

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840009

研究課題名(和文) DNA高次構造が制御するMre11 complexの新規DNA切断活性の解析

研究課題名(英文) Regulatory mechanism controlling a novel nuclease activity of Mre11 complex on structured DNA

研究代表者

古郡 麻子 (FURUKOHRU, Asako)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：90546293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Mre11 complexはゲノム安定維持機構において中心的な役割を果たすヌクレアーゼ複合体であるが、その働きには未だ不明な点が多い。本研究計画では大腸菌Mre11 complex (SbcCD)のDNA高次構造特異的ヌクレアーゼ活性の解析を行った。当初の予想に反し、DNA高次構造による活性の制御は顕著には見られなかったが、その検証過程において大腸菌Mre11 complexのヌクレアーゼ活性がDNA末端構造によって変化することを見いだした。得られた結果は今後ヒトMre11 complexの酵素活性制御機構や生体内での役割の分子機構の研究を進める上で重要な基礎的知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The Mre11/Rad50 complex has important roles in various genome maintenance pathways. In this research project, we analyzed a novel type of nuclease activity found for Escherichia coli Mre11/Rad50 complex, SbcCD. Unexpectedly, nuclease activities of SbcCD were not significantly affected by a secondary structure on substrate DNA, but we found that the activity of SbcCD is modulated by the presence of DNA end. SbcCD specifically cuts off the top of a cruciform DNA or the end of dsDNA by making incisions on both strands. The finding of this a novel, DNA-end dependent nuclease activity will provide new insights in the future research and may help us understand the role of the Mre11/Rad50 complex in the human cell.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA修復 Mre11 complex DNA二本鎖切断

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の維持伝達は DNA 複製と DNA 修復の二つの機構が担う。この両機構において Mre11 complex (ヒト Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN)、出芽酵母 Mre11-Rad50- Xrs2 (MRX)、古細菌 Mre11-Rad50 (MR)、バクテリア SbcC-SbcD (SbcCD)) が多彩な役割を果たしていることが知られている。Mre11 complex は停止した複製フォークの安定化や再開、テロメアの維持、減数分裂組換えなどにおいて重要な働きを担うほか、DNA 二本鎖切断 (DSB) 末端の認識や相同組換えなどの DNA 修復反応、チェックポイントシグナル伝達など様々な DNA 修復機構で働く事が報告されている。

また Mre11 complex を形成するサブユニットの変異は神経変性や早期発がんを伴う Ataxia telangiectasia-like disorder (Mre11 変異) や Nijmegen breakage syndrome (Nbs1 変異) といった深刻な遺伝性疾患を引き起こす。酵母や古細菌、バクテリアなどでも、Mre11 complex の変異により DSB を引き起こす放射線や変異原性化学物質に高感受性になることや、DNA 複製や減数分裂組換えの異常が高頻度で起こるようになることも良く知られている。

このように Mre11 complex が生体内でゲノム安定維持において必須の役割を果たすことが明らかになってきた一方で、その分子機構については不明な点は多い。例えば相同組換えでは、DSB によって生じた DNA 末端を 5' 側から削り、3' 突出末端を作るプロセス (resection) に Mre11 complex が必須であることが示されているが、反対に Non-homologous end joining では、DNA 末端を他のヌクレアーゼによる分解から保護するために Mre11 complex が必要である。しかしどのように単一の複合体が複数の経路で異なる役割を担うかは解明されていない。

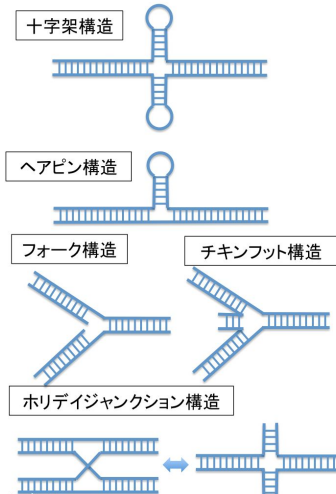
こうした分子レベルでの理解を深めるためには、Mre11 complex の生化学的解析が重要である。Mre11 complex はヌクレアーゼ複合体であり、主な活性としては一本鎖 DNA エンドヌクレアーゼ活性、二本鎖 DNA 3' 5' エキソヌクレアーゼ活性、ヘアピン構造依存のエンドヌクレアーゼ活性を持つことが報告されている。しかし、例えば前述の相同組換えでも、Mre11 complex のエキソヌクレアーゼ活性の方向 (3' 5') と resection の方向 (5' 3') が逆であるなど、その活性についても多くの謎が残り、更なる生化学的解析が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

私たちはこれまで大腸菌内で逆向き反復配列 (パリンドローム配列) が遺伝的不安定性を引き起こす分子機構について調べてきた。Mre11 complex がこの遺伝的不安定性を誘発することが報告されていたことから、大腸菌 Mre11 complex (SbcCD) を精製しその活性を調べたところ、報告されていた活性に加え、逆向き反復配列が形成する DNA 高次構造 (十字架構造) に対して切断活性を示すことを見いだした。更に、その切断様式は既知のヌクレアーゼ活性によるものとは異なっていたことから、何らかの新規ヌクレアーゼ活性により十字架構造 DNA の切断が起きていることが推測された。

そこで本研究計画では、この新たに見いだされた十字架構造特異的な新規 DNA 切断活性について詳細に解析し、その分子機構を明らかにすることを目的とした。また十字架構造の他に、生体内では相同組換えにおけるホリデイジャンクション構造や停止した複製フォークで見られるチキンフット構造などの DNA 高次構造が知られている。そこでこうし

様々なDNA高次構造



た様々な構造を持つ DNA (左図) を基質として用い、Mre11 complex の活性がどのように変化するかを調べることで、Mre11 complex の活性制御機構や生体内での働きの理解を深めることを目的とした。

3. 研究の方法

長い逆向き反復配列 (111-bp 単位) を導入したプラスミド DNA を用いて、十字架構造を形成させた基質 DNA を調製する。大腸菌 Mre11 complex をこの基質 DNA と反応させ、切断様式を詳細に解析する。またその際、シークエンスゲル電気泳動と部位特異的プローブを用いたサザンブロットを組み合わせた高感度な DNA 産物解析法を用いて 1 塩基単位で切断箇所を同定する。

十字架構造 DNA に対するヌクレアーゼ活性の解析が終了した後は、類似の構造を持つ基質 DNA (前頁上図) を用いて切断様式を調べる。様々な高次構造を持つ DNA に対する活性を調べる事で、基質のどのような構造が Mre11 complex のヌクレアーゼ活性を制御するかを調べる。

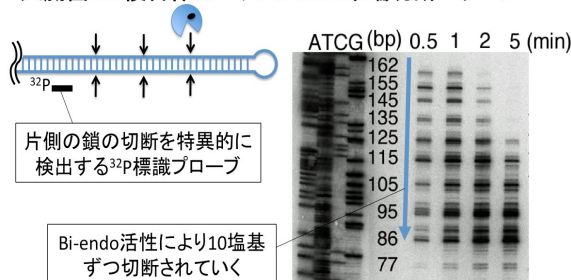
ヌクレアーゼ活性の解析で特異的基質となる DNA 高次構造が判明した場合は、その基質 DNA への結合をゲルシフトアッセイや表面プラズモン共鳴分析法 (Biacore 解析) を用いて調べる。また強い相互作用を示す高次構造 DNA が見いだされた場合は複合体の構造解析を行う。

大腸菌ヒト Mre11 complex 解析が終了した後は、バキュロウイルス発現系を用いてヒト Mre11 complex を発現・精製する。ヒト Mre11 complex を用いて大腸菌と同様の解析を行い、大腸菌 Mre11 complex で見られた活性との共通点、相違点を明らかにする。

4. 研究成果

当初計画した通り、逆向き反復配列によって形成される十字架構造 DNA を用い、大腸菌 Mre11 complex による切断様式を詳細に調べた。その結果、大腸菌 Mre11 complex は十字架構造の先端から ATP 依存的に二本鎖 DNA の両鎖を同時に切断し、10 bp を単位とする短い二本鎖 DNA 断片を産生する、他に類を見ない新規二本鎖 DNA 切断活性 (後述、Bi-endo 活性) を持つ事が明らかとなった (下図)。

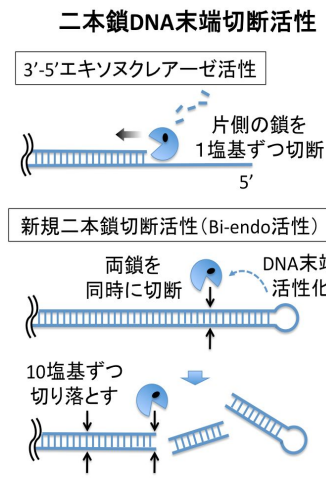
シーケンスゲルとザンブロット法にて検出した大腸菌MR複合体のヘアピンDNA末端切断パターン



どちらの鎖を認識するプローブでも10塩基ラダーが検出された

次に十字架構造 DNA 以外の様々な基質 DNA を用いてヌクレアーゼ活性を調べた。研究計画当初は十字架構造などの高次構造特異的にこの新規活性が見いだされると予想していたが、驚いた事に大腸菌 Mre11 complex は十字架構造 DNA やヘアピン構造 DNA のみならず、コントロールとして使用した高次構造を持たない直鎖状二本鎖 DNA を基質としても同様の新規二本鎖 DNA 切断活性を示した。

1998 年の報告以来、大腸菌 Mre11 complex は 3' -5' エキソヌクレアーゼ活性により直鎖状二本鎖 DNA を切断すると考えられてきた (下図)。なぜこれまでこの新規二本鎖 DNA 切断活性が報告されなかったか調べたところ、



る、基質 DNA 長によって大腸菌 Mre11 complex の活性が劇的に変化し、長い DNA はこの新規活性で、短い DNA は既知の 3' -5' エキソヌクレアーゼ活性により切断されることが明らかとなった。

この新規二本鎖 DNA 切断活性はエンドヌクレアーゼ活性にも関わらず環状二本鎖 DNA は切断せず、DNA 末端依存的に DNA を切断した。その一方で DNA 末端がヘアピンなどでキャップされていても同様に切断する特異な活性であった (上図)。そこでこの活性を DNA end-dependent binary endonuclease activity (Bi-endo 活性) と名付け学術雑誌にて発表 (Lim et al., Nucleic Acids Research, 2015) するとともに、学会等でも報告を行った。

上述のように当初の予想に反して DNA 高次構造は大腸菌 Mre11 complex のヌクレアーゼ活性に大きな影響は与えなかったため、研究計画後半には大きな変更が生じ、予定していた DNA 結合実験や構造解析に代わり Bi-endo 活性の制御機構について調べる様々な生化学実験を実施することとなった。しかしそれらの解析によって得られた研究結果は当初の目的通り、Mre11 complex の性質や働きについて多くの新発見を与えるものであった。また当初計画通りヒト Mre11 complex の発現・精製についても着手し、精製度は高くないものの報告されているヌクレアーゼ活性を示すヒト Mre11 complex の精製にも成功した。これらの研究成果は、今後のヒト Mre11 complex のヌクレアーゼ活性およびその制御機構の分子機構についての研究を進める上で重要な基礎となる研究成果であり、本研究計画については十分に当初目的を達成できたと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Lai P.J., Lim C.T., Le H.P., Katayama T., Leach D.R.F., Furukohri A*, Maki H. (2016), ' Long inverted repeat transiently stalls DNA replication by forming hairpin structures on both leading and lagging strands ', *Genes to Cells*, Vol. 21, No.2, p136-145, doi: 10.1111/gtc, 査読有り (* 責任著者)
2. Lim C.T., Lai P.J., Leach D.R.F., Maki H., Furukohri A*. (2015), ' A novel mode of nuclease action is revealed by the bacterial Mre11/Rad50 complex ', *Nucleic Acids Research*, Vol. 43, No.20, p9804-9816, doi: 10.1093/nar/gkv855, 査読有り
3. Le H.P., Masuda Y., Tsurimoto T., Maki S., Katayama T., Furukohri A*, Maki H. (2015), ' Short CCG repeat in huntingtin gene is an obstacle for replicative DNA polymerases, potentially hampering progression of replication fork ', *Genes to Cells*, Vol. 20, No.10, p817-833, doi: 10.1111/gtc.12275, 査読有り
4. Tan K. W., Pham T.M., Furukohri A., Maki H., Akiyama M.T*. (2015), ' Recombinase and translesion DNA polymerase decrease the speed of replication fork progression during the DNA damage response in Escherichia coli cells. ', *Nucleic Acids Research*, Vol. 43, No.3, p1714-1725, doi: 10.1093/nar/gkv044, 査読有り
5. Ikeda M[§]., Furukohri A[§].*, Philippin G., Loechler E., Akiyama M.T., Katayama T., Fuchs R.P.* , Maki H*. (2014), ' DNA polymerase IV mediates efficient and quick recovery of replication forks stalled at N2-dG adducts. ', *Nucleic Acids Research*, Vol. 42, No.13, p8461-8472, doi: 10.1093/nar/gku547, 査読有り (§ 共同筆頭著者, * 共同責任著者)

[学会発表](計 8 件)

[招待講演]

古郡 麻子, Chew Theng Lim, Pey Jiun Lai, David R.F. Leach, 真木 寿治「Biochemical analysis reveals the novel action of bacterial Mre11/Rad50 complex」日本遺伝学会第 87 回大会,東北大学(仙台市), 9 月 24-26 日 (2015)

[国際学会](計 3 件)

1. Asako Furukohri, Mio Ikeda, Masahiro T Akiyama, Tsutomu Katayama, Robert P Fuchs, Hisaji Maki ' Escherichia coli DNA polymerase IV mediates quick recovery of replication forks stalled at N²-dG adducts ', The 9th 3R symposium, National Institute of Genetics 2014 International Symposium, Gotemba, Japan, Nov 17-21 (2014)
2. Asako Furukohri, Mio Ikeda, Masahiro T Akiyama, Tsutomu Katayama, Robert P Fuchs, Hisaji Maki, ' Escherichia coli DNA polymerase IV mediates quick recovery of replication forks stalled at N²-dG adducts ', Zing Conferences, DNA polymerases: Biology, Diseases and Biomedical Applications Conference 2014, Robinson College, Cambridge, England, August 31-Sep 4 (2014)
3. Asako Furukohri, Mio Ikeda, Masahiro T Akiyama, Tsutomu Katayama, Robert P Fuchs, Hisaji Maki ' Escherichia coli DNA polymerase IV mediates quick recovery of replication forks stalled at N²-dG adducts ', International Conference, Kyoto, 2014 Replication, repair and transcription; coupling mechanisms and chromatin dynamics for genome integrity, Kyoto University, Kyoto, Japan, Feb 4-5 (2014)

[国内学会](計 4 件)

1. 古郡麻子、池田美央、西川義人、秋山昌広、片山勉、Robert P. Fuchs、真木寿治、「大腸菌 Mre11/Rad50 ホモログ SbcCD の新規 DNA 末端依存的二本鎖 DNA 切断活性の生化学的解析」第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、焼津グランドホテル(静岡県焼津市) 10 月 10-21 日 (2015)

2. 古郡麻子、池田美央、秋山昌広、片山勉、Robert P Fuchs、真木寿治、「大腸菌損傷乗り越え型 DNA polymerase IV の複製フォークにおける役割」、第 12 回 21 世紀大腸菌研究会、琵琶湖グランドホテル（滋賀県大津市）、3 月 4-5 日（2015）
3. 古郡麻子、池田美央、西川義人、秋山昌広、片山勉、Robert P. Fuchs、真木寿治、「大腸菌損傷乗り越え型 DNA Polymerase IV の複製フォークにおける役割」、日本遺伝学会第 86 回大会、長浜バイオ大学（滋賀県長浜市）、9 月 17-19 日（2014）
4. 古郡麻子、池田美央、西川義人、秋山昌広、片山勉、Robert P. Fuchs、真木寿治、「大腸菌 Pol IV の働きにより複製フォークは N²-dG DNA 損傷を効率良く乗り越えて進行を続ける」、第 2 2 回複製・組換え・修復ワークショップ、ホテルニュー水戸屋（宮城県仙台市）、11 月 20-22 日（2013）

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

古郡 麻子（FURUKOHR I, Asako）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：90546293