

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06182

研究課題名(和文)チミン合成を阻害する薬剤により生じる劇的な細胞死におけるゲノム動態の役割

研究課題名(英文)A role of genome dynamics in dramatic cell death caused by thymine synthesis inhibitors

研究代表者

秋山 昌広(Akiyama, Masahiro)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：80273837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：チミンの欠乏(飢餓)による複製阻害は、細胞死(チミン飢餓死)を生じる。しかし、そのメカニズムは、DNA複製がゲノム全域に渡って解明されていないため、未だに謎である。本研究では、その解明を目指し、大腸菌を用いて以下の成果を得た。(1)大腸菌ゲノムは複製進行の動態が異なる2つの領域に分かれること、そして(2)それらの境界は、チミン不足に依存して複製を遅延する領域(FTZと命名)であること。また、(3)染色体構造タンパク質H-NSと転写伸長因子DksAが、FTZでの複製の遅延に関与すること。さらに、(4)FTZで複製の進行を遅延できないと、チミン飢餓時のゲノム不安定化が亢進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、大腸菌のゲノムが、チミン不足に依存して特定のDNA領域で複製を遅延するように、染色体高次構造によってプログラムされている可能性を示した。さらに、この複製遅延が、チミン飢餓時のゲノム恒常性維持と関係する可能性も示した。これらは、染色体の複製を理解する上で重要な、新規の学術的知見である。チミン欠乏によるチミン飢餓死は医薬品の作用機序として現在でも利用されているが、その発見から60年以上たっても、細胞死のメカニズムは謎のままである。本研究で得られた知見は、チミン飢餓死の研究に新たな視点を提供する。それは、今後、チミン飢餓死のメカニズム解明に寄与して、社会的意義を持つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cell death (called thymine-less death) are induced when replication is inhibited by thymine starvation. However, their mechanisms are unclear because genome-wide profiles of replication progression have not been fully understood. Here, using Escherichia coli, we found the followings. (1) The E. coli genome is divided regionally into two types (named Fork Path) through which replication-fork progresses, and (2) progression of replication is delayed at the boundaries (named Fork Trapping Zone (FTZ)) of these two regions under scarce thymine. Moreover, (3) the bacterial chromatin-structuring protein H-NS and the transcription elongation factor DksA participate in the replication delay at FTZ, and (4) dysfunction of replication-pausing at the FTZ enhances genomic instability in thymine starvation. These results suggest that replication barriers at FTZ under scarce thymine are programmed in a fundamental genomic configuration, and safeguards genomic integrity in thymine starvation.

研究分野：分子生物学

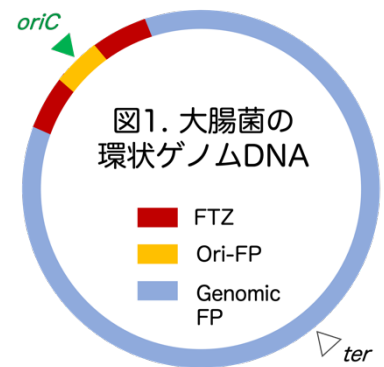
キーワード：DNA複製 複製フォーク 微生物ゲノム 複製遅延 ゲノム不安定化 チミン飢餓死 染色体構造タンパク質 転写伸長因子

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

DNAは、チミンを含む4種類の塩基を持つヌクレオチドの重合によって合成される。DNA複製では、Y字型DNA構造の複製フォークが、DNAを合成しながら染色体を移動する。チミンの欠乏(チミン飢餓)はDNA合成の材料不足のために、複製フォークの進行を停止させる。この複製阻害の細胞ストレス状態では、細胞の生存力が短時間で指数関数的に消失する。この劇的な細胞死の現象は1954年に大腸菌で発見され、「チミン飢餓死」と呼ばれている。その後、チミン飢餓死は他の微生物や真核生物でも同定された。そして、1956~1961年には、チミンの生合成を阻害してチミン飢餓死を誘発する薬剤(抗がん剤や抗菌剤)が開発され、現在まで医療現場で長年使用され続けている。しかし、チミン飢餓死のメカニズムは、その発見から60年以上たっても謎のままである。それは、チミン飢餓死を誘導する薬剤の改善や発展を妨げている。

大腸菌のDNA複製では、二つの複製フォークが複製開始点 *oriC* から複製終結点 *ter* へ向けて、それぞれ時計回りと反時計回りに環状ゲノム(4.6Mb)を進行する(図1)。チミン飢餓死の研究は、ゲノムが小さく単純で、解析の容易な大腸菌で最も進んでいる。これまでに、複製阻害とDNA組換えがチミン飢餓死に関与すること、さらに、チミン飢餓時に特定のゲノムDNA領域が分解して消失し、その領域の大きさはゲノムのおよそ15%に及ぶことが、主に国外の複数の研究グループによって明らかとなっている。このDNAが分解する領域には、DNA複製に必須な *oriC* や、細胞生存に重要な多数の増殖関連遺伝子が存在するので、それらの消失がチミン飢餓死の主要な原因である可能性が極めて高い。このDNA消失の仕組みを解明するには、チミン不足時の染色体複製をゲノムワイドに(ゲノム全般に)理解することが必要である。しかし、正常時の大腸菌でも、複製フォーク進行のゲノムワイドな動態の全容は明らかでなく、複製酵素の生化学的な解析などから想像されるレベルに留まっている。



現在のDNA複製の概念では、ヌクレオチド欠乏による複製フォークの進行阻害はゲノムのどの位置でもランダムに起きて、それがゲノム全体の不安定化に繋がるはずである。本研究の代表者は、大腸菌で、複製フォーク進行のゲノムワイドな動態の解析を世界で初めて可能にした(ND-seq法: Nascent DNA sequencingと命名)。その結果、DNA複製の既知の概念と異なり、複製フォークの進行がチミン不足に依存して、二カ所のゲノム領域(FTZ: Fork Trapping Zoneと命名)で高頻度に遅延することを見出した(図1)。また、このFTZ領域が、チミン飢餓死で消失するゲノム領域の境界と驚くほど良く一致することを発見し、特定のゲノム領域での複製阻害がチミン飢餓死に関わる可能性を初めて示した。さらに、FTZの新生DNA鎖の塩基配列情報を情報科学の手法で解析して、逆向き反復DNA配列での鋳型DNAスイッチの亢進を発見した。鋳型DNAスイッチでは、複製フォークの新生DNA鎖が本来と異なる鋳型DNAに対合して、異常なDNA合成が行われる。それは、突然変異や染色体再編などのゲノム不安定化に繋がる。そこで、本研究の代表者は、チミン飢餓死のゲノム消失の原因が、FTZでの鋳型DNAスイッチではないかと考えた。

近年、染色体の三次元構造の解析技術が進歩して、真核生物と同様に微生物でも、ゲノムDNAは高度に折り畳まれて可塑的な染色体ドメイン構造を形成することが判明している。しかし、染色体高次構造が、複製フォークの動態やゲノム安定性の維持にどの様に影響するかは未解明である。本研究の代表者は、微生物の染色体高次構造の一つ(CID: Chromosomal Interaction Domain)とFTZの大きさが類似すること、および、染色体高次構造の形成に関わるヒストン様タンパク質H-NSの結合分布が、FTZと相関することを見出し、染色体高次構造とチミン飢餓死が関係する可能性に気づいた。

近年、染色体の三次元構造の解析技術が進歩して、真核生物と同様に微生物でも、ゲノムDNAは高度に折り畳まれて可塑的な染色体ドメイン構造を形成することが判明している。しかし、染色体高次構造が、複製フォークの動態やゲノム安定性の維持にどの様に影響するかは未解明である。本研究の代表者は、微生物の染色体高次構造の一つ(CID: Chromosomal Interaction Domain)とFTZの大きさが類似すること、および、染色体高次構造の形成に関わるヒストン様タンパク質H-NSの結合分布が、FTZと相関することを見出し、染色体高次構造とチミン飢餓死が関係する可能性に気づいた。

2. 研究の目的

現在の DNA 複製の概念と異なる知見や、今までのチミン飢餓死の研究で得られなかった新しい知見に基づいて、本研究の代表者は「チミン飢餓では、① 複製フォークの進行が、H-NS による染色体構造によって FTZ で遅延し、② その遅延によって、逆向き反復 DNA 配列での異常な DNA 合成や DNA 鎖切断が蓄積し、③ 染色体再編によって部位特異的なゲノム消失が惹起されて、複製開始点を失う結果、細胞が生存力を失う」という新しい仮説を立案した。本研究は、この仮説を最新のゲノム解析技術を駆使して検討することを目的とした。今までのチミン飢餓死の研究では、複製がチミン不足に依存して遅延するゲノム領域を同定できておらず、FTZ に基づくこの仮説を最新のゲノム解析技術で検討する本研究は非常に先駆的である。

3. 研究の方法

(1) 複製フォーク進行の動態解析 (ND-seq 法によるゲノム解析)：ブromo・デオキシウリジン(BrdU: Bromo-deoxyuridine)は、チミン塩基を持つヌクレオチドの類似体で、ゲノム DNA への取り込み量によって DNA 合成を測定できる。大腸菌は、4.6 Mb のゲノムの複製を約 40 分で完了する。しかし、従来の大腸菌は、この複製の動態を解析できるほど短時間で、BrdU をゲノム DNA に取り込めなかった。本研究の代表者は、新規の大腸菌細胞 eCOMB (*E. coli* for combing と命名)を遺伝子改変技術により作製した。この細胞は、複製フォークの動作を解析するのに十分な量の BrdU を数分間でゲノムに取り込むことができるため、BrdU による大腸菌細胞内の複製フォークの動態解析を初めて可能にした。

細胞周期を同調していない対数増殖期の eCOMB 細胞に、BrdU を加えて 3 分間培養すると、BrdU が細胞集団中のゲノム上の様々な位置で新生 DNA 鎖に取り込まれる。BrdU で標識された DNA 鎖(以下 BrdU-DNA)を超音波で細分化した後、抗 BrdU 抗体による免疫沈降法で回収し、その塩基配列を次世代シーケンサーで網羅的に決定して、ゲノム DNA 全体にマッピングした (ND-seq 法)。この BrdU-DNA のゲノム上の位置と量は、染色上の複製フォークの存在場所と存在量 (集団平均値)を各々示す。もし複製フォークの進行具合がゲノム全体で均一ならば、細胞集団中で BrdU-DNA のゲノム分布に偏りはない。一方、複製フォークの停滞によって複製遅延が起きているゲノム部位では、複製フォークがスムーズに進行している他のゲノム部位に比べて、複製フォークの存在確率が高くなり、BrdU-DNA の割合が細胞集団中で相対的に高くなる。この原理により、ゲノム上の BrdU-DNA の位置と量から、複製フォークの動態を解析した。

(2) 染色体高次構造の解析 (染色体立体配座補足法 (Hi-C) 法によるゲノム解析)：エンドヌクレアーゼ I を欠損した eCOMB 細胞を対数増殖期まで培養して、細胞をホルムアルデヒドで固定した後、リゾチーム処理と浸透圧ショックによって細胞を破碎した。細胞破碎液から、バクテリアのクロマチン構造体 (ヌクレオイド)を精製し、制限酵素 *Hae* III でクロマチン DNA を完全に切断した。ビオチン標識したリンカー DNA(Bridge-linker DNA)を T4 リガーゼで DNA 切断末端に結合して、クロマチンで三次元的に近接している DNA 末端同士を連結してから、ホルムアルデヒドによる固定を解除した。クロマチン DNA を超音波によって細分化した後、リンカー DNA の結合によってビオチン標識されたゲノム DNA をストレプトアビジン・ビーズで回収し、塩基配列を次世代シーケンサーで網羅的に決定した(Bridge-linker Hi-C 法)。これによって、染色体 DNA 領域間の三次元上の距離を取得して、クロマチンの立体構造を解析した。

(3) チミン飢餓時のゲノム不安定性の解析：チミン飢餓時のゲノム不安定化は、ゲノム DNA の遺伝子量(遺伝子 DNA のコピー数)、または、鋳型 DNA スイッチで生じる突然変異によって解析した。

① 遺伝子量 (遺伝子 DNA のコピー数)の解析：定常期の eCOMB 細胞から、遺伝子量に偏りのないゲノム DNA を調製し、qPCR (Quantitative PCR) 解析の標準 DNA とした。段階希釈した標準 DNA を用いて標的遺伝子を PCR で増幅して Quantification Cycle (Cq) 値を測定し、Cq 値と DNA 量から標的遺伝子量の

検量線を作成した。標的遺伝子は、FTZ 内外と、複製開始点 *oriC* 近傍でそれぞれ複数箇所に設定した。チミン飢餓状態の eCOMB 細胞のゲノム DNA を調製し、同様に標的遺伝子を増幅して Cq 値を測定して、標準 DNA の検量線から標的遺伝子量を決定した。さらに、各サンプルの標的遺伝子量は、複製終結点近傍の遺伝子量で標準化して比較した。

② 鋳型 DNA スイッチの解析：異常な DNA 合成を、鋳型 DNA スイッチによって生じる配列置換変異を指標に解析した。配列置換変異とは、複製フォークでの鋳型 DNA スイッチによって、「不完全な逆向き反復配列」が「完全な逆向き反復配列（パリンドローム）」に変化する突然変異である。この突然変異の検出には、ラクトースを代謝する酵素をコードする *lacZ* の変異遺伝子 *lacZ(QP5)* を用いた。*lacZ(QP5)* は不完全な逆向き反復配列のためにラクトースを代謝できる酵素を産生できないので、*lacZ(QP5)* をもつ大腸菌 eCOMB は、ラクトースを単一炭素源とする最小培地で生育できない(LacZ⁻表現型)。一方、鋳型 DNA スイッチで「完全な逆向き反復配列」を生じると、この細胞はラクトースを単一炭素源とする最小培地でも生育可能となる(LacZ⁺表現型)。この LacZ⁻ から LacZ⁺ へ復帰する細胞の割合を決定して、チミン飢餓時の鋳型 DNA スイッチを解析した。

4. 研究成果

① 大腸菌ゲノムは、複製フォーク進行の動態が異なる 2 つのドメイン (FP: Fork Path と命名) に分かれ、それらの境界が複製遅延領域 FTZ であること (図 1)、そして、② 染色体構造タンパク質 H-NS と転写伸長因子 DksA が、チミジン不足に依存して複製フォークを FTZ に蓄積するために必要であることを明らかにした。さらに、③ FTZ に複製フォークを蓄積できない H-NS 欠損細胞と DksA の欠損細胞は、チミジン飢餓時にゲノムの不安定化を亢進することを明らかにした。これらの結果は、本研究の代表者が提唱するチミン飢餓死の仮説を支持した。さらに、FTZ は、忠実なゲノム複製を維持できるヌクレオチド濃度が整わないと、複製フォークが通過できないゲノムのチェックポイント領域 (関門) としても働く可能性が示唆された。

(1) 染色体の FP 領域と複製遅延領域 FTZ：充足量のチミン濃度で大腸菌細胞を培養し、ND-seq 法によって DNA 複製をゲノムワイドに解析した。その結果、大腸菌の環状ゲノムは複製フォークの進行具合によって 2 つの FP ドメインに分かれることを発見した (図 1)。一つは、複製フォークの進行がスムーズな、複製開始点 *oriC* を含む約 200kb の領域 (Ori-FP) である。もう一つは、複製フォークがスムーズに進行しにくい、ゲノムの大部分を占める 4Mb の領域 (Genomic FP) である。さらに、これらの二つの FP 領域の境界が、チミン不足時に複製が遅延する FTZ であった。この結果は、染色体の DNA 複製の理解に新たな知見を提供する。さらに、チミン欠乏時に複製フォーク進行を遅延するように、FTZ の複製障壁が染色体に予めプログラムされている可能性を示唆する。

(2) 染色体構造タンパク質 H-NS と複製遅延：FTZ では、複製フォークが進行するにつれて複製フォーク停滞の頻度が上昇し、その上昇パターンは H-NS タンパク質の結合部位の密度上昇パターンとほぼ一致した。この結果は、複製遅延に H-NS タンパク質が関与する可能性を改めて支持した。そこで、H-NS タンパク質を欠損した eCOMB 細胞で、複製フォークの動態をゲノムワイドに解析したところ、FTZ 領域での複製フォークの進行遅延は野生型の eCOMB 細胞と比較して大きく低下していた。この結果より、複製フォーク進行を遅延させる染色体障壁の形成が、H-NS タンパク質の新たな機能として初めて示唆された。しかし、微生物では先進的な Hi-C 法の高解像度でも、FTZ で形成される染色体高次構造を特定することはできなかったため、複製阻害機構の詳細は不明である。

H-NS はチミン不足時に FTZ に特異的な複製遅延に働くが、FTZ だけでなく染色体 DNA 全体に結合している。このことから、H-NS は FTZ での複製遅延の必要条件であるが、十分条件ではないことが示唆された。

H-NS タンパク質はホモ二量体を形成するだけでなく、H-NS のパラログである StpA タンパク質と結合してヘテロ複合体も形成する。そこで、StpA タンパク質も FTZ での複製フォークの進行遅延に働くかを検討するために、StpA を欠損した eCOMB 細胞で複製フォーク進行を解析した。その結果、StpA は FTZ 領域での複製フォークの進行遅延に必須でなかった。それ故に、H-NS による複製阻害の決定因子は、少なくとも、H-NS と StpA タンパク質のヘテロ二量体形成ではないことが明らかとなった。

(3) 染色体構造タンパク質 H-NS とゲノム不安定化： *lacZ(QP5)*変異遺伝子を FTZ 領域の内側と外側にそれぞれ挿入して、鋳型 DNA スイッチの発生を LacZ⁺復帰変異頻度によって解析した。その結果、チミン飢餓時に、LacZ⁺復帰変異頻度は FTZ 内で特異的に上昇したことから、FTZ での鋳型 DNA スイッチの亢進が改めて明らかになった。さらに、FTZ で複製遅延しない H-NS 欠損細胞で、チミン飢餓時の LacZ⁺復帰変異頻度を同様に解析した。その結果、チミン飢餓時の復帰変異頻度の亢進が、FTZ 領域で消失した。このことから、FTZ での鋳型 DNA スイッチは、H-NS を介して進行阻害された複製フォークで生じていることが明らかとなった。一方、H-NS 欠損細胞の FTZ 下流領域(Genomic FP 領域)では、チミン飢餓時に LacZ⁺復帰変異頻度が上昇した。この結果は、チミン飢餓時に FTZ で複製を遅延できないと、FTZ 下流の Genomic FP 領域が不安定化することを示す。

(4) 転写伸長因子 DksA とゲノム不安定化：二つの FTZ は、複製開始点 *oriC*の両側からそれぞれ約 100kb 離れている。また、*oriC*周辺の複製ドメイン(Ori-FP 領域)では、複製フォークは比較的スムーズに進行する。さらに、複製開始点 *oriC*から FTZ 間の領域は、チミン飢餓時にゲノム不安定性を示すことが報告されている。一方、*oriC*周辺には発現量の高い遺伝子が多く、おそらくチミン不足時には複製フォークが転写との衝突によって止まり易いと予想される。そこで、複製フォークが、*oriC*から FTZ 間の DNA 領域(Ori-FP 領域)をどのようにして通過して FTZ に到達するのかを解析した。

DksA は、RNA ポリメラーゼと結合して止まりにくくして、複製フォークとの衝突を回避する転写伸長因子である。DksA を欠損した eCOMB 細胞では、チミン不足時に、複製フォークが FTZ まで到達できずに、FTZ の手前(Ori-FP 領域)に蓄積した。この結果は、DksA は、複製フォークがチミン不足時に Ori-FP 領域をスムーズに進行して FTZ に到達するために重要であることを示す。さらに、DksA を欠損した eCOMB 細胞の遺伝子量を解析したところ、チミン飢餓時に、*oriC*周辺の遺伝子量が野生型の eCOMB 細胞よりも低下することを明らかにした。この結果は、DksA を欠損すると、チミン飢餓時のゲノム不安定化が Ori-FP 領域で亢進することを示す。このことは、チミン不足時に、FTZ に複製フォークを蓄積できないと、*oriC*周辺のゲノムが不安定化することを示す。

(5) 今後の展望：本研究で得られた成果より、FTZ の生理機能は、正確なゲノム複製のために必要なヌクレオチド濃度が整わないと、複製フォークが通過できない染色体上のチェックポイント領域である可能性が示唆された。FTZ は、クレオチド不足状態で Genomic FP を複製しないように、ヌクレオチド不足が回復するまでの間、複製を一時停止するのかもしれない。一方、不足が回復しない時は、FTZ に長期停滞した複製フォークでの異常な DNA 合成の蓄積によって、Ori-FP を不安定化して複製開始点を消失させ、細胞増殖能を奪うのかもしれない。

今後は、ゲノムの FTZ 領域を欠失した大腸菌を作製して遺伝学的な手法で解析し、「FTZ が正常なゲノム維持のために果たすチェックポイント機能」のさらなる解明が必要である。あるいは、試験管内 DNA 複製系を用いて、FTZ での複製フォーク動態を生化学的な手法で解析して、「ヌクレオチド不足時に、複製フォークの進行が FTZ で H-NS を介して阻害される分子メカニズム」の解明も必要である。これらの解析から、FTZ での複製遅延の生理的意義、および、チミン飢餓死のメカニズムを明らかにできると期待される。

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）

1. 著者名 Lan Anh Thi Le, Sayaka Ando, Thomas M. Conrad, Shohei Nunose, Akiko Sakai, Haruka Uefune, Masahiro Tatsumi Akiyama, Asako Furkohri, and Hisaji Maki	4. 巻 -
2. 論文標題 Nutritional conditions and oxygen concentrations affect spontaneous occurrence of homologous recombination events but not spontaneous mutagenesis in Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes and Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大橋慧也、唐住勇多、村尾雅司、愿山(岡本)郁、秋山昌広、真木寿治
2. 発表標題 三種類のヌクレアーゼ活性による鋳型スイッチの協調的な抑制
3. 学会等名 第16回 21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新川直道、榎本 愛、Tan Kang Wei、中手直哉、山本幸弘、古郡麻子、真木寿治、 秋山昌広
2. 発表標題 DinBによる複製フォーク進行の減速はゲノムの恒常性に影響しない
3. 学会等名 第15回大腸菌研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋山昌広、大島拓
2. 発表標題 大腸菌ゲノムのoriC近傍にプログラムされた低濃度チミジンでの複製停止
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋山昌広、高橋弘喜、大島 拓
2. 発表標題 大腸菌ゲノムは、低濃度チミジンに依存してDNA複製をoriC近傍で一時停止するようにプログラムされている
3. 学会等名 第17回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2021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
研究分担者	大島 拓 (Oshima Taku) (50346318)	富山県立大学・工学部・准教授 (23201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------