

令和元年6月10日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07675

研究課題名(和文) 単細胞性真核紅藻における複製開始点の同定とそれを利用した人工染色体の構築

研究課題名(英文) Identification of putative replication origin(s) and its application in unicellular red algae *Cyanidioschyzon merolae*

研究代表者

渡辺 智 (WATANABE, Satoru)

東京農業大学・生命科学部・准教授

研究者番号：10508237

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)：細胞はDNA複製の開始を厳密に制御することで染色体コピー数を正確に維持している。酵母や動物では複製開始機構が詳細に解析されている一方で、光合成を行う藻類や植物ではDNA複製の開始制御に関する知見は限られている。本研究では温泉などの高温、強酸性下に生息し単純な細胞構造、ゲノムを有する単細胞性真核紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) を用いて、複製起点の解析と、それを利用した新規ベクター系の開発に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シゾンは植物の基本的な細胞機能を解析するモデルとして期待されており、本研究から得られた成果を高等生物へとフィードバックすることで、農学を始め幅広い分野に応用可能である。また近年、単細胞性の真核藻類は有用物質生産のホストとして期待が高まっている。コンタミネーションのリスクが低いシゾンは物質生産のホストとしても高いポテンシャルを秘めており、本研究はシゾンをはじめとする藻類ゲノム工学の発展に大きく貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Regulation of DNA replication is essential for maintaining precise chromosomal copy number in all organisms. In yeast and animal cells, the mechanism of DNA replication initiation has been revealed, however the observation of that is very limited in algae and green plants. *Cyanidioschyzon merolae* is unicellular red algae, living under high temperature and strong acidity such as hot spring. *C. merolae* have simple cell structure and genome, thus this organism is suitable to study the basic principle of plant DNA replication initiation mechanism. In this study, we investigated DNA replication start sites in *C. merolae* by ChIP-seq and Repli-seq analysis and found several candidates. In addition, we constructed vector contains marker gene and centromere for the platform of artificial chromosome. Our study will contribute for not only understanding plant DNA replication but also developing algae genome biology.

研究分野：応用微生物

キーワード：DNA複製 複製開始 人工染色体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、単細胞性藻類は培地コストが安価であり高等植物と比べ増殖速度が速いことから有用物質生産のホストとして期待されている。特に高温 (45°C)、強酸性 (pH 2) 環境で生育する *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) はコンタミネーションのリスクを回避できるため、開放系での培養に適した生物である。シゾンは外来遺伝子の導入、ターゲティングが確立された唯一の真核藻類である。しかし一方で、外来遺伝子を長期に渡って保持させることが困難であることも経験的に知られている。今後シゾンや単細胞性紅藻を用いた応用研究を加速するためには、大規模かつ複雑な遺伝子コンストラクトを安定に保持できるベクター系の開発が不可欠である。出芽酵母では自律複製起点 ARS とセントロメア CEN を組み合わせた人工染色体が開発され、長鎖 DNA のベクターとして利用されてきた。シゾンにおいても CEN 領域が明らかとなったため (Kanesaki et al., FEBS Lett., 2015)、シゾン複製起点が特定できれば、これと合わせてシゾン人工染色体の構築が実現可能であると考えた。

酵母では ARS や副次的に機能する休眠複製起点など、複製開始機構が詳細に解析されているのに対し、藻類では DNA 複製の開始制御に関する知見は極めて限られている。シゾンは核、ミトコンドリア、葉緑体をそれぞれ一つずつという非常にシンプルな細胞構造をもつ (Kuroiwa, Bioessay, 1998)。これまでの研究からシゾンは明所から暗所に移行後、つまり夜間にゲノムを複製することが明らかとなっているが (Miyagishima, Nat. commun, 2014)、複製起点や複製開始のメカニズムは明らかとはなっていない。

2. 研究の目的

シゾンは真核生物としては最小クラスのゲノム (16.5 Mbp) をもつ (Matsuzaki et al., Nature, 2004)。ゲノム中には重複遺伝子が極めて少なく、複製起点やメカニズムを解析するのに適した生物であると考えられる。また、次世代シーケンサーやタイリングアレイ、ゲノムライブラリー等のポストゲノム解析のプラットフォームが整備されており、ゲノムワイドな解析が可能である。本研究ではこれらの技術を駆使してシゾンにおける複製起点を同定し、既知の CEN 領域と組み合わせた人工染色体の構築を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、シゾンの複製起点の同定および、それを用いた人工染色体の構築を目的とし、以下の研究を実施した。

(1) シゾン複製起点の同定

- 新規合成 DNA 検出系の構築
- シゾン複製時期の同定
- 新規合成 DNA の Repli-seq 解析
- シゾンにおける ORC 相同タンパク質の探索
- ORC2 の HA タグ融合発現株の構築
- ORC2-HA の ChIP-seq 解析

(2) シゾン人工染色体の構築

- シゾンマーカー遺伝子および CEN 領域のクローニング
- シアニジウムドラフトゲノムからのマーカー遺伝子、CEN 領域の抽出
- マーカー遺伝子および CEN 領域のクローニング

4. 研究成果

(1) シゾン複製起点の同定

新規合成 DNA 検出系の構築

酵母では、新規合成された DNA をチミジンのアナログである 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) によって標識し、タイリングアレイを用いて網羅的に解析することによって全複製起点が同定された (Hayashi et al., EMBO J, 2007)。研究代表者は本手法を元に BrdU 標識した DNA を次世代シーケンスする Replication-sequencing (Repli-seq) 法を確立し、シアノバクテリアの複製起点を同定した (Watanabe et al., Mol. Microbiol., 2012)。シゾンにおいても同様の手法で DNA 複製を解析した。BrdU の取り込みにはチミジinkinナーゼ (TK) が必要である。しかしシゾン野生型は TK 遺伝子を持たないため TK 発現株を新たに構築する必要があった。核ゲノムへの遺伝子導入法 (Watanabe et al., BBB, 2014) により、ヘルペスウィルス由来の TK 遺伝子を発現するシゾン TK 株を取得し BrdU 取り込み活性を比較した。その結果、TK 株は野生株に比べ高い BrdU 取り込み能を有することが示された。また抗 BrdU 抗体を用いた免疫蛍光観察よりミトコンドリアと核に BrdU の蛍光シグナルが検出された。

シゾン複製時期の同定

シゾン TK 株における細胞周期の同調培養条件を最適化した。シゾン野生株では定常期の細胞を暗所で 18 時間培養することで細胞周期を G1 期に揃え、その後明所に移すことで細胞周期を同調できる。シゾン TK 株は野生株に比べ細胞周期の同調率が低かったため、暗所での培養時間を 48 時間まで延長した。その結果、G1 期の細胞の割合が増加し、細胞周期の同調が確認

できた。明所に移行し細胞周期を再開させてから 3 時間ごとに BrdU でパルスラベルすると、細胞周期再開直後に BrdU のシグナルが検出され再開後 6-9 時間で取り込み活性は最大となった。一方、オルガネラの DNA 複製阻害剤ナリジキシン酸 (NDX) を BrdU と共に添加した場合は BrdU 取り込み活性は再開 3 時間後から検出され細胞周期再開 9-12 時間後にピークを示した。以上の結果より、オルガネラの DNA 複製は再開 (明所移行) 直後からただちに開始し、核はそれ以後に開始すると考えられた。

新規合成 DNA の Repli-seq 解析

シゾン TK 株を用いて、DNA が新規合成された領域について Repli-seq を実施した。暗所 (コントロール) および明所移行 9 時間後に BrdU ラベルし、免疫沈降によりラベルされた DNA を分離した。得られた DNA を NGS を用いてシーケンスしたが、現時点においてコントロールと比較して有意にシグナルの高い領域を見出すことはできていない。別のグループの研究より TK 株は核ゲノムに比べて AT に富んだミトコンドリア DNA への BrdU 取り込みが多いことが新たに示され、これが有意なシグナルが検出できない一因であると考えられる。

シゾンにおける ORC 相同タンパク質の探索

上記 - と併行して、複製起点に結合するタンパク質からも解析を進めた。ORC 複合体は真核生物に広く保存されたタンパク質複合体であり、複製起点に結合することが知られている。出芽酵母では ORC1 から ORC6 が存在し、G1 期後期において Cdt1、CDC6、MCM ヘリカーゼと共に複製開始前複合体 (pre-RC) を形成する。出芽酵母 ORC1-ORC6 の配列から、シゾンにおけるホモログを探索すると ORC1、ORC2、ORC4 に相同なタンパク質 (CMS112C、CMS058C、CMT300C) が見つかるのに対し、ORC3、ORC5、ORC6 のホモログは見つからなかった。Cdt1 も保持していないことから、シゾンの pre-RC の構成は出芽酵母とは異なると考えられた。

ORC2 の HA タグ融合発現株の構築

シゾンに保存された ORC のうち、ORC2 に着目し解析を進めた。強発現プロモーター APCC より HA タグと融合した ORC2 を発現する ORC2_{HA} 過剰発現株 (OX-ORC2_{HA}) および、ゲノム上の内在性 ORC2 に HA を付加した株 (Intact-ORC2_{HA}) を構築した。OX-ORC2_{HA} は細胞周期を通じて、ORC2_{HA} が発現するのに対し、Intact-ORC2_{HA} は内在性 ORC2 の挙動を解析することができる。Intact-ORC2_{HA} を用いて細胞周期の各フェーズにおける ORC2_{HA} の発現をウェスタン解析によって確認した結果、データベースに登録された ORC2 の分子量 50 kDa のシグナルに加え、5 kDa 程度サイズの大きなシグナルが検出された。大きなサイズのシグナルは S 期、G2/M 期にむけて徐々に減少し、逆に本来のサイズの ORC2 のシグナルは G1 期から S 期にかけて増加した。これらの結果からシゾン細胞周期において ORC2 はタンパク質のレベルの制御を受けることが考えられた。

ORC2-HA の ChIP-seq 解析

OX-ORC2_{HA} および Intact-ORC2_{HA} を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) および次世代シーケンス (以下、ChIP-seq 解析) による ORC2 結合領域の探索を行った。明暗処理により細胞周期を同調し、S 期の細胞について ORC2_{HA} の ChIP-seq 解析を実施した。その結果、ネガティブコントロールである親株と比べて ORC2_{HA} の結合シグナルを検出した。しかし、同様の ChIP サンプルを用いた定量 PCR では有意な差が確認できなかった。次世代シーケンスはサンプル調整の際に PCR 反応を要するため、ChIP-seq 解析で検出したシグナルは PCR バイアスも考慮して解析を進める。シゾンタイリングアレイを用いて、PCR バイアスの少ない ChIP-chip 解析も進めており、ChIP-seq や複製起点予測ソフトウェア (ORIS: Shah and Krishnamachari, 2012) の解析結果と照らし合わせながら、シゾン複製起点候補領域の絞り込みを行っている。

(2) シゾン人工染色体の構築

シゾンマーカー遺伝子および CEN 領域のクローニング

シゾンにおける栄養要求性マーカー *URA5.3* 遺伝子に加え、シゾン 20 番染色体のセントロメア領域を含むベクターを構築した。シゾンの複製起点のスクリーニングに向けて、シゾンゲノムライブラリーを作製中であったが、別の研究 (シアノバクテリアの複製起点の探索) から、ゲノムへの組換え能を有する生物の場合、ライブラリーのインテグレーションを考慮する必要があることに気がついた。シゾンの配列を基にした場合、ゲノムライブラリーが染色体にインテグレートして維持される可能性がある。そこで、シゾンの近縁種であり当研究グループにおいて解析が進められている *Cyanidium caldarium* (以下、シアニジウム) のドラフトゲノム情報を利用することに方針を転換した。

シアニジウムドラフトゲノムからのマーカー遺伝子、CEN 領域の抽出

シアニジウムはシゾンと同じイデコゴメ属の単細胞性紅藻である。これまでにシゾンではシアニジウムからさらに系統の離れた *Galdieria sulphuraria* (ガルデリア) の *URA* 遺伝子が機能することが知られており、マーカーとして利用されている (Minoda et al., 2004)。シアニジウムの配列はシゾンとは 100% 一致しないため、シゾンに利用する場合、ゲノムへのインテグ

レーションを考慮することなくスクリーニングに利用できる。シアニジウムのドラフトゲノム情報（兼崎ら、未発表）より配列の相同性を利用してマーカーとなる *URA5.3* 遺伝子および、シゾン 16 番染色体 CEN に最も相同性を示すシアニジウム CEN 領域を抽出した。シゾンとシアニジウム間での相同性は *URA5.3* 遺伝子では 66%、CEN 領域は 70% であり、全体的な類似性を保ちながらも一部シゾンと異なる配列が散在することからインテグレーションのリスクを回避できると考えた。

シアニジウムマーカー遺伝子および CEN 領域のクローニング

(2) で見出したマーカー遺伝子、CEN 領域をクローニングしたベクターを構築した。今後、シアニジウムのゲノムをクローニングし、ライブラリーの構築およびスクリーニングを進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Watanabe S., Noda A, Ohbayashi R, Uchioke K, Kurihara A, Nakatake S, Morioka S, Kanasaki Y, Chibazakura T, Yoshikawa H. ParA-like protein influences the distribution of multi-copy chromosomes in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

Microbiology. 2018 Jan;164(1):45-56. doi: 10.1099/mic.0.000577. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

岩上匡伸、山川健太、大庭優作、兼崎友、千葉櫻拓、渡辺智、吉川博文、単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における核ゲノム複製開始点の解析、日本植物学会第 80 回大会、沖縄コンベンションセンター、2016.9.16

岩上匡伸、山川健太、大庭優作、兼崎友、渡辺智、千葉櫻拓、吉川博文、単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における核ゲノム複製開始点の解析、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2016.12.1

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：兼崎 友

ローマ字氏名：KANESAKI, Yu

研究協力者氏名：大庭 優作

ローマ字氏名：OHBA, Yusaku

研究協力者氏名：岩上 匡伸

ローマ字氏名：IWAGAMI, Masanobu

研究協力者氏名：吉川 佳奈子

ローマ字氏名：YOSHIKAWA, Kanako

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。