DNA 二重鎖切断修復機構と減数分裂期組換え

大阪大学大学院理学研究科生物科学 坪内英生, 小川英行

Genetic material suffers various spontaneous or environmental damages, among which DNA double-strand breaks (DSBs) are fatal to the cell since they bring to the loss of genetic information. Cells provide with two strategies to repair DSBs. One is through homologous recombination and the other through an end-to-end joining reaction. The former process is more accurate. *RAD52* group genes of budding yeast are involved in these DSB repair processes. They are classified into two subgroups: one is composed of *RAD51*, *52*, *54*, *55* and *57* (*RAD51* subgroup), which are involved in homologous recombination, and the other *MRE11*, *RAD50* and *XRS2* (*MRE11* subgroup), which are involved in end-to-end joining. The DSB repair system is required for the proper segregation of homologous chromosomes in the reductional division of meiosis. Meiotic recombination is initiated with the formation of DSBs, the ends of which are processed and provided for homology search. Two subgroup genes work at two distinct steps: *MRE11* subgroup at DSB formation and *RAD51* subgroup at homology search, respectively. In addition, other meiosis specific proteins are also required for initiation and completion of meiotic recombination, some of which are components of synaptonemal complex. This review focuses on recent advances in the mechanism of DSB repair and its involvement in meiosis.

DSB / end-joining / meiosis / recombination / repair / synaptonemal complex

1. はじめに

遺伝情報は細胞内外の種々の要因によって常に改変の危機に瀕しているが、生物はその危機を乗り越えるさまざまな修復機構を備え、自らの遺伝情報を安定に保持し子孫に伝えている。とりわけDNAの二重鎖切断(DSB)は遺伝情報の大量欠失を来す要因となるが、その正確な修復のために相同DNA分子の助けを借りる組換え修復機構と切断端同志を直接再結合する修復で対処している。この二つの修復に関与する機能の多くは減数分裂期の組換えにも同時に関与していることが明らかになってきた。

体細胞分裂では2セットの遺伝情報がそのまま、できるだけ正確に娘細胞に伝わるのが主眼とされているが、減数分裂では次の世代へ渡す1セットの遺伝情報を2セットから選び出す際に極力2セットの遺伝子

がよく交じり合うことを目指して行われている。つまり父方の遺伝情報と母方の遺伝情報が染色体単位でランダムに分配されると同時に、相同染色体上の情報が相同組換え反応によってよく混じり合わされる。この働きによって、減数分裂期を経て生じた配偶子の遺伝情報セットには二つとして同じものがない。

DSB修復機構がそれぞれの細胞周期で一見相反する目的のために、中心的役割を果たしていることは極めて興味深い。この総説では真核生物のモデル生物である出芽酵母から得られた知見をもとに、①DSB修復のメカニズム、②減数分裂期の相同組換えにおけるDSB修復機構の役割について概説する。

2. DSB修復のメカニズム

DNA上の単鎖の切断とDSBではその修復機構は大きく異なる。単鎖切断によって失われた単鎖DNA上の

Mechanisms of DSB repair and their roles in meiosis

Hideo TSUBOUCHI and Hideyuki OGAWA

Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka University

図1 A DNA二重鎖切断修復機構：外的要因によりDNA上に生じたDSB傷害は組換え(b)，または末端結合経路(c)を経て修復される。
B 染色体間組換えと染色体内組換の種類の：相同な塩基配列を矢印で示した。

遺伝情報は相補鎖を鋳型にして修復される。DSBの修復は大きく二つに分けられる。一つは相同組換え反応を利用する方法で、DSB端の塩基配列が、それと相同な塩基配列をもつ分子を検索し、その相同領域を鋳型にして両切断の間の失われた情報を回復する(図1A-b)。この方法は生物がゲノムを二重保持している場合や、細胞がS期を通過して、姉妹染色体を持つ時期に極めて有効である。もう一つは、DSB末端を直接結合するもので(図1A-c)、この反応は、DSB末端間の塩基配列の短い相補性を手がかりに(場合によっては相補性も使わず)修復するが、異なる分子同士を結合したり、切断部位近傍の遺伝情報を失う場合もあるので、この方法での正確な修復は必ずしも期待できない。しかし、細胞内のDSB数が少なく、両端の一本鎖同士が互いに相補的であるときは、この修復反応は極めて効率的である。

電離放射線やアルキル化剤はDNAにDSBを引き起こすが、出芽酵母ではこれらの修復ができずに高感受性を示す変異株が数多く単離され、*rad52*変異群と呼ばれている。

3. DSB修復とRAD52グループ

*RAD52*遺伝子群の変異株はDSB修復欠損だけでなく、相同組換えにも影響を与える。その組換え反応に及ぼす影響の違いによりこのグループはさらに2つに分

けられる。

1) 体細胞組換え欠損グループ(*RAD51*サブグループ)

このグループは遺伝子*RAD51*, *52*, *54*, *55*, *57*, *59*, *RFA1* (*RPA*)で構成され、この遺伝子が欠損すると組換え頻度が低下することから、DSB修復の組換え修復系路に関わっていると考えられる¹⁾(図1A-b.)。Rad51とRad57蛋白は大腸菌の組換え反応に中心的役割を果たしているRecA蛋白質とアミノ酸配列に相同性をもつ。またRad54はヘリカーゼのコンセンサス配列を持つ。Rad59はRad52と相同性がある。*Rpa*は酵母の一本鎖DNA結合蛋白である。この中で*RAD52*は塩基配列の相同性を要求するあらゆる組換えに関与する。すなわち、その変異株はこのグループの中で最も強いDSB傷害感受性を示すほか、染色体間組換え(図1B-1.)、染色体内組換え(図1B-2.) i) 重複配列間、ii) 逆位反復配列間、iii) 一本鎖アニーリングによるそれぞれの組換えの効率を著しく低下させる。一方、*rad51*および*rad54*変異株では、染色体間組換え反応は欠損するが、染色体内組換えへの影響はわずかである。*rad55*と*rad57*変異株の場合、DSB傷害修復と染色体間組換えの頻度が部分的に低下し、この表現型は低温でより顕著となる。*rad59*変異株は染色体間組換えに欠損を示さないが、*rad51*変異との二重変異株では染色体内の逆位反復配列間の相同組換えが欠損する²⁾。

これらの遺伝子間および産物間でさまざまな相互作用

用が示されている。*rad52-20*変異のDNA修復欠損は*RAD51*の過剰発現により抑制される³⁾。*RAD55*と*RAD57*の欠失変異株の欠損は、*RAD51*または*RAD52*単独、もしくは両方の過剰発現によって抑制される⁴⁾。出芽酵母RPA(一本鎖結合蛋白質複合体)の変異*rfa1-44*では相同組換え効率が低下するが、それは*RAD52*遺伝子の過剰発現で抑制される⁵⁾。また*RAD59*欠失株のDNA修復欠損は*RAD52*の過剰発現により抑制される²⁾。他方、Two-Hybrid法によりRad51-Rad52、Rad51-Rad55、Rad55-Rad57の相互作用が示されている⁴⁾。さらに、Rad51-Rad52の試験管内での相互作用も示されている⁶⁾。

これらのことは、このグループに属する遺伝子産物が一機能単位としての複合体を形成して相同組換え反応を行っていることを示唆する。この複合体の中ではRad51、52蛋白質が核となり他の蛋白質がその反応効率を高めていると考えられる。

2) 体細胞組換え非欠損グループ(*MRE11*サブグループ)

このグループの遺伝子(*MRE11*, *XRS2*, *RAD50*)に変異が起こると体細胞組換えの頻度は、野生株の十倍程度上昇する。また、体細胞分裂期に人為的に形成したDSB末端からの5'-3'方向の単鎖DNAのプロセッシング反応(図1A-a.)は抑えられ、組換え反応の進行が遅れるが最終的な組換え産物は野生株と同じ量だけ生じる⁷⁾。免疫沈降実験によりこのグループの遺伝子産物はMre11を中心としたRad50-Mre11-Xrs2という複合体(Mre11複合体)を形成していることが明らかとなった(投稿中)。Mre11およびRad50はそれぞれ大腸菌のsbcd, sbcC蛋白質と相同性がある。Mre11はホスホジエステラーゼのコンセンサス配列を持ち、Rad50蛋白質はその一次配列からSMCファミリーに属する蛋白質と考えられる⁹⁾。sbcdとsbcCは強固に結合して複合体を形成し、単鎖DNAに対してはエンドヌクレアーゼ活性を、線状の二本鎖DNAにはATP依存性エキソヌクレアーゼ活性を示すことがわかった¹⁰⁾。Rad50-Mre11がこれらの活性を持つ可能性がある。

このグループの変異株では、相同染色体の存在しない一倍体の条件下でHOエンドヌクレアーゼによりDSBをゲノム上に導入すると極めて強い致死性を示す¹¹⁾(投稿準備中)。また、線状化したプラスミドを環状化する反応が低下している¹²⁾。これらのことからこのグループの遺伝子は、相同配列非依存的な末端結合反応によるDSB修復経路に関与すると考えられる(図1A-c.)。また両サブグループの遺伝子の二重変異は相乗的なMMS感受性を示すことから、DSB修復には組換えおよび末端結合反応が必要と考えられる(投稿準備中)。哺乳動物ではDSB末端にDNA依存性プロテイン

キナーゼ(DNA-PK)とKu70, Ku80が働いて直接結合反応に関与する事が知られている。Ku70, Ku80の酵母ホモログやDNAリガーゼIVの欠失株でもHOエンドヌクレアーゼで導入したDSB末端の結合反応が欠損し、*MRE11*サブグループと*KU*ホモログの二重変異株の解析から両者は同じ経路でDSB末端結合反応に働くことが示唆されている¹²⁾。また、転写サイレンシングに関わる遺伝子(*SIR2*, 3, 4)の変異により末端結合反応の効率が低下することが最近明らかとなった¹²⁾。しかし酵母の*KU*や*SIR*遺伝子の変異株はMMSやガンマ線に対して感受性を示さないの、DSBの種類によって両者は働き方が異なるのかも知れない。

4. 減数分裂期における相同組換えの役割

減数分裂期には、一回のDNA複製後二回の細胞分裂(減数第一分裂と減数第二分裂)が連続的に起こる(図2)。減数第一分裂では、相同染色体が対合し、それが二分配される。その際姉妹染色分体は一体となったまま分配され、減数第二分裂で体細胞分裂と同様に分離し各々の細胞に分配される。

減数分裂期では、組換え頻度が約千倍上昇するが、相同染色体同志の認識に相同組換え反応における相同検索機構が採用されているのではないかと考えられる。しかも、減数分裂期組換えは、減数第一分裂で相同染色体を正しく分配するためにも使われている。ここではDSB修復機構が減数分裂期の組換えにどのような役割をはたしているかを述べる。

4.1 減数分裂期組換え反応

1) 開始反応

減数分裂期組換えは組換えホットスポットにDSBが起きて開始される¹⁵⁾(図3-①)。組換えホットスポット部位は、他の部位よりも遺伝的距離が物理的距離に対して大きい所である。この部位は体細胞分裂期にヌクレアーゼ高感受性なので、ヌクレオソーム構造をとらない部位と考えられている¹⁶⁾。この部位は転写のプロモーター領域と一致することが多いが、ホットスポットであることと転写反応自体とは関係がない。

DSB形成に関わる遺伝子群には、体細胞分裂期のDSB修復にも機能するものと減数分裂期に特異的なものの二種類がある。前者は*MRE11*, *RAD50*, *XRS2*遺伝子で、後者は*SPO11*, *MEI4*, *MER2*, *REC102*, *REC104*, *REC114*遺伝子である¹⁷⁾(図3-②)。

この中で、Spo11蛋白質は古細菌で発見された新規のII型トポイソメラーゼとコンセンサス配列をもち、DSB形成反応を触媒する¹⁸⁾。この蛋白質の135番目のチロシン残基が可逆的のトランスエステラーゼ反応によ

DNA二重鎖切断修復機構と減数分裂期組換え

図2 減数分裂期白色と黒色の染色体よりなる二倍体の細胞が減数分裂を行い一倍体の配偶子を4つ形成するまでの経過をあらわしている。相同染色体の対合に伴い、染色体はシナプトネマ複合体 (SC) と呼ばれる高次構造を形成する。

図3 減数分裂期組換えの特徴と、その過程に関与する遺伝子。

りDNAのリン酸バックボーンを攻撃し、切断で生じた5'端とホスホジエステル結合で共有結合する(図3-②)。その後Spo11蛋白質が除かれ、5'末端はエキソヌクレアーゼによる攻撃を受け、3'端突出の切断端が形成される¹⁸⁾(図3-③)。そしてこの約600塩基の一本鎖DNAが相同性の検索に用いられる。

非常に興味深いのは、DSB修復に必須の役割を持つMre11、Rad50、Xrs2蛋白質がDSB形成にも必須なことである。Mre11のC末端領域がDSB形成にのみ必要なのが最近我々の研究室で示された(投稿準備中)。Mre11はSpo11等の減数分裂期特異的の蛋白質とも複合体を形成しDSB形成を触媒するのもかも知れない。

Mre11 複合体はDSB形成後のエキソヌクレアーゼ反応も行くと予想される(前述)。DSB形成後にMre11は一過的にリン酸化され、DSBが蓄積するRAD50の点変異株(*rad50S*)では、リン酸化フォームが蓄積する。Mre11のヌクレアーゼ活性はリン酸化により制御されているのかも知れない(投稿中)。MRE11遺伝子の点変異株*mre11-58*でも、減数分裂期のDSBは起きたままで蓄積するが、体細胞分裂期に生じたDSB末端からのプロセッシングもその欠変異株同様低下する⁸⁾。このことはMre11複合体の同じ活性が減数分裂期および体細胞分裂期のDSBプロセッシングに利用されていることを示唆している。*mre11-58*がホスホジエステラーゼのコンセンサス配列に変異を持つことから、Mre11がDSB末端のプロセッシング反応と、Spo11蛋白質を5'末端から取り除く反応に関与すると考えられる。減数分裂期のDSBプロセッシングにはさらにSae2/Com1蛋白質が必要である^{19), 20)}(図3-③)。

2) DNA鎖移行反応(図3-④)

減数分裂期組換えと体細胞分裂期のDSBの組換え修復は同じ機構で行われると考えられるが、前者にはいくつかの付加的な遺伝子が必要である。前述のRAD51, 52, 54, 55, 57遺伝子の変異株の内、*rad54*変異株以外はすべて減数分裂期異常のため配偶子が致死になる。RAD54遺伝子には相同遺伝子(*RDH54/TID1*)があり、両遺伝子の二重変異株は減数分裂異常を示す²¹⁾。RAD51には減数分裂期特異的に発現する相同遺伝子DMC1がある。Rad51と57同様、Dmc1蛋白質にはRecA蛋白と構造上の同源性がある²²⁾。これらの変異株では、減数分裂期に生じたDSBは消失せず、組換え体の形成は抑えられる。この事は、減数分裂期相同組換えにDSB修復機能が必須であることを示している。

4.2. 減数分裂期組換えの特性

減数分裂期組換えは相同染色体の正確な分配のための機構でもあり、それ観点から特有の制御を受けている。DSBにより誘発される減数分裂期組換え反応は、姉妹染色体間(図3-⑦)では抑えられ、相同染色体間で促進される(図3-⑥)。この相同染色体間の組換え反応の促進はシナプトネマ複合体の構成成分であるRed1蛋白質によって行われている²³⁾(図3-⑤)(後述)。減数分裂期組換えはその反応の中間体として二重ホリデー構造(図3-⑨)をとるが²⁴⁾、その解離の仕方にも減数分裂期組換え特有の制御がある(図3-⑧)。一般に組換え中間体(ホリデー構造)からは、その解離軸の方向の違いにより交叉型(図3-⑪)および遺伝子変換型(図3-⑫)の二種類の組換え体が生成する。減数分裂期では交叉型の組換え体形成が相同染色体対合保持の役

割を果たしており(図3-⑬)、その頻度が低下すると相同染色体不分離が起こり、配偶子は致死となる。減数分裂期の組換え中間体の解離過程では交叉型組換え体を積極的に確保する機構がある。減数分裂期特異的の遺伝子であるZIP1, MSH4, MSH5, MER3(投稿準備中)の機能が欠損すると交叉型組換えの頻度が2から10倍低下し胞子が致死となることから、これらの遺伝子がホリデー構造の解離方向を制御していると考えられる¹⁷⁾(図3-⑩)。

4.3 シナプトネマ複合体と減数分裂期組換えの制御

相同染色体は対合して、シナプトネマ複合体(SC)と呼ばれるリボン状の蛋白質と核酸の高次複合体を形成する。そして相同染色体は全長にわたって100 nmの近傍にまで近づく。SC形成初期には各々の姉妹染色分体上にaxial coreと呼ばれる構造が染色体当たり複数箇所形成され、それが染色体全長に広がりaxial elementが形成される(図2)。さらにこの部分にSCの中心部分(central element)を形成する蛋白質が組み込まれlateral elementを形成し、この構造が隔々まで行き渡りSC構造ができ上がる(図2)。DNAの大部分はlateral elementの外側にあってクロマチンループと呼ばれる束ねられた形態をとる。その局在場所から、Red1, Hop1蛋白質はlateral elementの、Zip1蛋白質はcentral elementの構成因子と考えられる²⁵⁾。減数分裂期の染色体上には組換え小節(recombination nodule)と呼ばれる構造体が局在する(図2)。相同染色体が対合し始める頃観察されるものを初期組換え小節と呼び、対合が完了した頃に観察されるものを後期組換え小節と呼ぶ。初期組換え小節は後期組換え小節に比べ数が多いこと、対合形成が始まる時期に最も高頻度に観察されることからDNA鎖移行反応を伴う相同検索機構の局在(図3-⑨に相当)を反映していると考えられる。対合形成時に染色体上に多数のフォーカスとして共局在するRad51とDmc1蛋白質や他のRAD52グループの蛋白質群はこの初期組換え小節の構成因子の有力な候補である²⁶⁾。一方、後期組換え小節は相同染色体が完全に対合する時期に観察されること、その数と分布がキアズマ(図3-⑬)と良く対応することから交叉型組換え機構の局在を反映していると考えられる¹⁷⁾。組換え中間体の解離方向を制御するMsh4, Msh5, Mer3蛋白質などがこの構造体を形成しているかもしれない。

5. おわりに

効率的なDSB修復には相同組換えと末端結合反応が必要である。MRE11サブグループの遺伝子産物はDSB末端のプロセッシングと末端の結合反応に関与する。

Mre11蛋白質複合体のプロセッシング反応は相同組換え反応が正常な速度で進行するために必要であるが、組換え効率自体には影響を与えない。このプロセッシング反応がMRE11サブグループの関与するDNA傷害修復過程にどの様に関与しているかについて明かな答えは得られていない。また、末端結合反応には高等真核生物においてDSB修復とV(D)J組換えに関与するKU遺伝子の酵母ホモログであるyKU70, 80遺伝子産物が関与しているが、これらの蛋白質とMRE11サブグループの遺伝子産物がどの様に関連しているかは興味深い問題である。

減数分裂期組換えの開始反応であるDSB形成がSpo11蛋白質によって行われることが判明したことは最近の大きな進展である。しかし、このDSB形成はDSB修復に関与するMre11, Xrs2, Rad50蛋白質の存在に強く依存するが、両者がどの様に関連しているかは分かっていない。一方で、DSBは染色体上でもホットスポットと呼ばれる領域でしか起こらず、その効率良い形成にはaxial coreの発達および相同染色体の存在が必要である。DSB形成の位置的、時間的制御機構の解明は今後の課題と思われる。さらに減数第一分裂において相同染色体は、体細胞分裂期における組換え修復と共通の機構により認識されると考えられるが、その後の正確な分配には交叉型組換えを染色体当たり最低一カ所確保することが必要なので、組換え中間体の解離方向の制御は減数分裂特有の問題として重要と思われる。また、今回はスペースの都合上触れられなかったが、減数第一分裂の染色体分配と染色体末端構造(テロメア)は密接な関係があり、今後の解析が注目される。これらの諸現象とシナプトネマ複合体との関係を知ることは減数分裂機構、とりわけDSB修復機構がどの様に取り込まれて減数分裂という細胞周期が進化してきたかを考える上でも極めて重要であろう。

文 献

- Shinohara, A., Ogawa, T. (1995) *Trends Biochem Sci*, **20**, 387-391.
- Bai, Y., Symington, L.S. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 2025-2037.
- Milne, G.T., Weaver, D.T. (1993) *Genes Dev*, **7**, 1755-65.
- Hays, S.L., Firmenich, A.A., Berg, P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**, 6925-6929.
- Firmenich, A.A., Elias, A.M., Berg, P. (1995) *Mol Cell Biol*, **15**, 1620-1631.
- Shinohara, A., Ogawa, H., Ogawa, T. (1992) *Cell*, **69**, 457-470.
- Ivanov, E.L., Sugawara, N., White, C.I., Fabre, F., Haber, J.E. (1994) *Mol Cell Biol*, **14**, 3414-3425.
- Tsubouchi, H., Ogawa, H. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 260-268.
- Sharples, G.J., Leach, D.R. (1995) *Mol. Microbiol.*, **17**, 1215-1217.
- Connelly, J.C., Leach, D.R.F. (1996) *Genes to Cells*, **1**, 285-291.
- Moore, J.K., Haber, J.E. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2164-2173.
- Boulton, S.J., Jackson, S.P. (1998) *EMBO J*, **17**, 1819-1828.
- Milne, G.T., Jin, S., Shannon, K.B., Weaver, D.T. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4189-4198.
- Tsukamoto, Y., Kato, J., Ikeda, H. (1997) *Nature*, **388**, 900-903.
- Sun, H., Treco, D., Schultes, N.P., Szostak, J.W. (1989) *Nature*, **338**, 87-90.
- Wu, T.C., Lichten, M. (1994) *Science*, **263**, 515-518.
- Roeder, G.S. (1997) *Genes Dev*, **11**, 2600-2621.
- Keeney, S., Giroux, C.N., Kleckner, N. (1997) *Cell*, **88**, 375-384.
- McKee, A.H., Kleckner, N. (1997) *Genetics*, **146**, 797-816.
- Prinz, S., Amon, A., Klein, F. (1997) *Genetics*, **146**, 781-795.
- Shinohara, M., Seta-Yamaguchi, E., Buerstedde, J.M., Shinagawa, H., Ogawa, H., Shinohara, A., (1997) *Genetics*, **147**, 1545-1556.
- Bishop, D.K., Park, D., Xu, L., Kleckner, N. (1992) *Cell*, **69**, 439-56.
- Schwacha, A., Kleckner, N. (1997) *Cell*, **90**, 1123-1135.
- Schwacha, A., Kleckner, N. (1995) *Cell*, **83**, 783-791.
- Smith, A.V., Roeder, G.S. (1997) *J. Cell Biol.*, **136**, 957-967.
- Bishop, D.K. (1994) *Cell*, **79**, 1081-1092.