

IS110 ファミリーリコンビナーゼはブリッジ RNA 依存性 DNA 組換え反応を触媒する

西増 弘志^{1,2}

最近、筆者らは、大腸菌のトランスポゾンにコードされた IS110 リコンビナーゼがブリッジ RNA と協働し、ブリッジ RNA に相補的な配列を持つドナー DNA およびターゲット DNA の間の組換え反応を触媒することを発見した。すなわち、IS110 リコンビナーゼは前例のない「プログラム可能な」DNA 組換え酵素であることが明らかになった。本稿では、IS110 因子の転移に関与するブリッジ RNA の発見、IS110 リコンビナーゼ-ブリッジ RNA 複合体による DNA 組換えメカニズム、および、IS110 システムの応用について紹介したい。

1. はじめに

「動く遺伝子」として知られるトランスポゾンは、ゲノム内を移動する遺伝的要素であり、1950年代にバーバラ・マクリントックにより発見された¹⁾。この発見によりマクリントックは1983年にノーベル生理学・医学賞を受賞した。トランスポゾンは、自身の塩基配列のコピーをゲノム内の別の位置に挿入し、ゲノムの構造と機能に大きな影響を与える。したがって、トランスポゾンは生物の進化や遺伝的多様性において重要な役割を果たすと考えられている。実際、ヒトゲノムの約40%はトランスポゾン由来の配列で占められている。トランスポゾンはDNA型とRNA型（レトロトランスポゾン）の二つに分類され、それぞれ

の転移メカニズムは長年にわたって研究されてきたが、その複雑性と多様性から未解明な点も多く残されている。トランスポゾンの転移を触媒する酵素は、長鎖DNAの組込みをはじめとするゲノム編集技術への応用においても注目されている。

2. IS110 ファミリー因子

DNA型トランスポゾンは、「カット&ペースト」メカニズムを用いてゲノム内を移動する。通常のDNA型トランスポゾンは、自身の転移を触媒する酵素（トランスポザーゼ）をコードする配列と両末端の逆向き反復（terminal inverted repeat: TIR）配列からなる。トランスポゾンから転写・翻訳されたトランスポザーゼはTIR配列を認識しトランスポゾン配列を切り出し、ゲノムDNAの異なる領域に挿入する²⁾。

挿入配列（insertion sequence: IS）因子は、原核生物のゲノムに存在する小型の転移因子であり、トランスポザーゼ遺伝子とTIR配列から構成される³⁾。IS因子は、トランスポザーゼの種類や転移メカニズムの違いに基づき、約30のファミリーに分類される。通常のIS因子と異なり、大腸菌由来IS621因子を含むIS110ファミリー因子は、環状DNA中間体としてゲノムDNAから切り出され、特定の配列（ターゲット配列）を持つゲノム領域に転移する⁴⁾（図1）。したがって、IS110ファミリー因子の転移を触媒する酵素は、標的DNAに対する特異性の低いトランスポザーゼではなく、Creなどの部位特異的リコンビナーゼに近い性質を持つため、リコンビナーゼに分類される。ま

¹ 東京大学先端科学技術研究センター（〒153-8904 東京都目黒区駒場4丁目6番1号）

² 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻（〒153-8904 東京都目黒区駒場4丁目6番1号）

IS110 family recombinases catalyze bridge RNA-guided DNA recombination

Hiroshi Nishimasu^{1,2} (1 Structural Biology Division, Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8904, Japan, 2 Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8904, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2024.960743

© 2024 公益社団法人日本生化学会

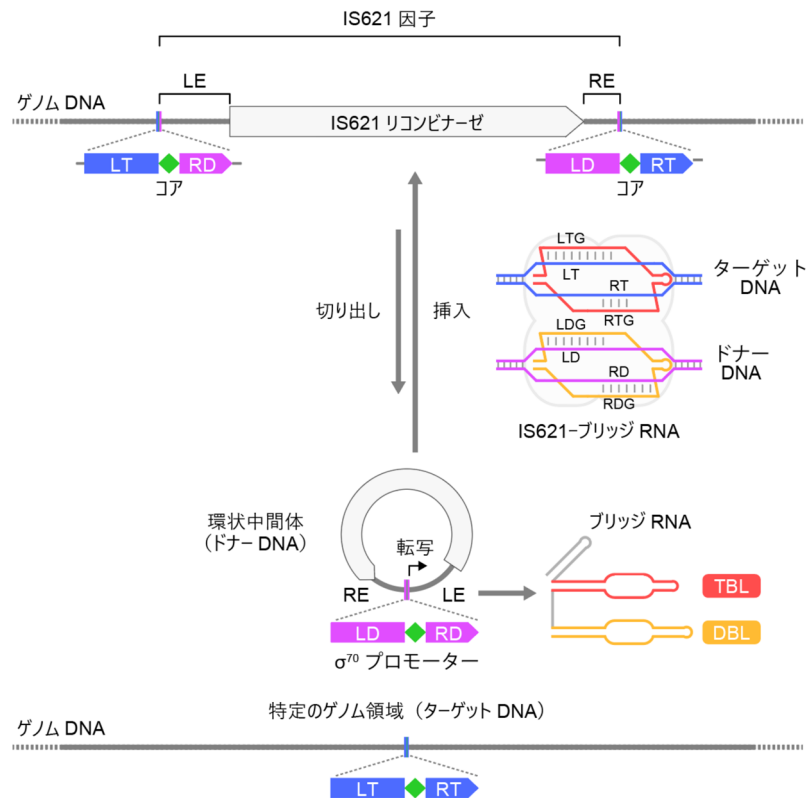


図1 IS621因子の転移サイクル

IS621因子が環状DNA中間体として切り出されるメカニズムは不明であり、今後の研究が待たれる。

た、他のトランスポザゼやリコンビナーゼと異なり、IS110リコンビナーゼは特徴的なDEDDモチーフ (Asp-Glu-Asp-Asp) を含むRuvCドメイン、および、保存されたセリン残基を含むTnpドメインを持つ⁵⁾。このような特徴から、IS110ファミリー因子の転移メカニズムは既知のIS因子と異なることが示唆されていたが、その詳細は不明だった。

3. ブリッジRNAの発見

大腸菌由来のIS621因子は、IS110ファミリー因子に分類され、レフトエンド (LE)、IS621リコンビナーゼ遺伝子、ライトエンド (RE) からなる (図1)。IS621因子の環状DNA中間体 (ドナーDNA) は、レフトドナー (LD) 配列、コア配列 (シトシンとチミンの2塩基)、ライトドナー (RD) 配列を持つ (図1)。一方、転移先のゲノム領域 (ターゲットDNA) は、レフトターゲット (LT) 配列、コア配列、ライトターゲット (RT) 配列を持つ (図1)。ドナーDNAとターゲットDNAの間の組換え反応はコア配列付近で起きる。しかし、そのメカニズムは不明だった。

我々は、Arc研究所のPatrick D. Hsu博士との共同研究により、IS621因子はIS621リコンビナーゼに加え、非コードRNA (ブリッジRNAと命名) を産生することを発見した (図1)⁶⁾。RNA-seq解析により、IS621因子の環状DNA中間体のRE-LEジャンクション (LD-コア-RD配列付近) から177塩基のブリッジRNAが転写されることが明らか

になった。興味深いことに、環状DNA中間体の形成に伴い、 σ^{70} プロモーターが再構成され、ブリッジRNAの転写が誘導されることが示唆された。

RNA二次構造予測の結果、ブリッジRNAはドナー結合ループ (DBL) とターゲット結合ループ (TBL) の二つのループ領域を持つことが判明した (図1)。さらに、バイオインフォマティクス解析の結果、TBLのレフトターゲットガイド (LTG) とライトターゲットガイド (RTG) が、ターゲットDNAのボトム鎖に含まれるレフトターゲット (LT) とライトターゲット (RT) とそれぞれ塩基相補性を持つことが明らかになった (図1)。同様に、DBLのレフトドナーガイド (LDG) とライトドナーガイド (RDG) はドナーDNAのレフトドナー (LD) とライトドナー (RD) と塩基相補性を持つことが判明した。生化学的解析および細胞生物学的解析の結果、IS621リコンビナーゼはブリッジRNAと複合体を形成し、ブリッジRNAのTBLとDBLに相補的な配列を持つターゲットDNAおよびドナーDNAの間の組換え反応を触媒することが明らかになった (図1)。重要なことに、TBLとDBLの塩基配列は変更可能であるため、IS621リコンビナーゼとブリッジRNAを利用すると、さまざまな塩基配列を持つターゲットDNAとドナーDNAの間の組換えが可能である。これらの結果から、IS621リコンビナーゼは従来の常識を覆すプログラム可能なRNA依存性DNA組換え酵素であることが明らかになった。

4. IS621リコンビナーゼ-ブリッジRNA-ドナー DNA-ターゲットDNA複合体の立体構造

機能解析の結果、IS621リコンビナーゼはブリッジRNAと協働して、ドナーDNAとターゲットDNAを認識し、2分子の二本鎖DNA（合計4本のDNA鎖）の切断、交換、再結合という複雑な反応を触媒することが示唆された。この前例のないDNA組換えメカニズムを解明するため、クライオ電子顕微鏡解析を用いて、IS621リコンビナーゼ-ブリッジRNA-ドナーDNA-ターゲットDNA複合体の立体構造を決定した⁷⁾ (図2)。構造解析の結果、四つのIS621リコンビナーゼ分子 (IS621.1~IS621.4と命名)、TBL, DBL, ターゲットDNA, および、ドナーDNAが複合体を形成す

ることが明らかになった。二つの二量体 (IS621.1/IS621.2とIS621.3/IS621.4) が、それぞれTBLおよびDBLに結合し、ターゲットDNAおよびドナーDNAを認識していた。IS621リコンビナーゼはRuvCドメイン、コイルドコイル(CC)ドメイン、Tnpドメインから構成されており、RuvCドメインの保存された四つのアミノ酸残基 (D11, E60, D102, D105) とTnpドメインの保存されたセリン残基S241が活性部位を形成することが明らかになった。

機能解析の結果と一致して、TBLおよびDBLはそれぞれターゲットDNAおよびドナーDNAと塩基対を形成していた (図3)。このことから、IS621リコンビナーゼがブリッジRNA依存的にドナーDNAおよびターゲットDNAを認識することが説明された。予想外なことに、IS621.1

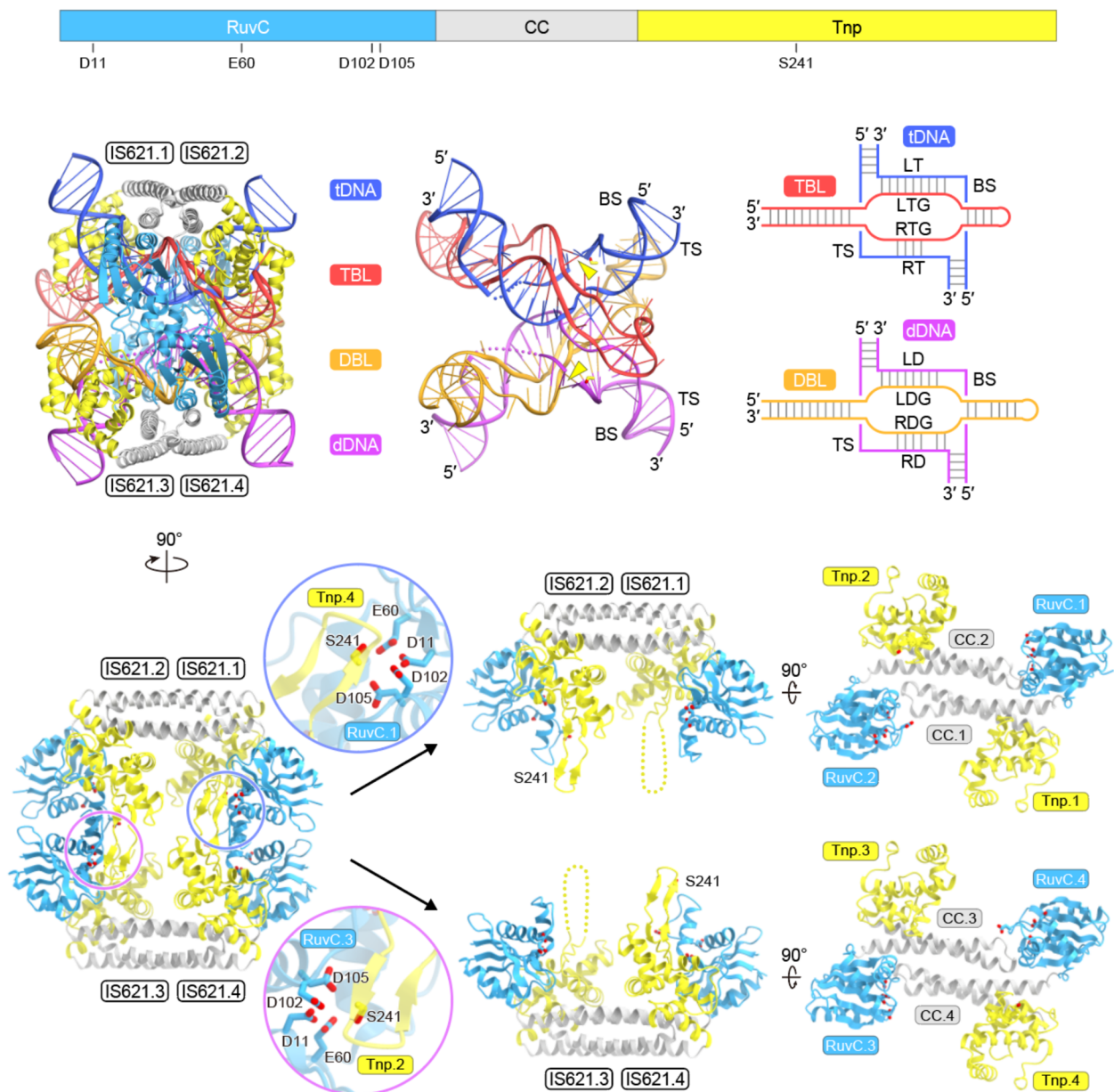


図2 IS621リコンビナーゼ-ブリッジRNA-ドナーDNA-ターゲットDNA複合体の立体構造
下段にはIS621リコンビナーゼ四量体のみを示した。DNA切断部位を黄色の三角形で示した。tDNA：ターゲットDNA, dDNA：ドナーDNA, TS：トップ鎖, BS：ボトム鎖。

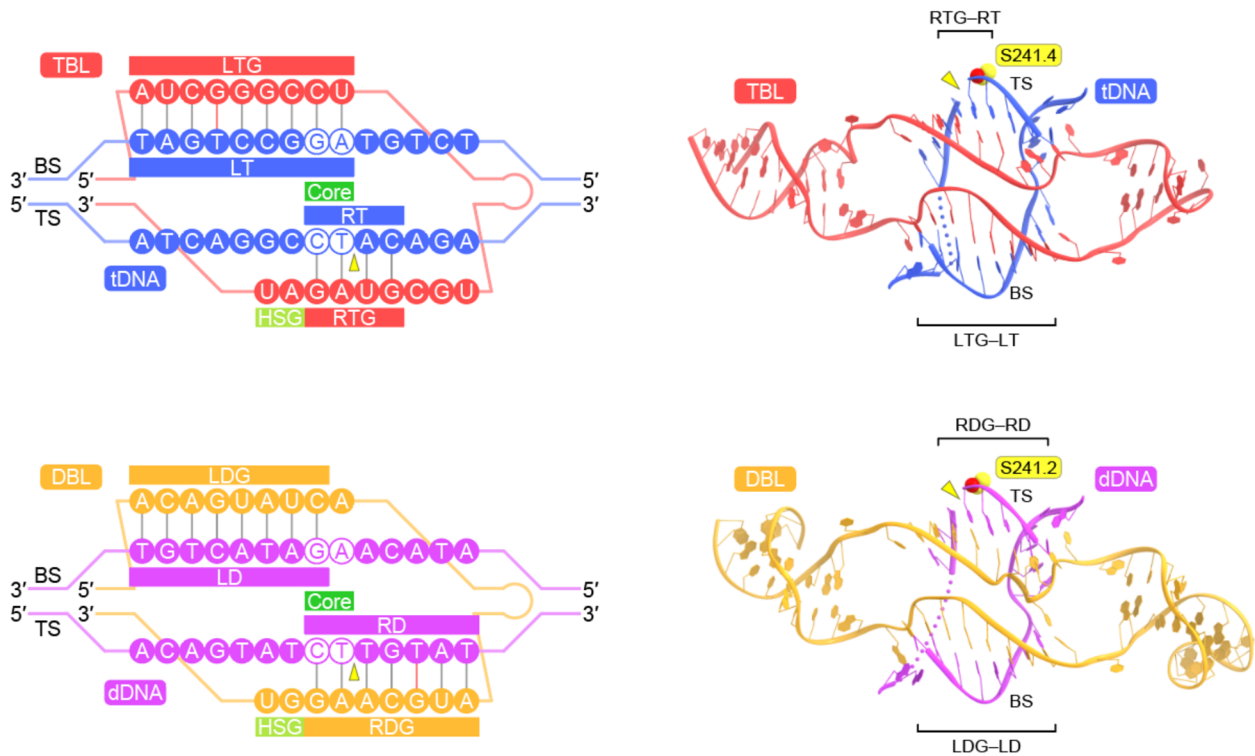


図3 プリッジRNAによるドナー DNA およびターゲット DNA 認識メカニズム
DNA 切断部位を黄色の三角形で示した。

と IS621.2 は別の二量体に含まれる IS621.4 と IS621.3 と活性部位を形成し、それぞれターゲット DNA およびドナー DNA のトップ鎖を切断していた (RT/RT, LT/LD を含む DNA 鎖をそれぞれトップ鎖、ボトム鎖と呼ぶ) (図2)。IS621.1 の RuvC ドメイン (RuvC.1) と IS621.4 の Tnp ドメイン (Tnp.4) の活性部位では、ターゲット DNA のトップ鎖が切断され、Tnp.4 の触媒セリン残基 S241 がターゲット DNA の A10 と 5'-ホスホセリン共有結合中間体を形成し、3'-ヒドロキシ基を持つ C9 が生成されていた (図3)。同様に、RuvC.3 と Tnp.2 の活性部位において、ドナー DNA のトップ鎖が切断され、Tnp.2 の触媒セリン残基 S241 とドナー DNA の T10 が共有結合中間体を形成し、3'-ヒドロキシ基を持つ C9 が生成されていた (図3)。Tnp.1 および Tnp.3 の S241 は活性部位の形成には関与せず、特定の構造をとっていなかった。これらの結果から、この複合体構造はターゲット DNA およびドナー DNA のトップ鎖が切断され、交換直前の状態を捉えたものであることが示唆された。

5. DNA 組換えメカニズム

トップ鎖の切断後、ターゲット DNA およびドナー DNA はどのようにして交換されるのだろうか? リコンビナーゼに関する文献調査の結果、IS621 リコンビナーゼはチロシンリコンビナーゼである Cre と予想外の類似性を持つことが明らかになった。Cre は *loxP* と呼ばれる特定の塩基配列を持つ 2 本の二本鎖 DNA を認識し、それらの間の組換

え反応を触媒する⁸⁾。Cre は IS621 とアミノ酸配列の類似性を持たないが、同様に四量体として DNA に結合し、基質 DNA のトップ鎖を切断する。Cre は触媒チロシン残基を用いて 2 本のトップ鎖を切断し、3'-ホスホチロシン中間体と 5'-ヒドロキシ基を生成する。この 5'-ヒドロキシ基がもう一方のトップ鎖の 3'-ホスホチロシン中間体に求核攻撃を行い、トップ鎖の再結合が起こる。これにより、トップ鎖が交換され、ホリデイジャンクション中間体が形成される。その後、同様にボトム鎖の切断、交換、再結合が起こり、DNA 組換え反応が完了する。したがって、IS621 が触媒する組換え反応においても、トップ鎖切断によって生じた 3'-ヒドロキシ基が、もう一方のトップ鎖の 5'-ホスホセリン中間体に求核攻撃し、トップ鎖の再結合が起きると予想された。

この DNA 組換えメカニズムでは、トップ鎖 (ターゲット DNA とドナー DNA) とブリッジ RNA (TBL と DBL) の間の塩基対形成のパターンが、トップ鎖交換と DNA 組換えの効率に影響を与えたと考えられた。実際に、機能解析の結果、トップ鎖交換前にターゲット DNA とドナー DNA の 6~7 位 (コア配列の上流) が、それぞれ TBL と DBL と相補性を持つ場合 (ターゲット DNA-TBL, ドナー DNA-DBL の塩基対が形成される)、トップ鎖の交換が起きにくく組換え反応が阻害されることが確認された。一方、トップ鎖の交換後にターゲット DNA とドナー DNA の 6~7 位がそれぞれ DBL と TBL と相補性を持つ場合 (ターゲット DNA-DBL, ドナー DNA-TBL の塩基対が形成される)、組換え反応が促進された。これらの結果から、ターゲット

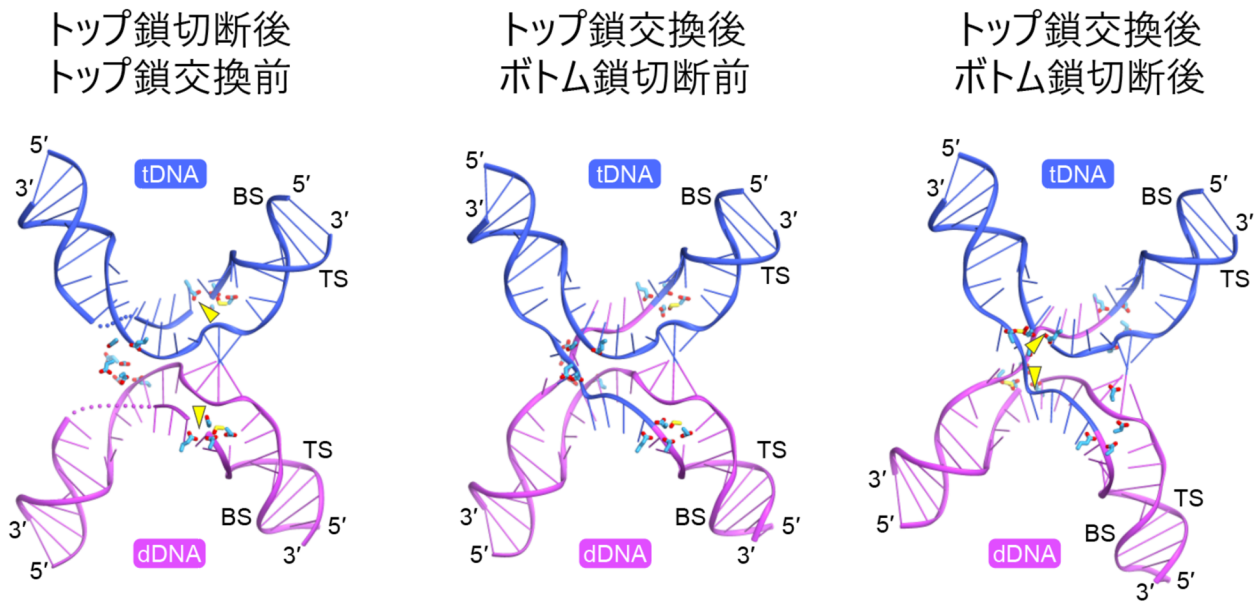


図4 IS621リコンビナーゼ-ブリッジRNA-ドナーDNA-ターゲットDNA複合体の立体構造
見やすさのためIS621リコンビナーゼとブリッジRNAは示さず、DNAのみを示した。RuvC/Tnp活性部位の残基をスティックモデルで示した。DNA切断部位を黄色の三角形で示した。

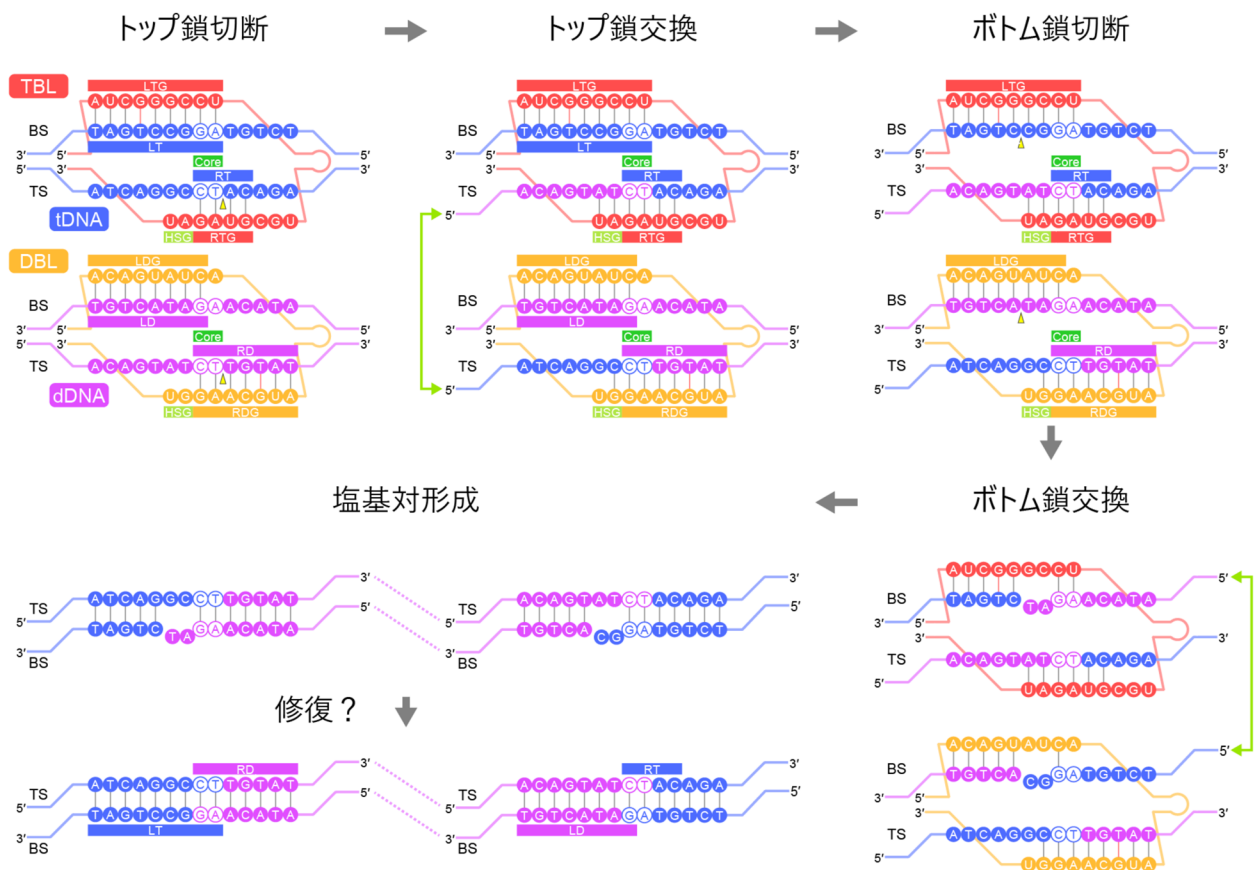


図5 IS621リコンビナーゼによるDNA組換えメカニズム
DNA切断部位を黄色の三角形で示した。

DNAおよびドナーDNAの6~7位とTBLおよびDBLの間の塩基相補性が、DNA組換え効率を決定することが明らかになった。そこで、TBL・DBLのこのガイド領域を「handshake guide (HSG)」と名づけた(図3)。

IS621リコンビナーゼによるDNA組換えメカニズムを解明するために、トップ鎖交換後にDBLおよびTBLのHSGと塩基対を形成するターゲットDNAおよびドナーDNAを用いて、クライオ電子顕微鏡解析を行った。その結果、

二つのトップ鎖交換後の状態（ボトム鎖の切断前後）の IS621-ブリッジRNA-ドナー DNA-ターゲット DNA 複合体構造の決定に成功した（図4）。これらの構造から、ターゲット DNA およびドナー DNA のトップ鎖が交換され、6~7位とコア配列（8~9位）が DBL および TBL と塩基対を形成し、ターゲット DNA とドナー DNA の間で再結合が起こることが確認された。ボトム鎖の切断後の構造では、トップ鎖の切断に関与していなかった RuvC.4/Tnp.1 および RuvC.2/Tnp.3 が活性部位を形成しボトム鎖を切断していた。

三つの反応中間体の構造比較により、IS621 リコンビナーゼがブリッジ RNA と協働してターゲット DNA とドナー DNA の組換え反応を触媒するメカニズムが解明された（図5）。まず、2分子の IS621 リコンビナーゼが TBL と DBL に結合し、IS621-TBL 二量体と IS621-DBL 二量体を形成する。これらの二量体がそれぞれターゲット DNA とドナー DNA を認識して IS621-TBL-ターゲット DNA と IS621-DBL-ドナー DNA が形成される。その後、これらの複合体が組み合わさって IS621-TBL-DBL-ターゲット DNA-ドナー DNA 複合体を形成する。この複合体が形成されると、ターゲット DNA およびドナー DNA のトップ鎖の切断、交換、再結合が行われ、続いてボトム鎖の切断と交換が続く。最終的に、ミスマッチ塩基が修復され、組換え反応が完了すると考えられる。

6. おわりに

「プログラム可能な」IS110ブリッジRNAシステムは、これまでCRISPR-Cas9では不可能だった長鎖DNAの組込みなどの大規模なゲノム編集を可能にする。このシステムが哺乳類細胞で機能するかは不明だが、ゲノムの大規模な欠失を伴う遺伝病の治療やゲノムデザインといったさまざまな応用が期待される。大腸菌由来IS621のほかにも、多様なIS110ファミリーリコンビナーゼが多数同定されており、それらの構造機能解析により、IS110システムの理解が進むことが期待される⁶⁾。

IS110リコンビナーゼは、ブリッジRNAと協働してドナーDNAとターゲットDNAを認識し、2本のDNA鎖を切

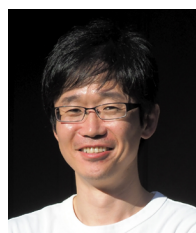
断、交換、結合した後、残りの2本も切断・交換するというきわめて複雑な反応を触媒する。このような酵素が存在することは予想外であり、自然界には予想を超える機能を持つ酵素が存在することを再認識した。共同研究者であるPatrickとは、彼がFeng Zhangラボの大学院生時代からの知り合いであり、2014年のCRISPR-Cas9の結晶構造解析に関する論文⁹⁾の共著者でもある。それから10年が経ち、互いに研究室を主宰するようになり、新たな共同研究を通じてこのような大きな発見をなしとげられたことを非常にうれしく思う。

文 献

- 1) McClintock, B. (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **36**, 344-355.
- 2) Curcio, M.J. & Derbyshire, K.M. (2003) The outs and ins of transposition: from Mu to Kangaroo. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 865-877.
- 3) Siguier, P., Gourbeyre, E., Varani, A., Ton-Hoang, B., & Chandler, M. (2015) Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences. *Microbiol. Spectr.*, **3**, MDNA3-0030-2014.
- 4) Perkins-Balding, D., Duval-Valentin, G., & Glasgow, A.C. (1999) Excision of IS492 requires flanking target sequences and results in circle formation in *Pseudoalteromonas atlantica*. *J. Bacteriol.*, **181**, 4937-4948.
- 5) Choi, S., Ohta, S., & Ohtsubo, E. (2003) A novel IS element, IS621, of the IS110/IS492 family transposes to a specific site in repetitive extragenic palindromic sequences in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **185**, 4891-4900.
- 6) Durrant, M.G., Perry, N.T., Pai, J.J., Jangid, A.R., Athukoralage, J.S., Hiraizumi, M., McSpedon, J.P., Pawluk, A., Nishimasu, H., Konermann, S., et al. (2024) Bridge RNAs direct modular and programmable recombination of target and donor DNA. *Nature*, **630**, 985-993.
- 7) Hiraizumi, M., Perry, N.T., Durrant, M.G., Soma, T., Nagahata, N., Okazaki, S., Athukoralage, J.S., Isayama, Y., Pai, J.J., Pawluk, A., et al. (2024) Structural mechanism of bridge RNA-guided recombination. *Nature*, **630**, 994-1002.
- 8) Meinke, G., Bohm, A., Hauber, J., Pisabarro, M.T., & Buchholz, F. (2016) Cre recombinase and other tyrosine recombinases. *Chem. Rev.*, **116**, 12785-12820.
- 9) Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S.I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, **156**, 935-949.

著者寸描

●西増 弘志 (にします ひろし)



東京大学先端科学技術研究センター 教授。博士（農学）。

■略歴 1979年北海道北見市に生る。2002年東京大学農学部卒業。07年同大学院農学生命科学研究科博士課程修了。20年より現職。22年度より東京大学大学院工学系研究科教授を兼任。

■研究テーマと抱負 タンパク質-核酸複合体が機能する分子メカニズムの解明

に取り組んでいます。新しい機能をもつタンパク質の発見や設計にも挑戦したいと考えています。

■ウェブサイト <https://www.youtube.com/watch?v=H7AG5hhnhKY>

■趣味 食べ歩き、ボクシング。