

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 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：2013～2014

課題番号：25650011

研究課題名(和文) 真核生物のミスマッチ修復反応に関わる因子の網羅的同定

研究課題名(英文) Identification of factors involved in the eukaryotic mismatch repair reaction

研究代表者

高橋 達郎 (Takahashi, Tatsuro)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50452420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物の染色体DNAはヒストンに巻き取られクロマチン構造を取る。クロマチンの動的変換と遺伝情報維持反応の協調は、DNA安定維持機構の重要な研究対象である。ミスマッチ修復は遺伝情報の維持に必須の機構であり、その破綻はヒトでは発がんに直結する。本研究では、試験管内でクロマチン形成を再現するツメガエル卵抽出液を用いて、クロマチン上でミスマッチに結合する因子の探索と解析を行った。結果、これまでミスマッチ修復への寄与が知られていない9の因子を同定し、うち3はクロマチン関連因子であった。本研究成果はクロマチン上でのミスマッチ修復解明に向けての重要な土台となる。

研究成果の概要(英文)：Eukaryotic chromosomal DNA is wrapped around histones to be assembled into chromatin, whose dynamic remodeling is linked to various DNA transactions. The mismatch repair system maintains DNA replication fidelity by correcting replication errors. Impairment of this system thus leads to oncogenesis in human. Here, we sought factors involved in the mismatch repair reaction in the context of chromatin, using *Xenopus* egg extract that promotes chromatin assembly in vitro. We have identified at least 9 factors whose involvements in mismatch repair have not previously been documented, and 3 of which were chromatin-related factors. Having identified these new factors, this work established an important step toward understanding of the mismatch repair reaction on chromatin.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ミスマッチ修復 クロマチン DNA損傷応答 DNA複製 ツメガエル 卵抽出液 試験管内系 DNA修復

1. 研究開始当初の背景

(1)真核生物の染色体 DNA はヒストン 8 量体に巻き取られ、クロマチンとして核内に収納される。クロマチン構造はタンパク質の DNA への接近や結合を阻害するため、DNA 複製や修復を含む多くの DNA 関連反応は、ヒストンの解離、再形成、移動のようなクロマチン動的構造変換を必要とする。しかしながら、これまでの遺伝情報維持反応の生化学的解析は、裸の DNA と精製酵素を用いたシンプルな解析からスタートしており、クロマチンを含む生化学的解析は未だ少数にとどまっている。したがって、クロマチン構造の動的な変換が遺伝情報維持反応とどのように協調するかは、現在の分子生物学研究の重要なトピックとなっている。

(2)ミスマッチ修復 (MMR) は、塩基ミスマッチや小規模な挿入・欠失ループ構造などの DNA 複製エラーを修復する機構であり、遺伝情報の正確な継承や発がん抑制に必須の役割を担う。複製エラーは、正しい遺伝情報を維持する鋳型鎖と誤って合成された新生鎖から構成されるため、新生鎖の同定は MMR の中心反応である。重要な事に、MMR は DNA 合成の直後に機能すると予想され、この時期はクロマチン形成反応が活発に起こる時期とも重なる。

(3)真核生物の MMR 反応は、おおよそ以下のような反応経路を経て進行すると考えられている。まず MutSa/β 複合体がミスマッチ塩基を探索し、結合する。MutSa/β は、MutLa エンドヌクレアーゼをミスマッチ部位に呼びこむ。この複合体は、DNA 上をスライドすることにより移動して、新生鎖に特異的に存在する一本鎖断点などの新生鎖識別シグナルを探索すると考えられている。その後新生鎖識別シグナルの情報をもとに MutLa が活性化され、新生鎖の除去が開始する。

(4)ところが、これらの反応の主要な部分はクロマチン化によって阻害されることが強く予想される。特に MutSa/β 複合体がクロマチン化した DNA 上をスライド可能かどうかについては、否定的な試験管内実験結果が複数存在し、生体内では MutSa/β 複合体のスライド反応を可能にする何らかの補助機構が存在することが強く疑われる。

(5)これに加え、MMR 因子は DNA 相同組換え、二重鎖間架橋 (ICL) 修復、チェックポイント活性化などにも機能することが示唆されている。また遺伝的解析から、MMR の DNA 鎖除去過程では、これまで知られている Exo1 以外に未知の因子も寄与することが示されている。

(6)このように、MMR 反応がクロマチン上で、他の修復経路とも協調して機能する仕組み

は理解が進んでいなかった。特にクロマチンとの関連性においては、クロマチン化を再現する実験系がきわめて限定されていることもあり、クロマチン上での MMR を可能にする機構や因子はほとんど理解されていなかった。

(7)ツメガエル卵抽出液は、クロマチン化を含むさまざまな遺伝情報維持反応を試験管内で効率よく再現する実験系である。本実験系は、これまで細胞周期制御や DNA 複製、修復などのモデル系として広く用いられてきた。一方でこの系での MMR の解析は進んでおらず、これまでに 5 報の論文が発表されているにとどまる。

2. 研究の目的

(1)これらの背景を踏まえ、本研究ではツメガエル卵抽出液を主たるモデル系として採用し、クロマチン化が起こる場で、ミスマッチ DNA に結合する因子を網羅的に探索、同定、カテゴリ分けすることにより、クロマチン上でのミスマッチ修復ネットワークを解明することを目指した。

(2)より詳細には、以下の二点の解明を目標とした。まず、ミスマッチの存在に依存して DNA に結合するクロマチン関連因子を同定し、それらがクロマチン上での MMR の促進にどのように機能するかを、ツメガエル卵抽出液と出芽酵母を用いて、*in vitro*、*in vivo* 両面からの解明を目指した。さらにミスマッチに結合する DNA 修復関連因子については、その DNA 結合の MMR 因子依存性、および MMR 因子との相互作用を解明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) は間期の核内環境を試験管内再現し、DNA 複製、さまざまな DNA 損傷修復、クロマチン形成などを効率よく引き起こす。NPE は、現在知られている中で、もっとも効率よくクロマチン形成を起こす試験管内系である。

(2)ミスマッチ結合因子を NPE から回収するため、ビオチン化した dT 塩基を特定の一カ所に持つ DNA を作成し、これにストレプトアビジン (4 量体であるため 4 箇所のビオチン結合部位を持つ) を結合させた。次に DNA 固定用の担体として、ビオチン化 sepharose HP を作成した。ストレプトアビジン四量体に存在する余剰のビオチン結合部位を利用し、ストレプトアビジンと結合したプラスミド DNA をビオチン化 sepharose HP に固定した。この固定化 DNA 基質は、ビーズと DNA の間に長いスペーサーを持つため、効率よくクロマチン形成、MMR 反応を引き起こす。

(3)セファロース固定 DNA を NPE に加えて反応させた後、結合したタンパク質を回収し、SDS-PAGE により分離した。NPE から MutSa/β あるいは MutLa を除去し、ミスマッチに結合する因子群が、MutSa/β あるいは MutLa に依存してロードされるかを解析した。

(4)ミスマッチ結合因子を質量分析により同定し、抗体を作成、NPE から免疫除去してミスマッチ修復への影響度を調べた。さらに、出芽酵母にホモログが保存されている因子については、出芽酵母株からの遺伝子破壊を行い、突然変異率の上昇を調べることで、ミスマッチ修復への欠損を解析した。

4. 研究成果

(1)ミスマッチ修復因子の回収と同定

ミスマッチ修復因子 Msh2 あるいは Mlh1 特異的抗体を用いて NPE を処理し、MutSa/β、あるいは MutLa を除去した NPE を得た。これにミスマッチ DNA を加え、結合した因子を SDS-PAGE と銀染色によって評価した結果を図 1 に示す。

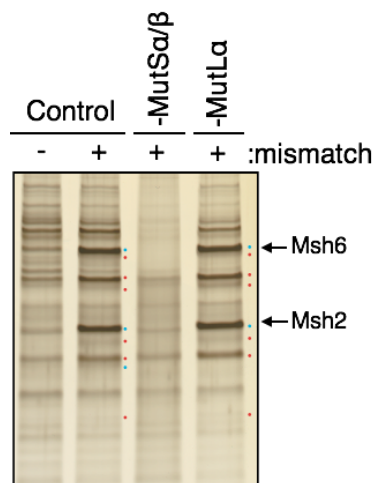


図 1：ミスマッチ結合タンパク質の同定

図 1 に示すように MutSa を構成する Msh2 および Msh6 は、ミスマッチ塩基の存在に依存して容易に同定された。銀染色の結果から、ほとんどのミスマッチ結合因子は MutSa/β に依存して、MutLa には依存せずミスマッチ DNA に結合することが予想された。

(2)北海道大学の小布施力史教授に依頼してミスマッチ結合タンパク質の質量分析と同定を進めていただいた。結果、銀染色から予想されたように、大半のミスマッチ結合性因子は MutSa/β に依存して DNA に結合していた。これらの中には、既知の MutSa/β 相互作用因子である Exo1 や WRN ヘリカーゼなどが含まれていた。

(3)これに加え、相同組換え因子の幾つかや、Ligase III など塩基除去修復因子の一部がミスマッチに呼び込まれることがわかった。さらにクロマチンリモデリング ATPase、ヒストンシャペロンなどが MutSa/β によって DNA に呼び込まれており、それらの中には MMR に関わることが過去に示されていないものが多数存在した。

(4)MMR に関与することが分かっていた損傷修復因子のうち、特に新規性の高いと予想されるいくつかについて特異的抗体を作成し、免疫染色によってミスマッチ結合を検証した。図 2 に一例を示すように、過去に相同組換えに機能することが示されている因子について、ミスマッチ塩基の存在に非常に特異的に DNA にロードされることが示された。この結合は MMR に必須の MutLa を除去した NPE でも維持されていたので、ミスマッチ修復の進行ではなく、ごく初期のミスマッチ認識反応の直後に DNA にロードされていることが予想された。他にも 3 つのクロマチン関連因子について、ミスマッチ塩基特異的かつ MutSa/β 依存的な DNA 結合を確認した。

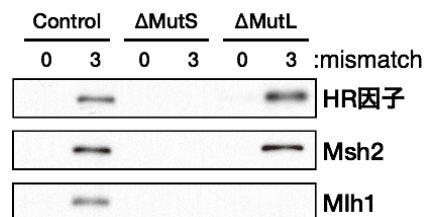


図 2：新規ミスマッチ結合因子の、免疫染色による DNA 結合評価

(6)ミスマッチに呼び込まれるクロマチンリモデリング因子については、出芽酵母でのホモログを破壊して表現形を検討した結果、DNA 複製の正確性が損なわれることを示唆する予備的結果を得た。これについては今後実験を重ねて検証していく予定である。

(7)さらにいくつかの因子についてタンパク質を発現、精製し、MutSa との相互作用を試験管内で検討した。現在までに 2 つの因子について検討を行い、うち 1 因子については、MutSa との相互作用が示された。発現精製する因子の数を増やすとともに、相互作用解析を進めて結合領域や結合の生理的意義などを解析することが、今後の重要な課題である。

(8)本研究において、複数のクロマチン因子を含む多数のミスマッチ結合因子を網羅的に同定した。既知のミスマッチ修復因子や MMR 相互作用因子は、本研究でもほとんど

同定されており、本研究の網羅性が示された。さらに、本研究ではこれまでMMRへの関与が全く報告されていないミスマッチ結合因子を、質量分析のレベルで少なくとも9因子、免疫染色によって確認された因子としては5因子得た。これら5因子については、既に生化学的、あるいは遺伝学的機能解析に着手し、1因子についてはMutSaとの結合を証明した。また興味深いことに、本研究で同定した新規9因子のすべてがMutSa/βに依存して、MutLaには依存せずにミスマッチに結合していた。この結果は、MutSa/βは他の因子の足場として機能すること、MutLaにはそのような機能がないことを強く示唆する。本研究の結果多数の新規MMR関連因子の同定に成功し、今後MMRを中心としたDNA損傷修復ネットワークの理解に向けて重要な進展を得ることができた。

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 3件)

① Sanuki Y, Kubota Y, Kanemaki MT, Takahashi TS, Mimura S, and Takisawa H (2015). RecQ4 promotes the conversion of the pre-initiation complex at a site-specific origin for DNA unwinding in *Xenopus* egg extracts. *Cell Cycle* **14**, 1010–1023. 査読あり doi: 10.1080/15384101.2015.1007003.

② Slenn TJ, Morris B, Havens CG, Freeman RM, Takahashi TS, and Walter JC (2014). Thymine DNA glycosylase is a CRL4Cdt2 substrate. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 23043–23055. 査読あり doi: 10.1074/jbc.M114.574194.

③ Shimada A, Kawasoe Y, Hata Y, Takahashi TS, Masui R, Kuramitsu S, and Fukui K (2013). MutS stimulates the endonuclease activity of MutL in an ATP-hydrolysis-dependent manner. *FEBS J.* **280**, 3467–3479.

[学会発表] (計 10件)

① 照井 利輝, 滝 佳菜恵, 長尾 恒治, 小布施 力史, 升方 久夫, 高橋 達郎、MutSa 依存的なミスマッチ塩基対周辺のヌクレオソーム排除反応、第 37 回日本分子生物学会年会、14 年 11 月、神奈川県横浜市、パシフィコ横浜

② 高橋 達郎, 照井 利輝, 滝 佳菜恵, 長尾 恒治, 中川 拓郎, 小布施 力史, 升方 久夫、MutSa-dependent exclusion of nucleosomes from mismatch sites in *Xenopus* egg extracts、The 9th 3R Symposium、14 年 11 月、静岡県御殿場市、ホテル時之栖

③ 高橋 達郎, 河添 好孝, 釣本 俊樹, 中川 拓郎, 升方 久夫、ミスマッチ修復とクロマチン複製のカップリング、蛋白研セミナー『染色体伝承の分子背景：複製から染色体分離まで』、14 年 9 月、大阪府吹田市、大阪大学蛋白質研究所 1 階講堂

④ 高橋 達郎, 照井 利輝, 滝 佳菜恵, 長尾 恒治, 中川 拓郎, 久保田 弓子, 滝澤 温彦, 小布施 力史, 升方 久夫、MutSa-dependent eviction of nucleosomes around mismatch sites in *Xenopus* egg extracts、International Conference: Replication, repair, and transcription; coupling mechanisms and chromatin dynamics for genome integrity、14 年 2 月、京都市左京区、京都大学 時計台 100 周年記念ホール

⑤ 高橋 達郎、真核生物ミスマッチ修復機構とクロマチン動態、DNA 損傷応答機構のクロストーク、平成 25 年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム、14 年 1 月、東京都千代田区 一橋記念講堂 (学術総合センター)

⑥ 照井 利輝, 滝 佳菜恵, 長尾 恒治, 中川 拓郎, 久保田 弓子, 滝澤 温彦, 小布施 力史, 升方 久夫, 高橋 達郎、ミスマッチ周辺での MutS 依存的ヌクレオソーム除去反応に関わる因子の探索、第 36 回日本分子生物学会年会、13 年 12 月、兵庫県神戸市、神戸国際会議場

⑦ 高橋 達郎, 照井 利輝, 滝 佳菜恵, 長尾 恒治, 中川 拓郎, 久保田 弓子, 滝澤 温彦, 小布施 力史, 升方 久夫、MutSa-dependent eviction of nucleosomes around mismatch sites in *Xenopus* egg extracts、第 36 回日本分子生物学会年会、13 年 12 月、兵庫県神戸市、神戸国際会議場

⑧ 高橋 達郎、真核生物ミスマッチ修復がクロマチン複製の場で機能する機構、国立遺伝学研究所・研究会「クロマチンによる遺伝情報のエピジェネティック制御機構」、13 年 10 月、静岡県三島市、国立遺伝学研究所、日本

⑨ 高橋 達郎、ミスマッチ修復機構がクロマチン複製の場で機能するための機構、国立遺伝学研究所・研究会「染色体 DNA の安定維持の分子メカニズム」、13 年 9 月、静岡県三島市、国立遺伝学研究所

⑩ 照井 利輝, 滝 佳菜恵, 東 寅彦, 中川 拓郎, 升方 久夫, 高橋 達郎、MutSa-dependent eviction of nucleosomes around mismatch sites in *Xenopus* egg extracts、Cold Spring Harbor Laboratory Meeting "Eukaryotic DNA replication & Genome Maintenance"、13 年 9 月、Cold Spring Harbor, NY、Cold Spring Harbor Laboratory, USA

[その他]

ホームページ等

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_we

b/lab_page/masukata/

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：

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

河添 好孝 (KAWASOE, Yoshitaka)
照井 利輝 (TERUI, Riki)