

令和 2 年 7 月 12 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07457

研究課題名(和文) In vitro DNA複製系を用いたリピート不安定性メカニズムの解明

研究課題名(英文) An in vitro approach for dynamics of unstable short tandem repeats.

研究代表者

織田 信弥 (Oda, Shinya)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・腫瘍遺伝学研究室長

研究者番号：40333372

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)：短タンデムリピート(short tandem repeat, STR)は、複製困難な配列であるにもかかわらず、真核生物ゲノム上に夥しい数が分布する。STRの生理機能は不明だが、その変化がヒトがんや神経・筋疾患の病因となる。STR変化の分子機序の解明が待たれるが、実際にin vivoで生じたリピート変化を帰納的に観察する研究には限界があった。本研究では、はじめてin vitro DNA複製系を用い、リピート変化の動態をin vitroで観察し、変化を規定する分子要因を演繹的に明らかにすることを目的とした。この目的に必要な多様なリピート配列をもつM13由来環状2本鎖DNA基質が作成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物ゲノムの特徴である短タンデムリピート(short tandem repeat, STR)では、DNA複製の際にエラーが頻発するため、しばしばその長さが変化する。実際に、STR変化はヒトがんや神経・筋疾患に見られるが、in vivoで生じたリピート変化を個別に観察する帰納的研究からは、リピート変化を規定する分子要因を明らかにすることは難しい。本研究は、研究代表者の把握する範囲では、世界ではじめてin vitroアッセイを用いて、演繹的にこの問題にアプローチしたはじめての研究である。このような研究の展開により、リピート病の原因だけでなく、STRの生理機能にもアプローチできるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Numerous short tandem repeats are mapped throughout the eukaryotic genomes, despite being particularly prone to replication errors. Although their physiological functions are unknown, their alterations underlie neoplastic and neuromuscular diseases in humans. Molecular mechanisms of STR alterations warrant attention. A posteriori approaches to observe STR alterations occurred in vivo have thus far been attempted, which are, however, obviously partial and insufficient. This study aimed to elucidate a priori molecular factors to determine the instability and the dynamics of STRs using an in vitro DNA replication assay system. For this purpose, replicative form M13 vectors carrying various repeat sequences have been constructed and prepared.

研究分野：腫瘍遺伝学、分子生物学

キーワード：リピート配列 DNA複製 DNAポリメラーゼ 複製エラー マイクロサテライト不安定性 ゲノム不安定性 リピート病

1. 研究開始当初の背景

1) リピート配列のパラドックス

マイクロサテライトに代表される短タンデムリピート(short tandem repeat, STR)は、真核生物ゲノムに遍く保存される特徴的な塩基配列である。マイクロサテライトは、1ないし数塩基対の最も小さな繰り返し単位をもつリピートであり、その数はヒトゲノムでは数十万にもものぼるとされている。このマイクロサテライトはヒト集団間で極めて豊かな多型をもっており、現在、個人識別やリンケージ解析に頻用されているが、このことは同時に、このリピートが極めて変化しやすいことを意味している。事実、STRはDNA複製の際にエラーが頻発するhot spotであり、ポリメラーゼにとって極めて複製困難な配列といえることができる。にもかかわらず、このような配列が進化の過程で高度に保存されており、ゲノム上に珍しい数が分布する事実は、これらリピートが相当の生理機能を担っていることを意味している。事実、一部のヒトがんや神経・筋疾患には、リピート変化が疾患のhallmarkともいえるものが存在する。真核生物ゲノムにおけるリピート変化の実態とその分子機序とを理解することは、単にゲノム動態への理解を深めるのみにとどまらず、ヒト疾病の理解にもつながることが期待される。

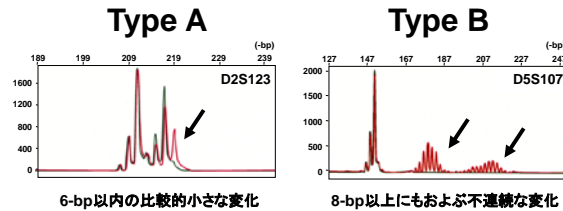


図1: ヒト腫瘍にみられる2つの異なるモードのマイクロサテライト不安定性 (Oda S et al. Nucleic Acids Res 2005)

2) リピート変化とヒト疾患

ヒトがんにおけるリピート変化は「マイクロサテライト不安定性(microsatellite instability, MSI)」としてひろく知られている。1993年、家系内に大腸癌などが多発する「リンチ症候群(Lynch syndrome, LS)」で、MSIはみつかった。このLSの責任遺伝子が追いつめられていたとき、リンケージ解析に用いられたマイクロサテライトが、腫瘍では著しく変化していたのである。この現象は以後、MSIと呼ばれ、疾患のhallmarkとなった。

MSIは腫瘍学の分野でとくに注目され、文献には膨大なデータが蓄積された。しかし、各疾患におけるその頻度は報告によってまちまちである。実は、MSI解析には技術論的に注意を要する問題が少なくない。申請者の研究グループは、主な技術論的問題をすべて解決した高精度マイクロサテライト解析系を1997年に報告した。この系を用いた多角的な解析により、ヒト腫瘍にみられるMSIには、質的に異なる2つのモードが存在することを明らかにした(Oda S et al., Nucleic Acids Res 2005)。すなわち、マイクロサテライトに1ないし数個の繰り返し単位の挿入・欠失がみられるType Aと、これを超える長大な変化が生じ、しばしば新しいアレルが出現したかのような様態をとるType Bである(図1)。ヒトがんゲノムで生じるリピート変化の実態は多様であることが示唆された。

一方、「トリプレットリピート病(triplet repeat disease)」とよばれるハンチントン舞踏病、脆弱X症候群、筋緊張性ジストロフィー、脊髄小脳変性症などの神経・筋疾患では、CAG、CTGといった3塩基リピートが変化することが知られている。これらの疾患では、特定の遺伝子内あるいはその近傍に存在するリピートが変化することで、遺伝子機能が失われ、発症するものと考えられている。

3) リピート変化のメカニズム

1回のDNA複製には、ヒトでは、 6.0×10^9 塩基対もの合成が必要となるが、その精度には限界がある。一般に、DNAポリメラーゼがおかす過ち、すなわち「複製エラー(replication error)」には2種類が存在する。(A)ヌクレオチドの入れ間違いによる塩基ミスマッチ(base mismatch)と(B)ポリメラーゼの「滑り(slippage)」に起因するDNA鎖ミスアラインメント(strand misalignment)である。これらは放置されると、1回の複製を経て、それぞれ塩基置換変異(base substitution)と挿入・欠失変異(insertion/deletion)とに固定されてしまう。リピートでは、このミスアラインメントが頻発することが変化の原因と考えられている(「滑り仮説(slippage model)」)(図2)。

これらの複製エラーは通常、ポリメラーゼ複合体に含まれる校正機能(proofreading, PR)とDNAミスマッチ修復(DNA mismatch repair, MMR)との

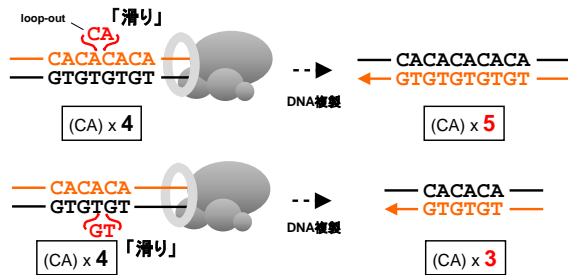


図2: ポリメラーゼの滑りによるリピート変化 (「滑り仮説(slippage model)」)

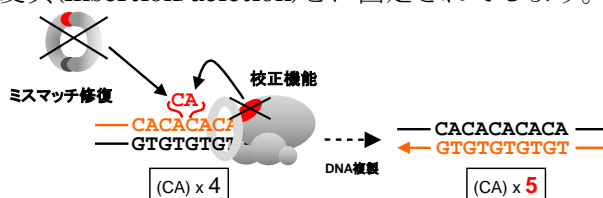


図3: ミスマッチ修復および校正機能異常によるマイクロサテライト変化

2つの機構により取り除かれており、突然変異の発生を未然に防いでいる。事実、LSの責任遺伝子として最初に同定された *MSH2* は、この MMR 系を構成する遺伝子のひとつであった。以来、ヒトがんにおけるリピート変化の原因は一元的に MMR 異常に帰されてきたが、リピート安定化における PR の役割については明らかになっていない(図 3)。また、申請者らによる MMR 遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析から、MMR 異常を十分条件として生じる MSI は Type A であることが明らかとなった(4)。一方、Type B は、LS に生じた腫瘍も含め、多くのヒト腫瘍で観察されているが、従来の滑り仮説と MMR 異常では説明できない。実際に、マイクロサテライト変化の原因としては、2重鎖切断修復(double strand break repair, DSBR)の異常(「遺伝子変換仮説(gene conversion model)」)も提唱されている(図 4)。

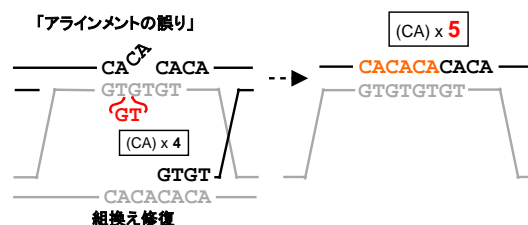


図4: 2重鎖切断に伴う相同組換え修復(遺伝子変換)時のミスアラインメントによるマイクロサテライト配列変化(「遺伝子変換仮説 (gene conversion model)」)

3塩基繰り返しリピートが変化する分子機序は一層明らかでない。酵母での研究からは、DNA複製の際に Okazaki フラグメント末端に生じる「フラップ(flap)」を処理するエンドヌクレアーゼ、FEN1(flap endonuclease 1)の欠損が3塩基リピートの変化につながることを示されたが(図 5)、*Fen1* 遺伝子欠損マウスでは、リピート変化は確認されず、罹患家系の遺伝学的解析においても、*FEN1* 遺伝子変異はみつかっていない。このように、ヒト疾患におけるリピート変化のメカニズムは、これまで考えられてきたように単純ではない。

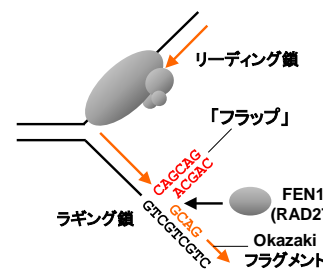


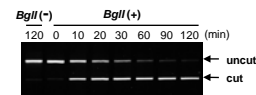
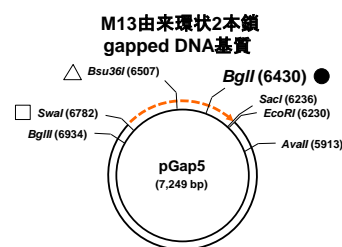
図5: Okazakiフラグメントにおける「フラップ」形成とマイクロサテライト変化

4) 研究の限界

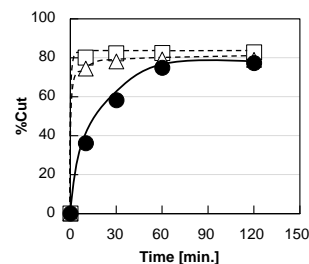
このような観察に共通する問題点は、ひとつひとつのリピートがその染色体文脈で長い歴史を経た結果を、常にとから(a posteriori)観察している点にある。リピート変化の普遍的な動態を、in vitro 系を用い目の前で(a priori)観察し、変化の要因を明らかにすることが求められている。

2. 研究の目的

真核生物のゲノム編成の特徴のひとつである短タンデムリピート(short tandem repeat, STR)は、DNA複製の際にエラーが頻発する極めて複製困難な配列といえる。にもかかわらずゲノム上には夥しい数の STR が分布している。STR の生理機能は明らかになっていないが、一部のヒトがんや神経・筋疾患ではリピートの変化が病因と考えられている。STR の変化の実態とその分子機序とを理解することは、単に真核生物ゲノム動態への理解を深めるのみにとどまらず、ヒト疾患の発生機序の解明にもつながることが期待されるが、in vivo で生じたひとつひとつのリピートの変化の結果を収集して考察するこれまでの帰納的(a posteriori)なリピート研究には限界があった。本研究は、はじめて in vitro DNA複製系を用い、リピートの普遍的な変化の動態を in vitro で観察し、変化を規定する分子要因を演繹的(a priori)に明らかにすることを目的とした。



細胞粗抽出液との反応後の電気泳動



定量化された複製効率(time course)

図6: Gap-filling反応を利用した新規定量的in vitro DNA複製系 (Nakao S et al. Biochimie 2013)

3. 研究の方法

Step1: リピート配列の DNA 複製動態 - 新規定量的 in vitro DNA複製系を用いた観察

1) 複製効率の変化と要因

申請者の研究グループは、M13 由来環状 2 本鎖 DNA 基質上のギャップ(1本鎖)領域に、主に複製型ポリメラーゼ pol delta により担われる生理的な DNA複製が in vitro で誘導される独自のアッセイ系を構築し、報告してきた(Oda S et al., EMBO J, 2000; Nakao S et al., Biochimie, 2013)(図 6)。

このシステムでは、ギャップ領域が DNA 合成により埋められた基質は、ギャップ領域の 3'下流に位置する制限酵素の認識サイトを利用することで消化可能となり、2本鎖線状 DNA 化される(図 6)。消化産物の割合を定量化することで、DNA複製反応の効率を定量的にとらえることができる。このシステムでは、細胞粗抽

出液のタンパク質濃度、反応時間のちがいによって DNA 複製効率の stoichiometric な変化が観察可能である(図 6)。

この基質のギャップ領域に種々のリピート配列を組み込むことで、リピートが複製される様子を *in vitro* でダイナミックにとらえることが可能である(図 7)。リピートの複製困難さを規定するシス配列因子は以下のようなものが想定される。

< シス配列因子 >

- A. リピート単位長
- B. リピート長
- C. 周辺配列

まず、このような因子の異なるさまざまなリピート配列をギャップ領域に組み込み、複製効率の変化から、複製困難なリピート配列の特徴を明らかにする。

2) 複製エラーの発生頻度と要因

DNA 複製の際に発生することが予想されるエラーには、

- A. misincorporation (ヌクレオチド取り込みの誤り)
- B. misalignment (リピート配列部における繰返し回数のずれ)
- C. strand break (鋳型 DNA 鎖の切断)

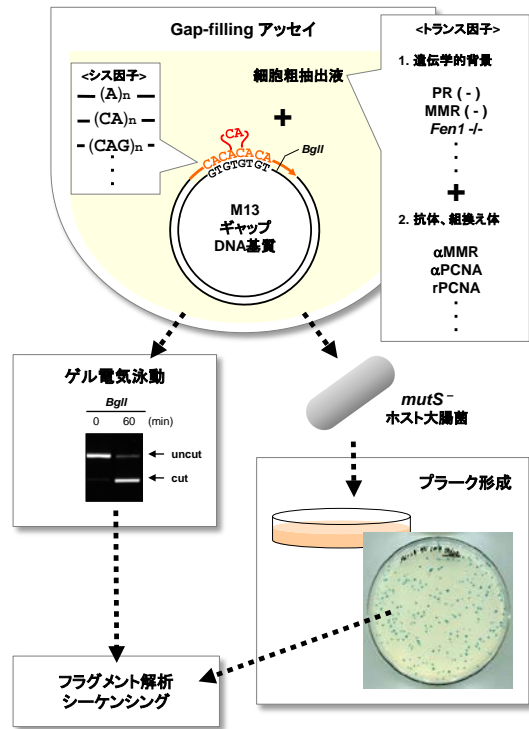


図7: 新規定量的*in vitro* DNA複製系を利用したリピート動態の*in vitro*解析系

の3つが挙げられる。リピート配列ではとくに後2者が発生することが予想される。ミスアラインメントによるリピート配列部の loop-out の形成(図 2 参照)は、反応産物に対し直接 PCR をおこなうことで、フラグメント解析やダイレクト・シーケンシングによりとらえることができる。また、基質は M13mp18 を基本としているため、ホスト大腸菌(*mutS*⁻)に導入し、プラークを形成させることで、リピート変化をもつ基質分子のひとつひとつを純化して解析することも可能となる(図 7)。一方、基質上のリピート配列部に鎖切断が生じた場合は、アガロース電気泳動上の移動度の変化としてこれをとらえることができる。シス配列因子の異なるさまざまなリピート配列を解析し、複製エラーの発生要因を明らかにする。

Step2: リピート不安定性につながる分子異常の同定

< トランス因子 >

- A. ポリメラーゼ校正機能(PR)
- B. PCNA
- C. ミスマッチ修復(MMR) etc.

1) ポリメラーゼ複合体機能異常の意義

複製型ポリメラーゼ複合体の触媒サブユニットに含まれる PR は、ミスアラインメントにより形成された loop-out を処理可能であることが予想される。PR 機能を欠くマウス細胞が入手可能である。また、PCNA はポリメラーゼ複合体の安定度に寄与しており、リピート配列部における複製エラーの発生に関与していることが予想される。PCNA は、細胞粗抽出液中より免疫沈降により除去可能であり、組換え体タンパク質、中和抗体も入手可能である。このように、トランスに働く諸因子を変化させることで、リピートの複製がどのように変化するか観察する(図 7)。

2) DNA 修復異常の意義

本システムでは、MMR が機能する(Oda S *et al.*, *EMBO J*, 2000)。MMR 遺伝子ノックアウト動物細胞の粗抽出液を対照とすることで、複製効率の低下からどの程度 MMR が活性化しているか評価可能である。リピートの特徴と MMR 活性化との関係を明らかに

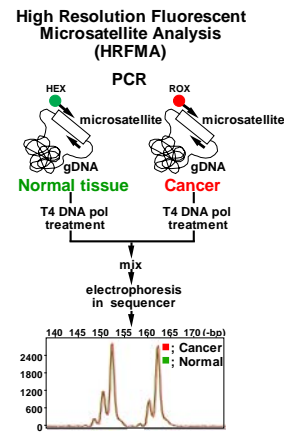


図8: 高精度蛍光マイクロサテライト解析系 (Oda S *et al.* *Nucleic Acids Res* 1997)

する。また、(CAG)_n リピートを導入した基質を用いて FEN の効果を観察する。

Step3: ヒト疾患におけるリピート不安定化分子異常の同定

申請者の研究グループはこれまで、高精度蛍光マイクロサテライト解析系(HRFMA) (図 8) を用いて、さまざまなヒト腫瘍を検索し、リピート不安定性を呈する疾患を同定してきた。これまでリピート不安定性を説明可能な分子メカニズムとしては唯一 MMR 異常が考察されてきたが、上記の研究で同定された分子異常をこのようなリピート不安定性陽性疾患で検索し、その病因論的意義を明らかにする。遺伝子の発現解析、シーケンシングなどの構造解析を主におこなう。

4. 研究成果

初年度の計画(第 1 ステップ)はまず、複製型ポリメラーゼはどのようにリピート配列を複製するのか、1) 複製効率の変化と要因、2) 複製エラーの発生頻度と要因を *in vitro* で明らかにすることを目標とした。この目的に必要なさまざまな性質のリピート配列をもつ M13 由来環状 2 本鎖 DNA 基質の作成に交付決定後すぐさま着手したが、進捗が遅れていた。H29 年度は、連携研究者と議論を重ね、さまざまなアッセイの基質として応用可能な統合型多目的 2 本鎖環状 DNA 基質を pBluescript を雛型にその配列を多地点で改変することにより作成した。合成と調製を終え、この基質を用いた gap-filling assay 系を構築することで、研究の進捗を目指した。一方、第 3 ステップで予定する課題(リピート不安定性疾患における分子異常の同定)に向け、ヒト諸疾患におけるリピート不安定性検索を平行して続けた結果、多発性骨髄腫、成人 T 細胞白血病においてもリピート不安定性が観察されることを見出し、その解析結果を公表した(Miyashita K *et al.* *J Cancer Res Clin Oncol* 143: 399-408, 2017; Miyashita K *et al.* *Leuk Lymphoma* 31: 1-6, 2018)。H30 年度には、pBluescript を雛型とした統合型多目的 2 本鎖環状 DNA 基質の構造を検証し、使用可能であることを確認した。また、第 2 ステップで予定した課題(リピート不安定性につながる分子異常の同定)として、ヒト疾患で見出された DNA ミスマッチ修復遺伝子変異をゲノム編集技術により導入したヒト細胞で、マイクロサテライト配列の変化を観察したところ、一般にヒト腫瘍でみられる変化と異なる変化が生じることを見出し、その解析結果を公表した(Hayashida G *et al.* *Exp Cell Res* 377: 24-35, 2019)。H31 年度には当初、統合型基質を用いた gap-filling assay 系を構築する予定であったが、様々な基礎検討をこの新基質を用いて再試しなければならないことから、計画を変更し、当初予定したとおり、M13 由来環状 2 本鎖 DNA 基質の作成を再開した。自然界に存在しない配列を含むため、合成にはさまざまな困難が生じたが、昨年度末合成と調製を終了した。また、HeLa 細胞の大量培養を行い、アッセイに必要な細胞粗抽出液も調製した。現在、gap-filling assay が漸く開始できる状態となった。今後、上記した諸問題に継続的に取り組んでいきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayashida G, Shioi S, Hidaka K, Fujikane R, Hidaka M, Tsurimoto T, Tsuzuki T, Oda S, Nakatsu Y	4. 巻 377
2. 論文標題 Differential genomic destabilisation in human cells with pathogenic MSH2 mutations introduced by genome editing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exp Cell Res	6. 最初と最後の頁 24 - 35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.02.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyashita K, Fujii K, Suehiro Y, Taguchi K, Uike N, Yoshida MA, Oda S	4. 巻 31
2. 論文標題 Heterochronous occurrence of microsatellite instability in multiple myeloma - an implication for a role of defective DNA mismatch repair in myelomagenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leuk Lymphoma	6. 最初と最後の頁 1 - 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10428194.2018.1427862.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyashita K, Fujii K, Taguchi K, Shimokawa M, Yoshida MA, Abe Y, Okamura J, Oda S, Uike N	4. 巻 143
2. 論文標題 A specific mode of microsatellite instability is a crucial biomarker in adult T-cell leukaemia/lymphoma patients.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Cancer Res Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 399 - 408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00432-016-2294-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 織田信弥、日高京子、林田元気、藤兼亮輔、日高真純、續輝久、中津可道
2. 発表標題 Genomic instability in MSH2-null HeLa cells with DNA polymerase delta R506H mutation introduced by CRISPR/Cas9.
3. 学会等名 第78日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 織田信弥、日高京子、林田元気、藤兼亮輔、日高真純、續輝久、中津可道
2. 発表標題 Repeat instability induced by a DNA polymerase delta proofreading domain mutation introduced by CRISPR/Cas9.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 織田信弥、林田元気、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、續輝久、中津可道
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムを用いてリンチ症候群MSH2変異を導入したヒト細胞におけるゲノム不安定性の特異な態様
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 織田信弥、林田元気、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、續輝久、中津可道
2. 発表標題 ゲノム編集を用いて有害なMSH2変異を導入したヒト細胞におけるリピート配列の特異な不安定化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、織田信弥、續輝久
2. 発表標題 リンチ症候群患者に見出されるMSH2 ATPaseドメイン変異体は、ヒト細胞において顕著な不安定性を示す
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、織田信弥、釣本敏樹、續輝久
2. 発表標題 MSH2リンチ症候群変異を持つヒト細胞の作製とその解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Song Y, Hidaka K, Nakatsu Y, Oda S, Hayashida G, Fujikane R, Hidata M, Tsuzuki T
2. 発表標題 Establishment of DNA polymerase delta R506H mutants in MSH2-null HeLa MR cell using CRISPR/Cas9 genome editing system.
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州がんセンター臨床研究センター腫瘍病態研究部 http://www.ia-nkcc.jp/information/detail/144
--

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
連携研究者	倉岡 功 (Kuraoka Isao) (60335396)	大阪大学・基礎工学部・准教授 (14401)	2017年、福岡大学に転出。