

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：14401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23657114
 研究課題名（和文） 真核生物ミスマッチ修復がクロマチン上で機能するための分子機構の解明
 研究課題名（英文） Reactions required for eukaryotic mismatch repair to function in the context of chromatin
 研究代表者
 高橋 達郎（TAKAHASHI TATSURO）
 大阪大学・大学院理学研究科・助教
 研究者番号：50452420

研究成果の概要（和文）：

ミスマッチ修復は DNA 合成の誤りを修復する機構であり、突然変異、発がんの抑制に重要な役割を果たす。ミスマッチ修復が機能する DNA 合成直後にはクロマチン再形成も起こる。ところがミスマッチ修復機構がクロマチン上で機能するためにどのような反応が必要であるのかはよくわかっていなかった。我々はクロマチン上でミスマッチ修復が機能するために必要な因子の探索を行い、その候補因子を同定した。本研究成果は真核生物ミスマッチ修復の反応機序の理解に貢献する。

研究成果の概要（英文）：

The mismatch repair system corrects replication errors to protect genomic information from mutations. The mismatch repair system functions after DNA synthesis, at the time when chromatin reassembly takes place. However, the reactions required for mismatch repair to function in the context of chromatin remain elusive. We sought factors that are involved in the mismatch repair reaction in the chromatin context, and identified several candidate factors. Our study will contribute to further understanding of the eukaryotic mismatch repair reaction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：DNA 損傷・修復、クロマチン

1. 研究開始当初の背景

DNA 複製や修復反応は、DNA の動的変化だけでなくクロマチンの動的変化（解離・再形成）を伴う（図 1A）。一方で、DNA 複製・修復がクロマチンの動態とどのように協調して機能するのはいまだよく分かっておらず、これらの分野の重要な研究課題となっている。

(1) ミスマッチ修復機構

ミスマッチ修復は DNA 複製エラー（ミスマッチ）を複製後修復する機構であり、遺伝情報の正確な継承に必須の役割を担う。ミスマッチの修復には、正しい情報を持つ鋳型鎖と、誤って合成された新生鎖を区別する必要がある。ミスマッチが生じると、MutS 蛋白質がミスマッチに結合し、その後 DNA 上を

「滑る」ことにより移動して新生鎖のシグナルである DNA 末端を探索すると考えられている (図 1 B) (Kunkel et al., *Annu Rev Biochem*, 2005)。

MutS (真核生物では MutSa および MutSb) はミスマッチを識別後、MutLa 複合体を DNA 上に呼び込む。MutLa はエンドヌクレアーゼであり、新生 DNA 鎖特異的に DNA 一本鎖を切断し、鎖除去反応を誘発する。

(2)クロマチン再形成

一方で、DNA 複製の直後には、複製に伴って解離したクロマチン再形成も起こる (図 1 A)。クロマチン繊維を構成するヒストン 8 量体は、DNA 複製フォークで H2A-H2B 二量体、H3-H4 四量体に分かれ、H3-H4 は複製フォークの後で再度 DNA 上に呼び込まれると考えられている。このときのクロマチン再形成には CAF-1 ヒストンシャペロンが主として機能し、さらに HIRA ヒストンシャペロンは DNA 複製と独立してクロマチン形成に関わる。

(3)ミスマッチ修復とクロマチン形成の相互関係

本研究開始当初、ミスマッチ修復とクロマチン構造との関係については、わずか 2 つの研究しか報告されていなかった。まず、試験管内において、ヌクレオソームが MutSa のスライディングを阻害することが示されていた (Li et al., *J. Biol. Chem*, 2009)。一方で、MutSa に弱いクロマチンリモデリング活性も報告されていた (Javaid et al., *Mol. Cell*, 2009)。これらの報告は全て試験管内での再構成実験に基づくものであり、ミスマッチ修復が起こる複製フォークにおいて、ミスマッチ修復因子とクロマチン再形成反応が、どのように協調的に機能するのかは全く理解されていなかった。

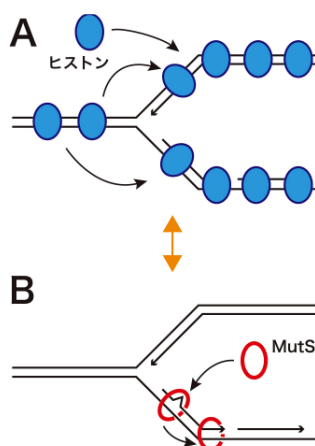


図 1 : 複製フォークでのクロマチン再形成とミスマッチ修復

2. 研究の目的

これらの背景を踏まえ、本研究では、クロマチン形成を試験管内再現するツメガエル卵核質抽出液実験系を用いて、クロマチン形成とミスマッチ修復反応の機能的な相互作用の実体、および、それに必要な因子を明らかにしようとした。この目的のため、次の課題の解決を目指して研究を行った。

- (1)クロマチン上でのミスマッチ修復反応の試験管内再現
- (2)クロマチン上でのミスマッチ修復に関与する因子の網羅的同定と機能解析

3. 研究の方法

(1)クロマチン形成を試験管内で再現する NPE 系

ツメガエル卵抽出液に精子核を加えると、精子核周辺に核膜が形成された後、核輸送を経て DNA 複製、修復やクロマチン形成が起きる。近年、ハーバード大学 Walter 博士らにより、核を多量に集め、核質の可溶成分 (NPE) を得る方法が報告された (Walter et al., *Mol. Cell*, 1998)。NPE は S 期の核内環境を試験管内で機能的に再現し、裸の DNA 上に効率よくヌクレオソームを形成してクロマチン化する。また NPE は多様な DNA 修復反応を試験管内再現することがこれまで示されている。本研究では、NPE を用いてミスマッチ修復関連因子の同定を行った。

(2)ビオチンを用いた DNA の固定

本研究では、NPE 系を用いて、クロマチン上でのミスマッチ修復に関わる因子の網羅的同定を試みた。この目的のため、DNA のセファロースビーズへの固定と NPE からの回収を行った。

- ①ビオチン化オリゴヌクレオチドと一本鎖環状 DNA を調製し、これらを用いて、一ヶ所にビオチン修飾を持つ閉環状二重鎖 DNA を試験管内合成した。
- ②NHS 活性化したセファロースビーズおよび第一級アミンを持つビオチン化合物を用い、ビオチン化セファロースビーズを作成した。
- ③ビオチン化二重鎖 DNA とストレプトアビジンを反応させ、ビオチン・ストレプトアビジン複合体を形成させた。これをさらにビオチン化セファロースビーズと反応させ、DNA とビーズがストレプトアビジンにより架橋された複合体を作成した。

(3)ミスマッチ修復関連因子の網羅的回収

(2)の方法でセファロースビーズに固定した DNA を NPE に加え、一定時間インキュベートした後遠心により回収し、buffer で洗

浄して DNA 結合画分を得た。これを少量に溶出し、SDS-PAGE により分画後、ウエスタンブロッティングもしくは質量分析により解析した。

4. 研究成果

(1)クロマチン上でのミスマッチ修復の再現

NPEにDNAを加えると、ヒストンがDNAに結合して数分以内にクロマチン化が起こる。免疫除去実験から、この時のクロマチン形成は、主としてFDNA合成非依存的なクロマチン形成を促進するHIRAシャペロンの機能によるものであることが分かった。この条件下でミスマッチ修復が機能するかを解析するため、様々な組み合わせの一塩基ミスマッチ、あるいはinsertion/deletion loop (IDLs)を持つDNAにgapを導入し、NPEでのミスマッチ修復効率を検討した。NPEはA:CやG:Tのミスマッチを効率よく(約60-80%)修復し、一般的にミスマッチ修復で直されにくいとされるG:GやC:Cのミスマッチも修復することがわかった。また±5のIDLも修復した。従って、NPEはクロマチン形成が効率よく起きるにもかかわらず、ミスマッチ塩基の修復を効率よく引き起こすことが示された。試験管内ではヌクレオソームがMutSaのスライディングを阻害することが示されているので(Li et al., J. Biol. Chem, 2009)、この結果は、何らかの因子の助けにより、NPE中でのミスマッチ修復が可能になっている可能性を示唆する。

(2)ミスマッチ塩基周辺でのクロマチン除去

NPEがクロマチン形成のみならずミスマッチ修復も効率よく試験管内再現する動作機構を知るため、ミスマッチ修復が起こる場でクロマチン構造に変化があるかを解析した。DNAのスーパーコイルを指標にヒストンの結合量を解析したところ、興味深いことにミスマッチの存在に依存してヒストンの結合が減少することが示唆された。さらにDNAをプルダウンしてヒストンの結合量を直接定量することにより、ミスマッチ塩基の存在によってクロマチン形成が阻害されていることが示された。マイクロコックアルヌクレアーゼを用いたマッピングから、この阻害はミスマッチ塩基周辺で起きていることが分かった。またこの阻害反応は既に形成されたクロマチン構造の解消を伴っていた。これらの結果は、ミスマッチ修復の場では、何らかの補助因子が機能することによってクロマチン構造が解消され、それによってミスマッチ修復が可能になることを示唆する。クロマチン形成はDNA上で起こる反応であるため、そのような補助因子が存在するのであれば、それらもミスマッチ塩基に依存してDNA

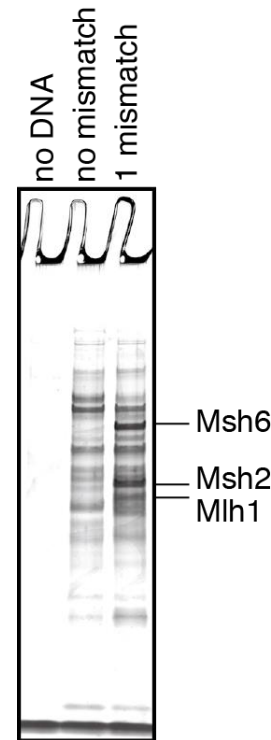


図2：ミスマッチを持つDNAに結合する因子の網羅的探索

に結合することが予想された。

(3)ミスマッチ塩基を持つDNAに結合する因子の網羅的回収

そこで、ミスマッチ塩基に結合する因子の網羅的な同定と解析を試みた。DNAに結合したタンパク質を、3-(3)に示した方法で回収し、銀染色したものを図2に示す。ミスマッチ修復因子であるMsh2およびMsh6はミスマッチの存在に依存してDNAに結合していた。また真核生物MutLのサブユニットであるMlh1のミスマッチ結合も、銀染色、ウエスタンブロットで確かめられた。これらの因子を質量分析計により網羅的に解析したところ(北海道大学小布施力史博士、長尾恒治博士との共同研究)、さらにMutLaのサブユニットであるPms2や、ミスマッチ修復に機能するエキソヌクレアーゼであるExo1などが同定された。さらに多数のDNA修復・クロマチン関連因子がミスマッチの存在に依存してDNAに結合することが示唆された。

(4)ミスマッチ結合因子の機能解析

同定された因子のうち、クロマチン形成に関与することが予想される因子について抗体を作成、あるいは分与していただいてそのDNA結合を解析したところ、MutSaに依存して、MutLa非依存的にDNAに結合する因子が見つかった。この因子をNPEから免疫除去し

たところ、ミスマッチ塩基周辺でのクロマチン除去の効率が低下することが示された。

(5) 結論と展望

本研究から、ミスマッチ塩基の存在と、MutSa の機能に依存して DNA にリクルートされるクロマチン関連因子が見つかった。また、これまで他の DNA 修復経路に必要であることがわかっている因子にも、同じ挙動をするものが複数発見された。これらの成果は、クロマチン上でミスマッチ修復が機能する機構を知るための重要な手がかりになる。また同時に、ミスマッチ修復反応と他の DNA 修復反応の間に、これまで知られていなかったクロストークが存在することを強く示唆する。今後、同定された因子の機能解析、および、より系統的なミスマッチ塩基結合因子の探索が、クロマチン上でのミスマッチ修復反応の理解に重要であると考えられる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 高橋 達郎

Inhibition of chromatin assembly by the mismatch repair system

第二回 日仏がんワークショップ

2012 年 11 月 29 日~2012 年 12 月 01 日

徳島県鳴門市

(2) 高橋 達郎、滝 佳菜恵、照井 利輝、長尾 恒治、中川 拓郎、小布施 力史、升方 久夫
Coupling of DNA mismatch repair and chromatin replication

第 35 回日本分子生物学会年会

2012 年 12 月 10 日~2012 年 12 月 14 日

福岡県福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 達郎 (TAKAHASHI TATSURO)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：50452420