

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650130

研究課題名(和文)ゲノム多様性ホットスポットと非S期DNA合成領域との関連解析

研究課題名(英文)The role of non-S DNA synthesis on the local mutation rate

研究代表者

大野 みずき (Ohno, Mizuki)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70380524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：突然変異頻度はゲノム領域ごとに異なるがその原因は明らかでない。突然変異は配偶子形成過程での複製エラーが主原因で、変異頻度は細胞分裂(DNA複製)回数に比例すると考えられている。しかしS期以外の細胞でもDNA修復などに伴うDNA合成が起こることがあり、その様な領域では相対的な変異発生頻度が全ゲノムの平均変異発生頻度より高くなる事が予測される。そこで、マウス精巣由来の精母細胞(既にS期を終了している細胞)を用いて、非S期DNA合成領域の解析を行ったところ、検出された領域は、相同染色体の組換え反応に伴うDNA合成領域である可能性が示唆された。相同染色体組換え頻度と塩基置換頻度との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A major source of spontaneous mutations is DNA replication error; therefore, a mutation rate depends on the frequency of DNA replication. However, local mutation rate varies across the genome. It is well known that the non-S DNA syntheses naturally occur in non-S phase cells in vivo. It is speculated that, in the genomic regions having a tendency of non-S DNA synthesis, mutation rate may be increased by the increased frequency of DNA synthesis. The role of non-S DNA synthesis on the local mutation rate was assessed by analyzing the incorporation of BrdU in the pachytene spermatocytes isolated from the mouse testes. Colocalization of BrdU and SCP3 (a maker for synaptonemal complex) immunofluorescence signals was detected in non-S pachytene spermatocytes, suggesting that non-S DNA synthesis detected here descend from a homologous recombination-dependent DNA synthesis.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：分子進化 突然変異

1. 研究開始当初の背景
ゲノムの変異の頻度は染色体やゲノム領域によって大きく異なっている。ヒトやマウスでは SNP (一塩基多型) 頻度の偏りとしても観察することができる。しかし、なぜそのような偏りが生じるのかは詳しくわかっていない。ヒトゲノムでは SNP 頻度は GC 含量や CpG 密度との相関が認められており、メチルシトシンの脱アミノ化によるチミンへの変換が塩基置換の中で最も多く検出される G から A へのトランジション置換の主原因とされている。しかしそれだけではその他の塩基置換の発生原因を説明できないことから、それ以外にも全ての種類の塩基置換の頻度に共通に影響する何らかの因子が存在するはずである。世代を超えて伝わる突然変異は、受精卵から配偶子が形成されるまでの過程で生じた DNA 複製エラーが主な原因であり、変異の発生回数は生殖細胞での細胞分裂の回数、すなわち DNA 複製の回数に比例すると考えられている。実際に、精子形成までの複製回数が多いオスの生殖細胞のみを通過する Y 染色体上の変異は、卵子形成までの複製回数がオスの場合に比較して少ないメスの生殖細胞を通過する事がある常染色体や X 染色体上の変異よりも多い事が示されている。「変異の発生頻度は DNA 複製の回数に比例する」のであれば、「変異頻度の高いゲノム領域は DNA 合成回数が多いのか?」という疑問が生じる。以前から培養細胞では S 期以外の細胞でも RI ラベルしたヌクレオチドの取り込みが起こる事が知られており、非 S 期 DNA 合成は vivo でも起きていると考えられている。このような非 S 期細胞におけるヌクレオチドの取り込みは主に DNA 修復過程での DNA 合成に伴うと考えられている。個体間での多様性の指標とされる一塩基多型 (SNP) は祖先の生殖細胞中で生じた一塩基置換変異に由来するので、SNP 頻度が高いゲノム領域では生殖細胞中で生じる突然変異頻度が

高いのではないかと予測される。しかしながら生殖細胞中での非 S 期 DNA 合成が突然変異頻度に及ぼす影響は明らかになっていない。

2. 研究の目的

前述の「変異の発生頻度は DNA 複製の回数に比例する」のであれば、「変異頻度の高いゲノム領域は DNA 合成回数が多いのか」という疑問に答えるために、本研究では、明らかに S 期ではない細胞を用いてヌクレオチドの取り込みを指標にした非 S 期 DNA 合成の検出と解析を目的とした。具体的には、マウスのオスの精子形成過程に注目し、第一次精母細胞 (最後の DNA 複製が終了し、減数分裂直前までの期間の細胞) における非 S 期 DNA 合成を実験的に可視化し解析する手法および、非 S 期 DNA 合成領域を含むゲノム領域の分離回収の手法の検討を行い、それらを用いたゲノム解析に向けての実験系の確立を目指す。

3. 研究の方法

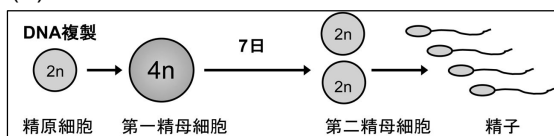
通常の方法で飼育した野生型マウス (C57BL/6J) のオスの精巣を材料にして、最後の S 期 DNA 複製が終了し減数分裂を行う直前のステージにある第一次精母細胞の核ゲノムにおいて、ヌクレオチドのアナログであるプロモデオキシウリジン (BrdU) の取り込みを指標にして、非 S 期 DNA 合成を解析する。

(1) マウスへの BrdU 投与、解剖、精巣の分離 BrdU 取り込みの確認

BrdU (50mg/kg) を、陰性対照群として生理食塩水を、生後 12 週令のオスマウスの腹腔内に投与し、6 時間後にマウスから精巣を摘出し、減数分裂期前の目的の細胞分離用に使用した。BrdU 取り込みの確認用として常に細胞分裂を行っている組織である小腸も同時に摘出した。BrdU 投与群および陰性対照群から 1 匹ずつのマウスは、片方の精巣および小腸

を4%パラフォルムアルデヒドで1日固定し、パラフィン置換し、パラフィン包埋ブロックを作製、薄切標本作製した。

(2) マウス精巣由来細胞の調製と FACS 解析



マウスの精子形成過程では上図に示すように、2nの精原細胞が最後のDNA複製を終了した後、4nのまま第一精母細胞（パキテン期）の状態が約7日間続く。この間はS期のDNA複製は行われない。その後第一、第二減数分裂に進み、最終的に1nの精子が生じる。本研究では4nの第一精母細胞における非S期DNA合成を解析した。1回のFACS解析・細胞分取の実験につき、4匹分の精巣を用いた。摘出した精巣はPBS中でミンチした。細胞懸濁液にコラゲナーゼ、トリプシン、DNase1を含む酵素液を添加し、細胞分散処理を行った。その後、細胞浮遊液をメンブレンフィルターに通し、組織片などのデブリを除き、5%のFBSを含むPBSで数回洗浄した。ヘキスト33342で生細胞を染色し、さらに小さいポアサイズのセルストレーナーに通しFACS解析に用いた。生殖細胞のステージ別に細胞をソートしする目的で、BD FACS Ariaを用いてDNA量と回収細胞形態を指標に目的の細胞の分離・回収を行った。

(3) 蛍光免疫染色法による精母細胞におけるBrdU取り込みの確認

ソートして回収した細胞の種類とS期細胞へのBrdUの取り込み、および非S期の確認のために、セルソーターにかけ前の細胞および、セルソーターにて分離回収した細胞をメタノール：酢酸固定液にて固定し、スライドガラス上に展開して細胞核標本作製した。抗SCP3(精母細胞パキテン期特異的に発現するシナプトネマ複合体タンパク質で、目的の

第一精母細胞のマーカ―)抗体と抗BrdU抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。腹腔内投与の成功の確認のために腸管と精巣のパラフィン包埋サンプルを用いての免疫染色を行った。

(4) セルソーターで分離回収した細胞のゲノムDNA抽出と抗BrdU抗体によるプルダウンアッセイおよびゲノム解析

セルソーターで分離した各フラクションの細胞よりゲノムDNAを抽出した。DNAはTEに溶解し、ソニケーターで500bp前後のサイズに断片化した。DNA溶液を数分間ボイルした後急冷し、IPバッファーと抗BrdU抗体を加え反応させた。その後、磁気ビーズを用いて抗体に結合したDNAフラグメントを回収し、精製した。精製したDNAはゲノム領域を解析するためにアレイ解析に用いた。またプルダウンアッセイにより特定の領域が濃縮されているかどうかの確認のために精製したDNAの一部をビオチンラベルし、正常マウスの培養脾臓細胞より作製した染色体標本に対して蛍光in situ分子雑種法により結合領域を調べた。

4. 研究成果

(1) BrdU抗体を用いた免疫学的検出

S期DNA複製によるBrdUの取り込みの陽性コントロールとして病理標本を用いて免疫染色を行った。腸管では生涯を通じて恒常的に細胞分裂を行う増殖細胞が存在する。小腸のパラフィン包埋薄切サンプルに対して抗BrdU抗体を用いて免疫染色を行ったところ、増殖細胞が局在する陰窩領域の細胞核のみが陽性に検出された(図1)。また精巣の病理切片においてもS期DNA複製によるBrdUの取り込みが検出されたことから、腹腔内投与によりBrdUが確実に細胞に取り込まれていることを確認した。

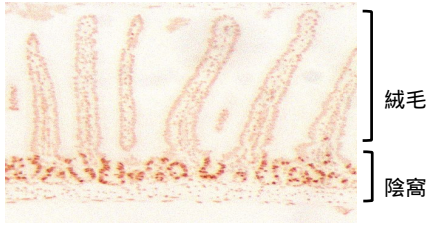


図 1. 小腸陰窩領域の S 期 BrdU 陽性細胞 (茶色く染色された抗 BrdU 抗体で検出された細胞陰窩領域に局在している)

精巣から分離した精母細胞をスライドガラス上に展開した標本に対して、抗 BrdU 抗体と抗 SCP3 抗体にて蛍光二重染色を行ったところ、SCP3 陰性の精原細胞に S 期 DNA 複製による輝度の高い BrdU 抗体由来の蛍光を検出した。そして SCP3 陽性のパキテン期精母細胞に、S 期の取り込みとは明らかに異なる非 S 期 DNA 合成のシグナルを検出した (図 2)。レプトテン / ザイゴテン期の細胞は SCP3 による染色が検出され始め相同染色体の対合が始まるが、シナプトネマ複合体形成は未熟で核形態は S 期細胞に近く、S 期後半の BrdU 取り込みが起きている (図 2)。

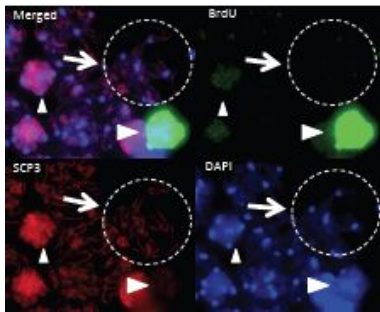


図 2. 精巣から分離した細胞の蛍光免疫多重染色 (矢印と点線円はパキテン期精母細胞、大矢頭は S 期 DNA 複製中の精原細胞、小矢頭は DNA 後期から移行中のレプトテン / ザイゴテン期細胞を示す)

非 S 期 BrdU シグナルの観察を効率的に行うため、高感度撮影条件にてパキテン期 / ディプロテン期の細胞を観察した (図 3)。相同染色体が対合した SCP3 陽性のシナプトネマ複合体上に BrdU のシグナルが多く観察され、一方対合していない SCP3 領域には低頻度に

検出された。また、ヘテロクロマチン領域周辺にも BrdU のシグナルが局在する傾向を認めた。相同染色体が対合しシナプトネマ複合体が形成されている領域では、相同染色体組換え反応が起こっている可能性があり、非 S 期 BrdU シグナルは相同染色体組換え (または遺伝子変換) に伴う DNA 合成領域を反映している可能性が示唆された。

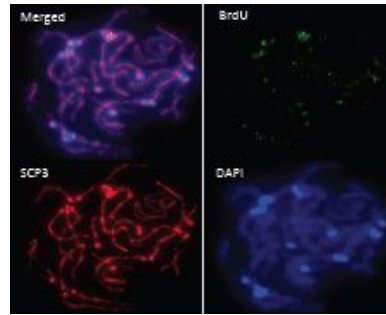


図 3. パキテン期細胞の蛍光免疫多重染色 (SCP3 と重なる領域で BrdU のシグナルが検出されている)

これまでに減数分裂期の組換えが高頻度に起こるゲノム領域の周辺では一塩基置換頻度が高いことが明らかになっており、今回の実験で検出された非 S 期 DNA 合成領域と突然変異頻度との相関が示唆された。そこで次に、非 S 期 DNA 合成領域を物理的に回収することができれば、ゲノム解析を効率的に行うことができると考え、パキテン期 / ディプロテン期の細胞のセルソーターによる分離を試みた。

2) マウス精巣由来細胞の調製と FACS 解析

BrdU を腹腔内投与し 6 時間経過した野生型 C57BL/6 の 12 週令のオスマウスから摘出した精巣を用いて細胞溶液を調製し FACS 解析を行った結果を図 4 に示す。目的のパキテン期 / ディプロテン期の細胞の細胞はゲノム量が 4N なので、図中の P6 フラクシオンに含まれる。しかし P6 フラクシオン中には目的以外の細胞も混入している。パキテン / ディプロ

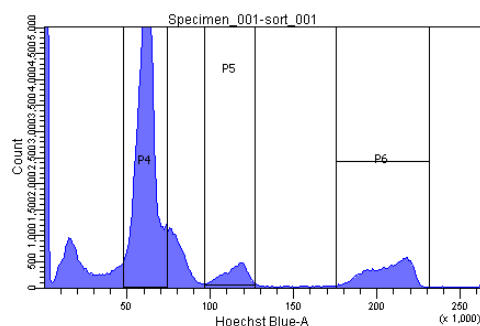


図4. 精巣由来細胞のFACS解析

P4, P5, P6はそれぞれDNA量が1C, 2C, 4Cの細胞群を含む。横軸はヘキストの蛍光量、縦軸はカウント数。

ロテン期の細胞の純度を上げるために、種々の条件でゲートかけた後、各フラクションをセルソーターで分離し回収した。それぞれのフラクションの細胞を顕微鏡で観察した結果、P4(1C)には第二精母細胞、精細胞、精子、その他が、P5(2C)には精原細胞、精母細胞、セルトリ細胞、その他が、P6(4C)にはパキテン/ディプロテン期、その他が含まれていた(それぞれのフラクション中の「その他」には死細胞の残骸やデブリ、精子同士が接着した細胞塊が含まれていた)。目的のP6(4C)で回収された細胞は全体の1%以下で、4匹分のマウスの精巣を使用しても全ゲノムシーケンス解析に十分な量の細胞を回収することは困難であった。P4(1C)フラクションに含まれる細胞の数が膨大であるため、目的細胞の回収率が悪くなっていることから、例えば事前に精子や精細胞を除いておくなど、今後さらにソート条件や細胞溶液の調整方法、または使用するマウスの週令などを検討する必要がある。

(4)セルソーターで分離回収した細胞のゲノムDNA抽出と抗BrdU抗体によるプルダウンアッセイおよびゲノム解析

各フラクションの細胞からゲノムDNAを抽出した。P6(4C)フラクションの細胞から抽出したゲノムDNAを用いて抗BrdU抗体によるBrdU含有DNA領域のプルダウンを行った。染

色体上の位置を確認するために、プルダウン後に精製したDNAの一部をランダムプライム法によってピオチンラベルし、野生型マウスの培養脾臓細胞から作製した染色体標本に対して蛍光in situ hybridizationを行った。全ての染色体上に微弱な蛍光シグナルが検出され、それらの一部は一定の領域に局在しているように思われたが、染色体上の位置の同定には至らなかった。さらにプルダウンサンプルと非プルダウンサンプルをプローブとしてマウスゲノム用アレイCGHを行ったが、プルダウンサンプル特異的なゲノム領域の確定には至らなかった。これはセルソーターで目的細胞を分離する段階での回収率や純度に起因すると考えられ、更なる条件検討が必要である。

一方で細胞標本を用いた免疫染色の結果では、非S期BrdUシグナルとシナプトネマ複合体との共局在が検出され、パキテン期でのBrdUの取り込みは相同染色体組換え反応に伴うDNA合成である可能性が示唆された。また、今回の実験でヘテロクロマチンの近傍で非S期BrdUシグナルが検出され、クロマチン構造と突然変異頻度との関連も示唆された。今後さらに、ゲノム解析を可能にするために各実験の最適な条件を構築し、相同染色体組換えのホットスポットと、第一精母細胞における非S期BrdU取り込み領域および突然変異頻度との関連を解析する予定である。

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 0件)

〔学会発表〕(計 10件)

Mizuki Ohno, Noriko Takano, Kunihiro Sakumi, Ryutaro Fukumura, Yuki Iwasaki, Toshimichi Ikemura, Yoichi Gondo, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi Nakatsu^a, Teruhisa Tsuzuki, Role of the oxidative DNA damage repair system in somatic and germline mutations in mice, Genome Integrity, Zing conference, 2015.8.1. Cairns, Australia

Mizuki Ohno, Noriko Takano, Kunihiro Sakumi, Ryutaro Fukumura, Yuki Iwasaki, Toshimichi Ikemura, Yoichi Gondo, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki, Influence of oxidative DNA damage on the rate of somatic and germline mutation, ICRR, 2015.5.26. Kyoto.

大野 みずき, Oxidative DNA damage and its repair system: implications for de novo germline mutations, 第 38 回日本分子生物学会, 2014.11.25. Yokohama

作見 邦彦, 大野 みずき, 福村 龍太郎, 権藤 洋一, 岩崎裕貴, 池村淑道, 續 輝久, 中別府 雄作, 8-oxoguanine に起因して新たに生じた生殖細胞突然変異の解析, 第 38 回日本分子生物学会, 2014.11.25. 横浜

大野 みずき, 鷹野典子, 佐々木史子, 李 贊, 田口健一, 中別府 雄作, 中津 可道, 續 輝久, 酸化ストレス誘発突然変異と消化管がんの解析, 日本放射線影響学会第 57 回大会, 2014.10.02. 鹿児島

作見 邦彦, 大野 みずき, 福村龍太郎, 権藤洋一, 岩崎裕貴, 池村淑道, 續 輝久, 中別府 雄作, DNA 酸化損傷修復欠損マウスの継代実験で捉えられた遺伝現象, 日本遺伝学会第 86 回大会, 2014.09.17. 長浜

大野 みずき, 鷹野典子, 中津 可道, 中別府 雄作, 續 輝久, Oxidative stress -induced tumorigenesis in the small intestine of Mutyh-deficient mouse, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014.09.27.

Yusaku Nakabeppu, Ohno Mizuki, SAKUMI Kunihiro, Oxidation of nucleic acids and control mechanisms of genetic diversity in mammals, International Symposium on Germline Mutagenesis and Biodiversification, 2014.03.21.

Ohno Mizuki, SAKUMI Kunihiro, FUKUMURA Ryutaro, IWASAKI Yuki, IKEMURA Toshimichi, Teruhisa Tsuzuki, GONDO Yoichi, Yusaku Nakabeppu, 8-Oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations: a study from the mutator mouse line, SMBE Satellite Meeting / NIG International Symposium: The Causes of Genome Evolution, 2014.03.15.

Yusaku Nakabeppu, Ohno Mizuki, SAKUMI Kunihiro, Oxidation of nucleic acids by reactive oxygen species and control mechanisms of genetic diversity in mammals, International Symposium between Kyushu University Post-Global Centers of Excellence Program and School of Biomedical Sciences, 2014.02.07.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 みずき (Mizuki Ohno)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 25650130