

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640117

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いたゲノム損傷抑制機構の解明

研究課題名(英文)Development of deep-sequencing approach for genome damage repair

研究代表者

飯田 哲史 (Iida, Tetsushi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：60391851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：リボヌクレオチドは、ゲノムDNAに誤って取込まれることにより内因性のゲノム損傷となるとともに、ゲノム修復のシグナルとなっている。しかし、損傷とその除去修復のバランスがどのように保たれているかは不明であった。本研究では、ゲノム中のリボヌクレオチドを1塩基レベルで網羅的に絶対定量することができるRiSQ-seq法を確立し、リボヌクレオチドがゲノムに均一ではなく特定の領域に取込まれることを見出した。RiSQ-seq法による解析は、野生型の細胞とリボヌクレオチドの除去が出来ない細胞を比較することで、修復効率を定量することも可能とし、変異が蓄積しやすい領域を評価する新たな指標を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Ribonucleotides misincorporated in the genome are an inevitable source of endogenous DNA damage, and also serve as signals for genome repair. However, damage repair has been previously evaluated indirectly, and the balance between incorporation and repair of ribonucleotides has not been elucidated. In this project, we developed a competitive sequencing method, RiSQ-seq, which enables absolute quantification of misincorporated ribonucleotides throughout the genome at single-base resolution. RiSQ-seq analysis revealed that ribonucleotides were incorporated non-uniformly in the genome. Direct comparison of ribonucleotide levels in wild-type and repair-deficient mutant cells enabled evaluation of ribonucleotide excision repair (RER) activity at base resolution. Profiling of RER efficiency revealed that the distinct preferences of ribonucleotide incorporation and RER result in hotspots of insertion and deletion mutation. RiSQ-seq can be used to evaluate the risk of mutations.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム維持修復 リボヌクレオチド rNMP 損傷 定量 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

一般に DNA 修復は、ゲノムにランダムに生じた DNA 損傷に誘導されておこると考えられている。正常な細胞においても、DNA 複製の際に、本来 RNA を構成するリボヌクレオチドが DNA ポリメラーゼによって誤ってゲノム DNA 中に取り込まれ内因性のゲノム損傷となることが報告されている。ゲノムへ誤って取り込まれたリボヌクレオチドは、試験管内の実験から、ゲノムの 0.1%程度と極めて高頻度に取り込まれると推定されているが、正常な細胞における変異の頻度は極めて低く抑えられており、リボヌクレアーゼ H(RNase H)を介して効率よく除去・修復されていると考えられる。一方、DNA 損傷がランダムに起こるという前提で多くの DNA 修復の研究がなされて来たのに対し、同種生物ゲノム間の多型は、特定の遺伝子やゲノム領域に偏って存在する。多型の不均一な分布は、多型の原因となる内因性ゲノム損傷の分布が偏っている可能性や、塩基置換を修復する修復効率がゲノムで均一でない為に生じる可能性などが考えられるが、実際に内因性のゲノム損傷が染色体のどの領域にどれくらい取り込まれたのち、除去修復されるかについては全く不明であり、変異蓄積との関係解明が待たれている。

2. 研究の目的

転写や DNA 複製が開始や終結の解析が染色体レベルで行われているのに対し、DNA 修復はランダムに導入される DNA 損傷に反応して起こると考えられており、染色体の何処でどれくらいの頻度で起こるのかは不明である。遺伝子多型のゲノム中における不均一な分布は、通常の細胞周期において DNA 損傷が特定の染色体領域に蓄積している可能性を示唆している。本研究では、高頻度の DNA 修復を誘導する可能性がある内在性の損傷として、染色体中に誤って取り込まれたりリボヌクレオチドに注目し、次世代シーケンサーを用いたゲノム中のリボヌクレオチド蓄積の網羅的定量法を確立し、染色体維持に関わる DNA 損傷蓄積の実態を明らかにすることを目的とした。また、ゲノム修復頻度を定量し、ゲノム上で行われるゲノム修復と変異蓄積との関係を明らかにすることも目指した。本研究で開発する手法は、変異導入のリスクを評価する重要な評価基準を提供することができると思われる。

3. 研究の方法

本研究では、突然変異誘発など染色体維持に関わる生体内の内在性 DNA 損傷のうち DNA 複製時に染色体に誤って取り込まれるリボヌクレオチドのゲノムへの蓄積過程を明らかにするため、網羅的かつ定量的解析法の確立を目指す。遺伝学的解析が可能でリボヌクレオチドの研究が最も進んでおり、ゲノムサイズが小さくゲノム情報が高度に整備され

ている酵母をモデルに、次世代シーケンサーを用いて、(I)変異を効率よく同定する方法を実験的手法とコンピューターによる解析手法の両面から確立する。(II)実際に酵母をモデルに野生型株の全ゲノムを決定し、ゲノム中における変異しやすい領域ににくい領域を明らかにする。(III)二次ライブラリーを用いたゲノム中のリボヌクレオチドの一塩基レベル網羅的定量マッピング法の確立と修復頻度推定法の確立を行う。

4. 研究成果

(I)変異同定のための次世代シーケンサーデータ解析ウェブツールの公開

次世代シーケンサーの登場により、様々な生物の全ゲノム配列決定が可能になり、参照配列が整備されている生物においては、変異や多型の検出が容易になった。しかし、実際に、変異体ゲノム中の原因変異を絞り込むには、実験的にもデータ解析の面においても工夫が必要であり、モデル生物である酵母においても効率よく原因変異を方法の確立はなされていなかった。そこで、戻し交配が可能で遺伝学的手法が使えるモデル生物において、変異体の原因を効率よく同定するための、戻し交配を応用したプール型連鎖解析による DNA 配列決定法を確立した。また、実験研究者が容易に次世代シーケンサーによる大容量の DNA 配列データを解析できるように、変異データ解析パイプラインをウェブツール "MUDI" としてインターネット上に公開した(図 1)。MUDI では、配列データをインターネットを介してツールに送信した後、ワンクリックで変異候補のリストを E-mail で解析依頼者に自動で返信することが出来る。変異リストでは、野生型・標準細胞の多型を差し引きし、マッピングや偽陽性の可能性についてのスコアを付加することで、変異誘導剤などによる大量の変異の中なかから容易に原因変異を同定することが出来るようにした(N. Iida *et al.* 2014 Genes to Cells)。

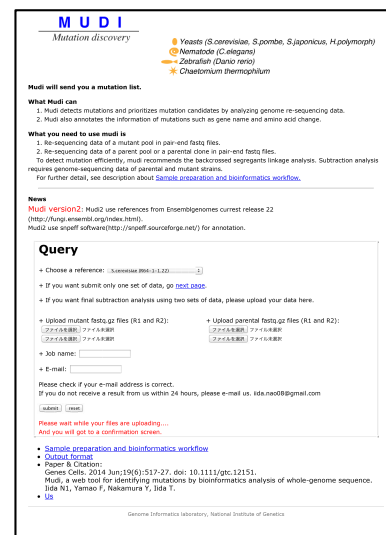


図 1. 変異同定ウェブツール MUDI (http://naoii.nig.ac.jp/mudi_top.html)

本 MUDI は、公開当初、分裂酵母、出芽酵母にのみ対応したものであったが、現在は、酵母 4 種 (*S. cerevisiae*, *S. pombe*, *S. japonicus*, *H. polymorph*)、真菌 (*C. thermophilum*)、線虫 (*C. elegans*)、ゼブラフィッシュ (*D. rerio*) に対応しており、様々なモデル生物研究者が使用している。

(II) 分裂酵母の 32 の野生株の全ゲノム配列決定による染色体機能領域の推定

染色体研究のモデル生物である分裂酵母の野生型株 32 株の全ゲノム配列を次世代シーケンサーを用いて決定し、32 株間の DNA 多型を同定することで、進化上ゲノムの変化が起きやすい領域、保存性の高い領域を集団遺伝学の視点から解析を行った (J. Fawcett *et al.* 2014 PLoS ONE)。本研究の手法により、染色体の維持に関わる非コード DNA 領域を保存性の極めて高い領域 (インターメア) として推定することが可能となり、複数のインターメア候補領域を同定した。染色体の機能が異常になると、癌をはじめとする多くの疾患を引き起こすことが知られている。インターメアは染色体の機能維持に関わると考えられるため、インターメア候補領域は染色体異常の発症メカニズムの解明につながるものが期待される。

(III) 二次ライブラリーを用いたゲノム中のリボヌクレオチドの一塩基レベル網羅的定量マッピング法の確立

ほとんどの生物の細胞内では、DNA 合成の基質であるデオキシリボヌクレオチドに対して RNA の構成要素であるリボヌクレオチドの濃度が遙かに高いため、ゲノム複製の際に DNA ポリメラーゼが誤ってゲノム DNA 中にリボヌクレオチドを取り込むことが解ってきた。誤って取り込まれたリボヌクレオチドは、内因性のゲノム損傷として DNA 複製後 RNase H によって切断され除去修復によって取り除かれきれいなゲノム DNA が維持されると考えられている一方で、残存したリボヌクレオチドは変異蓄積を誘発する因子となることが示されている。しかし、正常な細胞においてどれくらいのリボヌクレオチドが取り込まれ、除去され、残存したまま次の世代の細胞に受け継がれるかは解っていなかった。本研究では、ゲノム内のリボヌクレオチドが RNase H III によって切断される点と、リボヌクレオチドを含まないゲノム DNA 断片量とリボヌクレオチド量を同時に比較定量するための DNA 配列決定ライブラリーの作製法と解析法を確立した (Ribonucleotide scanning quantification sequencing: RiSQ-seq, 図 2)。本法では、全ゲノム DNA シーケン斯拉イブラリーを一次ライブラリーとして作製した後、一次ライブラリーを RNase H III で処理しリボヌクレオチド導入箇所新たに検出アダプターを付加した二次ライブラリーを作製する。リボヌクレオチドを検出するア

ダプターとリボヌクレオチドを含まない断片由来のアダプターを次世代シーケンサーが検出し仕分けすることで、ゲノム内の DNA 量とリボヌクレオチド量を極めて高い定量性によって比較することができる。また、合成 DNA を標準試料として混合させて解析することで、リボヌクレオチドのゲノム中の存在頻度を絶対定量することが可能となる。

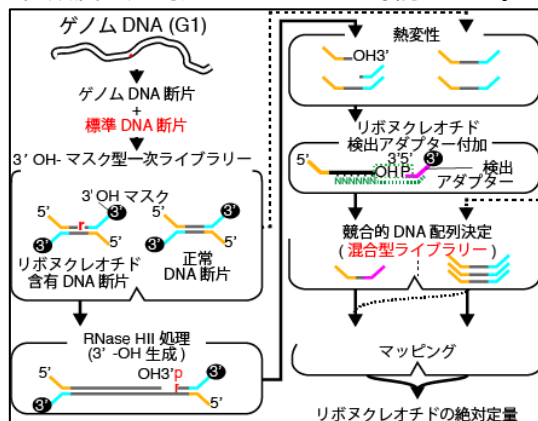


図 2. RiSQ-seq ライブラリー作製の概略 (競合シーケンシングによる絶対定量法)

出芽酵母をモデルに、DNA 複製が起こらない間期 G1 で停止した細胞からゲノム DNA を抽出し、RiSQ-seq 法によって解析した。リボヌクレオチドの除去修復が出来なくなった *rnh201Δ* 変異細胞と野生型細胞ともに、リボヌクレオチドは遺伝子領域に蓄積する傾向が見られ、DNA 鎖特異的なパターンを示すことを見出した。この遺伝子領域特異的なリボヌクレオチドの取り込みは、遺伝子領域の GC 含量と高い相関を示すことも見出した。また、*rnh201Δ* 変異細胞のリボヌクレオチド量を取込み量、野生型細胞のリボヌクレオチド量を除去修復後の残存量と見なすことで、絶対定量法によって [(*rnh201Δ* 変異細胞) - (野生型細胞)] の計算が可能となったため、塩基レベルでリボヌクレオチド除去修復の頻度、効率、特異性を評価した。リボヌクレオチド除去修復は、リーディング鎖で効率がよく、ラギング鎖で効率が低いものの、ラギング鎖のリボヌクレオチドの取込み量が元々低いため、野生型細胞では、リボヌクレオチドの残存量は、リーディング鎖とラギング鎖の間で殆ど差がなくなることも解った。リボヌクレオチド蓄積量や除去修復効率と変異蓄積頻度の関係を解析するため、酵母の野生型株間の多型の蓄積頻度とリボヌクレオチド蓄積量、除去修復効率を比較した。その結果、挿入・欠失変異の蓄積量とリボヌクレオチド除去修復効率の低い領域に相関を見出した。リボヌクレオチド除去修復効率は、リボヌクレオチドの取り込み量が高い状態から急激に低くなる領域で著しく低くなる。修復効率と関連するリボヌクレオチドの変化量を測る指標を作製し (Ribonucleotide transition metric: RTM)、リボヌクレオチド除去修復のされにくさの指標として、挿入・欠失変異との関係を調べたところ、RTM

と挿入・欠失変異の蓄積頻度は、極めて高い正の相関を示した。逆に、ゲノム各領域のRTMを用いて、挿入・欠失変異を実験的に検出した領域を予測できるかを調べたところ、95%の正確性で6割以上の挿入・欠失変異を予測することが出来た。変異導入の仕組みは、生物種間でよく保存されており、リボヌクレオチドの取り込みや除去修復についても酵母からヒトまで高度に保存されていることから、RiSQ-seq解析によって得られるパラメータRTMを用いれば、様々な生物種において挿入・欠失変異のリスクが高いゲノム領域を予測することが可能となると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Seiji Tanaka, Mayumi Miyazawa-Onami, Tetsushi Iida, Hiroyuki Araki
iAID: an improved auxin-inducible degnon system for the construction of a 'tight' conditional mutant in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*
Yeast (査読有り) 2015, vol.32, 567-581
DOI: 10.1002/yea.3080.

Jeffrey A. Fawcett, Tetsushi Iida, Shohei Takuno, Ryuichi P. Sugino, Tomoyuki Kado, Kazuto Kugou, Sachiko Mura, Takehiko Kobayashi, Kunihiro. Ohta, Jun-ichi. Nakayama, Hideki Innan
Population genomics of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*
PLOS ONE (査読有り) 2014, vol.9, e104241, 1-12
DOI: 10.1371/journal.pone.0104241.

飯田 哲史

出芽酵母の鋳型 DNA 鎖修復機構
「二十一世紀の遺伝学」GSJ コミュニケーションズ (査読無し) 2014, vol.10, 9

Naoko Iida, Fumiaki Yamao, Yasukazu Nakamura, Tetsushi Iida
Mudi, a web tool for identifying mutations by bioinformatics analysis of whole genome sequence
Genes to Cells (査読有り) 2014, vol.19, 517-27
DOI: 10.1111/gtc.12151.

〔学会発表〕(計7件)

飯田哲史, 小林武彦
“内因性ゲノム損傷 rNMP の絶対定量法でせまるゲノム修復” 第39回 日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 2016年11月28~30日 神奈川県・横浜市

飯田哲史

“酵母からはじめるゲノム修復研究” 酵母

研究ルネッサンス 2016, 東京大学駒場 II リサーチキャンパス 2016年11月29日 東京都・目黒区

Iida, Tetsushi., Iida, Naoko., Sese, Jun., Nakamura, Yasukazu., Kobayashi, Takehiko.
“Evaluation of repair activity by absolute quantification of misincorporated ribonucleotides in the genome” 3R Symposium, ホテル一畑 2016年11月13~17日 島根県・松江市

飯田哲史

“内因性ゲノム損傷とその修復の役割” 研究集会「生物ゲノム安定維持の分子機構」, 国立遺伝学研究所 2016年10月24~25日 静岡県・三島市

飯田哲史, 小林武彦

“蓄積した内因性ゲノム損傷定量法の確立。” 第23回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ, 焼津グランドホテル 2015年10月19~21日 静岡県・焼津市

飯田哲史

“内因性ゲノム損傷の網羅的定量からみるゲノムの姿” 研究集会「染色体DNAの安定維持の分子メカニズム」, 国立遺伝学研究所 2015年10月1~2日 静岡県・三島市

Iida, Tetsushi., Iida, Naoko., Sese, Jun., Kobayashi, Takehiko.
“Detecting ribonucleotides in the yeast genome.” 3R Symposium, 御殿場高原時の栖 2014年11月17~21日 静岡県・御殿場市

〔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
次世代シーケンサー変異同定 Web ツール
MUDI Mutation discovery
http://naoii.nig.ac.jp/mudi_top.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 哲史 (IIDA, Tetsushi)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号: 60391851