

「ゲノムの構造と機能」

平成10年度採択研究代表者

柴田 武彦

(理化学研究所遺伝生化学研究室 主任研究員)

「組換えを介したゲノム動態制御」

1. 研究実施の概要

本研究の目的は、相同DNA組換えによるゲノム構成の動態を制御する機構を解明することにある。この機構の解明により、特定の遺伝子座の組換えを人為的に制御することで初めて実現できる効率の良い合理的な品種改良や安全な遺伝子治療を行うための基盤技術を提供する。相同DNA組換えの実行と制御に関わっている蛋白は、数十を越え、その過程も複雑であるので、酵母という順・逆遺伝学を駆使できるモデル実験系が先導する形で研究が進展した。本プロジェクトの小川、柴田は、酵母を使った遺伝学的手法によって相同DNA組換えに働く遺伝子群の機能と情報伝達、諸反応のカスケードの研究を進め、また、染色体レベルで働く相同DNA組換え制御機構について独自の研究を発展させた。相同組換え機構のもっとも興味深い点は、数kbのDNAが、長大な染色体DNAの中から自己と同一の配列をもつ部位を検索できることにある。この能力ゆえに指定遺伝子ノックアウトも可能になる。組換えの素過程が試験管内で部分的に再現できている。柴田らは、生化学、構造生物学的手法によって組換えの分子機構を解析してきた。特に、同一の配列をもつ部位を検索するとき中心的な役割をもつRecA/Rad51属蛋白等が行う相同DNA対合反応の機構を原子分解能の分子立体構造を基礎において解明しつつある。武田は、高等真核細胞で唯一逆遺伝学的解析が容易にできるニワトリBリンパ細胞株を使って組換え機構を明らかにしてきた。最後に、これまで全く注目されてこなかったミトコンドリアゲノムでの相同DNA組換えの機能を明らかにすることで、相同DNA組換えによるゲノム動態支配の普遍的な法則を明らかにしたい。

2. 研究実施内容

DNA組換えのうち、似たDNA配列同士の間での切断・再結合でDNA部分を交換、または置き換える現象が相同DNA組換えである。ヒトの細胞のDNAは紫外線や自身の酸素呼吸などによって常時多量の損傷を受ける。二本鎖切断は、損傷の直接の結果として、また、損傷箇所をDNA複製点が通過することで生じる。二本鎖切断を正確に修復するには相同DNA組換えが欠かせず、細胞増殖の過程で何度も相同DNA組換えが起こる。そのため、高等動物では相同DNA組換え欠損変異は致死性である。更に、有性生殖において配偶子を作る減数分裂で、

相同染色体を正確に分離するにも相同DNA組換えは欠かせない。その開始はプログラムされた二本鎖切断で行われる。更に、特定の細胞の分化で、プログラムされた相同DNA組換えが行う遺伝子シャッフルによる特定遺伝子の多様化が働いている。減数分裂において、対立遺伝子の組合せを変えることによるゲノム構成の多様化と共に、遺伝子シャッフルによる遺伝子の多様化も働いている可能性が指摘されている。遺伝子やゲノムの多様化は、生物の環境適応に重要なだけでなく、作物、家畜の育種技術を支えている。本研究は、相同DNA組換えによるゲノム構成の動態を制御する機構を分子レベルで解明する事で、効率の良い合理的な品種改良や安全な遺伝子治療を行うための基盤技術を提供する。

相同DNA組換えの機構

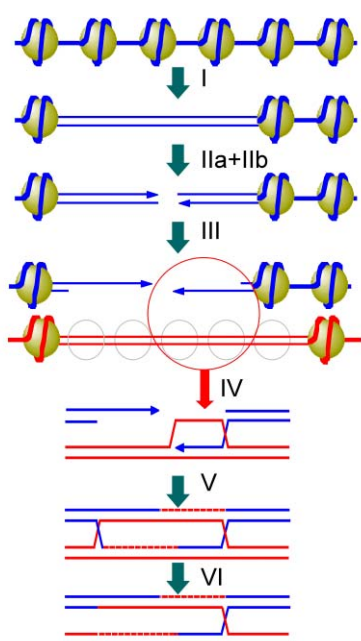


図 1 相同DNA組換え初期過程
ホリデー中間体形成までの過程を示す。ローマ数字はステップを示す。

酵母での組換え欠損変異体の遺伝学的解析が先導し、哺乳類のホモログ遺伝子の同定により、真核生物の減数分裂では普遍的に図 1 の I-IV の過程で相同DNA組換えが誘導されると考えられるようになった。転写因子と重なる因子によるクロマチン再編成 (I 段階) で組換え開始点近傍のヌクレオソームが排除され作用蛋白がDNAに働く環境ができる。Spo11とMre11が働いて開始点で局所的なクロマチン構造やDNA構造の変化 (クロマチンDNA遷移; IIa段階) が起こり、さらに、Rad50, Xrs2 (Nbs1) が加わりSpo11が活性化されて開始点で二本鎖切断が起こる (IIb段階)。そこに、Mre11, Rad50, Xrs2 (Nbs1) が働いてできる一本鎖末端域 (III段階) にRecA/Rad51族蛋白群とRad54やRad52が働き損傷されていないDNAの中から同じ塩基配列を探し出し分子間二本鎖 (ヘテロ二本鎖) をつくり 2 つのDNAを接合する (相同DNA対合反応、IV段階)。DNA修復合成、二本鎖切断のもう一つの端の一本鎖域との相同DNA対合、接合点の移動とで 2 つのホリデー接合点をもつ中間体ができる (V段階)、一方のホリデー接合点の切断 (VI段階) によってホリデー中間体ができる。ホリデー中間体で 2 つのDNAを連結している部分が移動し、切断されると組換え体DNAとなる。損傷としてできた二本鎖切断の修復では、III段階から後が起こる。二本鎖切断の正確な修復はほぼ全て相同DNA組換えで行われる。このことは、二本鎖切断の位置とタイミングで相同DNA組換えが制御されることを示す。

方法と成果

出芽酵母や分裂酵母の変異体の遺伝学的解析とクロマチン構造動態の解析、ニワトリBリンパ細胞株 (DT40株) での逆遺伝学手法によるヒト、ニワトリのホモログ遺伝子の解析、

単離蛋白のNMR分光とX線結晶構造解析による高分解能立体構造解析と生化学的解析を並行して行った。我々のこれまでの成果を図1の組換え過程を参照しながら述べる。

1. クロマチン再編成 (I段階)

分裂酵母のade6遺伝子座の1塩基置換変異でできたCRE様塩基配列が減数分裂期組換えホットスポットM26である。太田らは、この配列に特異的に結合するCREB/ATF型転写因子Atf1-Pcr1が、栄養飢餓、ストレス、接合型フェロモン応答で働く情報伝達系の複合支配下で活性化すること、活性化されるAtf1-Pcr1依存的に部位周辺に誘導されるGcn5によるヒストンH3のアセチル化によってホットスポット周辺のヌクレオソームの大規模な再編成やそれに引き続く二本鎖切断・組換えが促進されることを明らかにした。

2. クロマチンDNA遷移 (IIa段階)

太田らは、出芽酵母、分裂酵母で、減数分裂期相同DNA組換え開始は、クロマチン構造が開いた部位で起こること、相同DNA組換え開始部位特異的に、二本鎖切断に先だって起こる、球菌ヌクレアーゼ感受性増大で検出される局所的なクロマチン構造やDNA構造の変化(クロマチンDNA遷移)を見つけている。これには、小川らが発見したMre11の2つのドメインの内、C末端と、二本鎖切断酵素であるSpo11やそれに相互作用すると思われるRec102やSki8等の因子、更に減数分裂期開始を特徴づける前減数分裂期DNA複製が働くことを明らかにした。また、本来は相同DNA組換えの頻度が低い遺伝子座で働く転写因子のDNA結合ドメインを融合したSpo11を発現させた出芽酵母では、その遺伝子座でクロマチンDNA遷移、次段階の二本鎖切断が誘導され、減数分裂期相同DNA組換え頻度が10倍以上上昇することを明らかにした(太田; 仏国 A. Nicolas博士との共同研究)。

3. 二本鎖切断 (IIb段階)

Spo11が二本鎖切断酵素であることが知られている。太田らは、二本鎖切断に必要と言われていたRad50、Xrs2/Nbs1は、クロマチンDNA遷移には不要であるが、Spo11の切断活性の活性化に必要であることが明らかにした。こうした研究でクロマチン再編成、クロマチンDNA遷移が二本鎖切断のタイミングと位置を支配していることが明らかにされた。

4. 一本鎖末端域の形成 (III段階)

小川らはこの過程がMre11-Rad50-Xrs2/Nbs1複合体によって起こることを明らかにした。太田らは、Mre11のN末端側ドメインのみがこの過程に必要なことを見つけた。また、Mre11-Rad50-Xrs2/Nbs1複合体は、センサーとして二本鎖切断を感知して活性化される2種の損傷チェックポイント経路を活性化することが、小川らによって発見された。それらの内、特に、Tel1に依存する経路はMre11蛋白のリン酸化を通して、二本鎖切断端での一本鎖域形成開始制御に働いていることが示唆された。

5. 相同DNA対合とヘテロ二本鎖接合形成 (IV段階)

一本鎖DNAにRecA蛋白やその酵母ホモログであるRad51蛋白が働くと傷のない二本鎖

DNA内部の同じ塩基配列部分を探し出してヘテロ二本鎖を作る。RecA蛋白またはRad51蛋白に一本鎖が結合すると、各ヌクレオチド残基のデオキシリボース環のデオキシ部位であるメチレン基とその残基の3'側に隣接する残基の塩基との相互作用によって塩基間の距離がB型DNAの3.5 Åの1.5倍に当たる5 Åの間隔に引き延ばされたDNA構造が誘導される。この伸長構造をとると、一本鎖でも二本鎖でも塩基はデオキシリボース環のパッカー（環の平面からの歪み）の転換で水平に大きく回転でき、塩基間のワトソン・クリック相互作用によって二本鎖DNAと一本鎖DNAとの間で塩基配列の相補性を認識できる（柴田ら）。

RecA蛋白は強力に、酵母Rad51蛋白は弱いながら、ATP存在下で相同DNA対合反応を行うが、ヒトのRad51蛋白では、この活性があったとしても検出限界以下である。胡桃坂らは、ヒトのRad51蛋白パラログがヘテロ複合体（XRCC3-Rad51C, XRCC2-Rad51D）で、また、ヒトRad52蛋白は単独で、相同DNA対合反応を行うことを見つけた。これらの蛋白による相同DNA対合反応にはATPは必要ではない。反応様式はRecA蛋白の場合と同じと考えられるが、Rad52蛋白のX線結晶構造解析により、Rad52蛋白へのDNA結合様式は、RecA/Rad51蛋白の場合と全く異なることも明らかになった。

更に、武田らは、逆遺伝学的手法による多重変異体解析から高等動物の相同DNA組換えには、Rad51蛋白は必須であること、それに加え、Rad51蛋白パラログが働く段階またはRad52蛋白が働く段階のいずれかが必要なことを明らかにした。これらの研究から、真核生物では、Rad51蛋白、Rad51蛋白パラログやRad52蛋白が共同して、細菌でRecA蛋白が単独で行っている相同DNA対合反応を行っている実体が明らかになってきた。

凌らは、これまでRecA蛋白ホモログが見つからなかった酵母ミトコンドリアでの相同DNA組換えに必要なMhr1蛋白が、ATPを必要としない相同DNA対合活性を持つことを明らかにした。これまで、ATPを必要としない相同DNA対合蛋白が関わる相同DNA組換えは、細菌ウイルスとプラスミドでしか知られていなかった。

6. DNA修復合成（V段階の一部）

これまで真核生物でDNA合成酵素は13種類以上も見つかっているが、細胞株・個体のいずれでも機能欠損変異は致命的になるものが多いなど細胞機能の研究が阻まれている。これらのDNA合成酵素のうちどの酵素が相同DNA組換えに働いているかが分かっていた。ニワトリBリンパ細胞株で、武田らは、Rev3 DNA polymeraseが重要な働きをしていることを見出した。

7. ホリデー中間体の代謝（V-VI段階）

胡桃坂により、Rad51パラログの一つ（それ自身では相同DNA対合反応活性を持たないRad51B蛋白）が、相同DNA対合反応が起こった直後に形成されるホリデー中間体構造に結合する活性も持つことが示され、ホリデー中間体に機能する可能性が初めて示唆された

8. 相同DNA組換えの未知機能

母性遺伝のため高等動物で掛け合わせによる相同DNA組換えが観察されないミトコン

ドリアでは、これまでミトコンドリアDNA (mtDNA) の相同DNA組換えの機能は無視されてきた。凌は、全ての生物で最初のmtDNA組換え欠損変異 *mhr1-1* を出芽酵母から分離した。*MHR1* 遺伝子がコードするMhr1蛋白は上述した組換え関連活性を持つ。*mhr1-1* の効果と細胞増殖でのmtDNAの形態動態の解析から、mtDNAのMhr1蛋白によって開始されるローリングサークル型 (σ 型) DNA複製によって直列にいくつものゲノム単位DNAが連なったコンカテマーができる。コンカテマーは、娘細胞へのmtDNA分配の必須中間体で、分配に伴って単位長に切断されるというmtDNAの複製・分配の機構が明らかになった。この機構は大腸菌に感染する λ ファージの複製、ファージ粒子封入の機構に極めてよく似ている。アミノ酸配列は全く異なるが、Mhr1蛋白の機能は、 λ ファージの β 蛋白の機能ホモログといえる。ミトコンドリアは真性細菌が寄生した結果と言われているが、少なくとも出芽酵母では、そのDNA複製・分配機構は真性細菌に感染するウイルスと共通である。このような説はこれまで唱えられた例を知らない。

9. 真核生物に於ける相同DNA組換えの人為的制御：ゲノム動態制御の技術化

既に述べたように、二本鎖切断の位置とタイミングで相同DNA組換えが制御される。二本鎖切断の他、一本鎖ギャップもほぼ100%の効率で相同DNA組換えを誘導することが知られている。1-3で述べたように、クロマチン構造動態を制御することで組換えのタイミングを制御できる可能性が示唆された。そこで、もともと相同DNA組換え活性が高い唯一の高等動物株化細胞であるニワトリBリンパ細胞株を、クロマチン構造を修飾する薬剤で処理したところ、特定遺伝子座で観察された相同DNA組換えが桁違いの高頻度へ誘導されること、薬剤を除くことで元の頻度に戻ることが示された(太田)。このように、相同DNA組換え開始のタイミングを人為的に制御できることを実証した。更に、減数分裂期相同DNA組換えを誘導する二本鎖切断を起こすエンドヌクレアーゼ活性を担うSpo11蛋白に、出芽酵母のGal2遺伝子座の発現を制御する転写因子Gal4蛋白のDNA結合部位を融合した蛋白を出芽酵母細胞で発現させたところ、本来組換えが起こりにくい遺伝子座であるGAL2座において減数分裂期初期にクロマチンDNA遷移を誘導し、二本鎖切断を起こし、その座での相同DNA組換えを一桁以上上昇させることを示した(太田; 仏国 A. Nicolas博士との共同研究)。この手法は原理的にどこの遺伝子座でも使えることから、標的部位で相同DNA組換えを人為的に誘導する技術の核になると期待される。以上述べたように、相同DNA組換えの起こるタイミング、部位の制御が限定された条件下ではあるが人為的に制御できるようになってきた。

3. 研究実施体制

DNA鎖切断導入・修復、ゲノム流動化制御遺伝子グループ

① 研究者名

小川英行 岩手看護短期大学 学長

② 研究項目

DNA鎖切断導入・修復、ゲノム流動化制御遺伝子特に*MRE11*の細胞周期チェックポイント

ントへの関与の仕方について

染色体レベルのゲノム流動性・恒常性制御研究グループ

① 研究者名

柴田武彦 理化学研究所 遺伝生化学研究室 主任研究員

② 研究項目

染色体レベルのゲノム流動性・恒常性制御：組換え開始制御に働くクロマチン構造とその制御タンパク群の構造と機能の解析

動物細胞株でのゲノム改変技術研究グループ

① 研究者名

武田俊一 京都大学大学院 医学研究科 放射線遺伝学研究室 教授

② 研究項目

ニワトリBリンパ細胞株 (DT40) を用いた、ヒト組換え蛋白群、その変異蛋白の細胞機能解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Kurumizaka, H., Ikawa, S., Nakada, M., Enomoto, R., Kagawa, W., Kinebuchi, T., Yamazoe, M., Yokoyama, S., and Shibata, T.: "Homologous-pairing, and ring- and filament-structure formation activities of the human Xrcc2-Rad51D complex." *J. Biol. Chem.* **277**, 14315-14320 (2002).
- Kawasaki, K., Maruyama, S., Nakayama, M., Matsumoto, K., and Shibata, T.: "Drosophila melanogaster RECQ5/QE DNA helicase: Stimulation by GTP binding." *Nucleic Acids Res.* **30**, 3682-3691 (2002).
- Ling, F., and Shibata, T.: "Recombination-dependent mtDNA partitioning. In vivo role of Mhr1p to promote pairing of homologous DNA." *EMBO J.* **21**, 4730-4740 (2002).
- Pecina, A., Smith, K. N., Mezard, C., Murakami, H., Ohta, K., and Nicolas, A.: "Targeted stimulation of meiotic recombination." *Cell* **111**, 173-184 (2002).
- Yokoyama, H., Kurumizaka, H., Ikawa, S., Yokoyama, S., and Shibata, T.: "Holliday junction binding activity of the human Rad51B protein." *J. Biol. Chem.* **278**, 2767-72. (2003).
- Kagawa, W., Kurumizaka, H., ishitani, R., Fukai, S., Nureki, O., Shibata, T., and Yokoyama, S.: "Crystal structure of the homologous-pairing domain from the human Rad52 recombinase in the undecameric form" *Molecular Cell* **10**, 359-371 (2002)
- Seo, H., Okuhara, K., Kurumizaka, H., Yamada, T., Shibata, T., Ohta, K.,

Akiyama, T., and Murofushi, H. "Incorporation of DUF/FACT into chromatin enhances the accessibility of nucleosomal DNA" *Biochemical and Biophysical Research communications Biochem. Biophys. Res. Comm.* **303**, 8-13(2003)

○ Tauchi, H., Kobayashi, J., Morishima, K., vanGent, D., Shiraishi, T., Verkaik, N. S., vanHeems, D., Ito. E., Nakamura, A., Sonoda. E., Takata, M., Takeda, S., Matsuura, S., and Komatsu, K.:"Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells" *Nature* **420**, 93-98. (2002).

○ Tanaka, T., Hosoi, F., Yamaguchi-Iwai, Y., Nakamura, H., Masutani, H., Ueda, S., Nishiyama, A., Takeda, S., Wada, H., Spyrou, G. and Yodai, J. "Thioredoxin-2(TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis" *EMBO J.* **21**, 1695-1703. (2002).

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：3件（研究期間累積件数：6件）