

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19203

研究課題名（和文）RNA転写のDNA複製へのトランスアクション

研究課題名（英文）Transaction of RNA transcription to DNA replication

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はリーディング鎖・ラグging鎖合成を担うDNAポリラーゼの合成領域を示すデータを利用し、複製フォークの動態（開始、停止、進行）を定量的に示すゲノムプロファイルを創出した。このプロファイルを利用し、複製フォークの動態が特徴的な変化を示す領域を抽出した結果、複製開始領域は遺伝子近傍に存在し、遺伝子内部では、複製フォークの終結が起きることが示された。このことは遺伝子の末端から、内部の方向へ複製フォークが進行する傾向があることを意味する。また、この傾向は長い遺伝子では、さらに顕著になることも示され、複製フォークと遺伝子転写の衝突の影響は長い遺伝子において大きくなることを示唆する結果を得るに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA複製と転写は同じゲノム上で同時に機能する必要があるが、これら機能がお互いにどのように調和し、また、干渉し合っているかを具体的に示す研究は発展途上である。その状況で、本研究は、複製開始領域が遺伝子の転写領域を避けるように配置され、また、遺伝子転写領域において複製フォークがどのように進行するかを明らかにすることができた。結果として、本研究は、転写・複製コンフリクトによって引き起こされるゲノム不安定性を議論する上で重要な成果をあげることができた。

研究成果の概要（英文）：Using genomic datasets of DNA polymerase responsible for leading and lagging strand DNA synthesis, this study generated a genomic profile that quantitatively monitors the dynamics of replication forks (initiation, termination, and progression). Utilising this profile, we extracted regions where replication fork dynamics show characteristic changes and consequently demonstrated that replication initiation regions are located in the vicinity of actively transcribed genes and that fork termination occurs within gene bodies. This suggests a trend of replication fork progression from the periphery of genes towards their interiors. Additionally, as this tendency becomes more pronounced in large genes, our analysis suggests that the impact of collisions between replication forks and gene transcription is likely to be more significant around large genes.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：DNA複製 転写・複製コンフリクト ゲノム安定性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は2017-18年度に受けた挑戦的研究(萌芽)の課題として、Polymerase usage sequencing (Pu-seq) 実験をヒト細胞で確立し、研究開始段階でリーディング鎖、ラギング鎖合成それぞれを担う Pol ϵ (イプシロン) および、Pol α (アルファ) の合成領域を全ゲノムにわたり明らかにすることに成功した(図1)。Pu-seq 実験は本来、ゲノム複製における DNA ポリメラーゼ間での分業を明らかにすることを目的として構築されたが、そのデータの解析からゲノム領域に沿った複製フォーク進行の方向性を定量的に評価し、かつ、これまでにない精度で複製開始領域を同定することが可能となった。

ヒト細胞では、複製開始領域として一定のコンセンサス配列を持たず、また、個々の細胞、細胞周期のたびに異なるゲノム領域で確率的に開始反応がおき、heterogenous な複製パターンが形成される。よって、様々なゲノム上の要素が DNA 複製のパターンに及ぼす影響を明らかにするためにも、ヒトゲノム上の DNA 複製開始反応、および、その後の複製フォーク進行を解析する実験系を確立することが必要不可欠であった。

Pu-seq 実験の定量性を生かし、遺伝子領域周辺でリーディング鎖・ラギング鎖の合成を解析した結果、複製開始や伸長が遺伝子転写と強く関連することを示唆するデータを得ていたが、その実態は明らかではなかった。これは、比較的小さなゲノムを持つ出芽酵母や分裂酵母では明確に観察されなかった現象であり、これほどまでに転写による DNA 複製へ影響が明確に示された事例は過去になかった。本研究は、Pu-seq 実験によって得られた解析データから、複製フォークの開始・進行・停止を示すゲノムプロファイルを構築し、転写による複製フォークの動態への影響を明らかにすることを目指した。

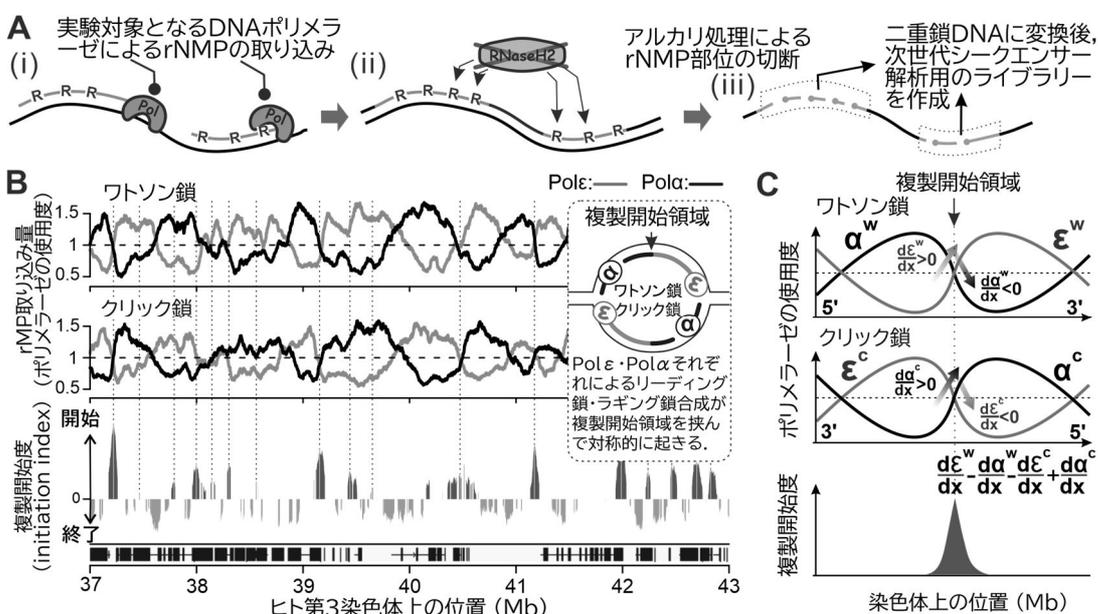


図2 ヒト培養細胞 hct116 における Pu-seq 実験。(A) 実験方法の概要。説明は本文 参照(B) Pol ϵ 、Pol α を対象とした Pu-seq 実験の結果。Pol ϵ によるゲノム DNA 上での rNMP の取り込み量。および、それより算出された複製開始度をプロットした。(C) Pol ϵ 、Pol α によるリーディング鎖・ラギング鎖合成の分布から複製フォーク進行が開始する領域を同定する解析方法。

2. 研究の目的

本研究は、培養ヒト細胞において、申請者らによって開発された特定の DNA ポリメラーゼ合成を全ゲノムにわたってプロファイリングする実験系：Pu-seq を用い、転写によるゲノム複製への影響を検証することを目的とする。研究代表者は、この実験系をヒト細胞に応用することに成功しており、リーディング鎖、ラギング鎖合成それぞれを担う Pol ϵ 、および、Pol α による DNA 合成をゲノムを網羅して解析する実験系をすでに確立している。この実験系を利用して、遺伝子内・近傍の領域での DNA 複製開始反応の活性化や複製フォーク進行・DNA 合成の遅延・停止が、転写機構によってどのように影響を受けるかを明らかにし、そのメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、大腸がん由来の2倍体細胞 HCT116 を使用する。本過程(1)、(2)に分け実施した。

(1) 複製フォークの開始、停止反応を同定する解析方法の確立

Pu-seq 実験は、実験対象のポリメラーゼの活性部位を変異させ、デオキシヌクレオチドの代わ

りに、リボヌクレオチド (rNMP) を高頻度で取り込むポリメラーゼをデザインし、細胞内で対象となるポリメラーゼによる合成を rNMP でマークすることでゲノム上での合成領域を網羅的に特定することができる (図 1)。本研究では、複製フォークと同方向に進むリーディング鎖合成を担う Pol ϵ と逆方向に進むラギング鎖合成を担う Pol α のゲノムプロファイルに Pu-seq 実験のデータより得て、そのデータを加工することにより、ゲノム各領域の複製開始反応、およびフォーク進行度を算出するアルゴリズムを確立した。

(2) 遺伝子転写により影響を受ける複製フォーク動態の検証

課題 (1) で複製開始反応、フォーク進行度を示すゲノムプロファイルが遺伝子領域周辺において示す特徴を明らかにした。特に、遺伝子の転写量や遺伝子の長さに応じて、転写に応じて、複製開始反応・フォーク進行度に及ぼす影響が増減するのかを検証し、転写と複製フォークの動態がゲノム上でどのように連動しているかをゲノム科学的な視点から明らかにした。

4. 研究成果

本研究の期間内においては、上記の通り計画された研究において、(1)複製フォークの開始、停止反応を同定する解析方法の確立、及び、(2) 遺伝子転写により影響を受ける複製フォーク動態の検証を実施した。

(1) 複製フォークの開始、停止反応を同定する解析方法の確立

DNA 鎖 (Watson 鎖、Crick 鎖) に分けて解析された Pol γ ・Pol δ によるリーディング鎖、ラギング鎖合成のプロファイルにおいて、Pol γ と Pol δ の取り込みが高い領域がゲノム DNA の両鎖で交互に存在する (図 1B)。このパターンは Pol γ によるリーディング鎖合成は複製開始領域より 3' 側に分布し、ラギング鎖合成はその逆側に分布するためであり、リーディング鎖、ラギング鎖のプロファイルは複製開始領域の両サイドで対照的なパターンを示すはずである (図 1C)。リーディング鎖・ラギング鎖合成が Watson、Crick 両鎖において開始する領域を特定するため、図 1C に示す通り、それぞれのポリメラーゼの合成プロファイルの微分量の和から、複製開始反応の起きやすさを示す initiation index を設定した。その結果、2 回の実験データに共通する initiation index のピークとして、ゲノム上に 8000 か所ほど複製開始領域を同定することができた。

(2) 遺伝子転写により影響を受ける複製フォーク動態の検証

課題 (1) で算出した、ゲノムを網羅して複製開始・停止領域を示すパラメータである initiation index を使用して、遺伝子周辺での複製フォークの動態を解析した結果、複製開始領域は遺伝子近傍の両脇に存在すると同時に (図 2A-左) 遺伝子内部においては、複製フォークの終結が起きる (図 2A-右)。このことは遺伝子の末端から、内部の方向へ複製フォークが進行する傾向を意味する (図 2B)。また、この傾向は長い遺伝子では、さらに顕著になることも示された。この結果から、転写装置が走っている領域においては、複製開始に関わる因子が局在することができず、複製開始反応が抑えられていると考えられる。その一方で、遺伝子の 3' 側 (下流側) の領域においては、複製フォークと遺伝子転写が逆方向になり、それらの衝突による複製・転写コンフリクトから逃れられないことが示唆され、長い遺伝子においてはその影響が大きくなることが予測される。実際に、染色体不安定部位が長い遺伝子周辺に存在することは、この結果と合致するものである。これらのことから、今後、本研究で示されるヒトゲノムにおける複製フォークの動態のデータを使用して、染色体不安定性が起きやすいゲノム領域を推測することも可能であると考える。

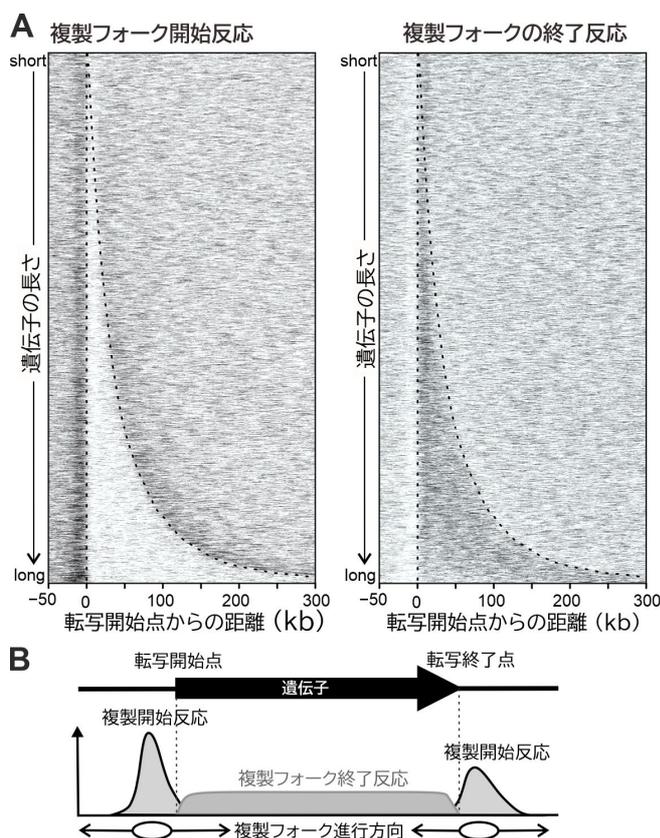


図 2 遺伝子周辺における複製フォーク動態。(A) 複製開始反応と複製終了反応の分布。濃い部分が、それぞれ開始・終了反応が起きる領域。点線は遺伝子の両端を示す。(B) 遺伝子周辺の複製フォーク動態を示すモデル図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2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

1. 著者名 Bainbridge Lewis J., Daigaku Yasukazu	4. 巻 -
2. 論文標題 Adaptive use of error prone DNA polymerases provides flexibility in genome replication during tumorigenesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.16188	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 5件/うち国際学会 4件）

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 Yasukazu Daigaku
2. 発表標題 Global usage of replicative polymerases and its relation with transcription in human cells U
3. 学会等名 UK-Japan Genome Stability Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

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 Yasukazu Daigaku
2. 発表標題 Chromosome fragility and DNA polymerase usage
3. 学会等名 8th Meeting of the Asian Forum for Chromosome & Chromatin Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasukazu Daigaku
2. 発表標題 Variation in usage of leading and lagging polymerases in the human genome and its relation to the transcriptional landscape
3. 学会等名 CSHL meeting - Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance (国際学会)
4. 発表年 2023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 細胞内・核内環境と連動するゲノム複製機構
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023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
---------	---------