

## “場”を可視化して核内での相同組換えを見る



技術解説

篠原 彰\*

Observation of recombination by visualizing the recombination site

Key Words : recombination, GFP

### 1. はじめに

ヒトを含めさまざまな生物の全ゲノムの塩基配列が決定されて、生物学は新しい時代に突入した。遺伝学や組換えDNAの手法を基盤に、この20年来生物学の大きな流れになっている分子生物学の解析は遺伝子の機能解析、あるいはそのコードする蛋白質を試験管内で解析し、その遺伝子/蛋白質の細胞機能を解析することで、その遺伝子/蛋白質が関わる生命現象を明らかにして来た。近年、蛋白質を可視化する技術が飛躍的に進歩することで、細胞内での蛋白質の局在やそのダイナミクスの解析が盛んに行なわれるようになった。今回は我々が近年取り組んでいる、染色体上の機能部位を可視化することによる、DNA交換反応の相同組換え反応の解析する方法とその成果についての概略を記してみたい。

### 2. 相同組換えとは？

父親由来、母親由来の相同な2本のDNA鎖あるいは染色体の交換反応である相同組換えはDNAの傷の修復を通してのゲノムの安定化に、配偶子形成においてはゲノムのシャッフリングを通して、遺伝子の多様性の産生に大切な役割を果たしている<sup>(1)</sup>。組換えの欠損はゲノムの安定維持に破綻を生み出し、我々ヒトでは体細胞の癌化を誘発し、生殖細胞では

流産の原因となる異数体の配偶子を生み出す原因となる。実際に近年の解析から遺伝性(家族性)の乳ガンの原因遺伝子が組換えに直接関わるということが知られてきて、組換えと細胞の癌化の関連が注目されている。

### 3. 組換えの場を可視化する

相同組換えに関わる蛋白質は細菌からヒトまで保存されていて、その分子メカニズムもおおまかには保存されていると考えられている。特にDNAの相同は配列の検索反応に関わる蛋白質(RecA/Rad51後述)は細菌、古細菌、真核生物に存在し、これまでゲノム配列が決まったすべての生物で保存されていることが分かっている<sup>(2)</sup>。組換えの分子メカニズムは細菌や菌類の遺伝学の解析、あるいは精製した蛋白質の生化学的な解析から明らかにされてきた。特に個々の蛋白質を用いた試験管内の再構成実験はさまざまな成果を生み出した。試験管内では裸のDNAを用いた。そして、他の蛋白質が存在しない状態での再構成系である一方、核の中ではDNAはヒストンに包まれており、多数の蛋白質が存在する中で進行する。よって、“細胞内で起こる”組換え反応を、その反応と共に集合解離する蛋白質と共に捕らえることは重要である。このような考えに基づき、細胞内の組換えの反応を明らかにすべく、我々は組換えの反応の場と関わる蛋白質を可視化することに取り組んでいる。

細胞内で起きる唯一の組換え反応を解析するため、我々はパン酵母の接合型変換の系を利用した(図1)。酵母の接合型は組換えによってその情報が変換され、雌雄の細胞が交互に生じる。この変換は接合型の情報を支配するMAT遺伝子座に特異的切断酵素HOエンドヌクレアーゼによって、組換えの開始反応である2重鎖切断が導入されることで始まる。MAT遺



\* Akira SHINOHARA  
1964年1月生  
1991年大阪大学大学院・理学研究科・博士課程修了  
現在、大阪大学・たんぱく質研究所・生合成部門、教授、理学博士、分子生物学  
TEL 06-6879-8624  
FAX 06-6879-8626  
E-Mail ashino@protein.osaka-u.ac.jp

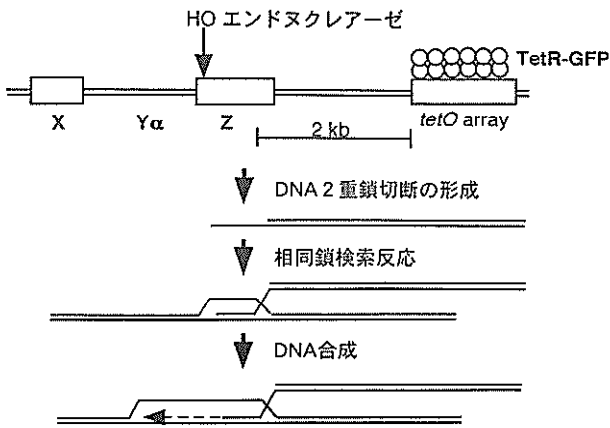


図1 酵母の接合型を支配するMAT遺伝子座に下流にGFP-TetRリプレッサー融合蛋白質の結合配列を挿入し、この部位を細胞内で可視化できるようにした。組換えの開始はHOエンドヌクレアーゼを一過的に発現させることでこの部位にDNA 2重鎖切断が生じる。2重鎖切断後生じる単鎖DNAを使い、相同な配列を持つ2本鎖DNAが探され、相同な配列が見つかったら1本鎖DNAが2本鎖DNAを開裂させることで、入り込む。この反応は相同鎖検索、交換反応と呼ばれ、酵母では大腸菌RecAホモログのRad51とRad52が反応に関わる。

伝子座を可視化するためにこの遺伝子座の近傍にDNA結合蛋白質-GFP融合蛋白質(我々の場合はテトラサイクリンリプレッサー蛋白とGFPの融合蛋白質)の認識部位の配列を挿入した(図1)。これにより細胞内のMAT遺伝子座を直接顕微鏡下で追うことができる。このような染色体上の特定の部位を可視化する技術はLacIやTetRリプレッサー蛋白を使い、酵母で広く使われている<sup>(3)</sup>。

この系では誘導可能なプロモーターの下流にHOエンドヌクレアーゼの遺伝子を置くことで、組換えを一過的かつ同調的に進行させることができる。我々はHOエンドヌクレアーゼによるDNA 2重鎖切断導入後の相同組換えに関わる蛋白質のこの部位への集積反応を間接蛍光抗体法を用いて解析した<sup>(4)</sup>。我々の方法の特徴は染色体上の蛋白質を固定し、展開した染色体上で抗体を用いて検出している点がGFPなどの融合蛋白質を用いて、生細胞で蛋白質の局在を検出する系とは大きく異なる。1つの問題点は細胞を固定するため、蛋白質の挙動のダイナミクスが直接追えないことが挙げられる。この系を用いて、2つの相同組換え反応に関わる蛋白質Rad51, Rad52の局在を解析した(例, 図2)。Rad51, Rad52は組換え反応の根幹を成す相同鎖検索反応に働く蛋白質

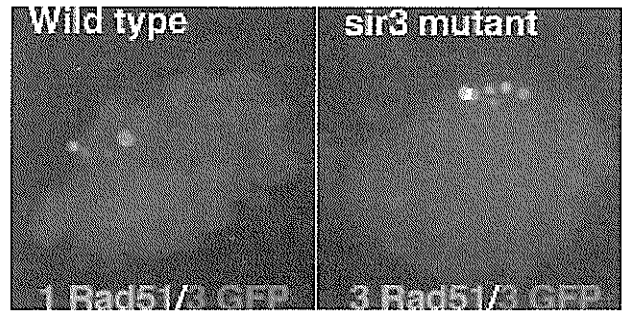


図2 図1の系を改良し、MAT遺伝子座に加え、2重鎖切断が入る2つの領域にもTetR-GFPの系を用いて、組換えの場を可視化できるようにした。この株で組換えの場(緑)と相同組換えに関わるRad51(赤)の局在を間接蛍光抗体法で検出した。左は2重鎖切断が1ヶ所入る野生株、右は2重鎖切断が3ヶ所入るsir3変異株での解析。両方の株で3つのGFPのシグナルが検出できるのに対して、野生株では1つ、sir3変異株では3つのRad51のシグナルが観察できる。

である。Rad51は単鎖DNA上に右巻の螺旋構造のフィラメントを作って相同鎖検索反応に関わる蛋白質である。一方、Rad52はリング状の構造をとり、Rad51のフィラメント構造形成を促進する因子である。

また、この系の大きな特徴は組換えの効率が高いため、組換え反応の中間体をサザン法などで検出できるところにある。つまり、DNAの変化とその上に存在する蛋白質の変化を同時に比べることができる。両者を比較することで、DNAの中間体の遷移反応とDNA上の蛋白質の集解除離反応が明確に対応付けられる。実際の解析から、非常に当たり前のことだが、1つの反応が進行し、次の反応に移行すると、そこに関わる蛋白質が効率良くその場から解離することが分かった。これは反応の終了と蛋白質複合体の解離が厳密に共役かつ制御されていることを示唆している。さらに、このような解析によってこれまで知られなかった組換えに関わる蛋白質の新しい機能や中間体としての蛋白質-DNA複合体が同定出来た。これまでは相同鎖検索反応はRecAホモログのRad51が形成するフィラメントが単独で行なうと考えられて来たが、我々の解析は、細胞内ではこの反応にはRad51だけでなく、Rad52を含む蛋白質の超分子装置が組換えの際の相同鎖検索、交換反応に働くことを示唆している。このように我々の解析によりこれまでとは異なる視点で組換え反応を

解析することで、細胞あるいは核内で組換えが起こる際に蛋白質がどのような状態で機能しているかが垣間見えたような気がする。今後この方法を組換えに関わる他の蛋白質あるいは減数分裂期の組換え反応に応用することで、さらに組換えの分子メカニズムについての新しい情報を生み出してくれることを期待している。また、この技術は他のDNA/染色体上で起きる反応、例えば、DNA損傷チェックポイント、などの解析にも応用できる。一方で、我々の解析は蛍光のシグナルの強度に依存するため、数少ない分子を観察するには現時点では適していない。さらなる技術の発展が必要だと考えられる。

#### 4. GFP融合蛋白質の問題点

近年、細胞内の蛋白質の局在、挙動の解析にGFP融合蛋白質が頻繁に使われている。同様な手法が酵母の相同組換えを解析するために使われた。不思議なことに我々の結果とGFP融合蛋白質を用いた他のグループの結果では異なる点が出て来た<sup>(5)</sup>。前述の組換えに関わるRad52のGFP融合蛋白質はDNA損傷の誘発後に核内に大きなドット状の構造体を形成する<sup>(5)</sup>。このドット状染色構造体を一般にfocusまたはfociと呼んでいる。興味深いことにこのRad52-GFPのfocusの数はDNAの損傷の数と比例しないことが示されている。例えば、細胞内に20個のDNA損傷が存在しても、1, 2個しかfocus構造体は形成されない。これはいくつもの組換え反応が集合し、1, 2個の組換えの場が集まっていることで説明できる。ところが、我々が上記の系を用いて、Rad52の解析を行なうと、少なくとも3つまではDNA 2重鎖切断部位とRad52 fociの数が1対1の対応することが分かった(図2)<sup>(4)</sup>。我々の系は細胞を固定しながら破裂され、染色体を展開して蛋白質の局在を解析する方法だが、GFPの場合は細胞そのままに蛍光のシグナルを観察できる。細胞を破碎した時に構造体が壊れた可能性も考えられる。そこで、Rad52-GFP融合蛋白質を持つ株と野生株でRad52の局在を同じ条件で観察した<sup>(4)</sup>。興味深いことに野生株(GFP融合蛋白を発現していない株)ではDNA損傷を導入すると多数のRad52 fociが観察されるのに対

して、Rad52-GFP融合蛋白質を持つ株では大きな、強いfocus構造が1つ観察された。この結果を素直に解釈すると、Rad52-GFP融合蛋白質はDNA損傷により大きな集合体を作り易い性質を持つと考えられる。つまり、GFP融合蛋白質の挙動と通常蛋白質の挙動は少なくともRad52に関しては異なると考えられる。もちろん、このような違いはRad52のみ見られる現象かもしれない。あるいは集積したRad52-GFPのシグナルは明るすぎる故に、弱いシグナルがあるにも関わらず見落としている可能性も考えられる。いずれにしても、このような解析結果はGFPを用いた方法が万能でないことを示唆している。一番の驚きはこのような通常蛋白質と異なる挙動を示すにも関わらず、Rad52-GFPを持つ株はDNAの修復に欠損を示さなく、一見正常に見える点にある。近年その便利さゆえにさまざまなタグが蛋白質の挙動を解析する場で使われているが、一見正常に見えても、通常蛋白質と機能を異なる場合も報告されている。そういう意味でもGFPを用いた場合、野生型の蛋白質ではなく、融合蛋白質の挙動を見ていることを場合によっては念頭においていた方がいいのかもしれない。

#### 5. 終わりに

相同組換え反応を細胞内で観察することで従来とは異なる組換えのモデルを提唱することができた。一方で、ここで示した*in vivo*での解析から*in vitro*の解析から得られた情報とは異なる結果が得られた。もちろん、一方で*in vitro*の解析結果が*in vivo*でも正しいことを確認出来た。つまり、今後の生物学の解析では*in vivo*, *in vitro*の解析が両方重要であることが分かる。その中で今回概説したように細胞内で特定の蛋白質の挙動を解析することはますます重要な位置を占めると考えられる。

#### 謝 辞

今回の原稿で概述した仕事は大阪大学理学研究科の大学院生、宮崎敏子さんと米国Brandeis大学のJim Haber博士との共同研究です。末筆ですが、宮崎さんの努力に感謝の意を表したいと思います。

文 献

1. Pāues, F. & Haber, J.E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 349-404. (1999).
2. Shinohara, A. & Ogawa, T. Rad51/RecA protein families and the associated proteins in eukaryotes. *Mutat Res* 435, 13-21(1999).
3. Robinett, C.C. et al. In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *J Cell Biol* 135, 1685-700(1996).
4. Miyazaki, T., Bressan, D.A., Shinohara, M., Haber, J.E. & Shinohara, A. In vivo assembly and disassembly of Rad51 and Rad52 complexes during double-strand break repair. *Embo J* 23, 939-49(2004).
5. Lisby, M., Mortensen, U.H. & Rothstein, R. Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat Cell Biol* 5, 572-7(2003).

この記事をお読みになり、著者の研究室の訪問見学をご希望の方は、当協会事務局へご連絡ください。事務局で著者と日程を調整して、お知らせいたします。

申し込み期限：本誌発行から2か月後の月末日

申し込み先：生産技術振興協会 tel 06-6395-4895 E-mail [seisan@maple.ocn.ne.jp](mailto:seisan@maple.ocn.ne.jp)

必 要 事 項：お名前、ご所属、希望日時(選択の幅をもたせてください)、複数人の場合はそれぞれのお名前、ご所属、代表者の連絡先

著者の都合でご希望に沿えない場合もありますので、予めご了承ください。