

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07382

研究課題名(和文) 多能性細胞のゲノム恒常性維持機構

研究課題名(英文) Genome Maintenance Mechanisms in Pluripotent Stem Cells

研究代表者

坪内 知美 (Tsubouchi, Tomomi)

基礎生物学研究所・幹細胞生物学研究室・准教授

研究者番号：70754505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胚性幹細胞(ES細胞)は個体発生のごく初期の段階から樹立された幹細胞で、生体内では体を構成する数百種類の細胞種の源になる細胞である。ES細胞は特徴的な核内構造以外に細胞分裂周期制御に関しても特徴的な性質を持つことが知られている。本研究ではES細胞においてはDNA複製装置がDNA複製(S)期を通じてゆっくりと進行すること、またその要因が低く維持されているdNTPであることを見出した。DNA複製装置が遅延しているにもかかわらず、ES細胞のS期は他の細胞と同じ時間内に終了する。これを可能にしているのは密に分布する複製開始点であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ES細胞を含む多能性幹細胞は、体を構成する数百種類の細胞種を生み出す能力を持ち、再生医療への応用が期待されている。しかしながら生物体内では個体発生のごく初期に短期間のみ存在する細胞群であり、ES細胞そのものの理解は不完全である。本研究ではES細胞のDNA複製制御に着目し、1) ES細胞が特有のDNA複製制御を持ち、ゲノム全体のDNA複製が時間内に確実に終了するよう制御されていること 2) ES細胞特異的なDNA複製制御には細胞内で合成されるdNTP量が他の細胞種と比較して低く維持されていること を明らかにした。本研究よりES細胞の維持にdNTP量が重要なファクターであることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Embryonic stem cells are the stem cells that are established from an early stage of a developing embryo. ES cells are the origin of cell types of several hundreds that compose our bodies, and they are known to hold properties that are unique in various aspects of cell division cycle. During this research period, we found that replication machinery progress slowly at all stage of DNA replication (S) phase, and found that this is due to reduced amount of dNTPs. Despite the slow replication-machinery, ES cells complete DNA synthesis within similar amount of time compared to MEFs. Our results show that this is due to denser distribution of active DNA replication machinery along the genome.

研究分野：細胞生物学

キーワード：胚性幹細胞 ゲノム恒常性 DNA複製 dNTP

## 1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cells 又は ES 細胞)を含む多能性幹細胞は、体を構成する全ての細胞種に分化できる特殊な細胞である。また、細胞周期の特徴としてはギャップ期と呼ばれる G1, G2 期が極端に短く、DNA 複製(S)期と染色体分配(M)期を休みなく繰り返すことが知られている。モデル生物や他のセルラインを使ったこれまでの解析から、DNA 損傷が生じた場合には、細胞周期を一時的に停止させ、損傷を修復するためのメカニズムを発動させる「チェックポイント機構」が働くことが知られている。しかし、ES 細胞ではこの機構が一部弱いか欠損していると考えられており、多能性幹細胞のゲノム恒常性がどのように維持されているかは明らかではなかった。

また、ES 細胞では DNA 損傷マーカーである $\gamma$ H2AX が染色体上に多数観察されることが知られていた。 $\gamma$ H2AX はヒストンバリエーション H2AX が 139 番目のセリンでリン酸化されたものを指し、DNA 損傷時の細胞応答で活性化されるキナーゼによりリン酸化されることが知られている。しかし、ES 細胞で観察される $\gamma$ H2AX が実際に DNA 損傷に起因するのか、またその損傷がどのような要因で生じているのかは明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

ES 細胞で見られる $\gamma$ H2AX の DNA 複製期に着目し ES 細胞におけるゲノム不安定化要因の特定及び複製異常が起こった際の細胞応答を明らかにすることを目的とした。特に、

- (1) DNA 複製期には S 期の異なるサブステージで特定の染色体領域を複製されることから、DNA 複製装置の進行速度 (複製フォーク速度) 停滯頻度を S 期のサブステージごとに精査することで DNA 複製・複製領域・DNA 損傷の関係性を明らかにすること
- (2) 染色体構造・転写活性など DNA 複製以外の要因が DNA 損傷を引き起こしている可能性を検討するために各阻害剤や siRNA を用いて $\gamma$ H2AX 出現頻度を精査し、空間的关系性を明らかにするために間接蛍光抗体染色を用いて顕微鏡下で $\gamma$ H2AX の分布と転写活性部位や染色体構造との関係性を明らかにすること
- (3)  $\gamma$ H2AX が及ぼす生物学的事象を理解するために ES 細胞特異的に $\gamma$ H2AX と結合する因子を特定すること

を目指した。(1)と(2)の解析途中で新規の発見があったため、(3)は本助成期間には進めなかった。

## 3. 研究の方法

- (1) DNA fiber assay と呼ばれる手法を用いた。この方法では細胞に一定時間ヌクレオチドアナログを投与し、DNA 複製によって新たに合成される DNA 断片の長さをアナログ特異的に可視化・測定することで評価する。また、2種類のヌクレオチドアナログ(IdU, CldU)を、個別に、連続して一定時間投与することで(i.e., IdU10min CldU10min)、一定速度で進行しているか(IdU, CldU の取り込みが同程度)、遅延しているか(IdU に対して CldU 取り込み領域が短い)、もしくは新たに複製を開始した部位であるか(CldU に対して IdU が短いもしくはラベルされない)、を特定できる。多能性幹細胞特異性を評価するために ES 細胞以外に MEF (マウス線維芽細胞)などの分化細胞を用いる。また、マウス特異的現象でないことを確認するためにヒトセルライン(human iPSC, RPE, HeLa)の解析も行なった。更に、S 期内のサブステージ毎の複製フォーク速度を比較するために、フローサイトメトリーを使ったソーティングを行ない、それぞれの分画サンプルに対して複製フォーク速度を測定した。当初エルトリエーションを用いた分画を予定していたが、DNA 含量を指標にしたソーティングと DNA fiber assay の組み合わせを可能にすることでより簡便に解析ができた。
- (2)  $\gamma$ H2AX の出現頻度・DNA 複製フォーク速度と転写活性の関係を調べるために、転写阻害剤を投与後に細胞をホルムアルデヒド固定し、 $\gamma$ H2AX 特異的抗体を用いた抗体染色を行なって阻害剤なしの条件と比較した。また、解析途中でヌクレオチド量の不足が可能性として浮上したため、前駆体であるヌクレオシドの投与を行い48時間後に DNA 複製速度と $\gamma$ H2AX の出現頻度を解析した。

## 4. 研究成果

- (1) S 期の異なるステージにおける DNA 複製装置速度  
マウス ES 細胞、MEF 細胞について S 期を early S, early-mid S, mid-late S, late S に分画し、それぞれに対して fiber assay を行い、複製フォーク速度を測定した。興味深いことに、MEF においては early S では遅く、late S にかけて複製フォーク速度が上昇することが明らかになった。一方、ES 細胞では特定のステージで複製フォーク速度が速かったり遅かったりすることなく、ほぼ一定の速度で進行することがわかった。つまり、MEF では何らかの要因で S 期の初期には複製速度が制限されていてこれが後

期にかけて解消されていくこと、一方で、ES 細胞では MEF で見られる複製速度制限が解消されないのではないかと考えられた。

( 2 ) ES 細胞で複製装置進行速度が抑制される要因の模索

ES 細胞で特に複製フォーク速度が抑制されている要因として、また、MEF において S 期初期にのみフォーク速度が遅いことの要因として、dNTP 量の不足を検討した。dNTP が不足すれば DNA 合成速度が遅延することが予想される。dNTP は S 期にのみ合成されるよう制御されているため、S 期初期では十分に蓄積していない可能性を検討した。残念ながら dNTP は培地中に投与しても細胞にはうまく取り込まれないため、前駆体であるリボヌクレオシドを投与した。結果、MEF でも ES 細胞でもフォーク速度は上昇したが ES 細胞でより顕著な効果が見られた。興味深いことに、ヌクレオシドを投与した細胞を異なる S 期のサブステージに分画し同様にフォーク速度を調べたところ、MEF では S 期にのみフォーク速度の上昇に効果があったが、ES 細胞ではどのステージでもフォーク速度が顕著に上昇した。このことから ES 細胞では S 期を通じて dNTP が不足しているためフォーク速度が低下している可能性が示唆された。しかしながらヌクレオシドの投与が実際に dNTP 量の上昇にどの程度効果があるのか、また他のどんな経路に影響を与えているのかは完全には把握できなかったため、dNTP 合成の律速反応を担っている RNR 酵素の発現量の操作が可能なセルラインを構築した。このセルラインではドキシサイクリンの有無で RNR の発現量を上昇させることができる。RNR の発現量を上昇させることで、複製フォーク速度はヌクレオシド投与時と同様（もしくはそれ以上に）上昇した。ES 細胞の複製では転写装置との衝突が起こりがちなのではないかと考えられているが、転写阻害剤の投与でフォーク速度が上昇することはなかった。

( 3 ) dNTP 合成、複製フォーク速度、DNA 複製完了精度の関係性

一般的に dNTP の不足は複製フォークを滞らせ、細胞増殖に支障をもたらす。上記より、ES 細胞では dNTP 量が低く維持されていると考えられたがこれがゲノム全体の DNA 複製の完了にどのように影響するかを、染色体分配時の架橋構造(Ultra-Fine Bridge: UFB)の出現頻度を指標に評価した。これまでに報告されている通り、ES 細胞における UFB 出現頻度は MEF と比較して低かった。興味深いことに、RNR の発現量を増大させると、UFB 出現頻度が MEF なみに増大することがわかった。通常は複製速度が低下するとゲノム全体の複製に遅延が生じる要因となるが、RNR の発現量を増大させると複製フォーク速度が上昇するにも関わらず UFB の出現頻度が上昇することは説明できない。ライブイメージングにより S 期の長さを比較したところ、S 期全体の長さは RNR 発現誘導前後で殆ど変化しないことがわかった。つまり、RNR 発現誘導時には複製フォーク速度は顕著に速くなるにも関わらず、複製完了の時間は短縮されない。そこで dNTP 量が変動し、複製フォーク速度が変化した場合に、複製開始点の数が変動するのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証するために、fiber assay 同様ヌクレオチドアナログを一定時間投与し、ラベルされた領域間の距離を測定することで複製開始点間の距離を評価したところ、RNR 発現誘導時には複製開始点間の距離が広いことがわかった。また ES 細胞と MEF を比較したところ ES 細胞の複製開始点間の距離は顕著に短い(i.e., ES 細胞の複製開始点が密に分布している)ことがわかった。

以上の結果より、ES 細胞では非多能性幹細胞と比較して dNTP 量が低く保たれているために複製フォークの速度が低下しているが、複製開始点がより密に存在することでゲノム全体の複製をタイムリーに完了させることができることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 坪内知美
2. 発表標題 哺乳類多能性幹細胞におけるDNA複製制御
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ 第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪内知美
2. 発表標題 哺乳類多能性幹細胞におけるDNA複製ストレスと複製制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪内知美
2. 発表標題 多能性幹細胞におけるdNTP産生制御とゲノム恒常性
3. 学会等名 第25回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomomi Tsubouchi
2. 発表標題 A unique regulation of dNTP levels in mammalian pluripotent stem cells
3. 学会等名 CSHLM "Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomomi Tsubouchi
2. 発表標題 Regulation of DNA replication in mammalian pluripotent stem cells
3. 学会等名 International Symposium for Female Researchers in Chromatin Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪内知美
2. 発表標題 Unique regulation of dNTP production in mammalian pluripotent stem cells
3. 学会等名 EMBO workshop on DNA Replication, Chromosome Segregation and Fate Decisions (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上川泰直
2. 発表標題 多能性幹細胞におけるDNA複製ストレス応答
3. 学会等名 第90回日本遺伝学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坪内知美
2. 発表標題 多能性幹細胞におけるDNA複製完了のメカニズム
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上川泰直
2. 発表標題 複製フォーク動態を介した多能性幹細胞におけるゲノム安定性維持機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坪内知美
2. 発表標題 Genome maintenance mechanisms in mammalian pluripotent stem cells
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坪内知美
2. 発表標題 DNA replication and genome stability in pluripotent stem cells
3. 学会等名 2017年度生命科学系合同年次大会（第40回日本分子生物学会年会）（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	上川 泰直  (Kamikawa Yasunao)	基礎生物学研究所・幹細胞生物学研究室・研究員  (63904)	