

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18207013

研究課題名（和文） 微生物における遺伝子増幅の機構とその機能

研究課題名（英文） Mechanism of gene amplification and its function in microorganisms

研究代表者

堀内 嵩 (HORIUCHI TAKASHI)

基礎生物学研究所・ゲノム動態研究部門・教授

研究者番号：60108644

研究成果の概要：生物界での代表的な 2 種類の遺伝子増幅機構（一つはリボソーム RNA 遺伝子（rDNA）、他はガン遺伝子）について、前者は既に増幅機構を明らかにしているため、ここでは増幅された多コピー遺伝子の維持機構について、後者については増幅機構について出芽酵母を用いて明らかにした。さらに遺伝子増幅の遺伝子進化への関与の可能性を探るため、大腸菌を用いてマイクロ遺伝子進化系を確立して調べたところ、遺伝子増幅以外に、集団内で複数の変異（挿入配列の挿入や点突然変異）が独立して起こり、その間での増殖速度の競争と選択が起こることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	13,100,000	3,930,000	17,030,000
2007年度	12,200,000	3,660,000	15,860,000
2008年度	12,600,000	3,780,000	16,380,000
年度			
年度			
総計	37,900,000	11,370,000	49,270,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：遺伝子情報複製・転写装置・再編・制御

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子増幅は多くの生物現象（薬剤抵抗性獲得・特異的遺伝子産物増産・がん悪性化）に関わっているものの、その機構は殆ど未解決であった。特に、一般的な遺伝子増幅として、リボソーム RNA 遺伝子（rDNA と呼ぶ）とガン遺伝子タイプ遺伝子増幅が知られている。共にごく最近までどちらの増幅機構も不明のままであったが、我々は前者については、1998 年にその突破口を開き、rDNA の増幅の分子機構を解明したが、(1) rDNA 遺伝子の多コピー維持機構が問題として残された。さら

に(2)ガン遺伝子の増幅機構は全く未解明のまま残されていた。また(3)遺伝子増幅と遺伝子進化の関係も、これまで理論的には推察されていたが、実験的に試みた例は殆どいなかった。

### 2. 研究の目的

(1) 真核生物の rDNA は、多コピー存在する。しかもそのコピー数は増減を繰り返している。この多コピーがどのように維持されているか全く不明のままだった。この多コピー維持機構を明らかにすることで、多コピーの生

理的意味、また rDNA 領域に付随する特質を明らかに出来る可能性があることからこの問題に取り組んだ。

(2) ガン遺伝子の増幅は、がんの悪性化の原因であることは、ほぼ間違いない。それ故、この機構が明らかになれば、ガン悪性化の抑制への路が開けることになり、医学的にも大きな意味を持つ。さらに、この遺伝子増幅系は、近年爆発的に開発されつつあるタンパク性治療薬の生産方法であるため、この増幅の効率化は、焦眉の問題である。このように基礎的、医学的、工業的に意味のある機構を明らかにすることは大いに勇気づけられるテーマである。

(3) 遺伝子進化は大変興味有る問題である。遺伝子はどのように進化するのか？について、理論的には様々な議論がなされているものの、実験的にはそれほど取り組まれていない。我々は、大腸菌を用い、K12 株が有しないキシリトール資化能力を獲得するマイクロ進化実験系を確立した。この系を用いて、連続培養を行い、キシリトール資化能力を獲得したクローンの出現パターン、ゲノムの変異同定等を解析することで、マイクロ進化の実態を明らかにしたい。

### 3. 研究の方法

(1) rDNA の多コピー維持機構の解明に関しては、出芽酵母を用いて、多コピー維持不能な変異株を分離解析する手法を採用した。コンデンシン変異株は、ある程度の rDNA のコピー数は維持可能である。そのため、この変異株に、コンデンシン遺伝子を有するプラスミドを導入しておいても、この変異株の生存は、コンデンシンプラスミドに依存しない。しかし、これに加えコピー数維持機能を有する遺伝子にさらに変異が入ると、その変異株の生存はコンデンシンプラスミドに依存する。プラスミドへの依存度をコロニーの色で区別できる手法を用いることで、rDNA 多コピー維持に関わる変異株を多数分離し、その遺伝子を同定し、それを解析した。(2) これも出芽酵母を用いて、デザインした増幅モデル系を構築し、それを用いて得られた増幅産物と自然の増幅産物を比較することで増幅機構を解明しようとした。増幅モデルとしては、ダブルローリングサークル複製を採用し、この複製の誘導には Cre-lox 系を用いた。

(3) 遺伝子進化実験は、大腸菌を用い、先人のプラスコ内で人工進化系を用いた。この系は、大腸菌 C 株は、糖アルコールであるリビトールやアラビトールを資化する遺伝子群を有するが、K12 株はそれらを持たない。また、リビトール・アラビトール解糖系は、それらの変異によってキシリトールを資化可能に変化する。そこで、C 株あるいは、リビトール・アラビトール資化遺伝子群と移した

K12 株を作成して、キシリトール資化可能株への変化を、連続培養法を用いて解析した。具体的には、最初は、どちらの株もキシリトール培地で生育しないが、徐々に生育を示す培地の濁りが始まり、徐々にその濁りのスピードが増してくる。一定時間毎にサンプリングを行い、そのゲノムの変化を追うことで、その変化の変遷を追跡する。

## 4. 研究成果

### (1) rDNA のコピー数維持機構の解明

酵母の rDNA の多コピー構造が維持不能な変異株を多数分離し、その変異した遺伝子を同定した。その結果、ゲノムの凝縮に必須であるコンデンシン(複合体)と呼ばれるタンパク群が複数同定出来た。このことはコンデンシンが多コピー構造の維持に必須であることを意味する。

次にこれらの内一つのコンデンシン変異株を利用して、さらに他の変異が加わると、よりコピー数が減少する変異株を多数分離し、その変異遺伝子を決定したところ、4 種類の遺伝子 (*FOB1*, *TOF2*, *CSM1*, *LRS4*) を同定した。これらの変異株と rDNA のコピー数との関係を解析したところ、コンデンシン複合体は、これら 4 つのタンパクによって、rDNA リピートの RFB と呼ばれる複製フォーク阻害点にリクルートされること、それには順序があり、コンデンシンに、まず *CSM1* と *LRS4* が結合し、次に *TOF1* が付き、それらが、RFB サイトに結合した *FOB1* タンパクにリクルートされることが判明した。コンデンシンはゲノムを収縮するため、ゲノムへリクルートされる必要があるが、コンデンシン特異的なリクルートタンパクの同定はこれが最初の例である。

### (2) ガン遺伝子増幅機構の解明

ガン遺伝子や薬剤耐性遺伝子は、rDNA と異なる増幅方法を探ることは明らかだったが、これまでその分子機構は不明であった。特にガン遺伝子が増幅によりガンの悪性化が起こることはよく知られており、その機構解明は医学的に大きな意味を持つことから、これまで人的資金的な投入にも関わらず不明のまま残された大きな問題であった。

我々はまず実験操作や解析が容易な酵母を材料に、増幅がダブルローリングサークル複製 (DRCR) によって起こるとの仮説に立ち、まず DRCR を誘導させる系を構築し、その増幅から得られる産物の構造と自然に得られる産物の構造を比較検討することで、増幅機構を明らかにするこれまで誰も採用したことの無い方法を採用した。

最初、酵母の HO エンドヌクレアーゼを誘導することで、DRCR を誘導することに成功したが、頻度が低いのが難点だった。今回は、動植物でも採用される Cre-lox 組換え系を

用いて DRCCR を効率よく誘導することに成功し、その産物を詳細に解析することが出来た。その結果、2 種類の増幅産物 (HSR と DMs) が得られ、それらは動物細胞で得られる産物に驚くほど酷似していた。そこで、同じ系を、動物培養細胞 (CHO) のゲノム上に構築し、調べたところ、CHO では酵母の 2 種類 (HSR と DMs) に加え分散型の産物が得られた。後者はガン細胞でよく観察される増幅タイプである。

以上のことから、自然の増幅系は、我々の Cre-lox 系の増幅系と酷似した機構であることが強く示唆された。その後、Cre-lox 組換えで起こる反応は、短かな lox 配列を、長い相同配列に置き換えることにより、同じ増幅が起こることが推察され、実際 4 本の相同配列 (→←→←) の構造 (これを FAIR と呼ぶ) がゲノム上にあると、自然に DRCCR が起こり、2 種類の増幅産物 (HSR と DMs) が得られることが酵母を用いて証明出来た。

その結果、ガン遺伝子の増幅機構の分子機構を解明することができた。動物細胞を用いて最終的な確認を現在行っている。

### (3) 実験的遺伝子進化実験

大腸菌を用いて、マイクロ進化実験を行った。実験方法は、上述した通りであり、1 回の実験におよそ 1 ヶ月～2 ヶ月かけた。およそ 1 週間から 10 日ほどすると、キシリトール資化菌が生じることで濁りだし、その増殖速度が徐々に上昇していく。ある濁度に達したら、希釈することで、連続的な培養を継続する。経時的にサンプリングし、それを用いて、PCR および変化した塩基を配列決定する。

まとめると以下ようになる。

(1)一つの培養液内においても、独立した複製数の変化が起きる。(2)変化は、IS の挿入、変異、増幅が起こる。(3)C 株は点変異が起き、K12 株は IS の挿入が優勢である。(4) *rtIA* 遺伝子発現のリプレッサー *rtIC* に挿入される IS は多様であり、選択により生育の早いものが生き残ると予想される。( *rtIC* の破壊により、*rtIA* の発現が増加し、本来の基質でないキシリトールをも資化し始める) (5)系により異なるクローンが選択される。(6)少なくともこの期間では、変化が継続している。(7)IS の転移が、菌がキシリトール培地に植えられると、活性化される可能性がある。

小さな培地において、ゲノムに予想以上の変化が起こり、生育の競争が起こり、選択されるクローンが次々変わる様は、少し大げさに言うと一つの宇宙をみているようだった。

### 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 8 件)

- (1) Johzuka and Horiuchi (2009) *Mol Cell* 34, 26-35. (査読有り)
- (2) Johzuka and Horiuchi (2007) *Genes Cells* 12, 759-771.(査読有り)
- (3) Ganlay and Kobayashi (2007) *Genome Research* 17, 184-191.(査読有り)
- (4) Cui, T., Moro-oka, N., Ohsumi, K., Kodama, K., Ohshima, T., Ogasawara, N., Mori, H., Wanner, B., Niki, H., and Horiuchi, T. *EMBO Rep* 8, 181-187. (2007)(査読有り)
- (5) Inagaki, S., Suzuki, T., Ohto, M., Urawa, H., Horiuchi, T., Nakamura, K., and Morikamid, A. (2006) *Plant Cell* 18, 879-892.(査読有り)
- (6) Johzuka, K., Terasawa, M., Ogawa, H., Ogawa, T., and Horiuchi, H. (2006) *Mol Cell Biol* 26, 2226-2236.(査読有り)
- (7) Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T. Wanner, B. L., Mori H., and Horiuchi, T. (2006) *Mol Systems Biol* doi:10.1038/msb.100049:E1-E5 (査読有り)
- (8) Riley, M., Abe, T., Arnaud, M. B., Berlyn, M. K., Blattner, F. R., Chaudhuri, R. R., Glasner, J. D., Horiuchi, T., Keseler, I. M., Kosuge, T., Mori, H., Perna, N. T., Plunkett III, G., Rudd, K. E., Serres, M. H., Thomas, G. H., Thomson, N. R., Wishart, D., and Wanner, B. L. (2006) *Nucleic Acids Res.* (2006) 34, 1-9. (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

- ①板津昌子、堀内 嵩、定塚勝樹「対数増殖期と減数分裂期における rDNA とセントロメア領域を中心としたコンデンシンの局在変化」第 31 回 分子生物学会年会 2008 年 12 月 9 日～12 日 (横浜)
- ②定塚勝樹、堀内 嵩「コンデンシン結合のシス配列とその結合の分子機構」第 31 回分子生物学会年会 2008 年 12 月 9 日～12 日(横浜)
- ③岡本治子、渡邊孝明、堀内 嵩「Gene amplification can be induced under the excessive silencing by the over expression of Sir2p and Sir3p in *Saccharomyces cerevisiae*」第 31 回 分子生物学会年会 2008 年 12 月 9 日～12 日 (横浜)
- ④定塚勝樹、堀内 嵩「コンデンシンが結合するシス配列とその結合の分子機構」遺伝学会 80 回大会 2008 年 9 月 3 日～5 日 (名古屋)
- ⑤諸岡直樹、崔泰林、堀内 嵩「大腸菌線状ゲノム分配の観察」遺伝学会 80 回大会 2008 年 9 月 3 日～5 日 (名古屋)
- ⑥児玉頭一、堀内 嵩「キシリトール資化能

力を指標とした大腸菌 K12 を用いたマイクロ進化実験」遺伝学会 80 回大会 2008 年 9 月 3 日～5 日 (名古屋)

⑦渡邊孝明、堀内 嵩「誘導可能な新規遺伝子増幅系の開発」遺伝学会 80 回大会 2008 年 9 月 3 日～5 日 (名古屋)

⑧渡邊孝明、堀内 嵩「Cre-lox を利用した出芽酵母による新規遺伝子増幅系の開発」第 30 回日本分子生物学会年会 2007 年 12 月 11 日～15 日 (神戸)

⑨定塚勝樹、堀内 嵩「酵母コンデンシンと rDNA リピートにある複製フォーク停止部位 (RFB) との結合機構」第 30 回日本分子生物学会年会 2007 年 12 月 11 日～15 日 (神戸)

⑩児玉頭一、堀内 嵩「キシリトール資化能力を獲得する大腸菌 K12 株を用いたマイクロ進化実験の試み」遺伝学会 79 回大会 2006 年 9 月 19 日～21 日 (岡山)

⑪定塚勝樹、堀内 嵩「Keep the condensin association site our of the RNA polymerase I transcription zone: a novel task of replication fork barrier to maintain long rDNA repeat securely」第 29 回分子生物学会年会 2006 年 6 月 18 日～23 日 (京都)

⑫芹澤直美、堀内 嵩、小林武彦「Transcription-mediated hyper-recombination in *HOT1*」第 29 回分子生物学会年会 2006 年 6 月 18 日～23 日 (京都)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 遺伝子増幅

発明者: 堀内 嵩、渡邊孝明

権利者: 大学共同利用法人 自然科学研究機構

種類: 特許権

国内出願番号: 2005-338119

国外出願番号: PCT/JP2006/314168

国内出願年月日: 平成 17 年 1 月 24 日

国外出願年月日: 平成 18 年 7 月 18 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀内 嵩 (HORIUCHI TAKASHI)

基礎生物学研究所・ゲノム動態研究部門・教授

研究者番号: 60108644

### (2) 研究分担者

定塚 勝樹 (JOHZUKA KATUKI)

基礎生物学研究所・ゲノム動態研究部門・助教

研究者番号: 40291893

渡邊 孝明 (WATANABE TAKAAKI)

基礎生物学研究所・ゲノム動態研究部門・助教

研究者番号: 20421365

(H20)

小林武彦 (KOBAYASHI TAKEHIKO)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究部門・教授

研究者番号: 40270475

(H18→H19)