

# 相同組換えの正確性を保証するメカニズムの理解

## Unraveling the mechanisms that ensure the fidelity of homologous recombination

(日本分子生物学会推薦)

代表研究者	九州大学	高橋達郎	Kyushu University	Tatsuro TAKAHASHI
協同研究者	九州大学	河添好孝	Kyushu University	Yoshitaka Kawasoe

The mismatch repair (MMR) system protects genetic information by handling mispairs arising from DNA replication errors and homology-directed repair between divergent sequences. Replication errors are corrected by the MMR system in a strand-specific manner to restore original genetic information. In contrast, homologous recombination between divergent sequences is rejected through the unwinding of recombination intermediates. Genetic studies in yeast have shown that this process, called antirecombination or heteroduplex rejection, depends on the Msh2–Msh6 (Mut $\alpha$ ) mismatch recognition complex and the RecQ homolog DNA helicase Sgs1. However, the mechanistic detail of antirecombination remains still ambiguous, especially in vertebrates, partly due to the lack of biochemical model systems.

In this study, we set up a single-strand annealing (SSA) model system in *Xenopus* egg extracts and found that sequence divergence between two repeating units significantly delays the annealing reaction and reduces the efficiency of SSA. Immunodepletion experiments showed that this reduction of SSA is mediated by Mut $\alpha$  and the Werner helicase. Mut $\alpha$  and the Werner helicase were also important for the fidelity of SSA. In addition, we found that the MutL $\alpha$  endonuclease, which plays a critical role in replication error correction, counteracts the Werner helicase during antirecombination. These data suggest that Mut $\alpha$  activates the Werner helicase during divergent SSA to improve the selectivity of recombination pairs and a balance between MutL $\alpha$  and the Werner helicase regulates the fidelity of SSA in *Xenopus* egg extracts.

### 研究目的

相同組換えは DNA 二重鎖切断損傷を修復する重要な DNA 修復経路であり、その機能は組換え酵素による相同鎖探索反応に依存する。一方で、特に動物や植物のようなゲノムサイズの大きい生物のゲノムには、多数の類似配列が存在する。類似配列間の相同組換えはゲノムの再編、不安定化をもたらすため、生物は類似配列間の相同組換えを抑制するメカニズムを進化させてきた。

類似配列間の相同組換え抑制は、30 年以上前にバクテリアで発見された (Rayssiguier et al., Nature, 1989)。バクテリアでは DNA 合成の誤りを修復するミスマッチ修復 (MMR) 因子群 (MutS, MutL, UvrD, MutH) の全てが、類似配列間の相同組換え抑制に機

能する (Rayssiguier et al., Nature, 1989 など)。興味深いことに、MMR システムが DNA 合成の誤りを修復する際にはミスマッチ塩基を削って再合成するのに対し、類似配列間の相同組換えを抑制する際には、ミスマッチ塩基を含む組換え中間体を削り込むのではなく引き剥がし、正しい相同鎖の再探索を可能とすると考えられている。この反応は、antirecombination (抗組換え反応) もしくは heteroduplex rejection (ヘテロ二重鎖引き剥がし反応) と呼ばれるが、本稿では抗組換え反応で統一する。その後、真核生物においても、MMR 因子に依存した抗組換え反応が発見された (Datta et al., Mol Cell Biol, 1996 など)。真核生物におけるこの分野のパイオニアは、Jim Haber (Brandeise Univ)、Eric Alani (Cornel Univ)、Sue

Jinks-Robertson (Duke Univ)、Richard Kolodner (UCSD)らであり、主に1990年代後半から2000年代前半にかけて重要な進展が相次いだ。興味深いことに、彼らの解析から、真核生物では、DNA合成に伴うミスマッチ塩基の修正と抗組換え反応は、大きく異なる因子群に依存することが分かってきた (Sugawara et al., PNAS, 2004 など)。具体的には、真核生物において DNA 合成の誤りを修復する MMR 因子群は MutS $\alpha$ 、MutL $\alpha$ 、Exo1、PCNA などであるが、抗組換え反応には Exo1 や PCNA の寄与はほぼ無く、MutL $\alpha$  の寄与は、実験系にも依存するが MutS $\alpha$  よりも小さい。また出芽酵母の抗組換え反応は、RecQ ファミリーヘリカーゼである Sgs1 ヘリカーゼを必要とするが、この因子は DNA 合成の誤りの修復には不要である。これらの事実は、真核生物におけるミスマッチ塩基の修正と抗組換え反応は、それぞれ大きく異なる分子メカニズムによって駆動されることを示唆する。

バクテリアの組換えエラー抑制については近年になって試験管内再構成が達成され (Tham et al., Mol Cell, 2013)、MutS と MutL が組換え中間体に結合して安定化する、UvrD ヘリカーゼが中間体を解きほぐすなどのモデルが提示されている。しかし前述のようにバクテリアと真核生物では関与する因子群が大きく異なり、反応機構も大きく異なる可能性が高い。特に MutL $\alpha$  の寄与は真核生物で小さく、この点でバクテリアのモデルを真核生物に適用することは難しい。真核生物での唯一の生化学解析は、精製 MutS $\alpha$  が D-loop 構造中のミスマッチを認識できることである (Honda et al., PNAS, 2014)。このように本分野の生化学的解析は非常に立ち後れているが、バクテリアの研究 (Tham et al., Mol Cell, 2013) が示すように、優れた試験管内系が分子機構理解のブレークスルーになると予想される。

我々の研究室では、ツメガエル卵の核質抽出液 (NPE) をモデル系に、MMR 反応を含む様々な DNA メタボリズム関連反応を試験管内で再現、解析してきた。本研究では、我々が確立した生化学的再現系を用いて、脊椎動物の抗組換え反応の分子メカニズムを解析したので報告する。

## 研究経過

真核生物の相同組換え経路は、反応メカニズムや産物の違いから、いくつかのサブ経路および関連経

路に分類することができる。そのうちの一つ、一本鎖アニーリング経路 (Single-strand annealing, SSA) は、タンデムに並んだ相同領域の間に DNA に重鎖切断損傷 (DSB) が生じた際にはたらく経路であり、組換え酵素による相同領域間のアニーリングを経て、相同領域のコピー数が一つ減った産物を生じる。この反応は、過去にツメガエル卵核質抽出液を用いて試験管内再現されている (Yan et al., J Cell Biol, 2005)。そこで本研究では、SSA 反応をモデル系に、抗組換え反応の試験管内モデル化と、これを用いた分子機構の解明を目指した。

まず我々は、420 bp の相同領域をタンデムに持つプラスミド DNA を構築し、これを用いて SSA の再現を試みた。制限酵素を用いて相同領域の間を切断し、これを NPE に加えたところ、40%程度の産物において、相同領域が2コピーから1コピーに減少していた。一方で、相同領域の外側を切断して NPE に加えたものでは、この相同領域が減少した産物は全く観察されなかった。これらの結果から、本実験系において観察された相同領域のコピー数が減少した産物は、SSA 経路によって生じた産物であると考えられた。以降、この産物を SSA 産物として取り扱う。

次に我々は、2コピーの相同領域のうち、1コピーの塩基配列を変え、相同性を96%および92%まで低下させた基質を作成した。これを相同領域の間で切断して NPE に加えたところ、相同性の低下に伴い、SSA 産物の著しい減少が確認された。さらに、NPE からミスマッチセンサーである MutS $\alpha$  を免疫除去したところ、96%および92%の相同性を持つ基質においても、顕著な SSA 産物を観察した。これらの結果は、本研究で構築した SSA 実験系は、相同配列間の相同性、および MutS $\alpha$  による制御を受ける事を示す。

我々はさらに、類似配列間 SSA の抑制を担う因子を探索した。出芽酵母においては、RecQ ファミリーのヘリカーゼである Sgs1 が抗組換え反応に必須である事が示されている (Sugawara et al., PNAS, 2004)。脊椎動物においては5種の RecQ ファミリーヘリカーゼが知られる。このうちのいくつかについて特異的抗体の作成を試み、NPE から免疫除去を行って抗組換え反応への影響を調べたところ、Werner (Recq3) の免疫除去によって、抗組換え活性が著しく減少することが分かった。Werner はヘリカーゼの活性に加え、エキソヌクレアーゼの活性も持つ複合酵素であ

る。昆虫細胞 Sf9 を用いて発現、精製した Werner タンパク質は、Werner の免疫除去による抗組換え活性の低下を相補可能であった。これを用いて抗組換え活性に必要な Werner の生化学的活性を検討したところ、ヌクレアーゼ欠損 Werner は抗組換え活性を保持していたのに対し、ヘリカーゼ欠損 Werner は抗組換え活性を完全に失っていた。これらの結果は、SSA をモデル系とした抗組換え反応は、MutS $\alpha$  の活性に加えて Werner のヘリカーゼ活性を必要とすることを示す。これに加え、我々は同様の実験から、DNA 合成の誤りを修復する因子である MutL $\alpha$  エンドヌクレアーゼは SSA を基質とした抗組換え反応に不要であることも見いだした。

我々はさらに、二種類の DNA 基質を組み合わせることで、正確な SSA と不正確な SSA を共存、競合させ、SSA の正確性を見積もる実験系を構築した。この実験系を用いて MutS $\alpha$ 、MutL $\alpha$ 、Werner が正確な SSA ペアの識別に果たす役割を検討したところ、予想と一致し、MutS $\alpha$ 、Werner の免疫除去は SSA の正確性を著しく下げることが分かった。ところが、興味深いことに、MutL $\alpha$  の免疫除去は SSA の正確性を、わずかではあるが、むしろ向上させた。さらに、Werner の組換えタンパク質を NPE に過剰に加えると、SSA の正確性が向上することも分かった。これらの結果は、MutS $\alpha$  の下流で働くと考えられる二つの因子、MutL $\alpha$  と Werner が、抗組換え反応に対して拮抗する作用を持つこと、および、そのタンパク質濃度のバランスを変えることで、SSA の正確性を操作可能であることを示す。

## 考察

我々の研究によって、真核生物の抗組換え反応を再現する生化学的実験系が、世界で初めて確立された。バクテリアの研究でも試験管内モデル系の確立によって抗組換え反応の分子メカニズム理解が大きく前進した (Tham et al., *Mol Cell*, 2013)。本実験系は、真核生物、特に脊椎動物における抗組換え反応の分子メカニズム解明に、今後役立つことが期待される。

本研究によって、これまでよくわかっていなかった、脊椎動物の抗組換え反応の概要が分かってきた。ミスマッチセンサーである MutS $\alpha$  は、出芽酵母と同様に抗組換え反応に必須であった。また、脊椎動物の 5 種の RecQ ファミリーヘリカーゼのうち、少なくとも Werner は SSA を基質とする抗組換え反応に

必須であることが分かった。他の 4 種の RecQ ファミリーヘリカーゼの寄与については現在のところ不明であるが、Werner の単独除去によって抗組換え反応が大きく損なわれることから考えて、他の RecQ ヘリカーゼが Werner と協調して抗組換え反応に働く可能性は十分に残されているものの、それらが単独で抗組換え反応に必須である可能性はほぼない。予備的実験からは、もう一つの主要な RecQ ヘリカーゼである Bloom については、DSB 末端の削り込みに必要であることが分かっている。Bloom を除去すると DSB 削り込みの下流で機能する SSA も阻害されるため、Bloom が抗組換え反応に果たす役割については検討できなかった。この点は今後の課題である。

本研究では、さらに複数種類の基質を混合することで正確な SSA と不正確な SSA を競合させ、SSA の正確性を見積もる実験系を構築した。この実験系は極めて感度に優れており、わずか 2% の相同性の低下であっても、それによる SSA のバイアスを検出することが可能であった。この系を用いて、我々は、Werner と MutL $\alpha$  がそれぞれ抗組換え反応の促進、抑制にはたらくと考えられる事を発見した。MutL $\alpha$  はミスマッチ塩基の修正に働くのに対し、抗組換え反応はミスマッチ塩基の修正を原則的に必要としないと予想されている (Sugawara et al., *PNAS*, 2004)。したがって、MutS $\alpha$  の下流でミスマッチ修正反応と抗組換え反応が分岐し、それぞれが拮抗的な関係にあると考えると、観察結果をうまく説明することができる。これらの経路の拮抗関係は、体細胞期には類似配列間の相同組換えが全く許されないのに対し、減数分裂期には相同染色体間でのミスマッチを含む組換えが必要とされることと対応するかもしれない。今後の研究により、相同組換えの正確性と寛容性を支配する制御メカニズムの全貌が明らかになると期待される。

## 参考文献

- Datta A, Adjiri A, New L, Crouse GF, Robertson SJ. 1996. Mitotic crossovers between diverged sequences are regulated by mismatch repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 1085–1093.
- Honda M, Okuno Y, Hengel SR, Martín-López JV, Cook CP, Amunugama R, Soukup RJ, Subramanyam S, Fishel R, Spies M. 2014. Mismatch repair protein

hMSH2–hMSH6 recognizes mismatches and forms sliding clamps within a D-loop recombination intermediate. *Proc National Acad Sci* **111**: E316–E325.

Rayssiguier C, Thaler DS, Radman M. 1989. The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* **342**: 396–401.

Sugawara N, Goldfarb T, Studamire B, Alani E, Haber JE. 2004. Heteroduplex rejection during single-strand annealing requires Sgs1 helicase and mismatch repair proteins Msh2 and Msh6 but not Pms1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9315–9320.

Tham K-C, Hermans N, Winterwerp HHK, Cox MM, Wyman C, Kanaar R, Lebbink JHG. 2013. Mismatch repair inhibits homologous recombination via coordinated directional unwinding of trapped DNA structures. *Molecular Cell* **51**: 326–337.

Yan H, McCane J, Toczylowski T, Chen C. 2005. Analysis of the *Xenopus* Werner syndrome protein in DNA double-strand break repair. *The Journal of Cell Biology* **171**: 217–227.

## 研究の発表

口頭発表

1. Takahashi T, Regulation of the fidelity of homology-directed repair in *Xenopus* egg extracts., The 11th quinquennial conference on DNA repair, Egmond aan Zee, The Netherland, 3/28/2022 (Invited)
2. 高橋達郎, Regulation of the fidelity of homology-directed repair in *Xenopus* egg extracts., 国立遺伝学研究所・研究集会「染色体安定維持研究会」, 静岡県三島市, 7/4/2022 (Invited)
3. Takahashi T, The mechanism of a chromatin-remodeling reaction associated with replication error correction., Chromosome Replication in the New Era - Old and New Questions in Life Science -, Mishima, Shizuoka, Japan, 11/11/2022 (Invited)
4. 高橋達郎, The mechanism of a chromatin-remodeling reaction associated with replication error correction., 第45回日本分子生物学会年会, 千葉県千葉市, 12/1/2022