS $\alpha$  と相互作用することが報告されている (Pedrazzi et al., 2003, Doherty et al., 2005, Saydam et al., 2007)。これらの情報から、ツメガエルでも上記のうちいずれか、あるいは複数の RecQ ヘリカーゼが抗組換え反応を担うことが予想された。そこでこれらの因子に対する抗体を作成し、免疫除去によってヘテロ二重鎖間の SSA に対する影響を調べたところ、免疫除去によって抗組換え反応を失うものを一つ同定した。現在、他の RecQ ヘリカーゼについて確認を進めると同時に、組換えタンパク質を作成して戻し実験を行うことで、同定したヘリカーゼが抗組換え反応を担うことを証明しようとしている。

#### 参考文献

- Doherty, K. M., Sharma, S., Uzdilla, L. A., Wilson, T. M., Cui, S., Vindigni, A., & Brosh, R. M. (2005). RECQ1 helicase interacts with human mismatch repair factors that regulate genetic recombination. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(30), 28085-28094.
- George, C. M., & Alani, E. (2012). Multiple cellular mechanisms prevent chromosomal rearrangements involving repetitive DNA. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 47(3), 297-313.
- Jiricny, J. (2013). Postreplicative Mismatch Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a012633-

a012633.

- Long, D. T., Räschle, M., Joukov, V., & Walter, J. C. (2011). Mechanism of RAD51-Dependent DNA Interstrand Cross-Link Repair. *Science*, 333(6038), 84–87.
- Saydam, N., Kanagaraj, R., Dietschy, T., Garcia, P. L., Peña-Diaz, J., Shevelev, I., et al. (2007). Physical and functional interactions between Werner syndrome helicase and mismatch-repair initiation factors. *Nucleic Acids Research*, 35(17), 5706–5716.
- Sugawara, N., Goldfarb, T., Studamire, B., Alani, E., & Haber, J. E. (2004). Heteroduplex rejection during single-strand annealing requires Sgs1 helicase and mismatch repair proteins Msh2 and Msh6 but not Pms1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(25), 9315–9320.
- Pedrazzi, G., Bachrati, C. Z., Selak, N., Studer, I., Petkovic, M., Hickson, I. D., et al. (2003). The Bloom's syndrome helicase interacts directly with the human DNA mismatch repair protein hMSH6. *Biological Chemistry*, 384(8), 1155–1164.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

(全て査読あり)

- ① Nucleosomes around a mismatched base pair are excluded via an Msh2-dependent reaction with the aid of SNF2-family ATPase Smarcd1.  
Terui R, Nagao K, Kawasoe Y, Taki K, Higashi TL, Tanaka S, Nakagawa T, Obuse C, Masukata H, Takahashi TS  
*Genes Dev. in press*
- ② Regulation of mitotic recombination between DNA repeats in centromeres.  
Zafar F, Okita AK, Onaka AT, Su J, Katahira Y, Nakayama JI, Takahashi TS, Masukata H, Nakagawa T  
*Nucleic Acids Res.*, 45, 11222–11235, 2017
- ③ Sensing and processing of DNA interstrand crosslinks by the mismatch repair pathway.  
Kato N, Kawasoe Y, Williams H, Coates E, Roy U, Shi Y, Beese LS, Schärer OD, Yan H, Gottesman ME, Takahashi TS, Gautier J  
*Cell rep.*, 21, 1375–1385, 2017
- ④ Rad51 and Rad54 promote noncrossover recombination between centromere repeats on the same chromatid to prevent isochromosome formation.  
Onaka AT, Toyofuku N, Inoue T, Okita AK,

Sagawa M, Su J, Shitanda T, Matsuyama R, Zafar F, Takahashi TS, Masukata H, Nakagawa T  
*Nucleic Acids Res.*, 44, 10744–10757, 2017

⑤ PCNA retention on DNA into G2/M phase causes genome instability in cells lacking Elg1.

Johnson C, Gali VK, Takahashi TS, Kubota T, *Cell reports*  
*Cell Rep.*, 16, 684–695, 2016

⑥ MutS $\alpha$  maintains the mismatch repair capability by inhibiting PCNA unloading.  
Kawasoe Y, Tsurimoto T, Nakagawa T, Masukata H, Takahashi TS  
*eLife*, 5, e15155, 2016

[学会発表] (計 7 件)

① 第35回染色体ワークショップ・第16回核ダイナミクス研究会  
類似配列間の相同性依存的組換えを抑制する反応の試験管内再現  
高橋達郎  
2017年12月20日 愛知県西尾市

② 2017年度生命科学系学会合同年次大会  
In vitro analysis of the mismatch-repair-dependent anti-recombination reaction  
高橋達郎  
2017年12月7日 兵庫県神戸市

③ The 6th US-Japan DNA Repair Meeting  
An in vitro model system for functional interaction of mismatch repair with chromatin assembly and homology-directed repair  
高橋達郎  
2017年5月17日 Berkeley, CA, USA

④ 第34回染色体ワークショップ・第15回核ダイナミクス研究会  
ミスマッチ修復依存的なヘテロ二重鎖解消反応の試験管内解析  
ミスマッチ修復依存的なヘテロ二重鎖解消反応の試験管内解析  
高橋達郎  
2017年1月12日 千葉県木更津市

⑤ 第39回日本分子生物学会年会  
In vitro analysis of interplay between chromatin replication, homology-directed repair, and mismatch repair  
高橋達郎  
2016年12月2日 神奈川県横浜市

⑥ The 10th 3R symposium  
Interplay between DNA synthesis, chromatin assembly, and mismatch repair  
高橋達郎

2016年11月17日 島根県松江市

⑦ At the Intersection of DNA Replication and Genome Maintenance: from Mechanisms to Therapy

Chromatin remodeling facilitates eukaryotic mismatch repair by promoting the displacement of nucleosomes around mismatches

高橋達郎

2016年6月30日 Trieste, Italy

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~chromosome/top.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 達郎 (Takahashi, Tatsuro)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：50452420

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

織田 里美 (Oda, Satomi)  
河添 好孝 (Kawasoe, Yoshitaka)  
坂詰 彩 (Sakazume, Aya)  
照井 利輝 (Terui, Riki)