

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06151

研究課題名(和文) DNA複製におけるポリメラーゼ群の協調的機能のゲノム科学的解析

研究課題名(英文) Genome-wide analysis of cooperative action among DNA polymerases

研究代表者

大学 保一(Daigaku, Yasukazu)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：80619875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物は10種類以上のDNAポリメラーゼを持つが、そのうち2種類が主にゲノム複製を担う。しかし、その他のDNAポリメラーゼは複製に必要とされながらも、どのようにゲノム複製に関与するかは明らかではない。本研究は、分裂酵母における解析により、誤りがちなDNAポリメラーゼPol^{II}が複製遅延領域のゲノム合成に関与し、その領域で突然変異が多い原因がPol^{II}によることを示した。また、多細胞生物におけるDNAポリメラーゼ間での協調的機能の解析に向けて、酵母にて開発されたDNAポリメラーゼをゲノム科学的に解析する実験法を線虫、ヒト培養細胞に応用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までに、ヒトを含めた多細胞生物では老化、がん化という細胞の変遷がゲノム情報の安定性へ影響することが示されてきた。がん細胞ではポリメラーゼ遺伝子に多くの変異が見つかるなど、その機能不全とがんにおけるゲノム不安定性との関連性が示唆され、同様に、老化した細胞においても複製ストレスを示すバイオマーカーが観察される。その過程でのDNA複製機構に起きる変遷を具体的に示す研究成果は乏しい状況であったが、本研究で開発された実験系を応用することにより、発がんや老化へ寄与する仕組みの解明へと大きく前進すると期待される。

研究成果の概要(英文)：There are more than 10 DNA polymerases encoded in eukaryotic cells and two polymerases (Pol^I and Pol^{III}) replicate the bulk of parental DNA. On the other hand, some of other polymerases are less processive but tolerant replication blockage. However, we know little about how activities of these DNA polymerases are coordinated during genome replication. We first tackled this issue in fission yeast using the experimental system to examine genome-wide usage of DNA polymerases (Pu-seq). We then applied this system to *C. elegans* and human culture cells to investigate flexibility in the mechanism of replication during change in cell identity such as differentiation and tumorigenesis.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：DNA複製 突然変異 DNAポリメラーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物では10種類以上のDNAポリメラーゼが同定されているが、それぞれのDNA合成反応の正確性は異なる (Lange et al. Nat Rev Cancer 11 96-110 2011). 現在までに、ゲノム複製に主に関わるポリメラーゼとして Pol ϵ (イプシロン) と Pol δ (デルタ) が「複製 Pol」として同定され (図1 A), その他のポリメラーゼは、DNA 損傷乗越え合成・修復での役割を持つとして別個に研究が行われてきた. しかし、DNA 損傷とは関わらず、染色体異常が起きやすい脆弱 (fragile) 部位などでの効率的な複製に、複製 Pol 以外のポリメラーゼ (Pol ζ :ゼータ, Pol η :イータ, Pol κ :カッパ, Pol θ :シータなど) が必要であることが近年示された (Boyer et al. J. Mol. Biol. 425 4767-81 2013). 研究開始当初までに、個別のポリメラーゼの生化学的な特徴は盛んに研究されてきたが、ゲノム複製における多くのポリメラーゼの協調的役割を示す研究は未だに成されていなかった. その点を追及するために、研究代表者は分裂酵母を用いて DNA ポリメラーゼの合成をゲノム上で網羅的に解析する実験系を開発し、複製 Pol (Pol ϵ , Pol δ) 機能の詳細なプロファイルから始めて (Daigaku et al Nat. Struct. Mol. Biol. 22 192-8 2015; 詳細は研究の方法に記述; Polymerase-usage: Pu-seq), 現在は多くのポリメラーゼを対象として、この実験系を応用する段階に至った.

また、ヒトを含めた多細胞生物では老化、がん化という細胞の変化がゲノム情報の安定性に影響を及ぼすことが示され、がん細胞でポリメラーゼ遺伝子に多くの変異が見つかるなど、ポリメラーゼの機能不全とがんにおけるゲノム不安定性との関連性が示唆された (図1 B). 同様に、老化した細胞においても複製ストレスを示すバイオマーカーが観察されていた. しかし、現在に至っても DNA 複製過程に起きる変化を具体的に示す研究成果は乏しく、個々の DNA ポリメラーゼ機能が発がんや老化へ寄与する仕組みの解明が期待されていた.

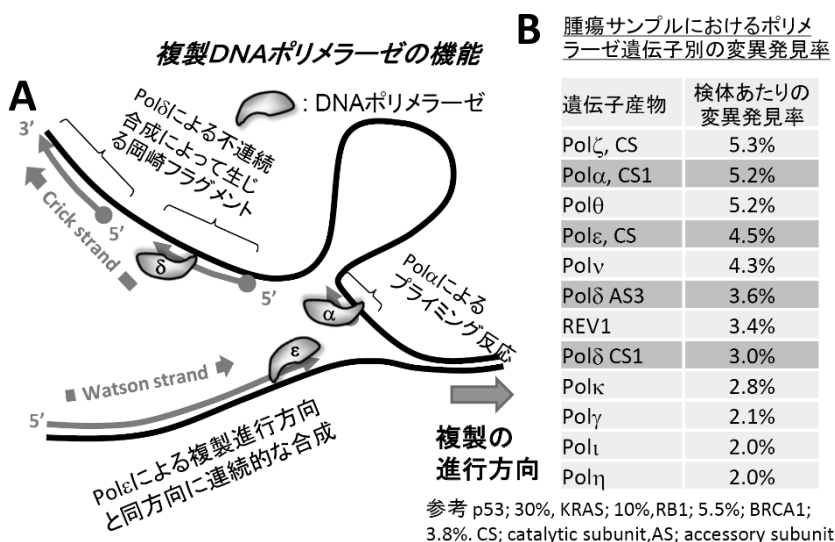


図1

(A) DNA複製フォークのモデル. DNA合成は必ず3'末端から伸長され、各々の新生DNAの姉妹鎖 (図中に Watson, Crick strand と表記) は連続的、または、非連続に合成される. (B) 腫瘍におけるDNAポリメラーゼ遺伝子の変異. 国際がんゲノムコンソーシアムのデータベースより転載.

2. 研究の目的

本研究では、第一に、分裂酵母において、複製 Pol に加えて、新規に多くのポリメラーゼを対象とした Pu-seq 実験の実施体制を整えた. 当初までの研究で示される通り、ゲノム複製への関与が示唆される Pol ζ , Pol η , Pol κ を新規に Pu-seq 実験の対象に加えた. 特に、ゲノム配列・構造上の特徴 (特殊な配列: 回文など, 二次構造, 高次のクロマチン構造: ヘテロクロマチン領域など) による位置特異的な合成を調べ、また、強力に発現する tRNA 遺伝子近傍における複製 Pol と転写装置の衝突や遺伝子上流域でのヌクレオソーム構造による DNA 合成への干渉を調べた. また、複製 Pol が他のポリメラーゼによってバックアップされる仕組みを明らかにするため、複製 Pol の機能が低下した状況で、もう一方の複製 Pol, Pol ζ , Pol η , Pol κ の機能を解析した (以下, (1)).

第二に、分裂酵母で構築される実験方法を応用し、がん化、老化に伴って DNA 複製機構がどのように変化するかを検証した. そのために、多細胞生物であり、かつ、遺伝学的な操作が容易である線虫 (*C. elegans*) を用いて、加齢の進行に伴って起きる個々の DNA ポリメラーゼの機能変化を観察した. また、同時に、上記の実験系をヒト細胞にも応用し、がん化した細胞における特徴的な DNA 複製の様式を同定する. 加齢の進行に伴って起きる個々の DNA ポリメラーゼの機能変化を観察するためには、DNA ポリメラーゼを直接制御する分子機構の解明が必要であるために、線虫において、DNA 上でポリメラーゼの足場となるタンパク質因子 PCNA の修飾が DNA ポリメラーゼ動態において果たす役割を解析した.

3. 研究の方法

(1), 分裂酵母を使用した DNA ポリメラーゼ動態解析

リボヌクレオチドを取り込む変異酵母株の作成- Pu-seq 実験では, Pol 活性部位を変異させリボヌクレオチド (rNMP) を高頻度で取り込む Pol をデザインし, 細胞内で発現させ, 対象となる Pol による合成を rNMP でマークする. よって, 実験の準備段階として, すでに構築した rNMP を取り込む変異 Pol ϵ , Pol δ の配列情報をもとに, 同様の Pol ζ , Pol η , Pol κ 遺伝子変異を特定し, cre-lox システムにより (Watson et al. Gene 407 63-74 2008), それらの変異 Pol 遺伝子を細胞内の野生型 Pol 遺伝子と置換した. その後, ゲノム DNA に取り込まれた rNMP の除去を抑制するため RNaseH2 をコードする遺伝子を欠損させ, それぞれの Pol 変異株のゲノム DNA 中への rNMP 取り込みを確認した.

Pol ζ , Pol η , Pol κ を対象とした Pu-seq の実施 - 得られた rNMP を取り込む変異 Pol 酵母株から DNA を抽出後, rNMP 部位をアルカリ処理により切断し, その DNA 断片より次世代シーケンサー解析用のライブラリ DNA を作成した. ハイスループット DNA 配列解析後, 各領域 (300bp) にアラインされる DNA 断片数から Pol 変異株における rNMP 取り込み量を算出し, 各領域の対象となる Pol による相対的合成量と成した.

(2), 線虫, ヒト細胞を使用した DNA 複製動態解析

分裂酵母, 同様, 線虫・ヒト細胞の実験においても, Pol ϵ (イプシロン) と Pol δ (デルタ) を対象として, rNMP を取り込む変異 Pol 遺伝子をゲノムに導入する必要がある, CRISPR-Cas9 による遺伝子導入法を用い, ヒト培養細胞, 線虫個体のゲノム改変を行った. その後, 線虫においては, RNAi, ヒト細胞においては, AID デグロンタグ法 (Nishimura et al. Nat Methods 6 917-22, 2009, Natsume et al. Cell rep. 2017) を使用し RNaseH2 を一時的に不活性化した. その条件下において, DNA を抽出後, 分裂酵母の場合と同様の方法で, 全ゲノムに渡る rNMP の取り込み量を解析し, ゲノム各領域 (1kb ごと) の DNA ポリメラーゼの使用度を算出した.

(3), 線虫における DNA 複製制御機構の解析

DNA 上でポリメラーゼの足場となるタンパク質因子 PCNA の修飾が DNA ポリメラーゼ動態において果たす役割を解析するため, PCNA が分子修飾をうける 165 番目のリジンがアルギニンに変異した線虫株を作成し, DNA ポリメラーゼ動態制御が線虫の生活環, および, 紫外線抵抗性に及ぼす影響を解析した.

4. 研究成果

(1), 分裂酵母を使用した DNA ポリメラーゼ動態解析

研究目的で挙げたポリメラーゼの中で, Pol ζ (ゼータ) を対象とした Pu-seq 実験を行う事に成功し, DNA 合成期 (S 期) の複製遅延領域において, Pol ζ が機能する確率が上昇することを示した. これらの結果から, DNA ポリメラーゼの使われ方がゲノム複製の進行と共に変化することを示し, ゲノム上の複製遅延領域に突然変異が多い原因が Pol ζ 機能によることを示すに至った.

(2), ヒト細胞, 線虫を使用した DNA 複製動態解析

HCT116 細胞株を使用し, ゲノム複製の大半を担う Pol δ (デルタ), Pol ϵ (イプシロン) の触媒サブユニットをコードする遺伝子 (POLD1, POLE1) へ, 単一のアミノ酸を置換する変異を導入する実験を実施した結果, POLE1 遺伝子の両遺伝子座への変異が導入された. POLD1 遺伝子座への変異導入頻度が低く, 単一遺伝子座へのみ変異が導入されたことは, 該当変異が POLD1 への機能を低減し, 変異導入された細胞の生存率に影響を及ぼしたためであると考えられた. よって, ヒト培養細胞においては, 作成した POLE1 変異体において, CRISPR-Cas9 システムを利用し, RNASEH2A の C 末端に aid タグを付加した. 得られた株を用いて, auxin 添加後に上記の通りリボヌクレオチドの取り込みを検証した. その結果, 経時的にリボヌクレオチドの蓄積が高まることが確認され, また, POLE1 変異体においてはリボヌクレオチドの取り込みがコントロール株よりも多いことが示された. その後, 次世代シーケンサーを利用し, ゲノム中に取り込まれた rNMP のマッピングにも成功し, ヒトのゲノムを網羅して Pol ϵ によるリーディング鎖合成が起きる領域を特定する実験系を確立した.

線虫において POLD1, POLE 遺伝子座へ, 単一のアミノ酸を置換する変異を導入する実験を実施した結果, 同様に, POLE1 遺伝子の両遺伝子座への変異が導入された. 得られた POLE1 変異線虫株の RNASEH2 を不活性化した結果, 非常に生育が悪くなり, Pu-seq 実験に十分な量の DNA を得るに至らず, 少量の DNA を使用し, ゲノム DNA 中でリボヌクレオチドのマッピングする方法を開発する必要があることが判明した.

(3), 線虫における DNA 複製制御機構の解析

CRISPR/Cas9 を使用したゲノム編集により, PCNA ユビキチン化部位に変異を導入し, 通常の DNA 複製は影響をうけず, DNA 損傷を乗り越える合成の誘導のみが阻害された線虫株を作成した. この変異線虫株に紫外線を照射し DNA 損傷形成を誘導した場合, 野生型に比べて, 発生初期の卵からの孵化, その後の幼生の発達がより顕著に阻害された. この結果から, 個体発生の一連の過程を通して, DNA 損傷乗り越え機構が機能していることが明らかになった (図 2A). また, DNA 損傷存在下で細胞周期を制御する DNA 損傷チェックポイントの機能が低下した状態で, PCNA のユビキチン化が起きない場合は, 正常な生殖細胞形成が行われないことも明らかにした. この結果は,

生殖細胞形成の前過程で活発に細胞が増殖するために、複製クランプのユビキチン化に依存した円滑なDNA複製が維持される必要があること示した。

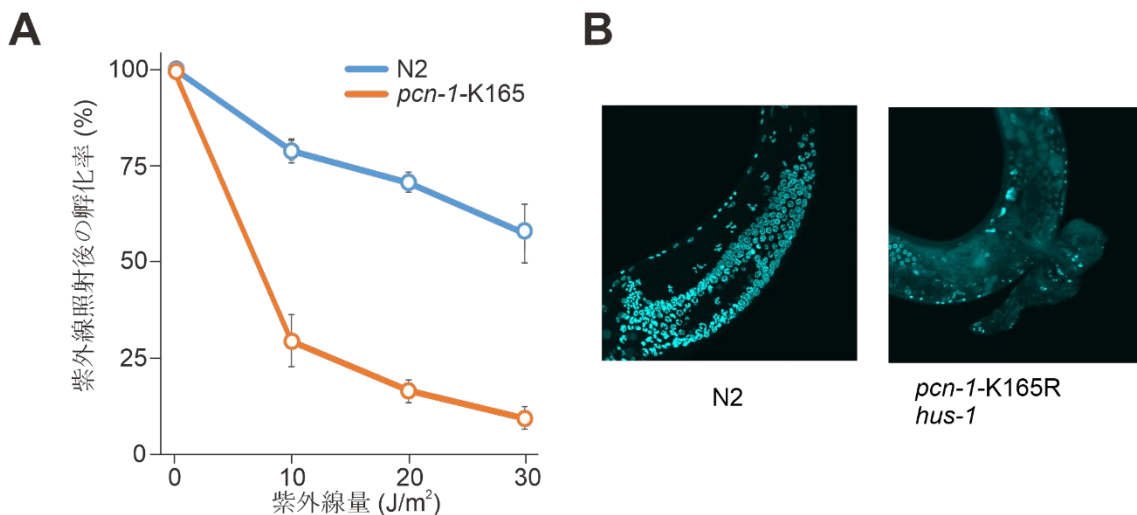


図 2

(A) 成虫である線虫に紫外線を照射し、その後、産み落とされた卵の孵化率. N2: 野生株, *pcn1-k165R*: PCNAのユビキチン部位が変異した株. (B) 線虫個体の生殖細胞形成部位の DNA を Hoechst® 33342 で染色後、顕微鏡観察をおこなった. 水色: DNA, *pcn1-k165R hus-1*: PCNAのユビキチン部位が変異し、DNA 損傷チェックポイントの機能が低下した線虫系統. この系統では、生殖細胞が形成されるべき領域で DNA が存在せず、生殖細胞が正常に形成されていない.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shao Zhenhua, Niwa Shinsuke, Higashitani Atsushi, Daigaku Yasukazu	4. 巻 82
2. 論文標題 Vital roles of PCNA K165 modification during <i>C. elegans</i> gametogenesis and embryogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 102688 ~ 102688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102688	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakazawa Yuka, Hara Yuichiro, Oka Yasuyoshi, Komine Okiru, van den Heuvel Diana, Guo Chaowan, Daigaku Yasukazu, (other 17 authors), Ogi Tomoo	4. 巻 180
2. 論文標題 Ubiquitination of DNA Damage-Stalled RNAPII Promotes Transcription-Coupled Repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1228 ~ 1244.e24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2020.02.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Garcia Rodriguez Nrstor, Morawska Magdalena, Wong Ronald P, Daigaku Yasukazu, Ulrich Helle D	4. 巻 37
2. 論文標題 Spatial separation between replisome and template induced replication stress signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e98369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.201798369	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Daigaku Yasukazu, Etheridge Thomas J., Nakazawa Yuka, Nakayama Mayumi, Watson Adam T., Miyabe Izumi, Ogi Tomoo, Osborne Mark A., Carr Antony M.	4. 巻 13
2. 論文標題 PCNA ubiquitylation ensures timely completion of unperturbed DNA replication in fission yeast	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1006789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 大学保一
2. 発表標題 ヒト細胞におけるDNA複製動態の柔軟さ, 危うさ
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasukazu Daigaku
2. 発表標題 Global usage of replicative DNA polymerase in human cells
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting "Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大学保一
2. 発表標題 ゲノム科学的視点から見るDNAポリメラーゼ機能の柔軟性
3. 学会等名 第41回分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasukazu Daigaku
2. 発表標題 DNA polymerase usage and mutagenesis
3. 学会等名 JSPS-DST Japan-India Forum for Advanced Study: Epigenetics and Human Disease（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大学保一
2. 発表標題 分裂酵母の複製フォークの動態から見る複製開始反応の確率的現象
3. 学会等名 日本遺伝学会第90回大会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大学保一
2. 発表標題 Usage of error prone DNA polymerase during genome replication
3. 学会等名 11th 3R+3C Symposium(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大学保一
2. 発表標題 突然変異を誘導するポリメラーゼ Pol のゲノム科学的解析
3. 学会等名 第192回酵母細胞研究会例会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大学保一
2. 発表標題 複製クランプのユビキチ化によるDNA複製機構のメンテナス
3. 学会等名 日本遺伝学会第88回大会 プレナリーワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大学保一
2. 発表標題 複製クランプPCNAの分子修飾のゲノム複製における役割
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yasukazu Daigaku
2. 発表標題 Variability in the usage of replicative polymerases during genome replication
3. 学会等名 ICGEB Conference "At the Intersection of DNA Replication and Genome Maintenance: from Mechanisms to Therapy" (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考