

研究終了報告書

「レプリケーター領域の構成的理解を介したゲノム複製の制御技術の確立」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：大学 保一

1. 研究のねらい

ヒトを含めた脊椎動物において DNA 複製が開始される領域(レプリケーター)がどのように構成されるかは明らかではない部分が多い。ほとんどの真核生物はゲノム配列の中にレプリケーター領域として一定のコンセンサス配列を持たない。加えて、個々のレプリケーターが一回のゲノム複製時に複製開始される確率や開始反応が起きるタイミングは異なり、細胞分裂の度にゲノム複製によって異なるレプリケーターが活性化し、heterogeneity な複製パターンが形成される。よって、DNA配列、周辺のゲノム上の特徴(遺伝子構造、クロマチン構造、エピジェネティック因子)や核内環境などの様々な要因によって、レプリケーターの機能を形成する仕組みの解明は、DNA複製の分野での重要課題である。ヒトゲノムにおけるレプリケーターをコードする仕組みが現在まで明らかでない理由の1つは、複製開始反応を定量的、かつ、網羅的にモニターする実験系が確立されていないことである。本研究は、ヒト培養細胞を用いて、全ゲノム領域に渡りリーディング鎖合成・ラギング鎖合成を行うポリメラーゼの使用度を算出する実験系を開発し、これらのポリメラーゼの使用度の変化から、個々の複製開始点の位置、及び、活動を定量的に評価する方法を確立する。これにより、全ゲノム上で精密な位置情報のみならず、世界に先駆けて個々のレプリケーター領域で開始反応が起きる確率を算出する実験系を構築できる。その後、得られるゲノムを網羅したレプリケーターの定量的なデータを利用して、様々なゲノム上の要因がレプリケーター形成、及び、機能に寄与する仕組みを明らかにする。最終的には、任意の配列からレプリケーターをデザインし、それを細胞内で検証することにより、効率的な複製開始に必要なDNA上の素因子の評価をより構成的かつ客観的に行う。これらの一連の解析結果をもとに、ゲノム上でレプリケーターがコードされる仕組みの解明に挑む。その成果は、染色体維持を担う要素を理解する上で重要性を持ち、同時に新たなプラスミドや人工染色体などの開発の基盤になると期待できる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、複製フォークにおけるラギング鎖合成、リーディング鎖合成の分布から複製開始反応領域を全ゲノムにわたり同定し、複製開始領域を構成する仕組みを明らかにすることを目的としている。そのために、ゲノムを網羅してDNA複製フォークの進行方向をリーディング鎖合成、および、ラギング鎖合成のプロファイルから明らかにする実験系を構築した。ラギング鎖合成は Pol δ (デルタ)と Pol α (アルファ)、リーディング鎖合成は、Pol ϵ (イプシロン)それぞれによって行われるので、これらのDNAポリメラーゼの合成領域を明らかにする実験系 Polymerase usage sequencing: Pu-seq の構築を大腸がん由来の細胞 hct116 を使用し実施した。その結果、ゲノムを網羅して Pol ϵ 、Pol α によって合成される領域を DNA 鎖 (Watson 鎖、Crick 鎖)に分けて特定し、Pol ϵ 、Pol α それぞれが主にリーディング鎖、ラギング鎖合成に関与することを示した。それらのポリメラーゼのプロファイルをリーディング鎖、ラ

ギング鎖プロファイルとして利用し、両鎖の合成が同時に開始される領域を情報科学的に同定し、複製開始領域のゲノム上での位置、および、その領域における開始確率を高精度に特定することに成功した。その後、遺伝子の様々な特徴と複製開始反応の関連性を調べた結果、転写開始領域(TSS)の15-20kb程度上流域、転写終了領域(TTS)の15-20kb程度下流域で複製開始反応が起きる傾向を示した。また、遺伝子の転写領域の長さが複製開始反応の活動度に強い関連性があることが示された。加えて、遺伝子発現の制御においてクロマチン構造が重要な役割を果たす点を考慮し、複製開始領域でのヌクレオソームの状態を解析した結果、H2AZ、H3K27me3 が特に局在することが示された。現在までのところ、H2AZ、H3K27me3 などの因子が複製開始反応に関わる詳細なメカニズムを明らかにするまでには至っていないものの、本研究は、ヒトゲノム上の複製開始領域は DNA の配列情報によって構成されるものではなく、遺伝子配置、クロマチン構造などを含めた多くの要因から高次な制御機構によるものであることを示し、今後の複製開始反応を人工的に制御するための基盤となる研究成果を得ることができた。

(2) 詳細

リーディング鎖合成を担う Pol ϵ 、ラギング鎖合成のプライミング Pol α 合成領域の同定、及び、複製開始インデックス: initiation index の構築

本研究は、ヒト培養細胞を使用してゲノム上のレプリケーター(複製開始領域)の構造、特徴の解明を目的とする。そのために、第1、2年次には、ゲノムを網羅してDNA複製フォークの進行方向をリーディング鎖合成、および、ラギング鎖合成のプロファイルから明らかにする実験系を構築した。ラギング鎖合成は Pol δ (デルタ)と Pol α (アルファ)、リーディング鎖合成は、Pol ϵ (イプシロン)それぞれによって行われるので、これらのDNAポリメラーゼの合成領域を明らかにする実験系 Polymerase usage sequencing: Pu-seq の構築を大腸がん由来の細胞 hct116 を使用し実施した。

DNA ポリメラーゼの合成領域を特定するために、対象となる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(rNMP)の取り込みを誘導し、取り込まれた rNMP の分布から対象となるポリメラーゼの合成領域を特定した。このポリメラーゼの変異を導入する遺伝子改変を CRISPR-Cas9 システムとドナーオリゴ DNA を使用して行った。その結果、Pol ϵ の触媒サブユニットをコードする POLE1 遺伝子には相同遺伝子の両方に変異(M630F)を導入することができたが、Pol δ の触媒サブユニットをコードする POLD1 遺伝子には片方の遺伝子のみを導入された。その後、Pol δ の代わりに、ラギング鎖のプライミングを行う Pol α をコードする遺伝子 POLA1 に rNMP の取り込みを誘導する変異の導入を行った。その結果、対立遺伝子座の両方に、目的の変異(Y865F)を導入することに成功した。

よって、本研究では、POLE1、POLA1 変異体を使用して、Pol ϵ ・Pol α によって取り込まれる rNMP のゲノム上の分布を解析し、それらのポリメラーゼによるリーディング鎖、ラギング鎖の合成領域を DNA 鎖(Watson 鎖、Crick 鎖)に分けて明らかにした。その結果、Pol ϵ と Pol α 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ことが示された。これは、Pol ϵ 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、Pol α によるラギング鎖合成はその逆側に分布することを意味する。よって、それぞれのポリメラーゼの合成

プロファイルの微分量から、複製開始反応の起きやすさを示す initiation index を算出した。その結果、initiation index がピークを成す領域をゲノム上に 8000 か所ほど同定することができ、それらは複製開始を活発に行う領域であると考えられた。

(i) 遺伝子分布と複製開始反応の分布・活動度

上記の通り複製開始領域を示すゲノムワイドデータ initiation index を利用して、レプリケーターを形成するために必要な染色体DNA上の特徴を明らかにする研究を実施した。initiation index のピークは遺伝子の前後、すなわち、転写開始・終末領域の近傍に位置した。これは、ヒトゲノム上でのレプリケーター領域の形成において、転写ユニットの分布が影響することを示唆する。ゲノム上の転写開始領域(TSS)、および、転写終末点(TTS)に initiation index を整列し、平均することにより、TSS の 15-20kb 程度上流域、TTS の 15-20kb 程度下流域で複製開始反応が起きる傾向を示した。転写産物量の高い遺伝子群において、その遺伝子近傍領域の initiation index のピークが多少高くなるものの、転写量と遺伝子上流域の initiation index の間には、強い相関は見られなかった。その一方、遺伝子の様々な特徴と複製開始反応の関連性を調べた結果、遺伝子の転写領域の長さが複製開始反応の活動度に強い関連性があることが示された。同時に、initiation index が負となる領域、すなわち、複製フォーク進行が終了する領域が遺伝子の長さに応じて大きくなることも示された。このことは、遺伝子領域付近においては、その両端で複製が開始され、遺伝子内部において両側から複製フォークが合わさり、複製が終了するということが考えられる。ただし、複製フォーク進行の終了が遺伝子内領域の中心(TSSとTTSの中間箇所)に集中しているわけではなく、遺伝子内領域にほぼ均一に起きている。よって、遺伝子の両端における複製開始反応のタイミング、また、開始反応の有無自体が確率的に起きる事象であり、終了反応もそれに応じて遺伝子内全域にランダムに分布したと考えられる。これらの結果を総ずるに、遺伝子の配置は複製開始反応のみならず、フォークの進行が終了する領域を決める上で重要な要因であることが示された。

複製開始領域に共通するクロマチン構造の探索

遺伝子発現の制御においてクロマチン構造が重要な役割を果たす。特に、転写開始点周辺においては、'active'なマークとしてのヒストン修飾(H3K4me3, H3K27ac)が起きる。遺伝子上流域で複製開始反応が起きやすいことを考慮し、転写の活性化に関わるヒストン修飾が同時に、複製開始反応に関連するかを検証した。ChromoHMM アルゴリズムを使用することにより、ゲノム領域のクロマチンの状態をパターン化し、転写開始点(TSS)、転写終末点(TTS)、及び、複製開始領域にそれらパターンがどの程度局在するかを検証した(Ernst et al Nat Prot 12 12 2017)。その結果、複製開始領域でクロマチンの状態のパターンが転写開始点、転写終末点のものと一致しないことが示された。加えて、複製開始領域での個々のヒストンの修飾、および、ヒストンバリエーションの量を解析した結果、H2AZ, H3K27me3 が特に局在することが示された。それと比較し、複製開始領域から 20kb 離れた位置に、H3K4me3, H3K27ac のピークが観察される。これは、その位置に転写開始点が多く分布することによると考えられる。これらの結果は、複製開始反応が転写開始反応とは独立したクロマチン構造による制御を受けることを示す。その一方で、initiation index のピークをなす領域には、現在までの解析においては、特徴的な DNA 配列は観察されなかった。よって、クロマチン構造が

複製開始反応の制御の中心的な役割を果たすと考えられる。H2AZ, H3K27me3 などの因子が複製開始反応に関わるメカニズムを明らかにすることは今後の課題である。

現在までの研究成果から予想する複製開始反応制御メカニズム

上記の結果から、遺伝子配置やクロマチン構造が複製開始領域に強く関連する要因であることが示されたが、その一方で、initiation index がピークを形成する領域では、特徴的な DNA 配列は観察されなかった。これらの結果から、出芽酵母、分裂酵母のように、DNA 配列情報によってヒト細胞の複製開始領域の位置は決定されないと考えられる。さらに、複製開始領域での H2AZ, H3K27me3 の分布を観察すると、これらの特徴が必ずしも局在するわけではなく、また、どちらかのみが局在する場合など、多岐にわたる。その点は、複製開始領域に関連するクロマチン因子のゲノムデータを使用した主成分分析においても、複製開始反応の高さが H2AZ, H3K27me3 の局在量と強く関連しつつも、成分の方向性がどちらの特徴とも完全には一致しない点からも示されている。複製開始反応を制御するメカニズムには、研究開始当初予想していた以上に、遺伝子配置・クロマチン構造を含めた多様な要素が関わることが示され、また、核内のゲノムが高度にドメイン化されていることなどを考慮に入れると、複製開始反応を含む DNA 複製の制御が一様でないとも考えられる。この後は、この点を含めた解析を行うことが必要であると考えられる。

Pu-seq 実験のマウス ES 細胞、ショウジョウバエへの応用(領域内共同研究)

細胞の加齢に伴い、染色体の異数性、ゲノム中でのコピー数多型の発生頻度が高くなることが報告され(Laurie et al Nat. Genet. 642-50 2012 など)、細胞の加齢に伴って、DNA 複製機能が逡減し、突然変異や染色体異常のリスクが高まると考えられている。しかし、現在までの真核生物における DNA 複製の研究は、主に単細胞生物の酵母等を対象として実施されたため、多細胞生物での発生や加齢に伴う DNA 複製機構の変遷を示す研究はごく少数に限られ、全世界的に見ても体系的な研究となり得ていない。

よって、同領域の坪内知美准教授(基礎生物学研究所・さがけ1期)との領域共同研究を通して、Pu-seq 実験をマウス ES 細胞に応用し、未分化な状態の細胞の複製開始領域の同定を含めた DNA 複製機構の解析を実施している。現在までに、この実験に必要な細胞の株の作成が、坪内研究室において完了し、Pu-seq 実験を実施する上での条件検討を共同で行っている。加えて、多細胞生物の分化の過程における DNA 複製機構の変遷を直接解析するために、近藤周准教授(東京理科大、さがけ1期)と共に、Pu-seq 実験の開発をショウジョウバエを用いて行っている。現在、必要なショウジョウバエの株を近藤准教授の研究室において作成中であり、それが完了次第、ショウジョウバエの様々な個体発生の過程で Pu-seq 実験を実施し、その間で、複製開始領域の分布やその活動度が異なるかを検証する。

3. 今後の展開

ヒト細胞において全ゲノムを網羅してリーディング鎖・ラギング鎖を担うポリメラーゼによる合成のゲノムプロファイルを得る方法 Pu-seq 実験を確立することができ、遺伝子配置やクロマチン構造が複製開始領域と強く関連する要素であることが示された。しかし、上記の通り、これらの要素

により一義的に複製開始領域が決定されていないことも示されている。よって、今後は、哺乳類細胞の核内のゲノムが高度にドメイン化されていることなどを考慮に入れ、Hi-C データや関連する要素の核内分布のデータを取り入れつつ、核内構造・領域によって複製開始領域が異なる可能性などを含めて解析を行う。このようなより多角的な解析を展開して、最終的には複製開始反応を制御するためのメカニズムの全容解明を目指す。

複製開始点の解析に加えて、Pu-seq 実験のデータによりヒト細胞のDNAポリメラーゼ動態が予想されていた以上に変化に富むことを示すデータも得られている。今後、ヒト細胞などの大きなゲノムを持つ生物における DNA 複製の柔軟性(flexibility), または、それに伴う脆弱性(fragility)の全容を明らかにする上で、大きな役割を果たすと考えられる。また、上記の通り、Pu-seq 実験を様々な培養細胞系、多細胞生物に応用することも試みており、分化やがん化などの細胞の状態の変化に応じて、DNA 複製機構が変化する仕組みの解明にも取り組んでいる。これらの研究を通して、DNA 複製がゲノム情報を安定して次世代を伝えるためにとられる戦略を明らかにし、かつ、ゲノム DNA の構成する要素の全容を包括的に明らかにすることに挑む。

4. 自己評価

研究目的の達成状況

全ゲノムを網羅してリーディング鎖・ラギング鎖合成のゲノムプロファイルを得て、複製開始領域を同定する方法を独自に確立した点は大きな成果であると自負するところであり、今後の様々な研究に応用することができる。現在(2022年5月)、その成果をまとめた論文の発表に向け、査読後の改訂作業中であり、論文発表をできるだけ迅速に行う必要があると考える(参考:(preprint) Koyanagi et al BioRxiv 2021 <https://doi.org/10.1101/2021.11.14.468503>)。また、複製開始反応を制御するメカニズムが、遺伝子発現、クロマチン構造などの多様な要素によって決定されることを明らかにすることができたが、その全容解明には更なる解析が必要である。そのため、複製開始領域を再構築し、新しい遺伝子キャリアを開発するという点は現在未達である。

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本研究は、年度に応じ1名または2名の研究補助員を雇用し、計3名の研究体制で行われた。分子生物学的実験においては、研究補助員を細胞培養関連の業務、次世代シーケンサーライブラリー作成など業務に関してバランス良く労力を配置することにより、必要な細胞株の作成、DNA サンプルの作成などを円滑に進めることができた。そのため、研究代表者は情報科学的な解析を集中的に実施することができた。また、研究費は増額分を含めて過不足なく執行している。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

今後、長鎖DNAによる人工染色体の設計を目指す場合には、より高度にDNA複製を制御する必要がある。長大な染色体の場合には、サイズに応じた数のレプリケーターを染色体上に配置する必要がある。その場合、染色体の位置によりクロマチン環境などが異なるために、様々な要因を考慮してレプリケーターの機能を予測する必要がある。本研究によるゲノム上の様々な要素と複製開始反応との関連性の成果は、この点において基盤となる成果である。

本研究によって、ヒト細胞における複製開始領域に関する成果は、上述の通り、様々な遺伝子キャリアの設計に応用できると考えられる。現在まで、ヒト細胞で安定的に保持されるプラスミドの

ほとんどは、ウイルス由来の複製因子(EBNA-1 など)をコードしているために、細胞のがん化を誘導する可能性や免疫反応の誘導など、医療への応用にはリスクがある。本研究の成果を生かし、細胞内に存在する因子のみによって、効率的な複製開始を行うレプリケーターをデザインした場合、医療の用途においても安全な遺伝子キャリアとなるプラスミドDNAを構築することが可能となると考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. Z. Shao, S. Niwa, A. Higashitani, <u>Y. Daigaku*</u> Vital roles of PCNA K165 modification during <i>C. elegans</i> gametogenesis and embryogenesis. <i>DNA Repair</i> , 82, 102688, (2019)
DNA 損傷バイパス機構の制御を線虫を使用して行った研究。本研究により、損傷バイパス機構が個体発生時のどの段階においても機能することが観察され、発生過程におけるDNA複製のメンテナンスの重要性を示した。DNA複製のメカニズムが個体発生の間に柔軟性をもって行われることを示唆するもので、今後の研究の指針の基礎となる業績。
2. Nakazawa, Y. Hara#, Y. Oka#, O.Komine#, D. Heuvel#, C.Guo#, Y. Daigaku#, M. Isono, Y. He, M. Shimada, K. Kato, N. Jia, S. Hashimoto, Y. Kotani, Y. Miyoshi, M. Tanaka, A. Sobue, No. Mitsutake, T. Suganami, A. Masuda, K. Ohno, S. Nakada, T. Mashimo, K. Yamanaka, M.S. Lujsterburg, Tomoo Ogi*, Ubiquitination of DNA Damage–Stalled RNAPII Promotes Transcription–Coupled Repair. <i>Cell</i> , 1228–1244, 180 (2020), #equal contributed 2nd author
ユビキチン化によるRNAポリメラーゼの伸長反応の制御がDNA修復に果たす役割を明らかにした研究。特に、全ゲノムに渡りRNA合成酵素とDNA損傷の局在解析を行うことにより、転写の伸長反応と共役して起きるDNA修復反応をモニターすることに成功した。今後、この研究で明らかになったRNAポリメラーゼ動態とDNA複製制御の関連性を明らかにする。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 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)

主要な学会発表

- ・小柳恵理, 柿本洋子, ○大学保一, 核内環境に応じた複製フォーク動態の多様性, 日本遺伝学会第92回大会, 2021年9月8日, オンライン発表(招待講演)
- ・○Yasukazu Daigaku, “Profiling DNA polymerase functions in human cells”, The 8th International Symposium of Gunma University Initiative for Advanced Research, satellite workshop – Genome Damage and Stability, ‘Profiling DNA polymerase functions in human cells’, Gunma, 2020年2月3日(招待講演)
- ・小柳恵理, 吉藤郁弥, 荻朋男, 夏目豊彰, 鐘巻将人, ○大学保一, ヒト細胞におけるDNA複製動態の柔軟さ, 危うさ, 第42回分子生物学会年会, 2019年12月3日, 福岡(招待講演)

- ・ ○大学保一, 染色体構造と DNA 複製動態 -分裂酵母とヒト細胞の視点から-, 染色体研究の最前線「染色体構造とDNA複製動態 -分裂酵母とヒト細胞の視点から-」, がん研究所(東京), 2019 年 3 月(招待講演)
- ・ Fumiya Yoshifuji, Eri Koyanagii, Tomoo Ogi, Toyoaki Natsume, Masato Kanemaki, ○Yasukazu Daigaku, Global usage of replicative DNA polymerase in human cells, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance, 2019 年 9 月 6 日, (指定講演)