

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291077

研究課題名(和文) DNA複製および転写に伴うDNAトポロジー変化に起因する染色体再編誘発機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement caused by topological changing of DNA.

研究代表者

真木 寿治 (Maki, Hisaji)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：20199649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：多くの生物種のゲノム中には各種の反復配列が存在し、ガンや遺伝病を引き起こす染色体再編の原因となる。試験管内DNA複製系を用いて、鑄型DNA中の長い逆向き反復配列のDNA複製に対する影響を解析した結果、この反復配列は複製に依存して十字構造を取り、複製の進行を一時的に阻害することを明らかにした。大腸菌のSbcCDタンパク質は十字構造DNAを末端から分解し、二本鎖DNA切断を引き起こして、遺伝的不安定性をもたらすことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Various kinds of repetitive sequence present in genomes of many species are known to be a cause of genetic instability which leads to genetic diseases and cancer. We found that a long inverted repeat is transformed to a cruciform DNA in a manner dependent on DNA replication. E. coli SbcCD appeared to have a novel enzymatic activity that cleaves such a cruciform DNA, and this enzyme perhaps causes the genetic instability at long inverted repeats.

研究分野：分子遺伝学、生化学

キーワード：染色体再編・維持 遺伝的不安定性 繰り返し配列

1. 研究開始当初の背景

代表者は、通常の細胞増殖における遺伝的变化、特に比較的小さな変化(自然突然変異)の原因と発生機構の研究を行ってきた(Maki, *Annu Rev Genetics*, 2002)。その研究の過程で、突然変異の発生を *in vitro* (*oriC* プラスミド試験管内 DNA 複製系)と *in vivo* (増殖中の細胞)の両方で比較検証しながら変異の発生を解析することが重要と考え、それが可能な実験系を開発した(Fujii et al., 1999, Kanie et al., 2007)。これは、大腸菌の *rpsL* 遺伝子を標的にした変異検出系であるが、塩基置換変異の検出効率が高いだけでなく、遺伝子機能を損なう全てのタイプの変異(フレームシフト、欠失、重複、逆位、挿入など)を塩基配列レベルで容易に解析でき、さらに細胞内で自然に生じる相同組換えも検出できる特徴を持っている。*rpsL* 変異検出系での解析において、通常の増殖を行っている大腸菌細胞では点突然変異とほぼ同じ程度に自然相同組換えや欠失、重複、逆位などが発生していることを見いだした。欠失や重複などでは発生部位の周辺に繰り返し配列が存在する場合がほとんどであった。そこで、点突然変異の起源を解明することと同様に、これらの染色体再編や染色体異常の発生原因を突き止めることを開始した。

一倍体の大腸菌では大きな欠失や転座などの解析に限界があるので、二倍体出芽酵母の実験系を開発して研究を進めたが(Umezu et al., 2002)。染色体上に散在する繰り返し配列間での相同組換えが最も重要な役割を果たしていることが判明した。さらに、これらの欠失や転座の発生原因については、DNA 損傷に依存しない複製フォークの stall が関与することを示唆する結果を得た(Watanabe et al., 2002)。また、遺伝研のグループとの共同研究により、複製フォークの stall には転写装置との衝突などの相互作用も一つの原因であることを示す結果も得られた(Ide et al., 2010)。近年、DNA 複製フォークの stall やそれをモニターする機構の研究が国内外で盛んになっているが、染色体再編・染色体異常の研究においては、DNA 二本鎖切断(Double Stranded DNA Break, DSB)とその修復機構の重要性が明らかになっており、DNA 複製フォークの stall が DSB の誘発に深く関わることが想像されている(Helleday et al., 2007)。しかしながら、複製フォーク stall に関連する DSB の誘発については世界的にも不明な点が多い。その中でも英国の Leach らによる 246 bp の逆向き反復配列(IR-246)の研究が大きな進展を見せている(Eykelenboom et al., 2008, Darmon et al., 2010)。IR-246 は大腸菌ゲノム上で極めて不安定であり、数世代で大腸菌ゲノムから消失し、その周辺配列に欠失などの染色体異常を引き起こす。Leach らは IR-246 の不安定性に関与する複数の遺伝子を同定し、それらには DNA 複製や組換えに関与するもの

に加えて、ヘアピン DNA に特異的なエンドヌクレアーゼをコードする *sbcC* および *sbcD* 遺伝子が含まれることを見いだしている。最近の研究から、彼らは IR-246 が DNA 複製の最中に lagging 鎖合成の鋳型が単鎖 DNA になる時にヘアピン DNA が生じ、それを SbcCD が切断することにより DNA 鎖が分解され、lagging 鎖上に生じた DSB が姉妹染色体間での相同組換えや染色体異常を誘発すると説明している。DSB が構造特異的なエンドヌクレアーゼにより誘発される点が新しい考えであるが、これらの分子遺伝学的研究だけでは、DSB 誘発の分子機構については想像の域を出ず、詳細は不明であった。

2. 研究の目的

複製フォークの進行により二本鎖 DNA が開裂すると、複製フォークの先頭には開裂した二本鎖 DNA 部分のらせんが移動して正の超らせんが生じる。二本鎖 DNA に蓄積される正の超らせんのレベルには限度があり、それに達すると二本鎖 DNA の開裂は不可能になり、複製フォークの進行は強く抑制される。この状況を解決するのが DNA ジャイレースであり、正の超らせんを解消するだけでなく、ATP 加水分解を伴って二本鎖 DNA に負の超らせんを導入する。これにより、複製フォークの進行は再開することができる。申請者らは、*in vitro oriC* プラスミド DNA 複製系を用いて、鋳型 DNA 中の長い逆向き反復配列(IR-246)が DNA 複製にどのような影響を及ぼすかを調べている間に、複製フォークの進行と DNA ジャイレースの働きにより逆向き反復配列が十字構造を形成することを示唆する予備的な結果を得た。さらに、SbcCD は単鎖 DNA 上のヘアピン構造よりも十字型 DNA を効率良く連続的に分解し、十字構造の根元で DSB を形成することを示す予備的な結果も得ていた。このことより、Leach のモデルとは異なり、DSB は複製フォークの先頭のまだ複製されていない鋳型二本鎖 DNA に生じるモデルを着想するに至った。

本研究の目的は、長い逆向き反復配列の遺伝的不安定性の原因を分子レベルで明らかにすることである。また、真核生物 Mre11 複合体の原核生物ホモログである SbcCD の新規の酵素活性についても詳細を明らかにすることとした。さらに、複製と DNA ジャイレースに依存する DNA トポロジーの変化は逆向き反復配列のみならず、様々なタイプの繰り返し配列の遺伝的不安定性全般に重要ではないかと考え、順向き反復配列および CAG リピートなどでも複製フォーク進行阻害や SbcCD による DSB 誘発が生じるかどうかを解析することとした。

3. 研究の方法

(1) 本研究で用いる *oriC* プラスミド DNA には、ラムダファージに由来する 246 bp の逆向き反復配列を導入し、対照実験に用いる

プラスミドとしては片方の繰り返し配列を全く関連のないものに置換したものをを用いた。DNA 変性が起きないように中性条件での DNA 精製法を用いて鋳型 DNA を調製した。

(2) *in vitro oriC* プラスミド複製系に必要な 20 種類程度のタンパク質を大量にかつ高純度に調製し、すでに我々が開発していた *oriC* からの特定の一方の複製フォークでの DNA 合成の検出・解析を行った。複製産物の解析は、アルカリアガロースゲルおよびシーケンスゲル電気泳動、二次元ゲル電気泳動にサザンプロットングを組み合わせて行った。leading 鎖新生鎖や岡崎フラグメントの長さの分布や経時的な変化の分析から、単一の複製装置複合体により leading 鎖と lagging 鎖が協調して合成されている状況での複製フォークの進行阻害を詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) 長い逆向き反復配列の遺伝的不安定性の分子機構

in vitro oriC プラスミド DNA 複製系を用いて、鋳型 DNA 中の長い逆向き反復配列 (IR-246) が DNA 複製にどのような影響を及ぼすかを詳細に解析した結果、IR-246 の直前および先頭の反復配列中で leading 鎖 DNA 合成が阻害されること、lagging 鎖では岡崎フラグメントの合成開始のパターンが IR-246 に依存して変化することを明らかにした。leading 鎖合成の阻害は DNA ジャイレースの濃度が低いほど強くなることから、複製フォークの進行に伴って蓄積する正の超らせん構造を解消する DNA ジャイレースの働きにより逆向き反復配列が十字構造を形成し、leading 鎖合成は鋳型の前方に存在するヘアピン構造により進行が阻害され、lagging 鎖では DNA ヘリカーゼの進行速度が低下するためにプライマー形成のタイミングが変化することが強く示唆された。また、SbcCD を *in vitro oriC* プラスミド DNA 複製系に加えると、DNA 複製に依存して IR-246 の部位で leading 鎖および lagging 鎖の両方が切断されることを見いだした。これらの結果から、長い反復配列は複製フォークの進行とトポイソメラーゼの働きにより、複製フォークが到達する前に十字構造を形成して DNA 複製や DSB の形成に影響を及ぼすという新しい分子モデルを提唱することができ、学術論文として発表した (Lai et al., 2016)。一方で、当初計画した *in vivo* での解析は、DNA ジャイレースの特異的阻害剤を用いた研究で期待した結果が得られなかったことから、*sbcCD* 欠損株での染色体異常の解析などを現在も進めている状況である。特に、*rpsL* 変異検出系は相同染色体間組換えの発生頻度も同時に測定できる特徴を有していることから、*rpsL* 遺伝子配列の後半部を含む逆向き反復配列を *rpsL* 遺伝子配列の下流に

導入して、逆向き反復配列に依存した染色体異常を特異的に検出・解析する実験系を開発した実験系に用いる大腸菌株の作成がほぼ完成したので、SbcCD と DNA トポイソメラーゼの効果を検査する準備が整った。

(2) IR-246 に依存した十字構造の発生機構を解析する実験系の構築

oriC プラスミド DNA を鋳型にした試験管内複製系を基にして、複製フォークの進行を詳細に解析する実験系を用いて、複製に依存した十字構造の発生を解析する方法を開発した。まず、タグ付きの Tus タンパク質とタグにアフィニティを持つ磁気ビーズを用いて、複製装置が結合した状態での複製中間体をインタクトな状態で分離する技術を開発した。さらに、*in vitro oriC* 系での反応を DNA ジャイレースを加えずに進めた際に生じる複製フォークの進行が停止した複製中間体の定量解析を行い、この条件で複製中間体が安定して存在することを確認した。さらに、タグ付きの Tus タンパク質を用いた分離法により、DNA ジャイレース非存在下で生じる複製中間体を分離する実験を行い、この実験系が十分に解析に用いることができることを示した。分離した複製中間体に DNA ジャイレースを再添加して複製フォークを開始した時に、逆向き反復配列 IR-246 に依存した十字構造が発生するかどうかを解析する準備を進めている。

(3) SbcCD タンパク質の生化学的解析

精製した SbcCD と十字構造やヘアピン構造を含む各種 DNA 基質を用いて、詳細な酵素学的解析を行った。その結果、SbcCD は二本鎖 DNA の長さに依存してヘアピンを含む DNA 末端でのヌクレアーゼ反応のモードを変えることが明らかになり、学術論文として発表した (Lim et al., 2015)。ヘアピンあるいは二本鎖 DNA の長さが 20 bp 以下の場合、片方の DNA 鎖にニックを導入するエンドヌクレアーゼ活性と、その部位から DNA を分解するエキソヌクレアーゼの活性を示す。一方、二本鎖 DNA の長さが 20 bp 以上の場合、DNA 鎖あるいはヘアピンの末端からスタートして、両方の DNA 鎖に同時にニックを導入する新規のエンドヌクレアーゼ活性を示し、反応はプロセシブに進んで行き、切断産物として 10 bp の小さな DNA 断片を直積する。

(4) ハンチントン病の原因遺伝子に含まれる単純繰り返し配列の遺伝的不安定性

oriC プラスミド DNA 複製系を用い、ハンチントン病の原因遺伝子であるヒト HTT 遺伝子に存在する CAG/CTG リピートが DNA 複製にどのような影響を及ぼすかを調べた。CAG/CTG リピートは不完全なヘアピン構造を取り得ることが報告されていたが、IR-246 で見られた DNA 複製の一時的な阻害は検出できなかった。しかし、CAG/CTG リピートの周辺に存在する CCG/CGG の 7 回繰り返し配列が顕著な DNA 複製の阻害を引き起こ

すことを発見した。生化学的な解析を進め、この複製阻害は十字構造やヘアピン構造によるものではなく、未知の機構、おそらくはCCG/CGGリピートが特異的な構造を取ることによるDNA鎖伸長反応の阻害であることが示唆された。これらの成果を学術論文として発表した(Le et al., 2015)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

すべて査読あり。*コレスポンディングオーサー

1. Lai, P. J., Lim, C. T., Le, H. P., Katayama, T., Leach, D. R. F., Furukori, A., and *Maki, H. (2016) Long inverted repeat transiently stalls DNA replication by forming hairpin structures on both leading and lagging strands. **Genes to Cells** 21, 136-145.
2. Lim, C. T., Lai, P. J., Leach, D. R. F., *Maki, H., and *Furukori, A. (2015) A novel mode of nuclease action is revealed by the bacterial Mre11/Rad50 complex. **Nucleic Acids Research** 43, 9804-9816.
3. Le, H. P., Masuda, Y., Tsurimoto, T., Maki, S., Katayama, T., Furukori, A., and *Maki, H. (2015) Short CCG repeat in huntingtin gene is an obstacle for replicative DNA polymerases, potentially hampering progression of replication fork. **Genes to Cells** 20, 817-833.
4. Tan, K. W., Pham, T. M., Furukori, A., Maki, H., and *Akiyama, M. (2015) Recombinase and translesion DNA polymerase decrease the speed of replication fork progression during the DNA damage response in *Escherichia coli* cells. **Nucleic Acids Research** 43, 1714-1725.
5. Ikeda, M., *Furukori, A., Akiyama, M., Katayama, T., Fuchs, R. P., and *Maki, H. (2014) DNA polymerase IV mediates efficient and quick recovery of replication forks stalled at N2-dG adducts. **Nucleic Acids Research** 42, 8461-8472.
6. *Yoshiyama, K. O., Kobayashi, J., Ogita, N., Ueda, M., Kimura, S., Maki, H. and Umeda, M. (2013) ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in Arabidopsis. **EMBO Rep.** 14, 817-822.

7. Pham, T. M., Tan, K. W., Sakumura, Y., Okumura, K., Maki, H., and *Akiyama, M. (2013) A single-molecule approach to DNA replication in *Escherichia coli* cells demonstrated that DNA polymerase III is a major determinant of fork speed. **Molecular Microbiology** 27, 584-596.

[学会発表](計25件)

招待講演からの抜粋

1. 真木寿治 ヌクレオチドプールとDNAの酸化損傷に起因する突然変異 日本遺伝学会第87回大会 2015年9月24日 東北大学(宮城県・仙台市)
2. Furukori, A., Ikeda, M., Akiyama, M., Katayama, T., Fuchs, R. P., and Maki, H. *Escherichia coli* DNA polymerase IV mediates quick recovery of replication forks stalled at N2-dG adducts. The 9th 3R Symposium 2014年11月17日 御殿場高原ホテル(静岡県・御殿場市)
3. Maki, H. Effects of nutrition and oxygen on spontaneous mutagenesis caused by oxidative DNA damages. The Beijing Symposium on Genomic Stability and Accurate Gene Expression under Oxidative Stress 2014年10月22日(Beijing, China)
4. 古郡麻子、池田美央、西川義人、秋山昌広、片山勉、Fuchs, R. P., 真木寿治 大腸菌損傷乗り越え型 DNA Polymerase IVの複製フォークにおける役割 日本遺伝学会第86回大会 2014年9月17日 長浜バイオ大学(滋賀県・長浜市)
5. Ikeda, M., Furukori, A., Philippin, G., Loechler, E., Akiyama, M., Katayama, T., Fuchs, R. P., and Maki, H. DNA polymerase IV mediates efficient and quick recovery of replication forks stalled at N2-dG adducts. Zing conference on DNA polymerases 2014年9月1日(Cambridge, UK)
6. Furukori, A., Ikeda, M., Akiyama, M., Katayama, T., Fuchs, R. P., and Maki, H. *Escherichia coli* DNA polymerase IV mediates quick recovery of replication forks stalled at N2-dG adducts. International Conference Kyoto 2014, Replication, repair and transcription; coupling mechanisms and chromatin dynamics for genome integrity 2014年2月4日京都大学(京都府・京都市)

7. 真木寿治 自然突然変異とDNAポリメラーゼの分子機構(日本遺伝学会木原賞受賞講演)日本遺伝学会第85回大会 2013年9月20日 慶応大学(神奈川県・横浜市)
8. Maki, H. Effects of nutrition and oxygen on spontaneous mutagenesis caused by oxidative DNA damage. 日本生化学会第86回大会 2013年9月11日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計2件)

1. Yoshiyama, K. O., Kimura, S., Maki, H., Britt, A. B., and Umeda, M. (2014) The role of SOG1, a plant-specific transcriptional regulator, in the DNA damage response. In "Plant Signal Behav." Vol. 9, ppe28889.
2. Maki H. and Furukohri A. (2013) DNA Polymerase III, Bacterial. In "Lennarz W.J. and Lane M.D. (eds.) The Encyclopedia of Biological Chemistry" Waltham, MA: Academic Press, Vol. 2, 92-95.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://bsw3.naist.jp/courses/courses301.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

真木 寿治(MAKI, Hisaji)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号: 20199649