

試験管内再構成による相同組換え反応 正確性制御メカニズムの解明

河添好孝*

In vitro Analysis of Regulations of the Fidelity of Homology-directed Repair

Yoshitaka KAWASOE*

DNA double-strand breaks (DSBs) are the most harmful type of DNA damage. Homology-directed repair (HDR) accurately repairs DSBs using homologous sequences. The accuracy of HDR is ensured by the mismatch repair (MMR) system in addition to recombinase's ability to search the homologous sequence. While HDR among similar but not identical sequences is rejected by DNA helicase (called anti-recombination or heteroduplex rejection), mismatches on the HDR intermediate are also strand-specifically corrected by the MutL α endonuclease-dependent pathway. However, molecular details of regulations of the balance between DNA helicase-mediated-rejection of intermediates and MutL α -mediated strand-specific mismatch correction have been unelucidated. To unveil the mechanistic detail of regulations of the fidelity of HDR, I aimed to reconstitute both the mismatch correction and the anti-recombination reaction with purified factors. I set up *in vitro* model systems recapitulating MutL α -dependent mismatch correction, Rad52 recombinase-dependent HDR, and DNA helicase-dependent heteroduplex rejection. Although these analysis systems are needed to be improved, these systems will serve the complete reconstitution of both mismatch-correction and anti-recombination during HDR, and lead to an understanding of regulations on homeologous HDR.

1. 研究の背景と目的

DNAは、絶えず内的・外的要因によって損傷を受け続けており、細胞は、生じた損傷を適切に修復する機構を備える。DNA損傷の中でも、DNAを構成する二本の鎖が同じ場所で切断されてしまうDNA二重鎖切断(DSB)は、最も重篤な損傷の一つである。相同性依存的修復(HDR)は、DSB部位の処理によって生じた一本鎖領域を利用してDSB周辺と相同な配列を探索し、その配列を鋳型としてDSB周辺の配列をコピーすることでDSBを繋ぐ。そのため、正確性の高いDSB修復経路として知られる。しかしながら、組換え因子による相同鎖探索の正確性は十分ではなく、10%程度異なる配列間においても組換えが進行することが知られる⁽¹⁾。ヒトではゲノムの50%以上が何らかのリピート配列で構成されているため、類似するが相同ではない配列間での誤ったHDRは、リピート数の変動といった遺伝的問題を引き起こす。

HDRの正確性を維持するためには、組換え因子による配列選択の正確性に加えて、ミスマッチ修復(MMR)システムによる補助が必要である⁽²⁾。類似配列間で組換えが起こると、組換え中間体上にミスマッチを生じる(図1)。組換え中間体上に生じたミスマッチは、ミスマッチセンサーであるMutS α によって認識される。MutS α は、誤ったHDRによって生じたミスマッチだけではなく、DNA合成エラーによるミスマッチも認識し、対処する。DNA合成エラーを修復するためには、MutS α によるミスマッチの認識後、MutL α エンドヌクレアーゼを含む複数のヌクレアーゼによる鎖特異的な塩基の除去修復が必要である(以下、塩基修正反応)。一方で、類似配列間での組換えによって生じたミスマッチに対しては、MutS α による認識後、DNAヘリカーゼが働いて中間体を解消することで、誤った組換えを中止させる(以下、抗組換え反応)。中間体から解消された一本鎖領域は、再度、相同領域の探索に用いられ、

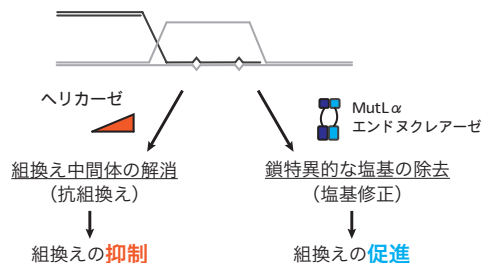


図1 HDRによって生じたミスマッチに対する対処。誤ったHDRによって生じたミスマッチは、ヘリカーゼによる中間体の解消、もしくはMutL α を介した除去修正を受ける。それぞれの反応の結果、類似配列間での組換えの正確性が制御される。

2023年3月3日 受理

* 豊田理研スカラー

九州大学大学院理学研究院生物科学部門

正しい組換えへと誘導されると考えられている。このようにMMRシステムは、ミスマッチの生じた原因に応じて二つの異なる反応経路を切り替えながら反応を進める興味深い機構を備える。

申請者の所属研究室では、脊椎動物における抗組換え反応の責任ヘリカーゼの同定に加え、塩基修正と抗組換え反応が拮抗状態にあり、二つの経路のバランスを変化させることでHDRの正確性が変化することを見出している。本研究では、二つの反応の経路選択やバランス制御のメカニズムを理解するため、精製タンパク質を用いて抗組換え反応と塩基修正反応の両方を同時に試験管内再現することを目指した。

2. 反応の試験管内再現に向けた経過

抗組換え反応と塩基修正反応を同時に解析できる試験管内系の構築に向けて、私は、1) 塩基修正反応、2) 組換え反応、3) 誤った組換え中間体の解消反応、の3つに反応を分けてそれぞれの反応を再構成し、最終的に全ての反応を組み合わせることを計画した。まず本研究に向けて、我々は、昆虫細胞Sf9を用いて、反応の再構成に必要と考えられる因子の大量発現系ならびに、精製法の確立・改良を行なった（一部、大腸菌発現系を含む）。これまでに、非常に高純度の精製標品を得ることができている（図2）。

1) 塩基修正反応

塩基修正には、修復する鎖の特異性を生み出すために、一本鎖断点が必要である。これまでに先行研究^(3,4)を参考に、一本鎖断点を持つ鎖が特異的にヌクレアーゼによる処理を受けるステップまでの再現に成功した。

2) 組換え反応

組換え反応は、反応諸過程が単純で再現しやすいことなどの理由から、HDRの一つの経路である一本鎖アニーリング（SSA）を選択した^(5,6)。SSAは組換え因子Rad52によって触媒される。我々は、精製Rad52によるSSAを再現し、Rad52の配列選択性が低いことも見出した。相補鎖と鋳型鎖の間で相同性を約10%低下させても、鋳型鎖に対して100%相補的なオリゴDNAを加えた場合と同程度のアニーリング効率を示した。

3) 誤った組換え中間体の解消反応

MutS α 、および我々が発見した抗組換え反応の責任ヘリカーゼを用いて、組換え中間体を模した基質上のヘテロ二重鎖を解消する反応の再現に成功した。ヘリカーゼは単独では弱いヘリカーゼ活性しか示さないが、MutS α を加えることでミスマッチ依存的に活性が促進された。さらに、ヘリカーゼと相互作用し、組換えの反応過程においても必要な因子を系に加えることでも、ヘリカーゼの活性が促進されることを明らかにした。

3. 今後の展望

本研究では、研究室の予備知見をもとに、精製タンパク質を用いて抗組換え反応と塩基修正反応の試験管内再構成の検討を行った。全ての反応過程において鍵となる反応の再現はできたと考えている。今後は、特に塩基修正に関する効率を改善することが課題である。本研究において構築した全ての反応条件を組み合わせることで、HDRの反応過程において生じたミスマッチが解消されるメカニズムや、HDRの正確性における抗組換え反応と塩基修正のバランス制御メカニズムに関する理解につながることを期待される。

4. 謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人豊田理化学研究所に心よりお礼を申し上げます。また、本実験の遂行にあたっては、九州大学の高橋達郎教授、大橋英治講師、大学院生の福田翔太氏、久持涼子氏にも数多くのご助言と手助けをいただきました。この場を借りて、お礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Anand, *et al.*, *Nature*, **544** (2017) 377-380.
- 2) Spies and Fishel, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **7** (2015) a022657.
- 3) Dzantiev, *et al.*, *Mol. Cell*, **15** (2004) 31-41.
- 4) Constantin, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **280** (2005) 39752-39761.
- 5) Bhargava, *et al.*, *Trends Genet.*, **32** (2016) 566-575.
- 6) Saotome, *et al.*, *iScience*, **3** (2018) 50-62.

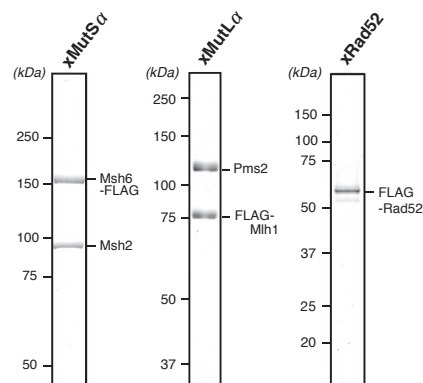


図2 試験管内再現に向けて精製した因子
精製した因子（一部）のCBB染色像を示す。ほぼ全ての因子で、シングルバンドに近い高純度に精製し、精製因子の活性も確認した。