

令和 3 年 10 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19279

研究課題名(和文) エピジェネティック突然変異を介した適応的突然変異誘発機構の探索

研究課題名(英文) Analysis of adaptive mutation induced by epeigenetic mutation

研究代表者

村上 洋太 (Murakami, Yota)

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：20260622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母で遺伝子発現を抑制するヘテロクロマチンがゲノム上に偶発的に生成し表現型に影響を与えるという私自身の知見と、ヘテロクロマチン内で突然変異の頻度が上昇する事を示唆する最近の報告から「偶発的なヘテロクロマチン(EHC)形成による遺伝子抑制により環境適応後、EHC内での突然変異誘発により、その表現型変化が遺伝的に固定化される」という仮説をたてた。この仮説の検証のためにヘテロクロマチンの有無が突然変異発生率に与える影響を検討した。アッセイ系の改良・最適化に時間を要したが最終的に信頼できる系を確立した。予備的結果ではヘテロクロマチン存在下で予想通り突然変異発生率が上昇する傾向にある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この仮説は可塑性を持つエピジェネティックな変異によるトライアンドエラーによりまず一時的な適応をおこなひ、その後遺伝的变化によりその適応状態を固定するという、二段階適応機構を想定している。これは、適応戦略・進化戦略を考える上で新規・かつ重要な概念であり、生物進化の分野に大きなインパクトを与える。

研究成果の概要(英文)：Our group found that transcriptionally inactive heterochromatin is ectopically formed on the fission yeast genome, which alters cellular phenotype. Together with the recent report that suggest heterochromatin may increase mutation rate of genes embedded with heterochromatin, I hypothesize that gene repression induced by ectopic heterochromatin promote temporal adaptation and the adapted situation is fixed by the mutation induced by ectopic heterochromatin formation. To examine this hypothesis, I have been trying to establish the assay system that enable the measurement of mutation rate in the absence and presence of heterochromatin on the target gene. Though it took long time to establish the system, I finally establish it. Preliminary results suggest that heterochromatin indeed increase the spontaneous mutation rate.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：エピジェネティクス 適応戦略 突然変異

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞のゲノム DNA は凝集した構造をもち遺伝子発現を抑制するヘテロクロマチンと、弛緩した構造をもち遺伝子発現が可能なユークロマチンの 2 種類のクロマチン構造を取って核に収納される。申請者はクロマチン制御解析のための実験材料として、単純かつ他の真核生物とよく保存されたエピジェネティック制御機構をもつ分裂酵母を用いてきた。そして、分裂酵母のヘテロクロマチン形成に関し以下の知見を得た(Sorida et al.2019 *Plos Genet.*)。

- (1) エピジェネティクス制御因子 Epe1 タンパク質の欠損 (*epe1Δ*)株では、ユークロマチン上に多数の場所で異所的ヘテロクロマチン(ectopic heterochromatin; EHC)形成が、偶発的に起こり、一度形成された EHC は体細胞分裂、減数分裂を経た世代交代を通してある程度安定に維持される。
- (2) EHC に含まれる遺伝子発現は抑制され、栄養要求性などの表現型変化を引き起こす。
- (3) 正常な Epe1 をもつ野生型株でもクローンごとに EHC の分布が異なる場合がある。

これらの結果は EHC の分布は偶発的に変化するもので、これによる環境適応のメカニズムが存在する事を示唆している。

さらに、がん細胞で最近ヘテロクロマチン内では顕著に突然変異頻度が上昇することを示す報告がある (Schuster-Bockler, 2012 *Nature*; Liu et al. 2013 *Nat Commun.*)。

以上の知見から図 1 に示す様な「EHC による遺伝子抑制により環境適応後、EHC 内での突然変異誘発により、その表現型変化が遺伝的に固定化される」との仮説をたてた。

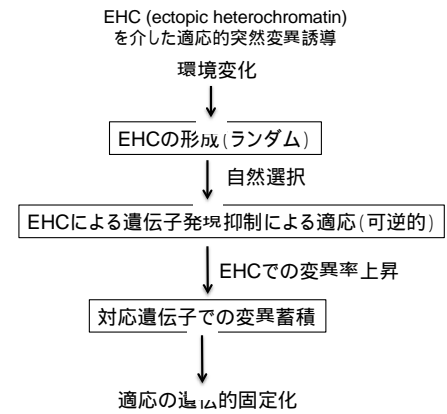


図1

## 2. 研究の目的

本研究では、生物が環境変化に適応する時に、まず突然変異を伴わないエピジェネティックな変異で適応後、それが対応する遺伝子の突然変異として遺伝的に固定されるプロセスが存在する可能性を探索する。具体的には分裂酵母を用いて「EHC による遺伝子抑制により環境適応後、EHC 内での突然変異誘発により、その表現型変化が遺伝的に固定化される」現象が起こりうるかを検証する。

## 3. 研究の方法

図 1 の適応の遺伝的固定化の各ステップのうち EHC 形成の過程はすでに Epe1 の解析から多くの情報が得られている。そのため、確認を急ぐ必要があるのは「EHC による突然変異率上昇」であると考えた。突然変異率の上昇がおきなければ、この研究の根幹となる仮説は成立しない。

この確認のためには全く同じ遺伝的背景の株を使い同一遺伝子についてヘテロクロマチンの有無で自然突然変異の発生率が変化するかを検討する必要がある。分裂酵母では薬剤の培地への添加により任意のゲノム領域で人為的にヘテロクロマチン形成を制御できる系が存在する (Ragunathan et al. 2015, *Science*; Audergon et al. 2015 *Science*; 図 2)。我々はこの系を *ura4* 遺伝子に導入し *ura4* 遺伝子での変異発生率を測定することにした。この系ではヘテロクロマチン形成を促すヒストン H3 の Lys9 のメチル化をおこなう酵素 Clr4 を Tet-R リプレッサーに融合したタンパク質を分裂酵母内で発現する。*ura4* 遺伝子近傍に TetR 結合配列を多コピー導入し融合タンパク質を呼び込む事でこの領域にヘテロクロマチンを形成する。培地にテトラサイクリン(Tet)を添加すると細胞に取り込まれた TetR は DNA 結合能を失い、この領域のヘテロクロマチンは消滅する。一方 *ura4* 遺伝子に変異が生じ酵素の機能が損なわれると FOA という薬剤に耐性を示すことから、FOA 耐性コロニーの出現により容易に変異発生をモニターする事が出来る。この系を用いてヘテロクロマチン存在・非存在下で培養後、FOA 耐性細胞の出現頻度を比較することで *ura4* での変異発生率を比較できる。これによりヘテロクロマチン存在下での *ura4* 突然変異の出現頻度を同じ遺伝的背景で比較できる。

Heterochromatin ON/OFF system (Ragunathan et al. 2015, *Science*; Audergon et al. 2015)

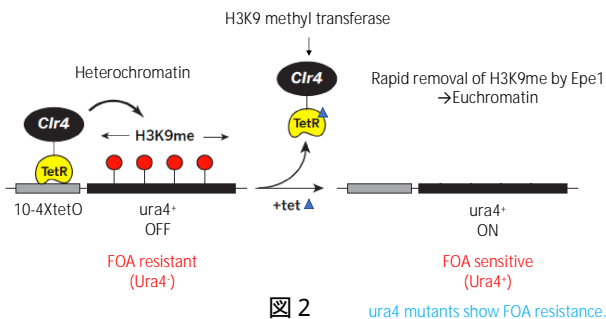


図 2

*ura4* mutants show FOA resistance.

正確な突然変異率の測定には、最初大腸菌で用いられ(Luria & Delubruk, 1943 Genetics)、出芽酵母での測定にも用いられた(Lung & Murray, 2007 Genetics) “Fluctuation assay”を用いる。この方法は single colony からスタートした pre culture から 96well plate に菌体を植え継ぎ平行して培養した各 culture からの FOA 耐性コロニーの出現数をカウントし、その分布から培養中の変異頻度を計算する。計算には、PC プログラム MatLab を用いた処理が必要となるが(Lung & Murray, 2007 Genetics)、この計算は北海道大学情報科学研究員の遠藤俊徳研究室との共同研究でおこなう。

ヘテロクロマチンの有無を見当する際は、上記の 96 穴プレートでの平行培養の時に Tet を加えるプレートと加えないプレートを用意し比較する。

#### 4. 研究成果

この実験では *ura4* 遺伝子上のヘテロクロマチンの有無での突然変異率の差を Fluctuation Assay を用いて調べるために、まず下記の培養条件の最適化する必要があった。

##### (1) TetR 結合配列の数の検討

TetR-Clr4 融合タンパク質を用いてヘテロクロマチンを ON/OFF する系はふたつある。原理は同一であるが、融合タンパク質の呼び込みに用いる TetR 結合配列の数が 4 個 (Audergon et al. 2015 Science) と 10 個(Ragunathan et al. 2015, Science)と異なっている。我々の実験では安定かつ強固に維持されるヘテロクロマチンが必要であるが、一方で 3)で述べるように FOA 耐性を調べる際に速やかにヘテロクロマチンを消去する必要がある。そこで、10 個と 4 個の TetR 結合配列をもつ株を用いてヘテロクロマチンの強さ、消去の早さの比較をおこなった。その結果、10 個もつものが強いヘテロクロマチンを形成できるが、Tet を加えて消去する際は 10 個と 4 個ではその早さに差は無かった。そこで 10 個の TetR を持つ株を以降の事件に用いることにした。

##### (2) FOA 感受性判定の条件の最適化

分裂酵母では *ura4* 遺伝子の機能欠損による FOA 耐性が出芽酵母(出芽酵母では *URA3* に相当)に比較して明確でなく、擬陽性が出やすい傾向がある。そのため、栄養鉢(YES 培地)、合成培地(EMM 培地)など培地の種類と FOA 濃度を細かく変えて、擬陽性が出ずにでないだけ低い FOA 濃度の検討をおこない、最終的に 40  $\mu$ g uracil を含む YES プレート、0.2% FOA を用いる事とした。

##### (3) テトラサイクリンの検討

TetR を使った実験では用いるテトラサイクリンも重要である。オリジナルの Tetracycline は菌類のリボゾームを阻害して生育阻害を引き起こすこともある。そのため Tetracycline 類似体について生育阻害を起こさず TetR と結合 DNA 結合能を阻害できるものがスクリーニングされ用いられている(Doxycycline, Anhyrotetracycline など)。これらの類似体は half-life や光感受性などが異なるため、我々の実験条件下でどの薬物が有効か *ura4* の発現を、細胞の FOA 感受性、uracil 要求性をもとに検討した。その結果、Anhyrotetracylin(AHT)が最も良い結果をもたらした

##### (4) Tet による *ura4* 遺伝子上でのヘテロクロマチン ON/OFF の最適化

本実験では、最終的に *ura4* 遺伝子の変異の有無を FOA 耐性で確認する。その場合、ヘテロクロマチンが *ura4* 遺伝子上に維持されている場合は、正常な *ura4* 遺伝子の発現も阻害され FOA 耐性となり突然変異が発生した細胞と区別できない。そこで 96 穴プレートで AHT 有り(ヘテロクロマチンあり)の条件で培養した細胞については FOA 入りプレートに塗布振る前に AHT を与えることでヘテロクロマチンを消去(図 1)する必要がある。この Tet による前処理の時間を検討した。その結果、前処理なしで、AHT 無し条件で培養した細胞を直接 Tet+FOA のプレートに塗布しても正常 *ura4* をもつ細胞は FOA 感受性となりコロニーを形成しないことから、AHT による前処理は不要と判断した。

##### (5) 96 穴のプレートによる培養条件の検討

96 穴プレートによる培養は、培養量が少ないため、培地の蒸発、培養液の攪拌などに注意する必要がある。市販の各種プレート、シーリング用フィルムを入手し、振盪の有無、浸透速度、培地の容量、さらに各条件での酵母の増殖速度などを比較し、もっとも培地の蒸発が少なく、通常の培養と同様の早さで増殖する条件を設定した。

以上の条件を決定後平行培養する数を 10 に減らした条件で、fluctuation assay をおこなうパイロット実験を今までに 2 回おこなっている。この条件では統計学的に意味のある突然変異頻度を決定することはできない。しかし、出現する FOA 耐性のコロニー数は AHT なし(ヘテロクロマチン有り)の条件で培養したものが AHT 有り(ヘテロクロマチン無し)のものに対し 2~3 倍多く、ヘテロクロマチン存在下で突然変異率が上昇している可能性がある。ただし、このアッセイでは変異が培養中におきるタイミングにより、FOA 耐性コロニーの出現数が大きく異なる(速いタイミングで変異がおきるほど最終的な FOA 耐性コロニーが増える)ため、現段階

で明確な答えは得られていない。

今後 fluctuation assay を最低 3 回できれば 5 回以上おこない、ヘテロクロマチンの有無が突然変異率に影響を与えるか明確な結論を得る。また、出現した FOA 耐性コロニーをランダムに 50 個以上ピックアップし *ura4* 領域の DNA 配列を決定することで変異のスペクトラムに対するクロマチン構造の寄与についても検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------