

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01876

研究課題名（和文）ミスマッチ修復システムによる相同組換え品質保証機構の動作原理の解明

研究課題名（英文）Mechanism of a mismatch-repair-dependent quality-control system for homology-directed repair

研究代表者

高橋 達郎（Takahashi, Tatsuuro）

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） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：相同性依存的修復（HDR）はDNA二重鎖切断の修復に重要であるが、類似配列間での異所的なHDRはゲノム不安定性の原因となる。HDRの正確性はミスマッチ修復（MMR）経路によって維持されているが、その詳細な動作原理は大部分未解明であり、またそれらがクロマチン上で機能するしくみも明らかでない。本研究ではツメガエル卵抽出液を用いてHDRを試験管内再現し、その正確性維持に必要な因子を同定、および反応機構を解析した。さらにMMR依存的反応がクロマチン上で働くしくみの一つを解明した。これらの成果は、MMRが関わるHDRおよびDNA複製正確性維持機構の理解を進展させるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノムの塩基配列情報の正確な継承と維持は生物にとって必須であるのみならず、ヒトの健康にも大きく関連する。本研究では、DNAの複製と、DNAの切断修復の二つの反応の正確性維持に重要な「ミスマッチ修復」システムの動作原理を、特に真核生物の染色体基本構造であるクロマチンに注目して解析し、新たなミスマッチ修復補助システムを同定するに至った。またDNA切断修復の正確性維持機構についても関与する因子の同定など、メカニズムの理解が進展した。これらの成果は、基礎生物学における学問的知見を進展させるのみならず、ゲノム不安定性に関連するヒト疾患の理解にも寄与する。

研究成果の概要（英文）：Homology-directed repair (HDR) is critical for the repair of DNA double-strand breaks, while HDR between similar but non-identical sequences can give rise to chromosome instability. The quality of HDR is maintained by the mismatch repair (MMR) pathway. However, the molecular mechanism of these reactions remains largely uncertain. In this study, we recapitulated an HDR reaction in *Xenopus* egg extracts, identified factors that maintain the accuracy of HDR, and studied the quality-control mechanism of HDR. We also discovered a novel mechanism that assists in the MMR reaction on chromatin. These studies contribute to the understanding of the MMR-dependent quality-control system for HDR and DNA replication.

研究分野：分子生物学

キーワード：相同性依存的修復 ミスマッチ修復 染色体安定性 DNA複製 一本鎖アニーリング ツメガエル卵抽出液 試験管内系

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 放射線や化学物質による DNA 二重鎖の切断は、異所的な、すなわち誤った組換えを介して染色体の再編や転座を引き起こし、がんや遺伝病の原因となる。誤った組換えが起こる際には、DNA は類似配列を利用して組換えられるため、ほとんどの場合組換えの中間体に多数の塩基ミスマッチが生じる。興味深いことに、このような誤った組換えは、ミスマッチ修復 (MMR) システムによって抑制されている。

(2) MMR は DNA 合成エラーを修復し、突然変異を抑制する DNA 修復機構としてよく知られる。DNA 合成エラーを修復するには、誤って合成された新生 DNA 鎖の塩基を特異的に修復する必要がある。一方で誤った組換え由来のミスマッチの場合、ミスマッチ塩基の修復と、組換え中間体の解消による組換えの抑制という、二つの異なる下流反応が起こる。たとえば対立遺伝子座での、正常な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が、この場合はミスマッチの修復と組換えの完了が優先される。一方、異所的な組換えの場合は多数のミスマッチが生じることが多く、この場合は組換え中間体の解消が優先的に起こる。このように MMR システムは、ミスマッチがどのような過程で生じたかに応じて適切に下流の応答反応を制御しているが、この重要な制御機構はほとんど理解されていない。

(3) ミスマッチの処理におけるもう一つの重要な問題は、真核生物では全ての反応がクロマチン上で起こることである。上述のようにミスマッチはその形成プロセスに応じて適切に処理される必要があるが、ミスマッチ塩基対のみから形成プロセスを特定することは不可能である。従ってミスマッチに対する適切な応答は、必ずミスマッチ周辺の DNA 構造の識別や探索に依存する。ところが、ヒストンは DNA を強固に巻き付けて修復因子のアクセスや DNA の構造変化を制限する。従って細胞がミスマッチに対して適切に応答するには、MMR システムをクロマチン上で機能させることが必須である。しかしながら、ミスマッチに対する応答がクロマチン上でどのように起こるかは、ほとんど理解されていなかった。

2. 研究の目的

(1) そこで本研究では、MMR が制御する合成エラー修復と類似配列間組換え抑制の、個々のメカニズムおよび分岐経路の制御メカニズムを、特にクロマチン構造との関連に注目して解明することを目指した。

(2) 具体的には、①クロマチン上で MMR 機構が合成エラーを修復するためのしくみ、②MMR 機構が類似配列間組換えを抑制する分子メカニズム、③合成エラー修復と類似配列間組換えの分岐メカニズム、の三点に分けて研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ツメガエル卵の核質抽出液 (Nucleoplasmic extract, または NPE) は、効率よく DNA 合成、ミスマッチ修復、相同性依存的修復、クロマチン形成を起こす、生理的な試験管内実験系である。本研究者は、ミスマッチを一カ所に持つプラスミド DNA を作製し、これを NPE に加えて DNA 合成エラー修復を試験管内再現した。

(2) また相同領域を持つプラスミド DNA を切断して NPE に加え、相同性依存的修復の一経路である一本鎖アニーリング (SSA) を検出した。

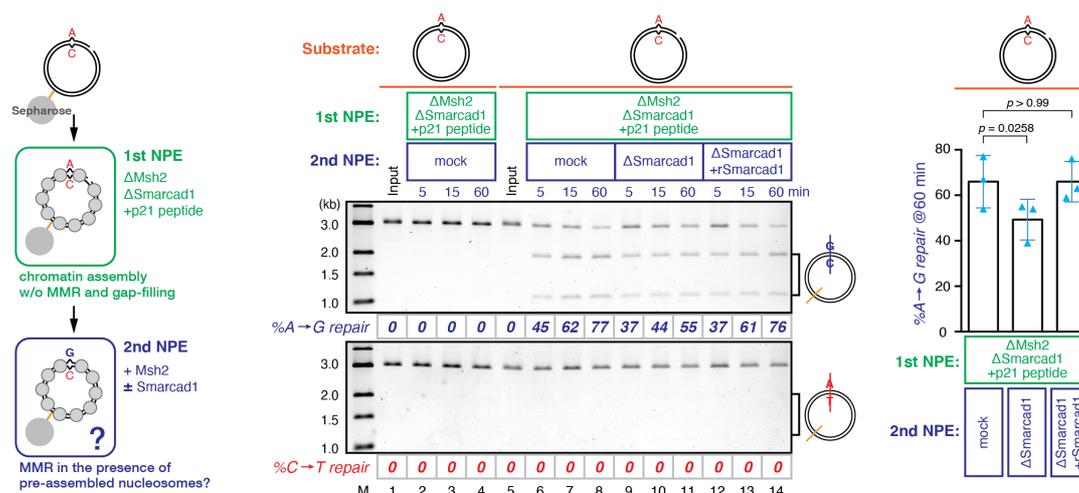
4. 研究成果

(1) この研究の開始までに、本研究者はミスマッチ塩基周辺でヌクレオソームが広範囲に排除されることを発見していた。また、MMR による合成エラー修復がクロマチン上で起こるしくみを解明する目的で、大阪大学の小布施博士らとの共同研究で、ミスマッチを持つ DNA に呼び込まれる因子を網羅的に同定し、SNF2 ファミリーのクロマチンリモデリング因子 Smarcd1 とヒストンシャペロン FACT を候補因子として得ていた。本研究において、これら因子の MMR、およびヌクレオソーム排除への寄与を詳細に調査した。

(2) Smarcd1 を NPE から免疫除去すると、ミスマッチに依存してヌクレオソームが排除される程度が有意に低下した。さらに、Smarcd1 と FACT をともに NPE から免疫除去した場合、Smarcd1 単独除去と比較して、ヌクレオソームの排除がさらに低下した。一方で FACT の単独除去では有意な変化は観察されなかった。これらの結果は、Smarcd1 がヌクレオソーム排除を補助しており、FACT はさらに補助的な役割を担うことを示唆する。

(3) Smarcd1 のミスマッチ修復への影響を調べるため、ミスマッチを持つ DNA を NPE 中でまずクロマチン化させ、その後、鎖特異的な MMR 反応を誘導した。この実験において Smarcd1 を NPE から除去すると、ミスマッチ修復の効率が有意に低下した (図：右のグラフを参照)。さらに、昆虫細胞を用いて発現、精製した組換え Smarcd1 タンパク質を、Smarcd1 を免疫除去した NPE

に加え戻すと、ミスマッチ修復効率が回復した。これらの結果は、Smarcad1 がクロマチン上でのミスマッチ修復を補助する因子である事を強く示唆する。



図：Smarcad1 はクロマチン上でのミスマッチ修復を促進する (adapted from Terui et al., *Genes Dev*, 2018, under the CC BY 4.0 license)

(4) 高知工科大の田中博士らとの共同研究で、出芽酵母を用いて Smarcad1 ホモログ Fun30 の MMR に対する寄与を遺伝学的に調べた。fun30 単独欠失では顕著な表現型が見られなかったが、ミスマッチ修復因子との二重欠失において相乗的な表現型が観察され、Fun30 が MMR 経路に関与することが示唆された。

(5) MMR 経路が相同性依存的修復の正確性を維持する機構を解析する目的で、SSA を用いた実験系を構築し、相同領域にミスマッチを生じるような組み合わせにおいて、SSA の効率が大きく低下する、つまり類似するが同一でない配列間の SSA が抑制されることを見いだした。

(6) このときの SSA 効率の低下は、NPE から MMR 因子 MutS α を免疫除去すると見られなくなった。この結果は、MutS α の関わる反応が、類似配列間の SSA を抑制していることを示す。

(7) さらに、MutS α と同様に、RecQ ファミリーヘリカーゼの一つが類似配列間の SSA を抑制することを見いだした。このヘリカーゼの免疫除去によって類似配列間 SSA の頻度が大きく上昇し、組換えタンパク質の加え戻しによって類似配列間 SSA が抑制された。抑制にはヘリカーゼモチーフが必須であった。従って、この RecQ ヘリカーゼが、ヘリカーゼモチーフを介して SSA を抑制することが強く示唆された。

(8) 類似配列間の SSA が抑制されるメカニズムを詳細に検討した。類似配列間 SSA においては、抑制に関与すると思われる一本鎖 DNA を含む SSA 中間体が蓄積していた。さらに、SSA の最終産物では、配列不一致に由来するミスマッチは多くが修正されていた。したがって、類似配列間の SSA はアニーリングステップで MMR 経路による阻害を受け、反応の進行が抑制されるが、そのステップを越えてアニーリングが進行した場合は、MMR 経路による塩基修正を受け、SSA 完了に至ることが推測された。

(9) さらに、類似配列間 SSA の抑制に必要な DNA 要素、タンパク質要素を探索し、新規反応を含むいくつかの重要な手がかりを得つつある。この点については現在解析が進行中である。

(10) 以上を総括する。クロマチン上でミスマッチ修復を促進する反応については、これまで知られていなかった新規反応を発見、関与する因子を同定し、反応の分子機構を推定するに至った。また相同性依存的修復の正確性維持機構について、新しい試験管内モデル実験系を確立し、関与する因子の同定と反応メカニズムの推定を進めつつある。さらにこれら反応の分岐機構について、重要な手がかりを得るに至っており、この点については現在研究が進行中である。このように、本研究における所期の目的については、相当の部分で十分な成果が得られ、部分的には当初想定した以上の進展が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Terui Riki, Nagao Koji, Kawasoe Yoshitaka, Taki Kanae, Higashi Torahiko L., Tanaka Seiji, Nakagawa Takuro, Obuse Chikashi, Masukata Hisao, Takahashi Tatsuro S.	4. 巻 32
2. 論文標題 Nucleosomes around a mismatched base pair are excluded via an Msh2-dependent reaction with the aid of SNF2 family ATPase Smrcad1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 806 ~ 821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1101/gad.310995.117	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 -
1. 著者名 Ogawa Shiho, Kido Sayuri, Handa Tetsuya, Ogawa Hidesato, Asakawa Haruhiko, Takahashi Tatsuro S., Nakagawa Takuro, Hiraoka Yasushi, Masukata Hisao	4. 巻 37
2. 論文標題 Shelterin promotes tethering of late replication origins to telomeres for replication timing control	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e98997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.15252/embj.201898997	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okita Akiko K., Zafar Faria, Su Jie, Weerasekara Dayalini, Kajitani Takuya, Takahashi Tatsuro S., Kimura Hiroshi, Murakami Yota, Masukata Hisao, Nakagawa Takuro	4. 巻 2
2. 論文標題 Heterochromatin suppresses gross chromosomal rearrangements at centromeres by repressing Tfs1/TFIIS-dependent transcription	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s42003-018-0251-z	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 -
1. 著者名 Zafar F, Okita AK, Onaka AT, Su J, Katahira Y, Nakayama JI, Takahashi TS, Masukata H, Nakagawa T.	4. 巻 45
2. 論文標題 Regulation of mitotic recombination between DNA repeats in centromeres.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 11222-11235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkx763	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 -

1. 著者名 Kato N, Kawasoe Y, Williams H, Coates E, Roy U, Shi Y, Beese LS, Scharer OD, Yan H, Gottesman ME, Takahashi TS, Gautier J.	4. 巻 21
2. 論文標題 Sensing and Processing of DNA Interstrand Crosslinks by the Mismatch Repair Pathway.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1375-1385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.10.032	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

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 高橋達郎
2. 発表標題 真核生物 DNA ミスマッチ修復機構による遺伝情報維持反応の解析
3. 学会等名 国立遺伝学研究所・研究集会「染色体安定維持研究会」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋達郎
2. 発表標題 クロマチン構造上でのDNAミスマッチ修復を促進するメカニズム
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋達郎
2. 発表標題 ミスマッチ塩基に依存したクロマチンリモデリングの試験管内再構成
3. 学会等名 第25回複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋達郎
2. 発表標題 Reconstitution of a chromatin-remodeling reaction that facilitates post-replicative DNA mismatch repair
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋達郎
2. 発表標題 The quality control mechanism of homology-directed repair in Xenopus egg extracts
3. 学会等名 CHROMOSOME DYNAMICS, An international symposium on chromatin and chromosome stability (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋達郎
2. 発表標題 ミスマッチ塩基に依存したヌクレオソームリモデリングの試験管内再構成
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋達郎
2. 発表標題 Msh2-dependent regulation of single-strand annealing between divergent sequences in Xenopus egg extracts
3. 学会等名 The 11th 3R+3C Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋達郎
2. 発表標題 ミスマッチ修復システムに依存した抗組換え反応の試験管内再現による解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋達郎
2. 発表標題 相同性依存的修復の品質管理機構を試験管内再現系によって探る
3. 学会等名 第3回ゲノム編集学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋達郎
2. 発表標題 真核生物ミスマッチ修復の多様な動作を支える分子基盤
3. 学会等名 国立遺伝学研究所・研究会「ゲノムの維持継承を支える分子基盤の包括的理解とその発展」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuro Takahashi
2. 発表標題 An in vitro model system for functional interaction of mismatch repair with chromatin assembly and homology-directed repair
3. 学会等名 The 6th US-Japan DNA Repair Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋 達郎
2. 発表標題 In vitro analysis of the mismatch-repair-dependent anti-recombination reaction
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋 達郎
2. 発表標題 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
3. 学会等名 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
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室web site http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~chromosome/top.html プレスリリース https://www.kyushu-u.ac.jp/f/33515/18_06_22_jp.pdf
--

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
研究協力者	小布施 力史 (Obuse Chikashi) (00273855)	大阪大学・大学院理学研究科・教授 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	長尾 恒治 (Nagao Koji) (60426575)	大阪大学・大学院理学研究科・准教授 (14401)	
研究協力者	田中 誠司 (Tanaka Seiji) (50263314)	高知工科大学・環境理工学群・教授 (26402)	
研究協力者	河添 好孝 (Kawasoe Yoshitaka) (60805422)	九州大学・大学院理学研究院・特任助教 (17102)	
研究協力者	照井 利輝 (Terui Riki) (30845467)	九州大学・大学院理学研究院・学術研究員 (17102)	
研究協力者	坂詰 彩 (Sakazume Aya) (17102)	九州大学・システム生命科学府・大学院生 (17102)	
研究協力者	中川 拓郎 (Nakagawa Takuro) (20324866)	大阪大学・大学院理学研究科・准教授 (14401)	