

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12595

研究課題名(和文) ヒト細胞のゲノム全体でDNA複製の全起点と終結点を解析する国際共同研究

研究課題名(英文) Genome-wide identification of DNA replication origin sequences in human cells

研究代表者

武田 俊一 (Takeda, Shunichi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60188191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：DNA複製は多数の複製起点から開始する。複製起点の場所はヒトでは不明である。本研究の目的は、複製起点全部をヒトTK6 Bリンパ細胞株で決定することにある。起点を境にDNA鎖のDNA合成は、リーディング鎖からラギング鎖合成に変わる。この変換点を決定することによって共同研究者(Prof. Tony Carr)は、酵母の複製起点を決定した。我々はこの手法を改変し、ヒト細胞に応用する手法を開発した。この手法を使いProf. Tony Carrが複製起点全部を実際に決定する予定である。

研究成果の概要(英文)：DNA replication is initiated from replication origin sequences in the genome. Although the locations of all origins have been identified in yeast species, the replication origins have not yet been mapped in the human genome. The aim of this research is to map all origin sequences in human cells, TK6 B cell line. DNA polymerases α and β ($\text{Pol } \alpha$ and $\text{Pol } \beta$) play roles in lagging-strand and leading-strand replication, respectively. Prof. Tony Carr (Sussex, UK) mapped all replication origins in the yeast genome by determining the exact locations of polymerase switching during lagging and leading strand replication. We had followed this method, which used the $\text{Pol } \alpha$ and $\text{Pol } \beta$ mutants that frequently mis-incorporates ribonucleotides. We then learned that such mutant polymerases are highly cytotoxic to human cells. We have established another method, and already sent mutant cells to a collaborator, Prof. Carr in Sussex, UK. They will map all replication origin sequences in the near future.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製 複製ポリメラーゼ 複製ポリメラーゼ 複製起点 シタラビン (Cytarabine) 変異

1. 研究開始当初の背景

変異の主要機構, 損傷乗越え DNA 合成の, 研究上の問題

ゲノム DNA には大量の損傷が発生する。損傷は複製 DNA ポリメラーゼ (Pol δ と Pol ϵ) による DNA 合成を停止する (図 1)。停止は、損傷乗越え DNA 合成 (以下に、損傷乗越えと略す) や相同組換えによって解除される。酵母では損傷乗越えが変異の最も主要な機構である。ニワトリ DT40 細胞では、損傷乗越え酵素, Rev1 がリーディング鎖の損傷乗越えを促進し、PCNA (Pol δ を複製フォークにつなぎ止める) のモノユビキチン化がラギング鎖の損傷乗越えを促進すると推定されている (Ref. *Mol Cell* 2008, PMID: 18498753)。ただし、この推定をニワトリやヒト細胞では検証しようがない。検証できない理由は、リーデ

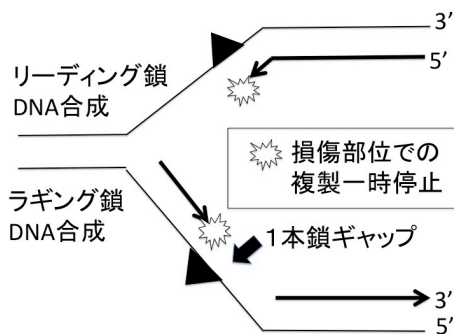


図 1 リーディング鎖 DNA 合成が損傷部位 (▲) で停止した場合には、すぐに停止を解除されないと複製フォークの進行が停止する。一方、ラギング鎖 DNA 合成が損傷部位で停止した結果できた 1 本鎖ギャップは、すぐに埋められなくても複製の進行には影響しない。複製停止は損傷乗越えと相同組換えによって解除される。解除の分子機構はリーディング鎖とラギング鎖で違うはずである。どう違うかは全く解明されていない。

ィング鎖とラギング鎖のそれぞれの DNA 合成を区別しながら、DNA 複製や複製停止、損傷乗越えを研究することが全くできないからである。本研究により複製フォークの進行方向が判れば、細胞に化学合成した DNA 損傷をノックインすることが可能になったが故に、変異の分子機構の解析が大きく進展する。

ヒト TK6 細胞株

ゲノム編集をヒト細胞で始めるとき、どの細胞株を親株として選択するかが非常に重要である。申請者は、TK6 B リンパ細胞株を選択し、既に 100 種類以上の遺伝子の改変を実施した。TK6 は、日本を含む OECD の諸国が工業化学物質や医薬品の発がん性 (= 変異原

性) を確認する様々なバイオアッセイに使うことを奨めている細胞株である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト細胞 (TK6) のゲノム全体で複製起点を決定することにある。

3. 研究の方法

酵母で成功した実験手法

T. Carr 博士 (英国・サセックス大学、ゲノム研究所長) は、分裂酵母のゲノム全体で複製起点と終結点を決定した。T. Carr 博士が実施した実験は、Pol δ と Pol ϵ が DNA 合成中にリボヌクレオチド (rNTP) を入れるように、それぞれの酵素に点変異を挿入したことである (点変異を挿入された酵素を Pol δ mt, Pol ϵ mt と呼ぶ, 図 2)。そして、リボヌクレオチド, rNMP が入った鎖をゲノム全体において決定した。

決定の手法であるが、細胞から精製した DNA 鎖のなかの rNMP が挿入されたサイトは、アルカリ処理によって切れやすいことを利用した。アルカリ処理によって断片化した DNA 鎖をその切断サイトからディープシーケンシングすれば、ワトソン鎖とクリック鎖のどちらがリーディング鎖もしくはラギング鎖合成されたかが解る。すなわち Pol ϵ mt 細胞においてディープシーケンシングされる鎖はリーディング鎖合成された DNA 鎖であり、Pol δ mt 細胞においてディープシーケンシングされる鎖はラギング鎖合成された DNA 鎖であると結論できる。Crick 鎖を 5' から 3' の方向に調べた時に、リーディング鎖合成の鋳型であった DNA 鎖が急にラギング鎖合成されるように転換した部位が複製起点である。この転換点をゲノム全体で解析することによって、どこが複製起点かを決定できる (図 3)。

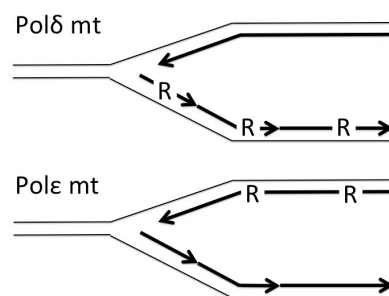


図 2 Pol δ はラギング鎖合成を行い、Pol ϵ はリーディング鎖合成を行う。したがって rNMP を取込みやすい変異 Pol δ を発現した細胞 (Pol δ mt 細胞) は、ラギング鎖にリボヌクレオチド (R) を大量に挿入する。一方、変異 Pol ϵ を発現した細胞 (Pol ϵ mt 細胞) は、リーディング鎖にリボヌクレオチド (R) を大量に挿入する。

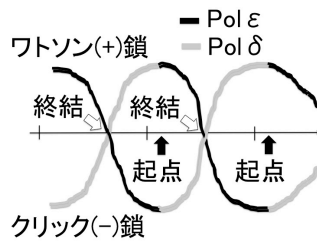


図3 複製起点の決定方法、横軸はゲノムDNA、縦軸は挿入されたリボヌクレオチド(R)の相対頻度を示す。実線は *Pol ε mt* 細胞(図2下)での相対頻度、灰色線は *Pol δ mt* 細胞での相対頻度を示す。*Pol δ* がリボヌクレオチド(R)を挿入した鎖から *Pol ε* がリボヌクレオチド(R)を挿入した鎖への転換点、複製起点に相当する。

4. 研究成果

酵母で成功した実験手法をヒト細胞に応用したが、*Pol δ mt* 細胞や *Pol ε mt* 細胞を樹立できなかった

DNA鎖のなかに挿入された rNMP は、RNaseH2によりすぐに除去される。除去を防ぐために、酵母の複製起点決定実験では RNaseH2 遺伝子破壊株 (*RNaseH2 Δ* 株) から *Pol δ mt* 細胞や *Pol ε mt* 細胞が樹立された (*Pol δ mt/RNaseH2 Δ* 株と *Pol ε mt/RNaseH2 Δ* 株と呼ぶ)。我々は、*RNaseH2 Δ* TK6 株を樹立した。さらに試薬(オーキシン)を培地に添加することにより RNaseH2 酵素を迅速に除去できる *RNaseH2* 条件変異 TK6 株も創った。

次に、我々は *Pol δ mt* TK6 細胞と *Pol ε mt* TK6 細胞の樹立を試みた。しかし我々も英国側 (Prof. Tony Carr) も樹立に失敗した。この失敗と *RNaseH2 Δ* TK6 株の増殖が非常に遅いという事実から、ヒト細胞では rNMP を高密度にゲノム全体に取込ませるのは無理と判断した。そこで rNMP 類似物質を高密度にゲノムの一部だけに取込ませる新手法を考案した(次章)。

抗がん剤、シタラビン(Ara-C)に一過性に大量曝露する、新しい実験手法

我々は、校正機能を無くした複製 DNA ポリメラーゼ (*Pol δ* 校正(-)と *Pol ε* 校正(-))は Ara-C を大量にゲノムのなかに取込むことを見出した(主な発表論文1, 次章で説明)。そして Ara-C に短時間(例, 10分)に大量曝露することにより、Ara-C の細胞毒性を抑制しながら特定のゲノム DNA のみに(ゲノム全体ではなく) Ara-C を高密度に取込ませることができると確認した。ゲノム DNA のなかに取込まれた Ara-CMP は、ゲノム DNA のなかに取込まれた rNMP と同様に、アルカリ処理によって切れやすい。ゆえに *Pol δ* 校正(-)TK6 細胞と *Pol ε* 校正(-)TK6 細胞を準備して、ラギング鎖とリーディング鎖にそれぞれ特異的に Ara-CMP を取込ませ、図3の手法によってどこが複製起点かを決定できる。具体的な方法は、Ara-CMP を取込ませた部位をアルカリ処理で切断し、切断された DNA 鎖断片を切断サイトからディープシーケンシングするのである。

精製 *Pol ε* 校正(-)は、シタラビン(Ara-C)を効率的に取込みかつさらに DNA 伸長できる

我々は、九大理・釣本教授と共同しヒト *Pol ε* ホロ酵素(野生型および校正機能欠損型)を精製した。校正機能欠損型は、Ara-CTP を野生型よりも効率よく取込むことを確認した(図4)。この知見から 野生型は、一旦取込んだプライマー3' 端の Ara-CMP のほとんどを校正ヌクレアーゼが除去すると結論した。

図4 Ara-CTP の取込み効率 A に示したプライマーと鋳型鎖に精製 *Pol ε* ホロ酵素と dCTP もしくは Ara-CTP を加えた。プライマー5' 末には ³²P ラベルが入っている。B は酵素反応の生成物を電気泳動→オートラジオグラフィーで調べたものである。S はプライマー、P は生成物(プライマーが1塩基伸長)を示す。C の縦軸は生成物の量を示す。WT は野生型 *Pol ε*、' exo-' は校正機能欠損型 *Pol ε* を示す。0.01μM の Ara-CTP を加えた場合の方が1μM の dCTP を加えた場合よりも多くの生成物ができていることが分かる。

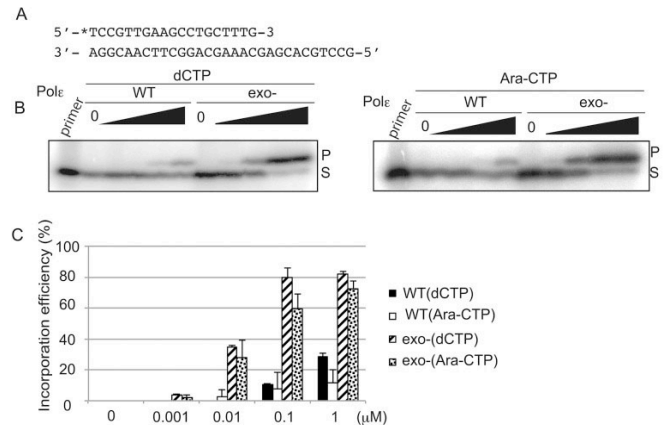


図4 Ara-CTP の取込み効率 A に示したプライマーと鋳型鎖に精製 *Pol ε* ホロ酵素と dCTP もしくは Ara-CTP を加えた。プライマー5' 末には ³²P ラベルが入っている。B は酵素反応の生成物を電気泳動→オートラジオグラフィーで調べたものである。S はプライマー、P は生成物(プライマーが1塩基伸長)を示す。C の縦軸は生成物の量を示す。WT は野生型 *Pol ε*、' exo-' は校正機能欠損型 *Pol ε* を示す。0.01μM の Ara-CTP を加えた場合の方が1μM の dCTP を加えた場合よりも多くの生成物ができていることが分かる。

次にプライマー3' 端に Ara-CMP を取込んだ後にさらに DNA 合成を継続できるか否かを解析した。この解析の為に、プライマー3' 端に Ara-CMP を付けたプライマーを準備した。そして精製ヒト *Pol ε* ホロ酵素(野生型および校正機能欠損型)が3' 端 Ara-CMP の次の塩基(チミン)を取込む(DNA 鎖伸長)することができるか否かを解析した。その結果、校正機能欠損型 *Pol ε* ホロ酵素が DNA 鎖伸長することを確認した(図5)。以上の実験結果から、校正機能欠損型 *Pol ε* は野生型 *Pol ε* に比べて10倍以上高い頻度でリーディング鎖特異的に Ara-CMP を取込ませることができると結論した。したがって、*Pol ε* 校正(-)TK6 細胞を

高濃度シタラビンに一過性に曝露することによってリーディング鎖合成された DNA を同定できる。

D

5' - *TCCGTTGAAGCCTGCTTTGC - 3'
 3' - AGGCAACTTCGGACGAAACGAGCACGTCGC - 5'
 5' - *TCCGTTGAAGCCTGCTTTG (Ara-CMP) - 3'
 3' - AGGCAACTTCGGACGAAACGAGCACGTCGC - 5'

E

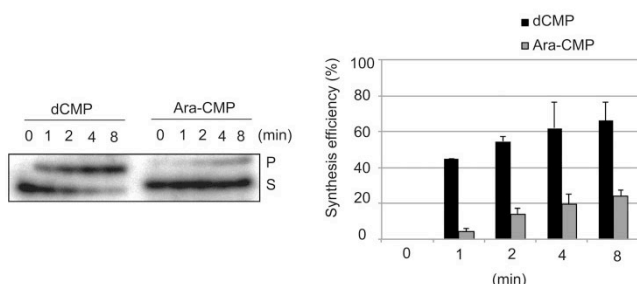


図5 プライマー3' 末の Ara-CMP からのプライマー鎖伸長の効率 D に示した 2 種類のプライマーと鋳型鎖に校正機能欠損型 Pol ε ホロ酵素と TTP を加えた。プライマー5' 末には³²P ラベルが入っており、3' 末には dCMP もしくは Ara-CMP が付いている。E の左は酵素反応の生成物を電気泳動→オートラジオグラフィーで調べたものである。S はプライマー、P は生成物(プライマーが 1 塩基伸長)を示す。E の右図の縦軸は生成物の量を示す。WT は野生型 Pol ε, 'exo-' は校正機能欠損型 Pol ε を示す。反応開始 1 分後の、Ara-CMP からの伸長効率は dCMP からの伸長効率より 1 桁少ない。

以上の実験結果から複製起点をゲノムワイドに決定できる実験手法を樹立したと結論した。

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)

1. Tsuda M, Terada K, Ooka M, Kobayashi K, Sasanuma H, Fujisawa R, Tsurimoto T, Yamamoto J, Iwai S, Kadoda K, Akagawa R, Huang SN, Pommier Y, Sale JE, Takeda S, Hirota K. (2017) The dominant role of proofreading exonuclease activity of replicative polymerase ε in cellular tolerance to cytarabine (Ara-C). *Oncotarget* 8 (20): 33457-33474. 査読有
DOI: 10.18632/oncotarget.16508

[学会発表] (計 3 件)

1. Mohiuddin, Evans TJ, Takeda S: "SUMO E3 ligases PIAS1 and PIAS4 facilitate template switching by enhancing SUMOylation of PCNA", Abcam

Mechanisms of Recombination 2016, Hotel Melia Alicante, Alicante, Spain, 5/16-20, 2016.

2. Hirota K, Tsuda M, Sale J, Takeda S: "In vivo evidence for translation synthesis by the replicative DNA polymerase delta", DNA Polymerases Meeting, Hotel Sofitel Le Miramar Thalassa, Biarritz, France, 10/4-8, 2016.
3. Hirota K, Tsuda M, Sale J, Takeda S: "In vivo evidence for translesion synthesis by the replicative DNA polymerase δ", The 10th 3R Symposium, Hotel Ichibata, Matsue, Japan, 11/13-17, 2016.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 俊一 (TAKEDA, Shunichi)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 60188191