

研究報告書

「Immortal DNA 機構解明への挑戦」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 飯田 哲史

1. 研究のねらい

多細胞生物のみならず単細胞生物においてもしばしば観察される非対称な細胞分裂機構は、多様な細胞を生み出すだけでなく未分化な状態を維持する機構として、幹細胞を作製・制御するために重要です。例えば高等真核生物に見られる成体幹細胞は、非対称な細胞分裂によって成体幹細胞自身と分化した細胞の二種類を生み出します。こうして維持された成体幹細胞は、分裂回数が限られている体細胞に比べ、遥かに多くの非対称な細胞分裂を経ても未分化維持し老化の抑制を行っているだけでなく、がん化などの細胞分裂に伴う染色体損傷や変異によって引き起こされる異常も抑える仕組みをもっていると考えられています。成体幹細胞が細胞分裂を繰り返してもゲノム中に残る変異を最小限にする可能性として 1970 年 John Cairns によって“Immortal DNA strand 仮説”が提唱されました。この仮説では、DNA 二本鎖をそれぞれ鋳型とした半保存的な DNA 複製によってつくられる姉妹染色分体のうち、変異が入りにくい DNA 鎖を鋳型にした姉妹染色分体のみが常に選択されて幹細胞側に分配され幹細胞ゲノムの安定性を維持するとしています。近年の染色体観察技術の向上により、この仮説を支持するような鋳型 DNA 選択型の染色体分配の現象の報告が様々な生物種・細胞種において報告される一方で、この現象を否定する報告も多数あり、鋳型 DNA 選択型の染色体分配が実際に起こっている現象なのかは不明です。もし一見同質に見える姉妹染色分体の一方の鋳型 DNA が選択されるエピジェネティックな現象が本当であるならば、その制御機構を明らかにすることはエピジェネティックスの新たな制御機構の発見につながることを期待されます。

現在、鋳型 DNA 選択型の染色体分配は様々な非対称分裂が見られる多細胞の高等真核生物を中心に細胞生物学的手法を用いて観察されています。しかし、一般に二倍体でゲノムサイズが大きく、染色体構造が複雑な高等真核生物モデルでは、細胞学的手法をもちいても大まかな染色体挙動を同定することしかできていませんでした。鋳型 DNA 選択型の染色体分配研究において問題となっている現象を明らかにするために、ゲノムサイズが小さく一倍体で染色体構造がシンプルな出芽酵母をモデルとして、鋳型 DNA 鎖選択型の染色体分配現象の探索と高速シーケンサーを用いた染色体解析技術の開発を目的としました。

2. 研究成果

(1) 概要

出芽酵母の XII 番染色体上にあるリボゾーム RNA 遺伝子リピート領域(以下、rDNA リピート)では、細胞周期の DNA 複製期において鋳型 DNA 鎖特異的な DNA 二重鎖切断が起こること、姉妹染色体のうち特定の鋳型 DNA 鎖を持つ一方で組換え修復機構により rDNA リピートのコピー数が増加すると考えられています。本研究では、一方の鋳型 DNA 鎖由来の染色体

の挙動を迫る現象であるrDNAリピートの増幅機構に着目し、鋳型DNA鎖選択型の染色体制御機構のモデルとして研究を行いました。また、鋳型DNA鎖依存的な染色体分配を考える上でImmortal DNA strand 仮説の重要な点である成体幹細胞における非対称分裂については、出芽酵母の“出芽”による細胞増殖様式に着目し、一つの母細胞が非対称分裂によって小さな“娘細胞”と大きな“母細胞”に分かれる際にどちらの鋳型DNA鎖をもったXII番染色体が分配されるのかについて解析を行いました。

出芽酵母の細胞周期を同調し、rDNA リピート増幅を誘導した場合、母細胞側にリピートが増幅した染色体とリピート数が変化しない染色体のうちどちらが選択的に分配されるかを調べた結果、母細胞側にリピートが増幅したXII番染色体が選択的に分配されることが明らかとなりました。また、XII番染色体のセントロメアを不活化した場合、他の染色体と異なりrDNAをもつXII番染色体は母細胞側に偏って蓄積することを見出しました。このことは、rDNAリピート自体に母細胞側に偏って分配する機構が存在する可能性を示唆しています。実際に、rDNAユニット中に母細胞側に残りやすくする機能領域の存在が明らかとなりました。

DNA複製前後において鋳型DNA鎖側には損傷が蓄積しにくく修復によるDNA合成がほとんど起こらないという仮定は、DNAの半保存的複製機構の後支えによって、DNA複製・修復機構の研究において検証されていないながらも常識となっています。Immortal DNA strand 仮説も、鋳型DNA鎖では損傷が蓄積しにくく修復が必要ないという前提の上に成り立っています。そこで、実際に鋳型DNA鎖の修復が通常起きていないのかを検証するため、高速シーケンサーを用いた一細胞周期における鋳型DNA鎖修復の定量技術を確立し、出芽酵母の一細胞周期における鋳型DNA鎖修復のゲノムワイドで網羅的な定量を行いました。その結果、これまで想定されていなかった鋳型DNA鎖の修復が染色体領域特異的に極めて高頻度で起こっているという全く新しい現象を見出しました。

(2) 詳細

研究テーマA「出芽酵母rDNAをモデルとした鋳型DNA鎖選択型染色体分配機構解析」

出芽酵母のrDNAでは、rDNAユニット内のRFB領域に結合する因子Fob1の発現を誘導することで組換え依存的なrDNAリピート増幅を一方の姉妹染色体(DNA複製時のリーディング鎖を新生する染色体)にのみ誘導することができます。そこで、細胞周期を間期であるG1期に同調した娘細胞でFob1の発現を誘導し、一細胞周期まわしたのち母細胞を分離しリピートが増幅した染色体が蓄積しているかをパルスフィールド電気泳動によって調べたところ、母細胞特異的にリピートが増幅したrDNAが分配されていることが明らかになりました。つぎに、どのような機構によって母細胞に増幅したrDNAリピートが分配されるのかを明らかにするために、rDNAののっているXII番染色体のセントロメアをガラクトース誘導型プロモータにより一過的に不活化し、分配されない染色体が母細胞と娘細胞のどちらに偏って蓄積するかを調べました。セントロメアの不活化によって、他の染色体では娘細胞側に一定の割合で染色体が蓄積するのに対し、すべての細胞でXII番染色体は母細胞側に偏って蓄積することを見出しました。このことは、組換えが起きたXII番染色体を母細胞側にrDNAを引き止める機構がある可能性を示唆していました。そこで、rDNAユニット内に母細胞側に引っ張る機能領域がある可能性を考え、rDNA一ユニットをもったプラスミドの分配を母細胞側に偏らせる領域の探索を行いました。その結果、rDNAの25SrRNA遺伝子領域内に母細胞側に偏って分配する配列が存

在することが明らかとなりました。この DNA 断片に作用し、rDNA の非対称分配を行う因子を探索するために、約 4,800 の遺伝子破壊株ライブラリを用いて非対称な分配によって起こる rDNA 依存的なプラスミドの不安定性を解消する変異体のスクリーニングを行いました。その結果、DNA 修復機構、細胞周期制御、ミトコンドリアなど様々な細胞機能に関連する 145 遺伝子破壊株において rDNA プラスミド特異的な不安定化が解消されていることを見出しました。このことは、染色体の特定領域に作用し、母細胞特異的に非対称に染色体を引っ張る作用をもつ機構が存在していることを強く示唆しています。

研究テーマ B 「高速シーケンサーを用いた網羅的な鋳型 DNA 鎖修復定量技術の確立」

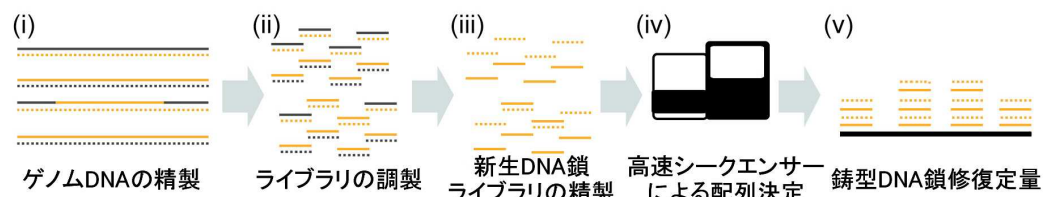


図 1. 高速シーケンサーを用いた網羅的な鋳型 DNA 鎖修復定量法の概略

一細胞周期を考えた際、DNA の鋳型鎖を検出するには新生 DNA 鎖のみを標識し、新生 DNA 鎖の挙動から鋳型 DNA 鎖の挙動を類推する方法が有効だと考えられてきました。しかし、鋳型 DNA 鎖側で DNA 修復による鋳型 DNA 鎖側での DNA 合成が起きていないという前提で鋳型 DNA 鎖の挙動を類推するためには、実際に鋳型 DNA 鎖側で DNA 修復による DNA 創成が高頻度で起きていないことを確認する必要があります。そこで、出芽酵母を用いて、間期 G1 期から次の G1 期まで一細胞周期だけ新生 DNA 鎖を標識し、ゲノム DNA を断片化・高速シーケンス用のライブラリ化を行い、新生 DNA 鎖ライブラリを精製しその配列を網羅的に高速シーケンサーで決定し、各染色体領域における新生 DNA 鎖配列の出現頻度を算出することで、DNA 複製に加えて起こる鋳型 DNA 鎖での新規の DNA 合成頻度を“鋳型 DNA 鎖修復”として定量する方法を確立しました(図 1)。

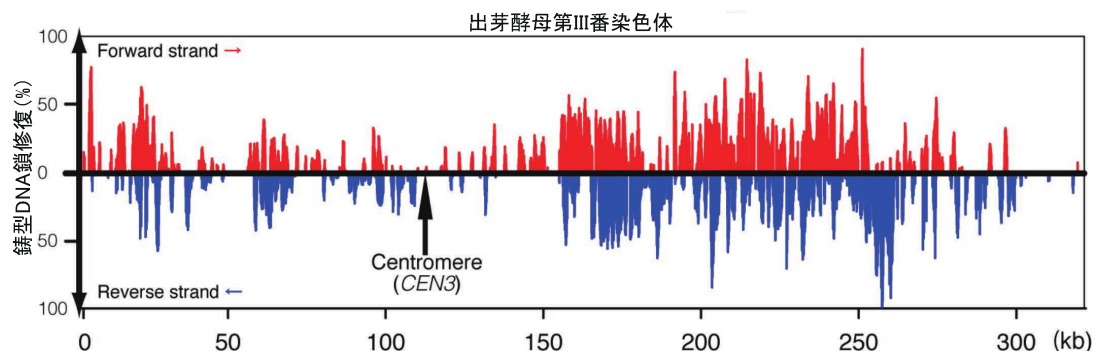


図 2. 出芽酵母第 III 番染色体全体における鋳型 DNA 鎖修復頻度。上方向赤線: Watson 鎖・Forward 鎖、下方向青線: Crick 鎖・Reverse 鎖、横軸: 染色体左腕末端からの距離(kbase)を示す。

この方法は、これまで定量 PCR などを用いて定量するには困難であった最大約 2 倍の変化を新生 DNA 鎖断片の出現頻度を計数するデジタルなデータで定量することにより極めて精度の高い定量性を確保しました。実際に、出芽酵母ゲノム全体における鋳型 DNA 鎖修復の頻度

について解析を行った結果、驚くべきことに、鋳型 DNA 鎖特異的な DNA 修復が 100%に近い極めて高い頻度で起こる染色体の特定の領域が複数クラスターを形成するように存在していることを見出しました(図 2)。このことは、これまで DNA 損傷が通常の細胞周期においてある程度ランダムに低頻度で起きていると考えられていたのが、実際には染色体の特定領域で極めて高頻度で起こるイベントであることを強く示唆しています。この鋳型 DNA 鎖修復による新規の DNA 合成は、一細胞周期あたり総量で全ゲノムの 10%にも及んでおり、染色体維持の機構が通常の細胞周期においても積極的に極めて活発に機能しているという新しい概念を提案する研究となりました。

3. 今後の展開

Immortal DNA strand 仮説が出芽酵母というモデルで解析できるかに挑戦する研究を行ったことで、染色体中に母細胞側に引き止められるような機能をもつ領域が存在する可能性が示唆されました。今後は、この領域に直接作用し核小体を構成する染色体の分配を担う因子の解析を行い、母細胞にのみ rDNA が増幅した染色体が分配されるという新しいタイプの鋳型 DNA 鎖特異的な染色体分配機構の研究を展開する予定です。

本研究課題で新たに見出した鋳型 DNA 鎖修復は、通常の細胞周期においても非常に活発にゲノムに内在性の DNA 損傷が特定の染色体領域蓄積していることを示しています。これまで、DNA 損傷は低頻度にランダムにゲノムに導入され、ほとんど蓄積することなく迅速に DNA 修復機構により修復されると考えられてきました。しかし、鋳型 DNA 鎖に DNA 損傷が残存しその後の細胞周期において染色体上のイベントを制御しているという可能性は、DNA 損傷自体が新しいエピジェネティックなマークとして機能しているというアイデアにつながると期待されます。DNA 損傷は、修復不全により遺伝子変異や染色体異常の原因となることがわかっています。DNA 損傷が特異的に蓄積する領域をヒトを含めた様々な生物種・細胞種で明らかにすることは、加齢に伴う疾病の原因となる遺伝子変異や染色体異常の原因となるメカニズムにせまる研究に発展すると期待しています。そこで、今後は様々な DNA 損傷がゲノム中に蓄積する動態を網羅的に定量解析する技術の開発を行い、「ゲノム損傷の蓄積動態の研究」として展開する予定です。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究の成果は、当初目標としていた鋳型 DNA 鎖選択型の染色体分配機構の分子メカニズムを踏み込んだ形で解明するものとは異なったものになりました。しかし、踏み込んだ研究が展開出来なかった理由である“安定な鋳型 DNA 鎖”という常識として考えられてきた前提を覆して“極めて動的な鋳型 DNA 鎖”を示す研究成果を得た点は、エピジェネティクスの新たな制御機構として DNA 損傷蓄積機構というアイデアを提供する研究として評価できると考えています。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

損傷の少ないゲノムの維持機構として提唱されている鋳型 DNA 鎖選択型の染色体分配現象について、鋳型鎖選択的にコピー数の増幅が起る出芽酵母の rDNA 領域をモデルとして検討した。その結果、rDNA 増幅染色体は母細胞に特異的に分配されることが分かり、その過程にエピジェネティック機構が働いていることが明らかになった。一般的に、鋳型 DNA 鎖は損傷が蓄積しにくいと信じられている。ところが、DNA 修復に伴う DNA 合成が鋳型 DNA 鎖において極めて高頻度かつ染色体領域特異的に起きていることが分かり、全く新しい現象の発見につながった。

出芽酵母をモデルとした研究において、染色体選択に rDNA 領域がエピジェネティックに関わっていることを明らかにしたが、今後その機構について明らかにする必要がある。一方、新たに発見された鋳型 DNA 鎖修復は特定領域に起るので、突然変異を予測可能な現象として捉えられるというパラダイムシフトを引き起こす。この現象の生物学的意味や制御機構について理解が進むのを期待する。とりわけ高等生物での解析、分化や疾患の発症につながることができれば社会インパクトは大きい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Iida, T., Iida, N., Tsutsui, Y., Yamao, F. and Kobayashi, T., “RNA interference regulates the cell cycle checkpoint through the RNA export factor, Ptr1, in fission yeast.”, <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 2012, 427, 143-147. |
| 2. Iida, N., Yamao, F., Nakamura, Y., and Iida, T*., “Mudi, a web tool for identifying mutations by bioinformatics analysis of whole-genome sequence”, <i>Genes Cells.</i> 2014 in press |

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 飯田哲史, 中嶋映里香, 小林武彦
“出芽酵母 *S. cerevisiae* における環状 rDNA 分子(ERC)の分配機構”, 第 44 回 酵母遺伝学フォーラム年会 (2011. 9) 福岡県・九州大
- Iida, T., Iida, N., Nakashima, E., Sese, J., Nakamura, Y. and Kobayashi, T.
“Repair? Frequent events on yeast genome.”, Message from yeast to Epigenetics, 国際シンポジウム (2013. 9) 福井県・あわら温泉 (招待講演)
- 飯田哲史, 飯田直子, 中嶋映理香, 瀬々潤, 中村保一, 小林武彦
“出芽酵母の鋳型 DNA 鎖修復機構” 日本遺伝学会第 85 回大会 (2013. 9) 神奈川県・慶応大
- 飯田哲史, 飯田直子, 中嶋映理香, 瀬々潤, 中村保一, 小林武彦
“出芽酵母の鋳型 DNA 鎖修復機構” 日本遺伝学会 (2013) Best Paper 賞 受賞
- 飯田哲史, 飯田直子, 中嶋映理香, 瀬々潤, 中村保一, 小林武彦
“酵母をとらえてみたゲノム維持の素顔” 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013. 12) 兵庫県・

神戸ポートアイランド（招待講演）