

柴田上席研究員研究室 Shibata Distinguished Senior Scientist Laboratory

上席研究員 柴田 武彦
SHIBATA, Takehiko

この研究室では、相同DNA組換え、特に、あるDNA配列が、同じまたは似たDNA配列によって上書きされる遺伝現象「gene conversion」に注目しています。Gene conversionは、DNA二本鎖切断修復に働くほか、特定条件下では既存の遺伝子をシャッフルし、効率よく新しい遺伝子を生み出す力があり、特に高等動植物では生体防御に働いていることが解り始めています。生体でのGene conversion開始制御機構と遺伝機能を、分子の反応として物質科学の法則で理解することを目指しています。さらに、その成果をもとに作物などの育種、予防や医療に役立つ制御と予知が可能な技術への橋渡しを視野に入れていきます。そのために、生化学、NMR等による分子構造解析など試験管内での解析を基礎に、分子遺伝学的手法まで必要に応じて使っています。組換え酵素と組換えメディエータの共同作用による相同DNA対合・ヘテロ二重鎖組換え中間体形成の分子機構、イネとシロイヌナズナの減数分裂期相同組換え開始酵素の分子機能解明、ミトコンドリアDNAの組換え依存的複製・分配機構と細胞質遺伝機能など、核と細胞質の遺伝の基本について新たな切り口での理解に貢献しています。

1. Gene conversion開始制御機構についての生化学、構造・分子生物学（井川*1, 柴田, 増田*3, 井上*2,3）

相同的DNA組換えに働く反応は、基質もDNAという高分子であるため、酵素論、生化学、分光法等従来の研究手法での解析が容易でなく研究の進展を阻んできた。本研究の目的は、相同的DNA組換えの機能、機構および制御を、蛋白質やDNAの分子間、分子内の相互作用を基に理解することである。相同DNA組換えの要は、相同DNA対合という、二本鎖切断端等に由来する一本鎖DNA領域が、ほぼ同じ配列をもつ（相同な）正常な二重鎖DNAに割り込み、分子間二重鎖（ヘテロ二重鎖）をつくる反応である。相同DNA対合は、核ゲノムでは、RecAやRad51等のRecA型蛋白質がATPを補助因子として行う。一方、我々は、相同DNA対合をATPなしで行うMhr1等の一群の蛋白質群を明らかにしてきた。RecA型と非RecA型蛋白質は、分子構造が互いにまったく異なる。そこで、我々がNMRによる反応中間体DNAの3D構造から推定したように、この両者が行う相同DNA対合の機構が同一であるのか、蛋白質構造の違いを反映して異なる機構によって起こるのかが問題である。我々は、RecA型と非RecA型蛋白質による相同DNA対合反応を比較解析することにより、相同DNA対合の基本機構を明らかにすることを目指した研究を行っている。さらに、RecA型蛋白質に作用して相同DNA対合反応の機能調節に働く蛋白質の存在が知られている（真正細菌ではRecF, RecO, RecR, SSB）。それらの、調節作用機構を明らかにすることを目指した研究も行っている。材料として、RecA型蛋白質としてRecA（大腸菌、高度好熱細菌 *Thermus thermophilus*）を非RecA型蛋白質としてMhr1（出芽酵母ミトコンドリア）とRecO（高度好熱細菌）を、また、調節蛋白質としては、RecF, RecO, RecRを扱っている。

NMRと電子顕微鏡による分子構造解析、FRETや指定部位変異法によるDNA結合部位解析、試験管内反応解析、さらに分子遺伝学的解析を行い、以下の成果を挙げた。1. バクテリアの組換えメディエーターRecFOR系において、これまで、RecF, RecO, RecRは、複合体を作って働くといわれてきた。われわれの解析の結果、RecR上のRecFとの結合に必要な部位とRecOとの結合に必要な部位は重なり合っており、RecFとRecOとがRecRに同時に結合できないことが明らかになった。また、単独では2量体であるRecRは、RecFと相互作用することでリング状の4量体になり二重鎖DNAに安定に結合することが示唆された。2. 一方、RecRとRecOとはRecAを単鎖DNA結合蛋白質が結合した単鎖DNAにRecAを載せる機能を持つが、RecOは単独で、単鎖DNAに結合しているSSBを置き換える過程を明らかにした。これらをもとに、RecFORによる二重鎖DNA・単鎖DNA境界にRecAを結合させる機構の新規な機構モデルを構築した。（ここまでは、城生体金属科学研究室の美川との共同研究）。2. 酵母ミトコンドリアDNA (mtDNA) は、非RecA型のMhr1による相同DNA対合により開始するローリングサークル様式（型）で複製しコンカテマーを作り、そのコンカテマーが選択的に子孫の細胞へ分配されることで、ホモプラスミーが急速に成立し、保たれることを明らかにしてきた。ホモプラスミーとは、数百から数千コピーもあるゲノムDNAをもつミトコンドリアと葉緑体で、その全てのDNAコピーが細胞レベルのみならず個体レベルでも同じ塩基配列を持っている状態を示し、これがオルガネラゲノムでは基本的な状態である。このローリングサークル型DNA複製開始に酸化損傷の修復に働くDNA-N-GlycosylaseであるNtg1が単独で、mtDNA複製開始点（ori）特異的な酸化損傷を認識し、ori部位にDNA二本鎖切断を入れること、それが、mtDNAの相同DNA組換えだけでなく、複製と分配にも主要な働きをしていることを初めて明らかにした。（この部分は、吉田化学遺伝学研究室の凌との共同研究）。これまで、mtDNAの相同DNA組換えはほとんど無視され、ホモプラスミー成立機構は謎とされてきた。そのため、mtDNA複製が、相同DNA組換えと共通の機構で開始し、それが、ホモプラスミー成立と維持に働くという機構が、高等動植物でも働いているかどうかは今後大きな問題である。

2. 高等植物のGene conversion開始制御機構の活用による新世代ゲノム加工技術（柴田, 新宮*2, 大里*2, 井川*1, 小沼*2, 片岡*4）

作物など高等植物において、ゲノム中の任意の狙った遺伝子だけを加工する標的技術が希求されているが未だ存在しない。これは、原理的には生物が自然に行う相同組換え機構を活用できれば、実現する。しかし、高等植物における相同DNA組換えの研究はあまり成果の報告が無く、理解が極めて限られている。そこで、まず、代表的な作物であり、モデル単子葉植物であるイネと、モデル双子葉植物であるシロイヌナズナを材料に、減数分裂期相同DNA組換え開始の分子機構の理解を目指した研究を始めた。この研究は、平成16年度までに、太田遺伝システム制御研究室との共同研究で、減数分裂期に働く相同DNA組換えの開始機構の研究を基にして、酵母やニワトリ培養免疫細胞において高頻度(集団の1/4~1/2) 標的組換えを独自の手法で誘導することに成功したことを背景としている。理研と作物研との共同研究によって、公的遺伝子銀行に登録されていなかったものも含め、イネに4種、

シロイヌナズナに3種ある組換え開始酵素Spo11蛋白質候補遺伝子のほゞ全てについて、蛋白質をコードする全長を含むcDNAを構築した。さらに、それらを用いてイネ、シロイヌナズナ、大腸菌での発現系構築と発現、シロイヌナズナでの相補試験系構築を行った。それに並行して、高等植物での相同DNA組換えの迅速測定系の開発と、植物細胞内での特定のDNA配列へのDNA結合ドメインの標的能力を測定する系の構築を進めた。

*¹嘱託職員，*²協力研究員，*³ジュニア・リサーチ・アソシエイト，*⁴研修生

The major research topic of this laboratory is the molecular mechanisms and functions of homologous (genetic or DNA) recombination, especially, gene conversion. Homologous recombination is observed within cells, as the overwriting of a DNA sequence by its homologous DNA sequence ("gene conversion"), or exchange of homologous DNA sequences between a pair of DNA molecules ("crossing-over"). Gene conversion plays a primary role in the repair of double-stranded breaks. Under certain conditions, in shuffling of sub-gene regions of similar but different genes to create new genes. A goal of our research is to understand the mechanisms and principles governing Mendelian and non-Mendelian genetic inheritance and evolution. The development of new genome-wide technology for plant breeding, based on the artificial control of gene conversion, is within our scope.

Intermolecular double-helix (heteroduplex) joint-formation is most important and unique to homologous recombination, which is generally catalyzed by RecA or its homologue in the presence of ATP (Shibata et al., 1979 PNAS). Our NMR analyses and the 3D structural modeling suggest that the extended DNA stabilized by a CH- π interaction between the 2' methylene moiety of the deoxyribose of each nucleotide-residue and the base of the following one (Nishinaka et al., 1997 PNAS), enables the simultaneous recognition and heteroduplex joint formation between homologous single-stranded and double-stranded DNAs. Thus, homologous recombination is likely to be an intrinsic molecular feature of DNA (Nishinaka et al., 1997 PNAS; Nishinaka et al., 1998 PNAS; Shibata et al., 2001 PNAS).

Non-Mendelian genetic inheritance is governed by mtDNA. Homoplasmy is a basic genetic state in non-Mendelian inheritance, in which all of 100-10000 mtDNA copies in each cell and all mtDNA in each individual have the same sequence. Mhr1, a protein required for mtDNA recombination, is a mitochondrial ATP-independent homologous pairing protein which we discovered based on the suggestion from the above finding (Ling & Shibata, 2002 EMBOJ). Our studies on Mhr1 of budding yeast (Ling et al., 1995 EMBOJ) revealed an unexpected mechanism of mtDNA replication and partitioning; *i.e.*, the homologous pairing activity of Mhr1 plays a role in the initiation of rolling circle mtDNA-replication to form head-to-tail multimers ("concatemers"), which are selectively partitioned into buds and are processed into monomers upon their transmission to buds (Ling & Shibata, 2002 EMBOJ). This finding reduced a model of the mechanism of establishing "homoplasmy," and we demonstrated that Mhr1 actually plays an important role in this process (Ling & Shibata, 2004 MBC).

Molecular functions of the proteins involved in the initiation of homologous recombination

In these studies, we analyze the molecular functions and interactions between proteins involved in homologous recombination at an atomic resolution, by the use of NMR and other spectroscopic means in addition to biochemical ones and site-directed mutagenesis. Generally homologous pairing is catalyzed by RecA-family proteins (RecA, Rad51, Dmc1). Within cells, 3'-single-stranded tails derived from double-stranded breaks are the first intermediates for the repair of the double-stranded breaks, but the single-stranded DNA-regions are immediately coated by single-strand binding protein (SSB, RPA), which prevents the binding of RecA-family proteins. In bacteria, RecF, RecR and RecO recognize the junction of double-stranded region and single-stranded one, and help the loading of RecA to the single-stranded region. Our studies revealed that the binding site of RecF and that of RecO on RecR overlap, and thus, the RecF and RecO compete in their binding to RecR. When the three proteins coexist, RecR which present form dimers by themselves preferentially bind to RecFs to form complexes consists of four RecRs and two RecFs. The binding of RecR and RecF is required for the complex formation of RecF, RecR and DNA. On the other hand, the interaction between RecR and RecO is required for the displacement of SSB by RecA on single-stranded DNA. Based on these findings, we proposed a new model for the function of RecF, RecR and RecO for the loading of RecA on SSB-coated single-stranded DNA from the junction of double-stranded region and single-stranded one. (Collaboration with Dr. Tsutomu MIKAWA, Biometal Science Laboratory)

The initiation of rolling circle mtDNA replication by *ori*-specific double-stranded cleavage by Ntg1, a base-excision N-glycosylase-DNA-lyase

The initiation of rolling circle replication by homologous pairing by Mhr1 suggests the requirement of double-stranded breaks for the initiation, like the case of homologous recombination. Yeast mtDNA has several replication origins (*oris*). We found *ori*-specific double-stranded breakage, which is stimulated by Ntg1 and oxidative stress. On the other hand, concatemer formation and mtDNA recombination are both stimulated by Ntg1. *In vitro* experiments using purified Ntg1 and DNA revealed that Ntg1 alone recognizes specific modification at *ori* on mtDNA and introduces a double-stranded break at *ori*. These findings suggest that mtDNA has a specific oxidative modification at *ori*, which Ntg1 recognizes and introduces a double-stranded break at *ori*. The double-stranded break is processed into 3'-single-stranded tail, which is paired by Mhr1 with an intact circular mtDNA to serve a primer to initiate rolling circle mtDNA replication or mtDNA recombination. This study also revealed that the same mechanism acts in hypersuppressiveness, an extremely biased inheritance of a small mtDNA fragments containing an *ori* over normal mtDNA. It has been a textbook description that RNA synthesized at an *ori* serves as a primer to initiate theta-type mtDNA replication. Thus, it would be a future issue whether or not the above mechanisms of mtDNA inheritance found in yeast generally play a critical role in mtDNA inheritance in higher eukaryotes such as animals and plants. (Collaboration with Dr. Feng LING, Chemical Genetics Laboratory)

Staff

Head

Dr. Takehiko Shibata

Members

Dr. Kouji HIROTA*¹

Dr. Jin INOUE*²

Dr. Kazuto KUGO*²

Dr. Yoshinori SHINGU*²

Dr. Shuichi OHSATO*²

Ms. Mariko ONUMA*³

Dr. Shukuko IKAWA*⁴

*¹Special Postdoctoral Researcher *² Contract Researcher *³Contract Technical Assistant *⁴Temporarily Employee

in collaboration with

Dr. Tsutomu MIKAWA (Biometal Science Laboratory)

Dr. Feng LING (Chemical Genetics Laboratory)

Visiting Members

Dr. Kunihiro OHTA (The University of Tokyo)

Dr. Yutaka ITO (Tokyo Metropolitan Univ.)

Dr. Kyo WAKASA (Tokyo University of Agriculture)

Dr. Hitoshi KURUMIZAKA (Waseda Univ.)

Dr. Koji KUSANO (Kyoto Institute of Technology)

Dr. Shuichi HIROAKI (Koube Univ.)

Dr. Katsumi KAWASAKI (Setsunan Univ.)

Dr. Hiroyuki SASANUMA (The University of Tokyo)

Dr. Lin WAKA (Saitama Bio)

Ms. Tokiha MASUDA (Grad. Sch. Sci., Yokohama City Univ.)

Trainees

Mr. Yoshitomo KATAOKA (Grad. Sch. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Kentaro YAMADA (Grad. Sch. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Kunitake IJU(Grad. Sch. Sci., Yokohama City Univ.)

Ms. Sakae ONODERA (Grad. Sch. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Kohei KUROSAWA (Meiji Univ.)

Mr. Tomohiko MORITA (Grad. Sch. Sci., Saitama Univ)