

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26840114

研究課題名(和文) rDNAにおいて複製と転写の連携を制御し染色体安定性を維持するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism that coordinates DNA replication and transcription activities in human ribosomal RNA gene

研究代表者

赤松 由布子 (Akamatsu, Yufuko)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：50381661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNA複製と転写は両者ともゲノムDNAを鋳型として新生DNA鎖またはRNA鎖を合成する。しかしS期に発現している遺伝子領域において、転写中のゲノムDNAがどのように複製されるのかについてはあまり理解されていない。本研究では、S期でも転写活性の高いリボソームRNA遺伝子(rDNA)に着目しこの問題に取り組み組んだ。その結果、rDNAの3'領域ではRNA polymerase Iの転写終結配列にTTF1が結合して、転写の下流からコーディング領域に侵入するDNA複製の進行を阻害するReplication fork barrier (RFB)として機能し転写と複製の衝突を阻害していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In S phase, the replication and transcription of genomic DNA need to accommodate each other, otherwise their machineries collide, with chromosomal instability as a possible consequence. The ribosomal RNA gene (rDNA) is the most actively transcribed gene in human cells and the activity is high during S phase. To understand how the collision between rDNA transcription and replication is prevented, the role of replication fork barrier (RFB) was investigated. We found that the Sal-box elements that are able to terminate rDNA transcription were the cis elements for the RFB activity. When fork arrests at these sites failed, rDNA transcription impedes replication fork progression. These results reveal a role of RFB for coordinating the progression of replication and transcription activity in highly transcribed rDNA.

研究分野：分子生物学

キーワード：リボソームRNA遺伝子 DNA複製 ゲノム安定性

1. 研究開始当初の背景

rRNA 遺伝子は多重遺伝子であり、ヒトではゲノム中に約 400 コピーを持つ。これらは細胞内の 10 本のアクロセントリック染色体の短腕に存在し、タンデムリピートからなるクラスター構造(rDNA クラスター)を形成している。rRNA はリボソームの構成成分でありタンパク質合成に必須なため、rRNA 合成は細胞内における転写の大部分を占める。400 コピーの rRNA 遺伝子はエピジェネティックに異なる 2 つの状態で作クラスターごとに分かれて存在し、実際に rRNA 転写が誘導される遺伝子 (active-rDNA) は約半分であり、残りはヘテロクロマチン化されている (silent-rDNA)。

active-rDNA では rRNA の転写活性は G1 期から上昇し、S/G2 期で最大となるが、この時 rRNA 一遺伝子当たり RNA polymerase I (PolI) が 100 個以上も数珠つなぎに存在して非常に活発に rRNA 合成を行っている。active-rDNA は、early-S 期に複製されるが、興味深いことに「複製中の rRNA 遺伝子は、核小体内の転写領域から隔離されて存在する」ことと「複製されると核小体内に戻り UBF などの転写活性化因子と共局在する」ことが細胞生物学的な実験から観察されていた (Pliss et al. 2005, Dimitrova 2011)。このことは active-rDNA では、DNA 複製の際にその領域で特異的に転写が不活性化していることを示唆しているが、その分子機構は明らかになっていない。

近年の研究から、転写活性の高い遺伝子が転座など染色体異常のホットスポットとして観察され、染色体不安定性を引き起こすことが示唆されている。転写と複製の衝突は、RNA polymerase の進行異常による DNA・RNA-hybrid の形成や DNA 複製フォークの進行遅延、複製複合体の崩壊を引き起こし、DNA を損傷する。重要なことに、ヒトでは多種のがん細胞で rDNA クラスターが正常細胞では見られない異常なゲノム再編成を上昇することが報告されている (Stults DM et al. 2009)。このことは、正常細胞が rDNA クラスターを安定に維持する機構を持つことを強く示唆している。

2. 研究の目的

rRNA コーディング領域の 3' 側には Replication fork barrier (RFB) が存在し、下流から転写領域に侵入する DNA 複製フォークの進行を阻害し、転写と複製の正面衝突を回避すると考えられている。出芽酵母では、Fob1 タンパク質が結合した RFB で DNA 複製フォークが停止すると DNA 二重鎖切断が生じ rDNA コピー間で組換えが誘導されて rDNA の不安定性が誘導されることが明らかになっている。しかし、哺乳動物細胞では Fob1 は保存されておらず、PolI の転写終結因子 TTF-1 が RFB の機能を担うと考えられている。

本研究では、ヒト細胞において RFB の分子メカニズムを検証し rDNA におけるゲノム不安定性への寄与を調べるために、以下の実験を行った。

3. 研究の方法

(1) DNA 二次元電気泳動法では、一次元目を DNA の分子量で分離した後、二次元目は DNA の形 (non-linear 型 DNA が単純な linear 型 DNA よりもアガロース中で電気泳動移動度が遅くなることを利用して) で分離する。そのため DNA 複製中間体の構造 (複製開始バブル、進行中の Y フォーク、複製終結、DNA 鎖交換による組換え中間体) を詳細に解析することが出来る。DNA 二次元電気泳動後にサザンプロットを行うことで、ゲノム DNA 中の目的とする配列を複製中の DNA 複製中間体の構造を観察することが可能となる。この方法を用いて、rDNA 上の DNA 複製中間体の検出を行った。

(2) rDNA に存在する cis 配列の DNA 複製における役割を解析するために、ヒト細胞内で DNA 複製を誘導出来る Epstein-Barr ウイルス由来の EBNA1/OriP 複製系を利用した。OriP 配列を持ったプラスミド上に rDNA の断片をクローニングし、EBNA-1 の安定性発現株である 293E 細胞にトランスフェクションした。DNA 二次元電気泳動法により、プラスミド上の rDNA 配列の DNA 複製中間体を解析した。また、トランスフェクション後に経時的に細胞を回収し 293E 細胞内でのプラスミドの複製を調べた。このとき、*dam+* 大腸菌由来の DNA は切断するが、293E 細胞で複製された DNA を切断しない制限酵素 DpnI を利用した。

4. 研究成果

(1) これまでの結果から、rDNA のコーディング領域下流に存在する RFB について、一部が Sal variation repeat 内に存在すること、PolI の転写終結因子である TTF-1 をノックダウンすると RFB の DNA 複製阻害が低下することが分かっていた。そこで、RFB の cis エlement が TTF-1 の結合する Sal-box T 配列であることを調べるために、5 種類ある T 配列 T1~T5 を OriP 配列を含むプラスミド上にクローニングして 293E 細胞内での DNA 複製を誘導した。二次元電気泳動法を用いて DNA 複製阻害について評価したところ、T1、T4、T5 が DNA 複製を阻害した。このとき、DNA 複製を阻害した方向性について、DNA 複製が転写の下流から上流に進む向きでは進行が阻害されたが、転写と同じ方向性では阻害が起らなかった。このことは、これらの配

列が、方向性特異的な RFB として機能しており、DNA 複製のコーディング領域への侵入による PolII 転写装置と正面衝突を回避していることを示唆している。また、T2、T3 については、DNA 複製の進行を阻害する活性が無かった。T2、T3 については、TTF-1 との結合に關与する塩基配列に多型があり、TTF-1 に結合出来ないことが報告されている。さらに、Sal variation repeat を含むコーディング領域の下流の配列を OriP プラスミド上にクローニングし、T1、T4、T5 配列に変異を入れたところ、DNA 複製進行阻害の活性が無くなった。これらのことから、ヒトでは PolII の転写終結因子 TTF-1 が結合した Sal-box T1、T4、T5 が RFB として機能していることが分かった。

- (2) rDNA のコーディング領域下流に存在する Sal variation repeat は T3、T4、T5 を含む配列であり、多型によって 1 回から 4 回のリピートが見られる。HeLa 細胞の RFB を二次元電気泳動で解析するとリピート数 3 回の variant では明瞭な DNA 複製阻害が観察されるが、リピート数 2 回の variant では複製阻害効率が低かった。この原因を明らかにするために、double thymidine block により細胞周期を同調して DNA 複製を経時的に解析した。その結果、RFB の DNA 複製進行阻害は early-S 期に最も活性が高く、S 期が進行するごとに下がり、late-S 期ではほとんど起こらなかった。多コピーの rDNA のうち PolII 転写が活発な ractive-rDNA は early-S 期に DNA 複製されることから、active-rDNA では RFB が機能しているが、late-S 期に複製されるヘテロクロマチン化した転写活性の無い silent-rDNA では DNA 複製阻害が起こらないことがわかった。さらに、メチル化 CpG との関係性を調べるために、メチル化 CpG に感受性の制限酵素 SacII で処理した後に RFB を含む領域の DNA 複製を調べたところ、RFB の活性が高く DNA 複製の進行が阻害される rDNA コピーは SacII に切断され、高度に CpG メチル化の起こっている rDNA コピーでは DNA 複製阻害が起こっていなかった。このことから、RFB での DNA 複製阻害がエピジェネティックに制御されており、PolII の転写活性に連携している可能性が示唆された。
- (3) これまでの結果から、DNA 複製複合体に含まれる TIM タンパク質が RFB での DNA 複製進行阻害に重要であることがわかってきた。DNA 二次元電気泳動法により TIM ノックダウン細胞の DNA 複製中間体を解析すると、Sal-box T1 付近で、DNA 複製の進行が遅延するパターンが観察

された。PolII の転写はほとんどが T1 で停止することが知られているため、転写と TIM ノックダウン細胞で見られた複製遅延の関係を調べるために、アクチノマイシン D またはコルジセピンによって細胞の PolII 転写を阻害した。その結果、TIM ノックダウン細胞で見られていた T1 付近の DNA 複製の遅延が無くなった。コントロール細胞の T1、T4、T5 での DNA 複製進行阻害は、PolII 転写阻害によって影響を受けなかった。このことから、RFB で DNA 複製進行が阻害されない場合は、PolII 転写との衝突により DNA 複製が遅延することが示唆された。

- (4) RFB の機能不全による PolII 転写と DNA 複製の衝突が rDNA のゲノム安定性に与える影響を調べるために、TIM をノックダウンした細胞の rDNA クラスター長をパルスフィールド電気泳動法で調べたが、コントロール細胞と比較して大きな違いは観察されなかった。しかしこの方法ではゲノム中で 1M 以下の比較的短い rDNA クラスターしか調べることが出来ず、長い rDNA クラスターを調べるためには電気泳動の移動度の問題から感度が十分ではないと考えられる。そこで、OriP を持つプラスミド上に、PolII promoter を含むコーディング領域上流の配列と RFB を含む下流領域の配列を繋いだ mini-rDNA を構築し、293E 細胞内で DNA 複製を誘導、PolII 転写と RFB のプラスミドの安定性への影響を調べた。まず、下流領域のみをのせたプラスミドでは、RFB で DNA 複製の進行阻害が起こるものの、RFB を持たないコントロールプラスミドと同じ程度に 293E 細胞内で複製されたプラスミドが維持されていた。このことは、RFB で DNA 複製の進行が阻害されることはプラスミド DNA の安定性に影響を与えないことを示唆している。RFB の上流にプロモーター領域をクローニングしたところ、293E 細胞内で複製されたプラスミドはコントロールと同程度に維持されたが、T1、T4、T5 配列に変異を導入し RFB の機能を阻害すると低下した。またこの低下は、プロモーターに変異を入れて PolII 転写を阻害すると抑圧された。RFB が、転写によって複製中のプラスミドが不安定化することを制限していることを示唆している。従って、RFB は、同じ DNA 上で起こる PolII 転写と DNA 複製のコンフリクトを緩和し、DNA を安定に維持する役割を担っていると考えられる。

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1件)

Yufuko Akamatsu and Takehiko Kobayashi The Human RNA Polymerase I Transcription Terminator Complex Acts as a Replication Fork Barrier That Coordinates the Progress of Replication with rRNA Transcription Activity Mol. Cell. Biol. May 2015 vol. 35 no. 10 1871-1881, DOI: 10.1128/MCB.01521-14
(査読有り)

〔学会発表〕(計2件)

赤松由布子 ヒト ribosomal RNA 遺伝子に存在する Replication fork barrier の機能解析 第39回日本分子生物学会年会 2016年

Yufuko Akamatsu The Pol I Transcription Terminator Complex Sal-box/TTF-1 Acts as Replication Fork Barrier in Human Cells The 9th 3R Symposium 2014年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤松 由布子 (AKAMATSU YUFUKO)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号: 50381661