

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：63801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25891026

研究課題名(和文)ゲノム編集とデグロン法によるヒト新細胞遺伝学を応用した複製フォーク再生機構の解明

研究課題名(英文)A new cytogenetic approach toward understanding regeneration of DNA replication fork in human cells: Using genome editing and degron technologies

研究代表者

夏目 豊彰(Natsume, Toyoaki)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・特任研究員

研究者番号：10435513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、ゲノム編集技術と標的タンパク質を瞬時に分解することが可能なデグロン法を応用し、ヒト細胞における「新細胞遺伝学」的な解析法を立ち上げた。今後は、酵母などの一部の生物種においてのみ可能であった、詳細な分子細胞遺伝学的な解析が、ヒト細胞においても遂行できる。また、本解析法をもとに、複製フォークの再生機構の研究を行った。DNAの分岐構造である複製フォークは大変脆弱である一面を持ち、内的外的ストレスによって破壊され、その再生が必要になることがある。私達は、Mcm2-7複製ヘリカーゼに類似した、Mcm8-9ヘリカーゼが、複製フォークの再生に重要な役割を果たしていることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We have set up a new cytogenetic approach in human cells by combining the genome editing technology and the auxin-inducible degron system, which quickly induces protein degradation. This approach allows us to study various biological phenomena in unprecedented detail using human cells. In addition, by taking advantage of these technologies, we have studied regeneration of DNA replication forks. Replication forks are fragile branched DNA structure and are essential for DNA replication. During S phase, they are challenged by various endogenous and exogenous stresses, and, in extreme cases, they completely collapse and need to be regenerated before restarting DNA synthesis. We have revealed that the Mcm8-9 helicase, a paralogue of the Mcm2-7 replicative helicase, plays a pivotal role in regeneration of replication forks in human cells.

研究分野：染色体複製・分配、ゲノム科学

キーワード：ヒト新細胞遺伝学 ゲノム編集 オーキシン誘導デグロン法 複製フォーク再生 ICL修復 Mcm2-7ヘリカーゼ Mcm8-9ヘリカーゼ

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を担う染色体 DNA は、正確に複製され子孫に伝えられなければならない。この機構の破綻は、遺伝病や発癌の原因となり得る。DNA の複製は、複製フォークと呼ばれる必要不可欠な DNA の分岐構造上で生じるが、これは大変脆弱であるという一面を持ち、内的や外的ストレスによって崩壊することがある。細胞は、壊れた複製フォークを再生する「複製バックアップシステム」を持っており、細菌や酵母などの比較的単純な生物において研究が進んでいる。一方、ヒトを含めた高等生物では、そのメカニズムはほとんど分かっていない。

この理由の一つとして、細菌や酵母と比べてヒトなどの培養細胞では、分子遺伝学的及び細胞遺伝学的な研究手法が限られていることが挙げられる。とりわけ、染色体 DNA を自由に改変し、遺伝子を破壊したり、人工的な配列を付加したりする「ゲノム編集」の技術はこれまで一部の生物種でのみ可能であり、その他の生物種では遺伝子の機能を正確及び詳細に解析することが比較的困難であった。

このような状況の中、近年、TALEN 法や CRISPR/Cas 法などのゲノム編集技術が相次いで開発され、理論上、あらゆる生物種において詳細な分子細胞遺伝学が可能になった。また、所属する研究室において、標的の遺伝子産物を瞬時に分解することができる「オーキシン誘導デグロン法」が開発されていた。この2つのテクノロジーを組み合わせることにより、様々な生命現象の詳細な解析が可能になることが期待できた。

また、複製フォーク再生に関連しては、所属する研究室におけるニワトリ DT40 細胞を用いた解析(Nishimura et al. 2012, *Mol Cell*)から、複製ヘリカーゼである Mcm2-7 複合体に類似した、Mcm8-9 ヘリカーゼ複合体が、複製フォークの再生に関わることが示唆され、高等生物における本機構の解明の手がかりが得られていた。

2. 研究の目的

本研究では、ゲノム編集技術とオーキシン誘導デグロン法を駆使し、ヒト細胞における複製フォーク再生機構を解明することを目的とした。

1) ゲノム編集技術とオーキシン誘導デグロン法を利用して、ヒト細胞における「新細胞遺伝学」を立ち上げる。

2) 新細胞遺伝学的手法を用いて、ヒト細胞における複製フォーク再生機構の解明を Mcm8-9 複合体に着目して行う。

3. 研究の方法

1) ゲノム編集とオーキシン誘導デグロン法のヒト細胞における応用

ゲノム上の配列を任意に改変し、遺伝子の破壊や修飾をするために、CRISPR/Cas 法などのゲノム編集技術を用いた。また、オーキシン誘導デグロン法を用いれば、標的遺伝子に AID と呼ばれる小さなタグを付加することにより、細胞内で標的遺伝子産物を数時間以内に分解除去することが可能である。両テクノロジーを組み合わせ、ヒト細胞の内在性の遺伝子に AID タグを付加して瞬時に分解し、その遺伝子産物の機能を正確に解析することが可能になる。また、GFP などの蛍光タンパク質遺伝子を内在性遺伝子に付加し、細胞内における局在を生細胞中で観察できる。

2) ヒト細胞における複製フォーク再生機構の解析

DNA 二本鎖間架橋 (ICL) を用いて

ICL は、DNA 二重鎖の開裂を阻害し、DNA 複製や転写に障害を引き起こす。DNA 複製フォークが ICL に衝突すると、様々な因子の働きにより、複製フォークは一旦解消され、ICL が除去された後に、相同組換え依存的なフォークの再生が生じると考えられている。ICL を誘導する抗がん剤であるマイトマイシン C (MMC) やシスプラチンで細胞を処理することにより、フォークの解消と再生を誘導することができる。この状況下での、Mcm8-9 遺伝子の必要性や細胞内局在を解析した。

人工的な複製フォーク破壊システムを用いて

前述した ICL 修復は、最終的には複製フォークの再生を誘導すると考えられるが、多数の因子が関わる大変複雑な系である。複製フォークの再生をより直接的に観察するために、Mcm2-7 複製ヘリカーゼの構成因子である、MCM2 遺伝子に AID タグを付加した。この細胞にオーキシンを添加すると瞬時に Mcm2-7 複合体さらには複製フォークが崩壊する。この系を用いたフォーク再生の解析も行った。

4. 研究成果

1) ヒト細胞における新細胞遺伝学的解析の立ち上げ

マウスの受精卵において CRISPR/Cas 法を用いたゲノム編集の報告は数多くあったが、ヒトを含めた培養細胞における報告は限られており、まず条件の最適化が必要であった。私達は、CRISPR/Cas の導入条件やヒト

細胞株の種類を検討した結果、約1ヶ月以内で、両アリの遺伝子が、破壊またはタギングされた細胞株を樹立できるようになった。これにより、これまで酵母などの一部の生物種でしかできなかった、詳細な分子細胞遺伝学的な解析が、ヒト細胞でも可能になった。

2) MCM8-9 遺伝子破壊株と GFP タギング株の構築

1) において最適化した条件を用い、複数のヒト細胞株種において、MCM8 および MCM9 のヒト遺伝子破壊株を樹立した。これらの遺伝子破壊株は、野生株とほぼ同様な速度で増殖し、細胞周期の欠損も示さなかった。Mcm2-7 は DNA 複製に必須である一方、これに類似した Mcm8-9 複合体は複製には必須では無いことが示された。Mcm8-9 の通常の DNA 複製への関与に関しては議論の対象になっていたが、分子遺伝学的手法を用いた本研究が明確な答えを示した。

また、内在性の MCM8 遺伝子に GFP などの蛍光タンパク質遺伝子を付加した株を構築した。MMC を添加した際、核内に多数のフォーカスを形成することから、Mcm8-9 タンパク質は DNA 傷害の場に蓄積することが示された。

3) ICL 修復における Mcm8-9 複合体の役割の解明

一方、さらなる解析から、Mcm8-9 複合体は MMC によって誘導される ICL の修復に重要であることが分かった。また、抗がん剤として期待されている、PARP 阻害剤に引き起こされる DNA 傷害の修復にも必要であった。これらの薬剤に共通するのは、DNA 複製フォークを崩壊させ、DNA の分岐構造において DNA 二重鎖切断 (DSB) を生じさせることである。私達はさらに、遺伝学的な解析から、DSB 相同組換え修復で中心的な役割を果たす、Rad51 リコンビナーゼの下流において、Mcm8-9 が機能することが示した。これらの結果から、Mcm8-9 は、複製フォークで生じた DSB 修復の後半、つまり複製フォークの再生のステップで働いていることが示された。

4) 人工的な複製フォーク破壊システムの構築

ICL 修復以外でも、Mcm8-9 複合体がフォーク再生に関わっているかを調べるために、人工的な複製フォーク破壊システムを構築した。ヒト細胞の内在性 MCM2 遺伝子に AID タグを付加し、オーキシン添加後数時間で、Mcm2 タンパク質を分解し、細胞を S 期の途中で停止させることを可能にした。この細胞の核内には、DSB のマーカーである -H2AX や Rad51 リコンビナーゼのフォーカ

スが多量に形成されることから、複製フォークが瞬時に崩壊していることが分かった。興味深いことに、Mcm8 タンパク質もこれらのフォーカスに局在することから、人工的に複製フォークを破壊した系においても、Mcm8-9 複合体は重要な役割を果たしていることが分かった。

5) 今後の展望

本研究では、ゲノム編集とオーキシン誘導デグロン法を組み合わせ、新細胞遺伝学的な解析法を立ち上げることに成功した。これまで広く用いられてきた、RNA 干渉法に比べ、短時間に効率良く標的の遺伝子産物を分解除去することができ、ヒト細胞内での機能を調べるには大変有用である。また、この技術を駆使し、人工的な複製フォーク破壊システムを構築することにも成功したが、ヒト細胞でこのような実験例はこれまでに無い。今後はこのシステムを最大限に活用し、Mcm8-9 複合体を中心とした、複製フォークの再生機構の解析が期待される。さらに医学的な見知から、ある種のがん細胞では、複製フォークの再生機構が亢進し、抗がん剤に耐性になっていることも考えられる。フォークの再生機構を特異的に阻害する薬剤と抗がん剤を併用することにより、効率良くがんを治療することが可能になるかもしれない。

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 6 件)

1. 夏目豊彰、金原良樹、西村浩平、鐘巻将人 ゲノム安定性の維持における DNA 複製バックアップシステムの役割
「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム、2015年1月27日～28日、一橋講堂(東京)

2. Natsume, T., Nishimura K., Kanehara Y., & Kanemaki M. The Mcm8-9 complex promotes DNA strand synthesis in homologous recombination induced by DNA inter-strand crosslinks
The 9th 3R Symposium, 2014年11月17日～21日、御殿場高原時之栖(御殿場)

3. Natsume, T. Nishimura K., Yanagihara H., & Kanemaki M. The Mcm8-9 helicase promotes DNA strand synthesis in recombination repair induced by DNA inter-strand crosslink
IIAS Research Conference 2014 – Chromatin Decoding, 2014年5月12日～15

日、 国際高等研究所（京都）

4. Natsume, T., Nishimura K., Yanagihara H., & Kanemaki M. The Mcm8-9 helicase promotes DNA strand synthesis in recombination repair induced by DNA inter-strand crosslink

Ramon Areces Foundation International Symposium – Cell Proliferation and Genome Integrity, 2014年4月3日～4日、Palace of La Magdalena (Santander, Spain)

5. Natsume, T., Nishimura K., & Kanemaki M. A role of the Mcm8-9 complex in homologous recombination during DNA inter-strand crosslink repair

29th RBC-NIRS International Symposium, 2013年11月28日～29日、コープイン京都（京都）

6. 夏目豊彰、西村浩平、鐘巻将人 ヒト遺伝子破壊株を用いた複製フォーク再構成におけるMcm8-9複合体の機能解析

第31回染色体ワークショップ・第12回核ダイナミクス研究会、2013年11月25日～27日、ホテルおかだ（箱根）

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

研究所内 HP

<http://www.nig.ac.jp/section/kanemaki/kanemaki-j.html>

研究室 HP

<http://www.nig.ac.jp/labs/MolFunc/Molecular Function HP/Home.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

夏目豊彰 (NATSUME TOYOAKI)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・特任研究員

研究者番号：10435513

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし