

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14577

研究課題名(和文)ゲノムの可逆的な改編を可能にする分子メカニズム

研究課題名(英文)Molecular mechanism for the reversible genome modulation

研究代表者

田中 誠司(Tanaka, Seiji)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教

研究者番号：50263314

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)：出芽酵母のCUP1領域のように、そのゲノム情報を積極的に変更(コピー数変化)することで、環境に適応し生存を図るようなゲノム改編戦略は染色体の安定維持にとっては非常に危険であり、両立を可能にしている機構に興味を持たれる。この領域をモデル系としてゲノム改編と染色体の安定維持の両立を可能にする分子機構の解明を目指し、解析を行った。この領域の複製活性を調べたところ、これまで保存されていると考えられてきた、出芽酵母複製開始点の構造や機能とは完全に異なる制御を受けていることを示すという驚きの結果が得られた。このことは、新しいタイプの複製開始点を発見したことを意味している。

研究成果の概要(英文)：Usually genome information must be maintained stably over generations for the integrity of the organism. However, some exceptions exist. One example is the CUP1 locus of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, whose copy number changes upon the concentration of copper ion included in the growth medium. Such copy number change might help *S. cerevisiae* to adapt the environment, however, it also might be a big threat for stable genome maintenance. Therefore, I investigated how this organism keeps these controversial mechanisms. As a first approach, I elucidated how this locus is replicated in the cell cycle and I found that the structure and the mode of regulation of replication origin in the CUP1 locus is very different from that of typical replication origins in *S. cerevisiae*. This indicates that I found a novel type of replication origin.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製 複製開始点 ゲノム安定維持

1. 研究開始当初の背景

真核生物が世代を超えてゲノムを安定に維持してゆく仕組みは生命の最も基本的な局面のひとつであり、「ゲノム DNA の完全な状態 (genome integrity) の維持」という側面から、DNA 複製自体の制御と DNA に起きた傷を元通りにするのに必要な DNA ダメージ応答について多くの研究がなされており、申請者も、染色体 DNA 複製の研究を通して貢献して来た¹⁻⁷。一方、ゲノム情報を積極的に改編するような現象はゲノム安定維持にとって大きな脅威になると考えられる。出芽酵母の CUP1 遺伝子領域はそのような領域の一例であり、培地中の銅イオン濃度によりそのコピー数が増減することが古くから知られている⁸。このことは、酵母細胞がゲノム安定維持と改編という相反する事象をうまく両立させていることを意味するが、それを可能にしているメカニズムについては未だ全く理解されていない。そこで、この両立機構の解明を行うことで、新規のダイナミックなゲノム制御機構の発見につながるのではないかと考えた。真核生物ではリボソーム RNA をコードする rDNA がタンデムに数百～数千並んだ領域がリピート配列として有名であり、そのコピー数維持には DNA 複製が大きな役割を果たすことが示されている。申請者は DNA 複製研究を専門としており、CUP1 領域内にも複製開始点が存在することから、本研究においては申請者のこれまでに培った研究スキルが存分に生かされることが期待できる。

参考文献 (申請者に下線、*: corresponding author)

1. Tanaka S & Diffley JFX* (2002) Nature Cell Biol. 4: 198-207.
2. Tanaka S & Diffley JFX* (2002) Genes Dev. 16: 2639-2649.
3. Mimura S, Seki T, Tanaka S & Diffley JFX* (2004) Nature 431: 1118-1123.
4. Tanaka S, Umemori T, Hirai K, Muramatsu S, Kamimura Y & Araki H* (2007) Nature 445: 328-332.
5. Tanaka S*, Nakato R, Katou Y, Shirahige K, Araki H. (2011). Curr Biol. 21: 2055-2063.
6. Tanaka S* & Araki H. (2011) PLoS Genet. 6: e1002136 (pp 1-16).
7. Tanaka S*, Komeda Y, Umemori T, Kubota Y, Takisawa H & Araki H. (2013). Mol Cell Biol. 33: 2614-2622.
8. Fogel S and Welch JW. (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79: 5342-5346.

2. 研究の目的

生命体の全遺伝情報を担うゲノム DNA は、世代を超えて安定に維持されてゆく。これを可能とするために、生物は DNA 複製を細胞周期につき一度に制限する制御や DNA ダメージ応答等、きめ細かな制御系を備える。一方、出芽酵母の銅耐性因子をコードする CUP1 遺伝子のように、そのゲノム情報を積極的に変更 (コピー数変化) することで、環境に適応し生存を図るよう

な機構も存在する。このようなゲノム改編戦略は染色体の安定維持にとっては非常に危険であり、両立を可能にしている機構に興味を持たれるが、それらは不明なままである。そこで、CUP1 領域をモデル系としてゲノム改編と染色体の安定維持の両立を可能にする分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

研究目的達成のために、上述したように出芽酵母を研究材料として用いて、CUP1 領域について研究を行った。以下の6点についてそれぞれ解析を進めてゆく予定であったが、研究成果の欄で述べるような驚くべき結果が得られたため、方向性を大きく転換し、(4)の点を中心に解析を進めた。

- (1) CUP1 領域ゲノム改編 (コピー数変化) プロファイルの詳細な解析
- (2) ゲノム改編 (コピー数変化) における相同組換え・非相同末端結合経路の関与の検証
- (3) DNA2 本鎖切断生成の有無の検証ならびにその生成条件の解明
- (4) 複製開始点の必要性の検証ならびにその複製プロファイル・複製開始点活性化機構の解明
- (5) CUP1 解析結果に基づく、ゲノム改編を任意に誘導できるような人工カセットの作製
- (6) CUP1 領域ゲノム改編と全体的なゲノム安定維持との関係性の解明

4. 研究成果

実際に解析を開始するにあたり、この領域について過去に記述された DNA 複製や野生型細胞株におけるゲノム上での遺伝子コピー数についての確認から開始した。

その結果、これまでの研究成果としてデータベースに記載された、

- (1) 遺伝子コピー数、
 - (2) 複製開始点の活性、
 - (3) 複製開始点の有無、等、
- 検証した全ての点において過去に記述された結果と一致しないという事実が多数発覚した。これらの齟齬の原因としては、
- (1) この領域の初期の解析がとて古く、以後継続的に詳細かつ厳正な解析がなされてこなかったこと、
 - (2) ゲノムワイドな解析において、同一領域がタンデムに多コピー存在するということがそのコピー数も含めきちんと考慮に入られていないように思われること、
 - (3) 同解析においては個々の領域について個別に厳密な機能解析がなされないこと、等があげられると思われた。

そのため、自分で正確な情報を確定するところから解析を開始することとなった。上述したように、この領域のコピー数変化には DNA 複製制御機構が関与することが予想さ

れたため、まず手始めとして、DNA 複製開始点の同定から開始した。結果、以下 (1)-(8) に記すような数々の興味深い事実が明らかとなった。

(1) 過去の文献・データベースにおいて報告された複製開始点の位置が誤りであり、該当領域は細胞に入れても複製開始点としての活性を示さないこと、

(2) しかし、CUP1 領域全体としてみた場合、弱いながらも複製開始点としての活性を示すこと、

(3) ただし、その複製活性は、2 コピー以上の CUP1 領域がタンデムに存在した場合で顕著に現れ、

(4) 2 コピーの CUP1 領域から出発し、両端から徐々に短く削り込んだ多数の削除構築体を作製したところ、複製活性を担う領域が同定できた (図 1,2)。

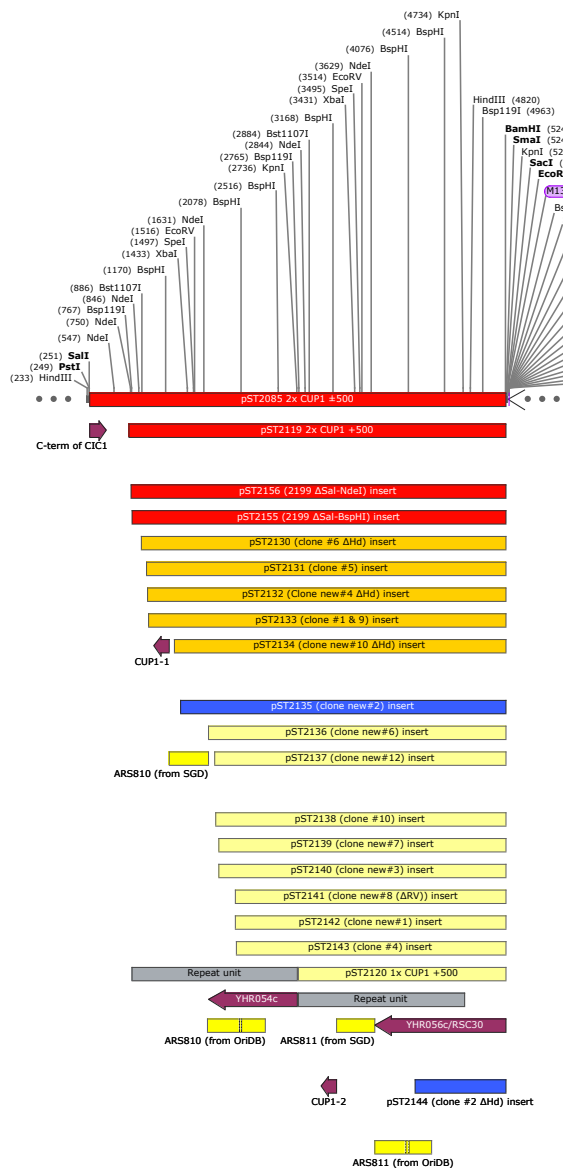


図 1. CUP1 領域の複製活性責任領域の限定化。図中グレーで示した 2 コピーの CUP1 領域とその周辺領域を持つプラスミドを作製 (図の最上段の赤 box) し、左方向から領域を順次欠失した構築体を作製し、その複製活性を調べた。顕著な複製活性が見られたものを赤、中間的な活性を示したものをオレンジ、複製活性が見られなかったものを薄黄色で示す。過去の解析より、複製開始点であるとされていた領域 (図中黄色 box, ARS810, ARS811 と表記) と異なる領域が複製活性に必要であることがわかる。

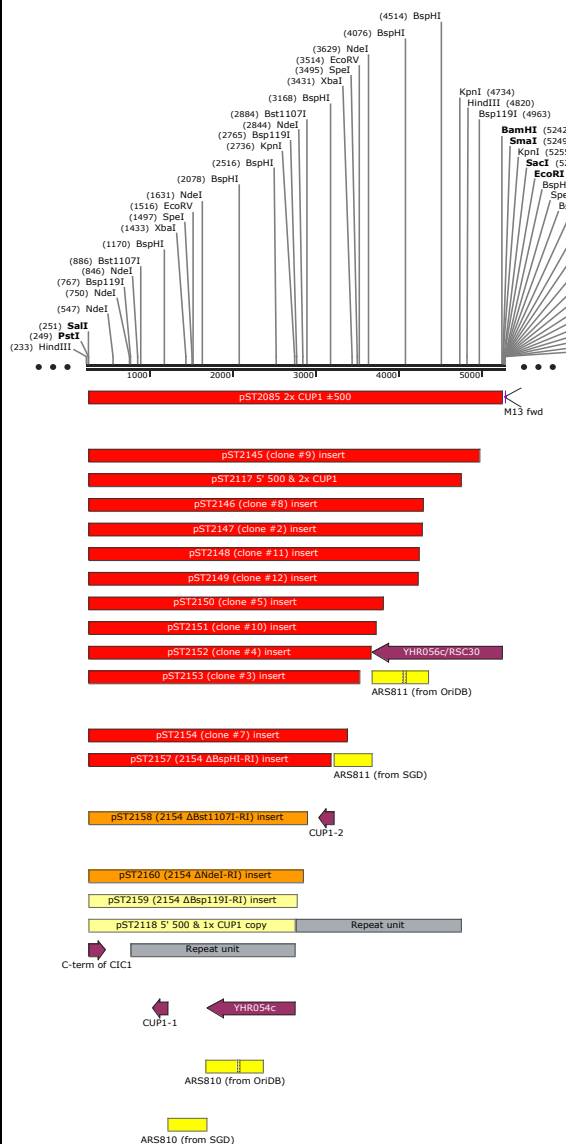


図 2. CUP1 領域の複製活性責任領域の限定化。図 1 とは逆に右方向から領域を順次欠失したものの結果を示す。顕著な複製活性が見られたものを赤、中間的な活性を示したものをオレンジ、複製活性が見られなかったものを薄黄色で示す。図 1 同様に、複製活性に必要である領域は過去の解析より複製開始点であるとされていた領域 (図中黄色 box, ARS810, ARS811 と表記) とはオーバーラップしないことがわかる。

(5) ただし、この領域単独では複数コピー存在させても複製活性は現れず、複製活性出現のためには、1コピーのこの領域と1コピーの完全なCUP1領域を必要とすることがわかった。さらに、

(6) (4)で述べた領域内には出芽酵母複製開始点で通常観察され、複製開始活性の表出に必須であるACS (ARS consensus sequence)と呼ばれる高度に保存された配列が存在しておらず、驚いたことに、

(7) CUP1領域の複製活性はCUP1領域内へとin-frameで流れ込むCUP1の隣の遺伝子の存在と関連があり、

(8) この隣の因子はtransに供給しても効果を示すことが分かった。

以上の結果は、CUP1領域にはこれまでに見つかっていなかった完全に新規なタイプの複製開始点：すなわち、

(1) 出芽酵母で複製開始点機能に必須とされているACSを持たず、

(2) 2コピー以上のタンデムに配置された配列を必要とし、

(3) transに供給される通常の複製因子とは異なる因子をその機能発言に必要とする、

が存在することが本研究によって初めて明らかになったことを示している。

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 2 件)

① H Okimoto, S Tanaka, H Araki, E Ohashi, T Tsurimoto. (2016). Conserved interaction of Ctf18-RFC with DNA polymerase ϵ is critical for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells. Genes to Cells* 21 (5), 482-491. 査読あり
DOI: 10.1111/gtc.12356

② S Tanaka, M Miyazawa-Onami, T Iida, H Araki. (2015). iAID: an improved auxin-inducible degron system for the construction of a 'tight' conditional mutant in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 32 (8), 567-581. 査読あり
DOI: 10.1002/yea.3080

[学会発表] (計 15 件)

① 大浪 真由美、荒木 弘之、田中 誠司
Switch-like assembly of preinitiation

complex in the initiation of DNA replication. 第39回日本分子生物学会年会 横浜市 2016年11月30日.

② Seiji Tanaka, Mayumi Ohnami, Akari Hosoe, Hiroyuki Araki.

Interaction between the replication initiation factor Sld3 and the histone acetyltransferase Esa1 promotes the activation of subset of replication origins in budding yeast.

The 10th 3R Symposium (International Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair) 松江市 2016年11月15日.

③ 田中 誠司、大浪 真由美、細江 朱里、荒木 弘之.

真核細胞における染色体 DNA 複製開始反応とクロマチン制御因子の関わり 日本遺伝学会第88回大会 三島市 2016年9月7日

④ 大浪 真由美、荒木 弘之、田中 誠司.

複製開始反応における律速因子の高発現によるサイレンス化拮抗作用. BMB2015 神戸市 2015年12月3日

⑤ 大浪 真由美、荒木 弘之、田中 誠司.

Switch-like assembly of pre-initiation complex in the initiation of DNA replication. DNA複製・組換え・修復ワークショップ 焼津市 2015年10月21日

⑥ 大浪 真由美、荒木 弘之、田中 誠司.

染色体 DNA 複製開始反応における律速因子の高発現によるサイレンス化拮抗作用. 日本遺伝学会第87回大会 仙台市 2015年9月25日

⑦ Seiji Tanaka. Dissection of the initiation reaction of DNA replication in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Laboratory meeting: Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance 2015. Cold Spring Harbor, NY (USA) 2015年9月3日

⑧ Seiji Tanaka. Dissection of the initiation reaction of DNA replication by systematic chromatin immunoprecipitation. EMBO Conference: DNA replication, chromosome segregation and cell division. Royal Holloway, University of London, Egham, Surrey (UK) 2015年7月28日.

[図書] (計 1 件)

① Tanaka S, Araki H. (2015). Chapter 13 (pp 263-278). Role of CDK in replication initiation. in "The Initiation of DNA Replication in Eukaryotes to be published

by Springer”. Ed. Daniel L. Kaplan,
Springer. ISBN 978-3-319-24694-9.

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 誠司 (Tanaka Seiji)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教

研究者番号：50263314