

令和元年6月12日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19336

研究課題名(和文) ヒト培養細胞を用いたDNAポリメラーゼ機能のゲノムワイド解析系の確立

研究課題名(英文) Genome-wide identification of replicative DNA polymerase usage

研究代表者

大学 保一(Daigaku, Yasukazu)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：80619875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNAポリメラーゼは遺伝情報を担うゲノムDNAを合成する酵素であり、現在までに同定されたものとして、ヒトには15種類存在する。その分子の機能の効率、正確性は遺伝情報の安定性に直接影響し、数多くのポリメラーゼがどのように協調的に機能するかは、遺伝の仕組みを明らかにする上で重要な課題である。本研究では、培養ヒト細胞を用いて、長大なゲノムDNA上で個々のDNAポリメラーゼが機能する領域を特定する実験系の構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までのDNA複製研究は出芽酵母、分裂酵母などの単細胞モデルによるものが中心であり、ヒト細胞における研究は非常に限られている。DNA複製に必要な因子は高度に保存され、同様の機構が存在すると考えられるが、多細胞生物には分化、老化、がん化という細胞の形質変化があるために、経時的にどのようにDNA複製機構が変化するかは、個体の恒常性の維持という点で重要な問題であると考えられる。しかし、それは現在のDNA複製研究では未踏の領域であり、本研究では、ヒト細胞を用いて新たにゲノム全体を対象としてDNAポリメラーゼの分業を明らかにする実験系を構築することにより、この問題にチャレンジした。

研究成果の概要(英文)：The division of labour among DNA polymerases is essential for efficient genome replication. In both fission yeast and budding yeast, the assignment of replicative polymerase has been identified at a genome-wide level. However, activities of DNA polymerases are expected to be more flexible in organisms with the larger genome, including human. Thus, in this study, using human cultured cell, we established the method to characterise the function of a particular DNA polymerase in vivo.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：DNA複製 DNAポリメラーゼ 突然変異 ゲノム安定性

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在までのDNAポリメラーゼ研究では、リーディング鎖、ラギング鎖合成を行う Pol  $\epsilon$ 、Pol  $\delta$  は「複製ポリメラーゼ」と分類され、その他のポリメラーゼは一概にDNA損傷乗越え合成・修復の過程での役割を持つと認識されてきた。しかし、我々は、細胞周期のタイミングに応じたポリメラーゼ機能制御の研究を通し (Daigaku et al. Nature 465 951-55 2010)、複製ポリメラーゼ以外のDNAポリメラーゼもゲノム複製に関与していることを示唆する結果を得た。その後、効率、正確性が異なるDNAポリメラーゼがどのように協調的に機能するかを解明すべく、分裂酵母を使用して、DNAポリメラーゼの機能を全ゲノムを網羅し、かつ、これまでになく詳細に検証する実験系を開発した (Daigaku et al Nat. Struct. Mol. Biol. 22 192-8 2015)。ヒト細胞のような大きなゲノムを持つ細胞が行う、効率的なゲノム複製のシステムの解明を目指し、本研究は構想された。この研究を応用して、加齢とともに我々の体内に蓄積する遺伝情報の変化である塩基多型 (SNP)、copy number variation、染色体異常に、DNAポリメラーゼ機能の変化がどのように関与するかを検証できると考えている。

近年、多くのがん細胞のゲノムが解読され、様々なDNAポリメラーゼの遺伝子における変異が、がん化と強い関連性があることが示され、また、特定のDNAポリメラーゼの発現量と癌の進行スピードが相関することも報告されてきた (Lemée et al. PNAS 107 13390-5 2010)。これは細胞内のDNAポリメラーゼ機能の変化が、がん発生と関わることを示唆する。よって、現在まで、がん細胞の1つの特徴としてゲノム不安定が漠然と議論されてきたが、がん細胞株に Pu-seq 実験を応用することにより、ゲノム不安定の原因となるDNA複製機構の変化を詳細に観察することができると予想している。

### 2. 研究の目的

真核生物では、DNA合成反応の正確性や速度が異なる15種類のDNAポリメラーゼが存在し、多くのポリメラーゼによる分業はゲノム情報の維持という点において重要な現象である。半世紀の間、個々のDNAポリメラーゼの生化学的研究が盛んに行われてきたが、細胞内でのDNAポリメラーゼ群の総括的な機能研究は発展途上の段階である。現在、出芽酵母、分裂酵母などの比較的ゲノムが小さい真核生物において、DNAポリメラーゼ間での分業に関する研究が進展しつつある。現在までに申請者は、分裂酵母を用いて、特定のDNAポリメラーゼ合成領域を全ゲノム領域に渡り同定する実験方法を開発し、ゲノムの大半を複製する2つのポリメラーゼ Pol  $\epsilon$ 、Pol  $\delta$  の合成領域に関する詳細なプロファイルを得た (Daigaku et al Nat. Struct. Mol. Biol. 22 192-8 2015; 詳細は以下に記述; Polymerase-usage sequencing: Pu-seq)。この実験により、全ゲノム領域にわたり、Pol  $\epsilon$  (イプシロン) はリーディング鎖合成、Pol  $\delta$  (デルタ) はラギング鎖合成を担うことが示された。しかし、ゲノムサイズが格段に大きいヒト細胞においては、1つの複製装置が合成する領域が長大になることから、ゲノム上の様々な構造や特徴の影響が大きくなり、様々なポリメラーゼの介入のチャンスが大きくなると考えられる。よって、本研究ではその点を明らかにする布石の第一歩として、ヒト細胞で Pu-seq 実験を確立し、ゲノム上で複製ポリメラーゼ Pol  $\epsilon$ 、Pol  $\delta$  の合成領域のプロファイルを明らかにし、個々のポリメラーゼが機能する領域と突然変異、染色体編成が起きやすい場所を比較し、我々の体内で起きるゲノム不安定性とDNA複製機構の関連性を検証する。

### 3. 研究の方法

本研究では遺伝子改変が比較的容易な大腸がん由来の2倍体細胞 HCT116 を使用する。本過程(1)-(3)に分け実施した。

#### (1)、ヒト細胞で Pu-seq 実験に必要な細胞株の樹立

##### ① ポリメラーゼ変異の導入

Pu-seq 実験では、細胞内の特定のポリメラーゼ (Pol) の活性部位を変異させ、その Pol によるゲノムDNA中へのリボヌクレオチドの取り込みを誘導することにより、取り込まれたリボヌクレオチドの分布から対象となる Pol によって合成が行われた領域を特定する (図1)。よって、ヒト細胞での Pu-seq 実験の準備段階として、分裂酵母でリボヌクレオチドを取り込む変異 Pol  $\epsilon$ 、Pol  $\delta$  の配列情報をもとに、同様のヒト Pol  $\epsilon$ 、Pol  $\delta$  の遺伝子変異を特定する。その後、CRISPR/Cas9 系を用いた一本鎖ドナーオリゴヌクレオチドの配列導入により、上記の Pol 変異を導入する。

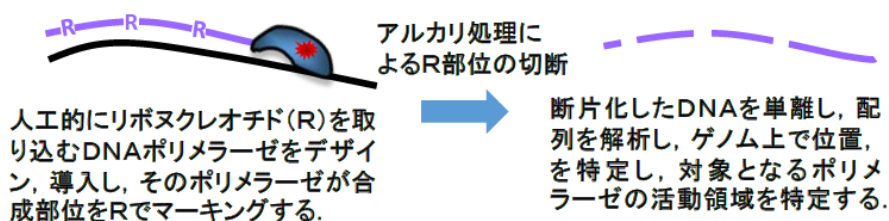


図1  
Pu-seq 実験の概要

## ② リボヌクレオチドを除去する酵素の不活化

同時に、ゲノムDNA上のリボヌクレオチドをDNA鎖から除去する細胞内のRNaseH2を不活性化する必要がある。しかし、ヒト細胞の場合は分裂酵母とは異なり、RNaseH2はp53+の機能が維持され正常に細胞周期が制御される株の生存に必須である(Reijns et al. Cell 149 1008-1022 2012)。よって、(1)で得られたそれぞれのPol変異株に、siRNAを使用したノックダウン方法、薬剤により標的となるタンパク質の分解誘導を行う方法(AIDタンパク質分解法; Nishimura et al. Nat Methods 6 917-22 2009)を応用し、細胞内でのRNaseH2を不活性化する。

### (2)Pu-seq 実験の実施, および, ゲノム情報科学的な解析

過程(1)で樹立したリボヌクレオチドを取り込む変異Polを導入した株(2種)を使用し、以下①~③の実験, 解析を行い, Pol $\epsilon$ , Pol $\delta$ の合成領域を特定し, それらのポリメラーゼに影響するゲノム上の構造, 特徴を探る。

#### ① リボヌクレオチドが取り込まれた領域のDNAの回収

(1)-(2)の過程でRNaseH2を不活性化した細胞からゲノムDNAを回収後, アルカリ処理によりrNTP部位での切断を誘導する。DNA鎖中のリボヌクレオチド取り込みの有無を処理後の断片化の程度を電気泳動で確認し, その断片を回収する。このDNA断片から次世代シーケンサー解析用にライブラリーDNAを作成し, 配列解析を行う。

#### ② ゲノム中リボヌクレオチド取り込み領域の同定しPol合成領域を特定する。

①で得られた次世代シーケンサー解析データから, ゲノム上の各領域(300bp~)にアラインされるDNA断片数から各Pol変異株におけるリボヌクレオチド取り込み量を得て, 各領域の対象となるPolによる相対的な使用度を算出する。そのデータの解析により, それぞれによって合成される領域を特定する。

③ 突然変異とポリメラーゼ合成領域の関連性の解析 - それぞれのDNAポリメラーゼ合成領域とヒト細胞における単塩基多型(ヒト集団間やがん細胞サンプル間に見られるもの), または, fragile siteの分布(Fungtammasan et al Genome Res. 2012 22: 993-1005)の関連性を比較し, DNAポリメラーゼの機能分担が突然変異に及ぼす影響を検証する。

## 4. 研究成果

本研究の期間内においては, 上記の通り計画された研究において, (1)DNA合成中にリボヌクレオチドの取り込みを誘導するDNAポリメラーゼ遺伝子への変異の導入, 得られた変異体の解析, 及び, (2)①, ②構築した細胞を使用したPu-seq実験を実施した。

### (1), ヒト細胞でPu-seq実験に必要な細胞株の樹立

#### ① リボヌクレオチドを取り込んでDNA合成を行うポリメラーゼ変異体の作成

ヒト細胞におけるPu-seq実験のその第一段階として, 正常に2倍体を形成するHCT116細胞株を使用し, ゲノム複製の大半を担うPol $\delta$ (デルタ), Pol $\epsilon$ (イプシロン)の触媒サブユニットをコードする遺伝子(POLD1, POLE1)へ, 単一のアミノ酸を置換する変異を導入する実験を実施した。具体的には, CRISPR-Cas9システムによる標的遺伝子座での二重鎖切断の誘導と同時に, 改変配列及びその周辺配列をもつ一本鎖DNAを細胞内に導入した。この実験操作後に形成されたHCT116細胞株のコロニーのうち, POLD1改変において, 候補となる100クローン, POLE1改変においては200クローンのポリメラーゼ遺伝子の解析を行った。その結果, POLD1の単一遺伝子座へ変異が導入された1クローン, POLE1遺伝子の両遺伝子座への変異が導入されたものを12クローン単離した。POLD1, POLE1遺伝子座の両方において, CRISPR-Cas9システムによる鎖切断は5%程度の細胞で起きていることから, POLD1遺伝子への変異導入頻度が低く, 単一遺伝子座へのみ変異が導入されたことは, 該当変異がPOLD1への機能を低減し, 変異導入された細胞の生存率に影響を及ぼしたためであると考えられた。

#### ②, DNAポリメラーゼ変異体でのゲノムDNAへのリボヌクレオチド取り込み量の検証

次に, 上記の実験で得られたDNAポリメラーゼの変異体における, ゲノムDNAへ取り込まれたリボヌクレオチドを検証した。ゲノムDNA中のリボヌクレオチドはRNaseH2に除去されるので, リボヌクレオチドの蓄積を誘導するために, RNaseH2のコンポーネントであるRNaseH2AのsiRNAによるノックダウンを行った。ノックダウンを行ったDNAポリメラーゼ変異体, および, その親株からDNAを抽出し, アルカリ処理後によりリボヌクレオチドの部位での断裂を誘導し, 電気泳動後に断片化した単鎖DNAを可視化した。この方法によりゲノムDNAへのリボヌクレオチドの取り込み量を解析した。この実験によりRNaseH2AのノックダウンがゲノムDNAへのリボヌクレオチドの蓄積を引き起こすことが確認されたものの, DNAポリメラーゼの変異体特異的な取り込みの増加は観察されなかった。

よって, より強力かつ迅速に標的タンパク質を分解し不活性化する方法であるAIDタンパク質分解法を用いて, RNaseH2Aの分解を試みた。aidタグを付加されたタンパク質はaidタグと

auxin が結合した時に、ユビキチン化酵素との結合能が高まり、プロテアソームによりユビキチン依存的に分解される。この性質を利用して、auxin 添加後に標的タンパク質を迅速に分解可能である (Natsume et al Cell Rep. 2019)。よって、①で作成したDNAポリメラーゼ変異体において、CRISPR-Cas9 システムを利用し、RNASEH2A のC末端に aid タグを付加した。得られた株を用いて、auxin 添加後に上記の通りリボヌクレオチドの取り込みを検証した。その結果、経時的にリボヌクレオチドの蓄積が高まることが確認され、また、POLE1 変異体においてはリボヌクレオチドの取り込みがコントロール株よりも多いことが示された。これは、Pol ε による合成領域がリボヌクレオチドによってラベルされたことを示す。

## (2), Pol ε を対象とした Pu-seq 実験の実施

① (1)-②で述べた通り RNASEH2A 分解を誘導後、ゲノムDNAを回収した。その後、得られたゲノムDNAのアルカリ処理によりリボヌクレオチド 部位での切断を誘導し、2kb 以下のDNA断片を回収した。その断片を用いて、illumina プラットフォームによる網羅的な配列解析用のライブラリーDNAを作成し、配列解析を行った。得られたシークエンスデータを解析し、ゲノム上の各領域 (1kb サイズ) にアラインされるDNA断片の量を求めリボヌクレオチド取り込み量を算出した。そのデータをもとに、Pol ε によるDNA合成のプロファイルを得た。その結果、ゲノムDNAの二重鎖の両鎖でのパターンを比較した場合、お互い異なる領域で Pol ε による合成の頻度が高くなることが示された。これは、複製開始領域の5' 方向に進んだ Pol ε によるリーディング鎖合成の領域を同定したことを示している。

## (3), 今後の展開

本研究期間内で、ヒトゲノムを網羅して Pol ε の合成領域を同定できたことは、DNAポリメラーゼ動態とゲノム不安定性の関連性を明らかにする上での1つのマイルストーンに到達したといえる。本研究は、ヒト細胞においても Pu-seq 実験の構築が可能であることを示し、今後は本研究終了時点でも構築中である Pol δ を対象とした実験、および、その他の多くのDNAポリメラーゼで同様の実験を行い、DNA 複製機構の柔軟性を明らかにする研究を今後も継続する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① N. García-Rodríguez, M. Morawska, R. P. Wong, Y. Daigaku, H. D. Ulrich, Spatial separation between replisome- and template- induced replication stress signalling, EMBO J. 3, e98369, 2018 (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 大学保一, 「ゲノム科学的視点から見るDNAポリメラーゼ機能の柔軟性」, 第41回分子生物学会年会 ワークショップ 見えてきた!フレキシブルでダイナミックなゲノム維持機構のすがた, 2018年
- ② 大学保一, 「複製フォーク動態のゲノム科学的解析から見る染色体複製」, 第36回染色体ワークショップ, 2019年
- ③ 大学保一, 「染色体構造とDNA複製動態一分裂酵母とヒト細胞の視点から」, 染色体研究の最前線, 2019年

[図書] (計 1 件)

Andrea Keszthelyi, Izumi Miyabe, Katie Ptasińska, Yasukazu Daigaku, Karel Naiman, Antony M. Carr, Humana Press, Genome Instability. Methods in Molecular Biology, 2018, p239-259 (リストした著者で担当した範囲)

## 6. 研究組織

### (1)研究協力者

研究協力者氏名: 鐘巻 将人

ローマ字氏名: Masato Kanemaki

所属研究機関名: 国立遺伝学研究所

部局名: 分子細胞工学研究室

職名: 教授

※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。