

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03233

研究課題名(和文) DNAポリメラーゼ動態から成る遺伝情報の安定性

研究課題名(英文) DNA polymerase dynamics and genome stability

研究代表者

大学 保一 (DAIGAKU, Yasukazu)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 がんゲノム動態プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：80619875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物は15種類のDNAポリメラーゼを持つが、その中でも、Pol α (ゼータ)は自然突然変異の主な原因であり、遺伝情報の安定性とDNAポリメラーゼ機能との関連を論じる上で重要な分子である。Pol α はPol α とサブユニットを共有し、細胞内でのPol α の状態がPol α の機能に大きく影響すると考えられる。本研究では、分裂酵母を使用して、Pol α のサブユニットの核内での動態がPol α の機能に及ぼす影響を明らかにすることを試みた。その結果、DNA損傷に応答した機能として、Pol α のサブユニットの1つであるCdc1因子の細胞内での量に応じてDNAポリメラーゼの機能が制御されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、分裂酵母を中心的に使用し、突然変異の主な原因となるポリメラーゼの制御を明らかにすることを目的とした。今後、哺乳類細胞を対象とした研究へと発展させることにより、がん細胞における突然変異率の上昇の原因究明に貢献することが大いに期待される。また、この研究をモデルとして、その他の多くのDNAポリメラーゼを対象に加えた研究へと発展させ、多種多様なDNAポリメラーゼが協調的に機能する仕組みが明らかになると期待される。

研究成果の概要(英文)：There are 15 different DNA polymerases in eukaryotes and the fidelity and efficiency of their synthetic activities are distinct. The correct division of labour among these polymerases is therefore a primary factor in determining the stability of genome duplication. Among these DNA polymerases, polymerase α (Pol α) was previously identified to be the main cause of spontaneous mutagenesis and share subunits with Polymerase α (Pol α), which is responsible for lagging strand DNA synthesis. In this study, we investigated how the function of Pol α is regulated by subunits of Pol α . We discovered that, in the context of DNA damage tolerance, the abundance of Cdc1 (one of the Pol α subunits) is the key factor to activate Pol α . We also observed that the relative amount of Cdc1 to the Pol α catalytic subunit Cdc6 are increased in G2 phase. This trend in the protein level of Cdc1 may lead to high Pol α activity in G2 phase and mutagenesis by this polymerase.

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

1. 研究開始当初の背景

細胞は分裂する際、ゲノム情報の担体である DNA を迅速かつ正確に複製する必要があるが、DNA 複製のエラーは一定の頻度で生じ、突然変異として遺伝情報に記録される。従って、DNA 鎖合成を行う DNA ポリメラーゼの機能は、遺伝情報の複製の正確性に大きく影響し、突然変異生成と密接に関わる。ほとんどのゲノム DNA は細胞内で最も正確性の高い 2 種の「複製ポリメラーゼ」Pol ϵ (イプシロン) Pol δ (デルタ) により複製され、その他の多くのポリメラーゼは、DNA 損傷乗越え合成・修復の過程で役割を持つとして研究されてきた。我々は、DNA 複製因子の翻訳後修飾とともに、細胞周期のタイミングに応じ複数の DNA ポリメラーゼが使用されることを発表した^{1, 2}。また、ゲノムが大きなヒト細胞においては、DNA 合成が遅れて起きる領域や異常が生じ易い染色体の脆弱部位 (fragile site) などにおいて、複製ポリメラーゼ以外のポリメラーゼも効率的なゲノム複製に必要とされることが示された³。

遺伝情報の安定性と DNA ポリメラーゼ機能との関連性を論じる上で、研究代表者が特に着目した分子は、その発見以来、突然変異の主な原因となることが示されてきた Pol ζ (ゼータ) である⁴。現在まで、Pol ζ は誤りがちな DNA ポリメラーゼとして DNA 損傷や配列による 2 次構造など、DNA 合成が阻害される領域でのみ機能すると考えられていた。しかし、最近の自身の細胞内因子の分子生物学的解析や、他のグループの再構築された複製装置の 1 分子解析から、複製ポリメラーゼは DNA 複製装置に常に結合してはならず、自律的に機能することが示された。このような状況下では、Pol ζ を含む複製装置と相互作用しない DNA ポリメラーゼもゲノム複製に関与すると考えられる^{2, 5}。特に、Pol ζ は、自然突然変異の主な原因であり、染色体異常を抑制することから、ゲノム安定性に深く関与する仕組みを持つと考えられる。その分子メカニズムを明らかにすることは、突然変異の生成機序の解明であり、分子生物学的に大きな意義のある課題であると同時に、生物進化、基礎医学の分野にも大きなインパクトを与える研究となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、Pol ζ の機能が核内環境・染色体構造や特定の複製因子の量や分子構造によって制御される仕組みを明らかにし、DNA ポリメラーゼの分業と遺伝情報の安定性の関連を明らかにすることを目的とする。我々は現在までに、分裂酵母やヒト培養細胞において、任意の DNA ポリメラーゼの合成領域を全ゲノムに渡り同定する実験技術 Polymerase-usage sequencing (Pu-seq) を確立している。この実験技術や顕微鏡観察を駆使し、誤りがちな DNA ポリメラーゼ Pol ζ がどのように複製ポリメラーゼと関わり合いつつ、ゲノム複製に関与するかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は、分裂酵母を使用して、Pol ζ がゲノム複製に関わるメカニズムを明らかにする。まず、Pol ζ と Pol δ の各コンポーネントの核内での動態を明らかにする。具体的には、Pol ζ と Pol δ の触媒サブユニット (それぞれ Cdc6、Rev3) 両者がコンポーネントとする非触媒サブユニット (Cdc1、Cdc27) のゲノム上の局在を明らかにし、Pol ζ と Rev3-Cdc1-Cdc27 の複合体が形成しやすい領域を予測する。同時に、Pol ζ を対象とした Pu-seq 実験を実施し、Pol ζ による合成領域を同定する。これらの両課題の結果を比較し、Pol ζ の機能制御における、ポリメラーゼサブユニット間の量比、相互作用の役割を明らかにする。加えて、細胞内での Pol ζ の各コンポーネント (Cdc6、Cdc1、Cdc27) を人工的に増減させ、Pol ζ がゲノム複製へ寄与するタイミングやその程度が変化するかを Pu-seq 実験で検証する。また、同様の制御により Pol ζ 依存的な突然変異の頻度に変化が生じるかを検証する。上記の仮説の通り、細胞内で Pol ζ の触媒サブユニット Cdc6 と Pol ζ の触媒サブユニット Rev3 が競合関係にあるならば、Cdc1、Cdc27 タンパク質が増加した場合、それらは Cdc6 に加えて Rev3 とも会合するチャンスが増え、Pol ζ の機能が高まり、その結果、Pol ζ 依存的な突然変異が増加する。Cdc6 の量が低下した場合にも、同様に Pol ζ の機能が高まると考えられる。最終的に、1 分子レベルで Pol ζ と Pol δ のコンポーネントを可視化し、個々のコンポーネントの核内動態と DNA ポリメラーゼの機能の関連性を検証する。これらの結果を総じて、Pol ζ と Pol δ が時間的にも、空間的にも均一でない DNA 複製機構で、どのようにゲノム情報の安定性と関わるかを考察する。

4. 研究成果

(1) Pu-seq 実験による Pol ζ が DNA 合成に関与するゲノム領域の同定 - 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。しかし、各ゲノム領域での Pol ζ による合成量は、実験ごとの変動が大きく、今後、この原因を明らかにし、安定したデータを得ることが必要であると考えられる。

(2) Pol α コンポーネントの増減による Pol α 機能への影響 - 細胞抽出液を分画し、細胞内の Pol α サブユニットのタンパク質をウェスタンブロッティングで可視化した結果、Cdc6 (Pol α のカタリティック因子) は、Cdc1 (Pol α ・Pol α の共通因子) よりもクロマチン画分に豊富に存在していた。また、細胞を G1/S 境界期に同調し、細胞周期再開後の Pol α サブユニットの量的変化を観察した結果、Cdc6 因子は、S 期後半から G2 期にかけて減少することが確認された。一方、Cdc1 因子においては、細胞周期を通じて、大きな量的変化が見られなかった。これらの結果から、細胞内で Cdc6 の量に対する Cdc1 の量が DNA 複製後期に増加し、Pol α と Cdc1 因子が物理的に相互作用するチャンスが高まると考察される。Pol α サブユニット (Cdc6/ Cdc1/ Cdc27) の過剰発現を誘導し、UV 照射による突然変異頻度を測定した結果、Cdc1 因子の過剰発現株では、Pol α 依存的な突然変異の発生が増加した。一方、Cdc27 の過剰発現株は、紫外線照射による突然変異の発生頻度は野生株と同程度であった。これらのことから、予想した通り、Cdc1 因子の細胞内での量に応じて Pol α の機能が制御されることを明らかにした。

(3) Pol α コンポーネントの増減による Pol α 機能への影響 - (2) で構築した Pol α の各コンポーネント (Cdc6、Cdc1、Cdc27) の発現量をコントロール可能な分裂酵母株を使用して、Pol α (デルタ)・Pol α (ゼータ) サブユニットの核内空間配置の変化を検証した。その結果、これらのタンパク質の発現量に応じた、Pol α ・Pol α それぞれのカタリティックサブユニット (Cdc6、Rev3) の核内分布に変化は見られなかった。Cdc6 の場合は、比較的、存在量の多いタンパク質であったせいか、どの条件においても核内に一様に存在していた。Rev3 の場合は、逆に非常に数少ないタンパク質のせいか、検出限界に近い状況での観察であり、明確な差異を観察することが困難であった。Rev3 の解析においては、今後、1 分子レベルでの観察 (PALM、STORM 法など) が必要であると考えられる。

(4) Pol α ・Pol α サブユニットのゲノム上での局在 - 分裂酵母 Pol α (Cdc6、Cdc1、Cdc27) の各コンポーネントを対象として CUT&RUN-sequencing 実験を行うために、それらのコンポーネントの C 末端に必要なタグ配列を付加する遺伝子改変を行った。その結果、タグを付加した時点で分裂酵母の生育に著しく影響するケースが多いことが判明した。タグ周辺の配列やタグ配列を付加する位置を N 末端に変更するなどの方法により、今後、酵母の生育に大きく影響しない遺伝子改変に取り組む必要があると考えられる。

(5) ヒト細胞における Pol α 合成領域の同定 - 研究代表者は、現在までに、ヒト培養細胞 HCT116 を用いて、特定の DNA ポリメラーゼの活性部位を変異させ、そのポリメラーゼによるゲノム DNA 中へのリボヌクレオチドの取り込みを誘導し、リボヌクレオチドの分布を指標として特定のポリメラーゼの合成領域を解析する方法を確立している。この方法を Pol α に応用するために、必要な細胞株の作成を行った。現在までに、リボヌクレオチドを取り込む Pol α ノックイン細胞株の作成が完了した。現況では、Pol α の合成領域を同定するために実験条件 (ゲノム DNA からリボヌクレオチドを除去する酵素 RNASEH2 を分解するための方法など) を検討している状況であり、今後も継続した実験、および解析が必要である。

(6) 総括 - 現在までに研究において、DNA ポリメラーゼ サブユニットの 1 つである Cdc1 の量がポリメラーゼの機能を制御する一因であることが上記の (2) の実験より示された。その点を様々な側面から検証するために、現在も Cdc1 の量に応じて、Pol α によって DNA 合成がおこなわれるゲノム領域が変化するか、また、Pol α の核内局在が変化するかを現在も検証中である。これらの点は継続しつつ、現在の研究を進展させると同時に、今後は、この研究をモデルとしつつ、その他の多くの DNA ポリメラーゼを対象に加えた研究へ発展させ、多種多様な DNA ポリメラーゼが協調的に機能する仕組みを明らかにする。これらの成果をもとに、最終的には、ゲノム複製が柔軟性と変異生成のバランスがどのように保たれているかを明らかにすること目標とする。

< 引用文献 >

- Daigaku et al, Nature, 465, 951-955, 2010
- Daigaku et al, PLOS Genetics, 13, e1006789, 2017
- Bergoglio et al, J Cell Biol, 201, 395-408, 2013
- Lawrence, DNA repair, 1, 425-435, 2002
- Graham et al, Cell, 169, 1201-1213, 2017
- Daigaku et al, Nat Struct Mol Biol, 22, 192-198, 2015

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koyanagi Eri, Kakimoto Yoko, Minamisawa Tamiko, Yoshifuji Fumiya, Natsume Toyoaki, Higashitani Atsushi, Ogi Tomoo, Carr Antony M., Kanemaki Masato T., Daigaku Yasukazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Global landscape of replicative DNA polymerase usage in the human genome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-34929-8	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6件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小柳恵理, 柿本洋子, 大学保一
2. 発表標題 核内環境に応じた複製フォーク動態の多様性
3. 学会等名 日本遺伝学会第92回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小柳恵理, 柿本洋子, 荻朋男, 夏目豊彰, 鐘巻将人, 大学保一
2. 発表標題 遺伝子転写のDNAポリメラーゼ動態への影響
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小柳恵理, 柿本洋子, 荻朋男, 夏目豊彰, 鐘巻将人, 大学保一
2. 発表標題 DNAポリメラーゼ動態から見る, 転写機構の染色体複製への影響
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大学保一
2. 発表標題 DNAポリメラーゼ機能と複製フォーク動態における柔軟性と脆弱性
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大学保一, 鐘巻将人
2. 発表標題 DNA polymerase dynamics and genomic instability
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大学保一, 小柳恵理, 柿本洋子, 南澤宝美后, 夏目豊彰, 鐘巻将人
2. 発表標題 遺伝子分布・転写機構が複製フォーク動態に及ぼす影響
3. 学会等名 日本遺伝学会 第94回大会
4. 発表年 2022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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------