

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15036

研究課題名（和文）相同組換えの正確性制御メカニズムの試験管内再構成による解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms that control the fidelity of homologous recombination using in vitro analyses

研究代表者

河添 好孝（Kawasoe, Yoshitaka）

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：60805422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：相同組換えは、遺伝情報の断裂であるDNA二重鎖切断損傷を正確に修復する、遺伝情報の安定維持に必須の修復経路である。相同組換えでは、塩基配列の相同性を利用して無傷のDNAを探索し、修復に利用する。本研究では、相同組換えの正確性を制御する反応に着目し、精製タンパク質を用いて反応を人工的に再構成することで、その制御メカニズムの解明を目指した。これまでに、反応の再構成に必要と予測される全タンパク質を精製した。それらは全て、内在性タンパク質とほぼ同程度の活性を有していた。さらに反応全体像を理解するために、着目する反応を3つに分割し、それぞれの反応の鍵となる反応まで再構成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ゲノム中にはよく似た配列が多数存在し、それらは誤った組換えの原因となる。相同組換えの正確性の破綻は、染色体異常や染色体喪失などを引き起こし、それらは細胞のがん化や細胞死につながる。一方で、遺伝的な多様性を生み出すためには、ある程度の配列不一致を許容して組換えを行う必要がある。本研究によって、組換えの正確性を制御する反応が理解されれば、基礎科学だけでなく医学的な側面などへも、重要な知見を提供できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Homologous recombination (HR) is one of the important pathways to repair DNA double-strand breaks (DSBs). It utilizes the sequence homology around DSB sites to repair DSBs. In this study, I aimed to elucidate the regulatory mechanisms that control the fidelity of HR by reconstituting the reaction using purified proteins. Up to now, I have purified all the factors predicted to be required for the reconstitution. They have almost the same activities as the endogenous proteins in our biochemical experimental system. I divided the reaction required to control the fidelity of HR into three reactions and reconstituted the key reaction in each reaction.

研究分野：DNA修復・複製

キーワード：DNA修復 相同組換え ミスマッチ修復 DNA二重鎖切断損傷 試験管内再構成 ツメガエル卵抽出液

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝情報の安定維持は、種や個体の維持、発がんの抑制に必須である。相同組換え (homologous recombination: **HR**) は、致命的な DNA 損傷である DNA 二重鎖切断 (DNA double-strand break: **DSB**) を、塩基配列の相同性を利用して正確に修復する重要な修復経路である。HR 反応は、DSB 末端の削り込みと、組換え因子による相同鎖探索によって進行する。しかしながら組換え因子の正確性は十分ではなく、最大で 10~20% 程度異なる配列間においても組換えが起こることが報告されている (Anand et al., *Nature*, 2017)。

(2) 類似配列間において組換えが起こると、組換え中間体にミスマッチ塩基が生じる。中間体上に生じたミスマッチは、MutSα ミスマッチセンサー複合体が認識する (Honda et al., *PNAS*, 2014)。その後、MutSα は DNA ヘリカーゼを呼び込み、生じた中間体を解消し、誤った組換えを中止させ、正しい組換えへと誘導する (Sugawara et al., *PNAS*, 2004)。この反応は抗組換え反応と呼ばれ、組換え配列間に、たった 0.3% の相違がある場合にも機能する (Datta et al., *PNAS*, 1997)。一方で、ミスマッチは、MutLα エンドヌクレアーゼ、PCNA 複製クランプに依存した合成エラー修復に類似した塩基修正を受けることでも解消され、この場合、遺伝子変換を起こす (Sugawara et al., *PNAS*, 2004)。すなわち、抗組換え反応と塩基修正反応の経路切り替え制御、あるいは 2 つの反応のバランス制御は、組換えが許容する配列類似度を定める決定的要素であると予想される。ところが、これら 2 つの反応の制御メカニズムは十分に理解されていない。また、数多くの生化学解析から得られた塩基修正反応の豊富な知見に対し (Jiricny, *CSH perspect Biol*, 2013)、抗組換え反応の生化学解析は乏しく、その分子メカニズムはほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では精製タンパク質を用いて類似配列間での組換え反応、ならびにその組換えの正確性を制御する反応を試験管内再構成することで、抗組換え反応の分子メカニズムの解明、抗組換え反応と塩基修正反応を分岐させる要素の解明、を目指した。

(2) 所属研究室では、ツメガエル卵核質抽出液 (Nucleoplasmic extracts: **NPE**) を用いて、脊椎動物における抗組換え反応の解析を進めている。我々はその解析系を用いて、組換え反応の正確性に影響を与える要素を複数見出している。それらについて本研究で構築する試験管内再構成系を用いて検証していくことで、組換えの正確性を決定づける要素の特定と、その要素によって影響を受けるステップの特定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 組換えの正確性を決定づける反応について解析するためには、類似配列間での組換え反応、誤った組換え中間体の解消反応、塩基修正反応、の 3 つの反応を再構成する必要がある。まず、それぞれの反応への関与が報告されている因子に関して (Spies and Fishel, *CSH Perspect Biol*, 2015)、発現系・精製系の構築を行った。精製したタンパク質については、NPE 系や生化学解析系を用いて活性を解析した。

(2) 上記精製タンパク質を用いて、反応全体の再構成に必要な要素である 3 つの反応をそれぞれ

れ再構成した (Genschel and Modrich, *Mol Cell*, 2003, Dzantiev et al., *Mol Cell*, 2004, Saydam et al., *NAR*, 2007, Saotome et al., *iScience*, 2018などを参照)。その後、それぞれの反応を組み合わせながら反応を最適化していき、最終的に反応全体を再構成することを計画した。また、所属研究室の解析から明らかとなった、組換えの正確性を変化させる要素が、反応の何を変化させているのか詳細に解析することで、類似配列間での組換えとその正確性を制御する要素の解明を目指した。

4. 研究成果

(1) それぞれの反応を再構成するため、昆虫細胞発現系、もしくは大腸菌発現系を用いて、反応に必要なすべての因子の発現、ならびに精製系の構築に取り組んだ。これまでに、すべての因子において、複数種類のカラムを用いて、夾雑物のほとんど含まれないレベルにまで精製した。また、ほぼすべての因子に対し、NPEを用いた加え戻し実験により、内在性タンパク質とほぼ同程度の活性を有することを確認した。NPEへの加え戻し実験ができないタンパク質については、生化学解析系を用いて活性を確認した。

(2) 組換え反応の再構成系として、既存の情報を参考に、組換え因子 Rad52 に依存した組換え反応を再構成した (Saotome et al., *iScience*, 2018 など)。Rad52 に依存した組換え反応は一本鎖アニーリング (Single-strand annealing : SSA) と呼ばれ、所属研究室の NPE を用いた解析においても反応系として利用している。これまでに、Rad52 による類似配列間での組換え反応の再現にも成功し、組換え酵素 Rad51 による既知の情報と一致して (Anand et al., *Nature*, 2017)、Rad52 のみでは、10%程度の配列不一致を許容し、組換え反応が進行することを見出した。

(3) 誤った中間体の解消反応を再現するため、オリゴ DNA を用いて誤った組換え中間体を模した基質を作成し、ヘリカーゼによる中間体の引き剥がしを解析した。私たちはこれまでに、脊椎動物における類似配列間の組換えの抑制を担う因子として、Werner を見出している。これまでに、過去の解析と一致して、Werner が MutSa や一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA を加えることで、そのヘリカーゼ活性が促進されることを見出した (Saydam et al., *NAR*, 2007, Shen et al., *NAR*, 1998, Brosh et al., *JBC*, 1999 など)。

(4) 塩基修正反応には、修復する鎖の特異性を生み出すために、一本鎖断点が試験管内解析において必要である (Holmes et al., *PNAS*, 1990, Thomas et al., *JBC*, 1991)。試験管内の解析では、一本鎖断点のミスマッチに対する位置関係によって必要因子が異なる (Genschel and Modrich, *Mol Cell*, 2003, Zhang et al., *Cell*, 2005, Dzantiev et al., *Mol Cell*, 2004, Constantin et al., *JBC*, 2005)。これまでに私は、全長約 300 bp の基質を用いて、MutLα による鎖特異的な切断 (一本鎖断点がミスマッチの 3'側にある場合) や、ミスマッチ塩基周辺の塩基を除去する ExoI エキソヌクレアーゼによる鎖の削り込みのステップ (一本鎖断点がミスマッチの 5'側にある場合) について再現した。

(5) これまでに、3つの反応において、類似配列間での組換え反応については再構成を完了し、誤った組換え中間体の解消反応や塩基修正反応については、それぞれの鍵となる反応までの再現に成功した。未だ反応効率が悪いため、それらを改善することが喫緊の課題である。しかし、類似配列間での組換えの正確性の解析において、それぞれの鍵となる反応を検出指標として解析を進めていける段階には到達したと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyashita Ryota, Nishiyama Atsuya, Qin Weihua, Chiba Yoshie, Kori Satomi, Kato Norie, Konishi Chieko, Kumamoto Soichiro, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Kawasoe Yoshitaka, Tsurimoto Toshiki, Takahashi Tatsuro S, Leonhardt Heinrich, Arita Kyohei, Nakanishi Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 The termination of UHRF1-dependent PAF15 ubiquitin signaling is regulated by USP7 and ATAD5	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.79013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kawasoe Yoshitaka, Shimokawa Sakiko, Gillespie Peter J., Blow J. Julian, Tsurimoto Toshiki, Takahashi Tatsuro S.	4. 巻 300
2. 論文標題 The Atad5 RFC-like complex is the major unloader of proliferating cell nuclear antigen in Xenopus egg extracts	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105588 ~ 105588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.105588	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tatsukawa Kensuke, Sakamoto Reihi, Kawasoe Yoshitaka, Kubota Yumiko, Tsurimoto Toshiki, Takahashi Tatsuro S, Ohashi Eiji	4. 巻 52
2. 論文標題 Resection of DNA double-strand breaks activates Mre11-Rad50-Nbs1- and Rad9-Hus1-Rad1-dependent mechanisms that redundantly promote ATR checkpoint activation and end processing in Xenopus egg extracts	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 3146 ~ 3163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkae082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河添好孝
2. 発表標題 WernerヘリカーゼとMutL エンドヌクレアーゼは一本鎖アニーリングの正確性を制御する
3. 学会等名 第95回日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河添好孝
2. 発表標題 WernerヘリカーゼとMutL エンドヌクレアーゼは一本鎖アニーリングの正確性を制御する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久持涼子
2. 発表標題 試験管内再構成による抗組換え反応のメカニズムの解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河添好孝
2. 発表標題 WernerヘリカーゼとMutL エンドヌクレアーゼは一本鎖アニーリングの正確性を制御する
3. 学会等名 第27回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上野佳凜
2. 発表標題 エキソヌクレアーゼExo1はミスマッチ指向的な鎖削り込みに必要である
3. 学会等名 第27回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学理学部 染色体機能学研究室ホームページ
<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~chromosome/>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
英国	University of Dundee		
ドイツ	LMU Munchen		