

54. DNA 複製開始を制御する機構の異常によるゲノム不安定化

田中 誠司

高知工科大学 環境理工学群 生命科学専攻

Key words : DNA 複製制御, CDK, 過剰複製, ゲノム不安定性

緒 言

真核生物の染色体 DNA 複製は過不足ない複製を保证するため、「一回の細胞周期につき一度だけおきる」ように厳密に制御されている (Once-per-cell cycle control : 以下 OCC 制御と略す)。DNA 複製は染色体上の特定の領域 (複製起点) から開始する。このため、複製起点の活性化が OCC 制御のターゲットとなっている。複製起点の活性化は以下に述べるような 2 段階の反応からなる。まず、細胞周期の G1 期に複製準備として複製時ヘリカーゼを不活性型で複製開始点にロードし (複製起点のライセンス化)、次に、このヘリカーゼを活性化する (複製起点の“発火”反応 : Firing) ことで S 期が開始する。これら 2 つの反応が、細胞周期の進行を制御するサイクリン依存性キナーゼ (Cyclin-dependent kinase : CDK) の活性と組み合わせられることで、細胞周期の別々の時期に起きる (ライセンス化は CDK 活性の低い G1 期に、firing は、CDK 活性が上昇した S 期以降に起きる) ように制御され、OCC 制御が可能となる (図 1) [1~4]。

OCC 制御の破綻は細胞生存率の著しい低下等、重篤な結果をもたらす (図 2) [5~7]。OCC 制御の破綻はライセンス化と firing 反応が同時に起きることを意味し、DNA 再複製は異常な構造を持つ染色体を生み出す結果、生存率が大きく低下する [7]。この際、わずかに生き残ってくるサバイバー細胞 (図 2) の染色体を解析すると、染色体異数性や、染色体転座が起きているものが多数出現する [7]。このことは、OCC 制御の破綻は強力な細胞毒性を示すだけでなく、細胞が生き残ったとしてもゲノム不安定化が引き起こされるということを示している。

上述の OCC 制御の破綻による染色体異数性や転座に代表されるゲノム不安定化は、がん細胞の大きな特徴として知られている。がん細胞では、複製因子の過剰発現がしばしば観察され、複製ストレスと細胞がん化は密接な関係にあること広く知られている [8, 9] ことから、複製制御機構の異常がゲノム不安定性を引き起こし、細胞がん化に関わっている可能性も示唆される。

このように、過剰複製がゲノム不安定化につながることはわかったが、細胞が過剰複製というストレスにどのように対処し、結果ゲノムの不安定化がどのような過程を経て起きるのかについては未知のままである。そこでこれらの点を理解することを目的として、真核細胞の良いモデルである出芽酵母を用いて本解析を行なった。

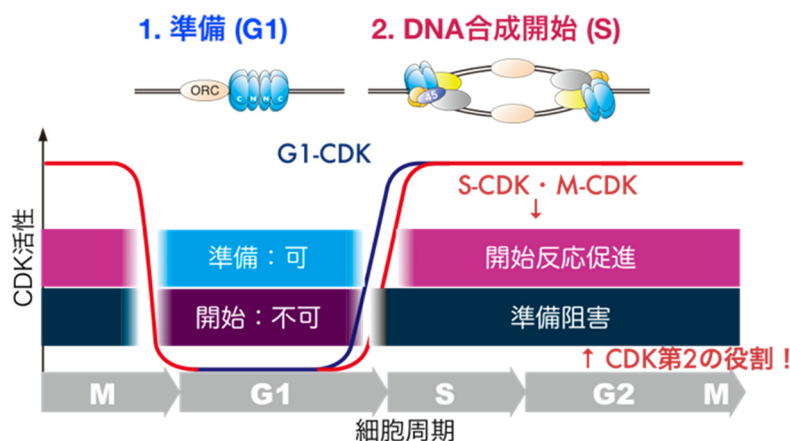


図 1. OCC 制御機構の模式図。詳細は本文を参照

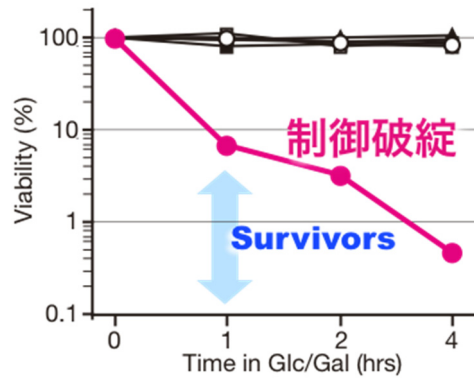


図 2. OCC 制御機構の破綻は大幅な生存率低下となる

方 法

1. 酵母株

本研究室が所有する W303-1a $\Delta bar1$ 株 (*MATa ade2-1 ura3-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3, 112 can1-100 $\Delta bar1::hisG$*) を親株とし、*KanMX*, *HIS3* カセットを用いた一般的な遺伝子破壊法により以下の欠損変異をそれぞれ導入した。 *$\Delta rad9$* , *$\Delta mrc1$* , *$\Delta sml1$* , *$\Delta rad53$* , *$\Delta sae2$* , *$\Delta rad51$* , *$\Delta rad52$* , *$\Delta mre11$* , *$\Delta yku70$* 。

2. 各変異体のスポット解析

各変異体を定常期付近まで増殖させ、10 倍希釈系列の細胞希釈液を作製し、各種薬剤を含む培地にスポットし、30°C におき、コロニー形成させた。

3. G1 期における時期尚早な DNA 複製の誘導とその後の解析

初期対数増殖期にある細胞 ($\sim 10^7$ cells/mL) に α ファクター (終濃度 40 ng/mL) を加え、G1 期停止させた後、ガラクトースを加え (終濃度 2%、この時刻を $t=0$ h とする)、その後経時的に細胞を分取した ($t=1, 2, 3$ h)。各サンプルについて、一部をプレートに蒔くことによる生存率測定、フローサイトメーターによる DNA 含量測定を行なった。3h サンプルから生じたサバイバーはパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) にて染色体プロファイルの解析を行った。

結果および考察

1. DNA ダメージ応答に関わる因子の欠損は DNA 過剰複製に対し、顕著な感受性を示さない

本研究では、CDK の活性がない状態でも DNA 複製を開始させ、一定条件 (ガラクトース存在) 下で DNA 過剰複製を起こさせるために Cdc45JET1 と Sld2-11D を同時に発現させることが可能な酵母株 (以下 OCC 変異株と略す) を用いた [7, 10]。コントロール株は、GALp のみを持つ野生型株である。まず、これらを親株として、図 3 左側に示したような、DNA ダメージ応答 (DNA damage response : DDR) 経路に関わる種々の因子の欠損株を作製し、変異体の基本的な挙動を確認した。図 1 に示すように、 *$\Delta sml1$* と *$\Delta yku70$* を除く全ての株が、DNA 複製阻害剤である Hydroxyurea、DNA2 本鎖切断を引き起こす zeocin に対し、高い感受性を示した (*$\Delta sml1$* は *$\Delta rad53$* 変異導入に必要な変異であり、実質野生型。また、 *$\Delta yku70$* の関わる非相同末端結合 (NHEJ) 経路は主要なプレーヤーでないことを示す)。この結果はこれまで報告されている通り、DDR 経路の欠損は、DNA ダメージに感受性となることを示しており、本研究で作製した株が期待通りの表現系を備えていることを示している。

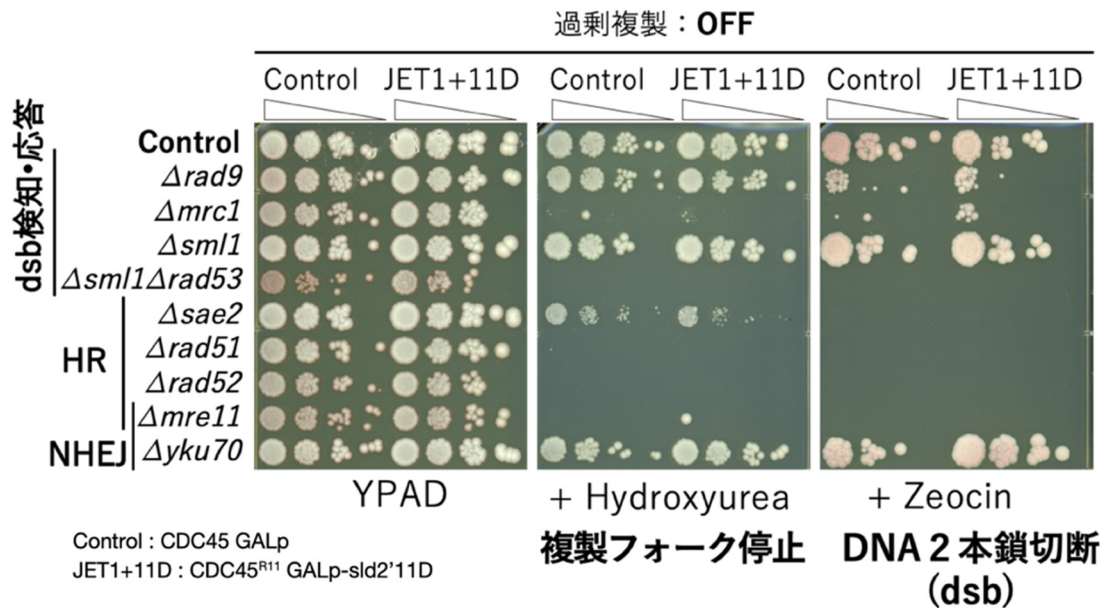


図 3. DDR 因子を欠損した酵母細胞は Hydroxyurea、Zeocin 感受性を示す

左側に示した遺伝子を欠損させた株を作製し、それらの希釈系列を作り、それぞれの培地にスポットし、培養した。

この結果を踏まえ、時期尚早な DNA 複製を誘導できる条件下で、これらの変異が細胞の生育に及ぼす影響を調べた (図 4)。右側のパネルの最上段の Control 株は生育条件の如何にかかわらず、同じように生育したのに対し、OCC 変異株 (JET1+11D) は、2%ガラクトースを含む培地 (+2.0% Gal) では生育が悪くなっていた (図 2、黄色の四角で囲んだ領域)。この時、種々の DDR 因子を欠損した株は、HU や zeocin 処理の際観察されたような大幅な生育不良は見られなかった (図 4、オレンジ色の四角で囲んだ領域)。もう少し詳しく見ると、親株と比べて $\Delta rad51$ と $\Delta rad52$ 株はやや、 $\Delta rad53$ 株はやや生育が悪くなっているようであったが、HU や zeocin 処理した際の生育 (図 3) と比べると、かなり生えているということが出来る。また、 $\Delta mrc1$ 株は親株よりもむしろ生育がよくなっているように見えた。

これらの結果は、ここで用いた DDR 経路に関わる因子群が、DNA 過剰複製で生じる DNA ダメージに対し有効に機能していないということを示している。そこで、これらの因子の欠損株で何が起きている (あるいは起きていない) のかについてさらなる情報を得るために、同調培養を用いた詳細な解析を行った。

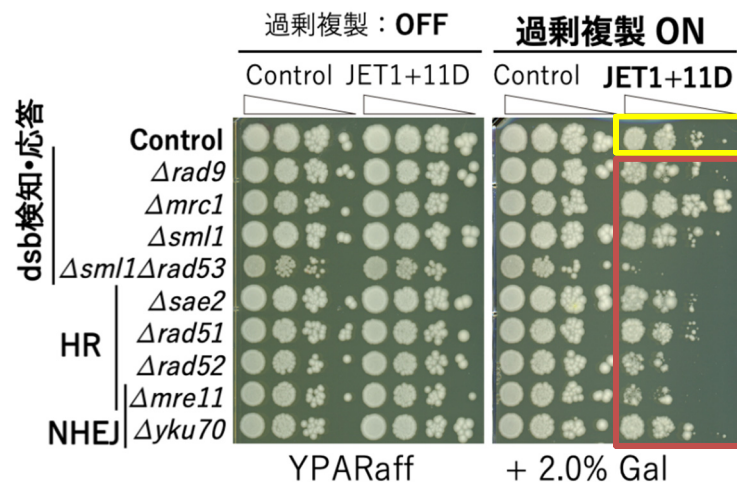


図 4. DDR 因子を欠損した酵母細胞は DNA 過剰複製で生じるダメージについて顕著な表現型を示さない

図 3 で用いたものと同じ 10 倍希釈系列培養液を過剰複製非誘導性 (YPARaff) および誘導性の培地 (+2.0% Gal) にそれぞれスポットし、30℃で 3 日間培養した。

2. DDRに関わる各種因子の欠損は過剰複製で生じる DNA ダメージに対し、有効に機能できない

前項の結果を踏まえ、それぞれの株について、同調培養を用いた詳細な細胞生存率のモニターを行った。各実験で程度の差はあれ、いずれの株も、過剰複製誘導による生存率低下を示した。しかし、驚くべきことに親株として用いた OCC 変異株よりも顕著に生存率が下がった株は一株もなかった。また、むしろ親株よりも生存率が回復しているというさなる驚きをもたらす株も存在した。ここでは紙幅の関係もあるため、顕著な表現型が見られた相同組み換え修復に関与する因子の欠損株である $\Delta rad51$ 、 $\Delta rad52$ 、 $\Delta sae2$ 株の結果を中心に結果を紹介する。

DNA の過剰複製が起きると、一旦複製された部位が部分的にもう一度複製されることとなり、2 重になったフォークの衝突や、M 期に染色体不分離となる構造の形成により、DNA2 本鎖切断に代表されるような DNA ダメージを生じると予想される。実際われわれはこれまでの解析で、このことを示している [7]。DNA2 本鎖切断は、非同源末端結合 (Non-Homologous End Joining : NHEJ) あるいは相同組み換え (Homologous Recombination : HR) で修復される。本研究で材料として用いた出芽酵母においては HR が主要な DNA2 本鎖切断の修復経路である。HR に関与する因子群のうち、主要なものとして、ここでは以下の 3 つの因子 : Sae2、Rad51、Rad52 をそれぞれ欠損させた。各因子の役割は以下の通り。Sae2 : HR に必須の ssDNA を産生するリセクション開始を促進する ; Rad51 : 実際の組み換え反応を行うリコンビナーゼ ; Rad52 : 組み換え中間体である D-loop 形成の促進。これまでの解析から $\Delta rad52$ では HR が完全に抑制、 $\Delta sae2$ 、 $\Delta rad51$ では、部分的に抑制されることが知られている。

過剰複製を誘導したところ、いずれの株でも、コントロール株同様の DNA 含量の増加が見られた (図 3 上段及び下段左側の各パネルの右側 (Gal))。このことは、全ての株において過剰 DNA 複製誘導が同程度のレベルで起きたことを示す。この時、各タイムポイントにおける細胞生存率は、親株と比べて生存率が大幅に低下するようなものは一つもなく、いずれの株も、むしろ生存率はやや上昇していた (図 5 右下のグラフ)。HR 関連因子の欠損株は複製フォークの進行阻害や dsb に対し高感受性を示す (図 3) が、本解析条件下では感受性は示さず、むしろ耐性となるという結果となった (図 4)。特に $\Delta rad51$ 、 $\Delta rad52$ 株ではその傾向が顕著であった。

過去の解析から、過剰複製が DDR 経路を活性化することは確実である [7]。しかし、今回の解析の結果は DDR 経路が DNA 過剰複製に対し有効に機能しえないことを示している。つまり、一旦過剰複製が起きると、DDR 経路は生存率を維持できるような形に染色体を修復できないことが示唆される。NHEJ に必須の Yku70 や、HR で中心的な役割を担う Rad51、Rad52 を欠損した株では生存率がコントロール株より高くなる傾向が見られた (特に、HR 経路に変異を入れた株 ($\Delta sae2$ 、 $\Delta rad51$ 、 $\Delta rad52$) で顕著)。これらの結果は、過剰複製が一旦起こって染色体がおかしくなってしまう細胞においては、むしろ修復が起きない方が良いということを示していると考えられる。

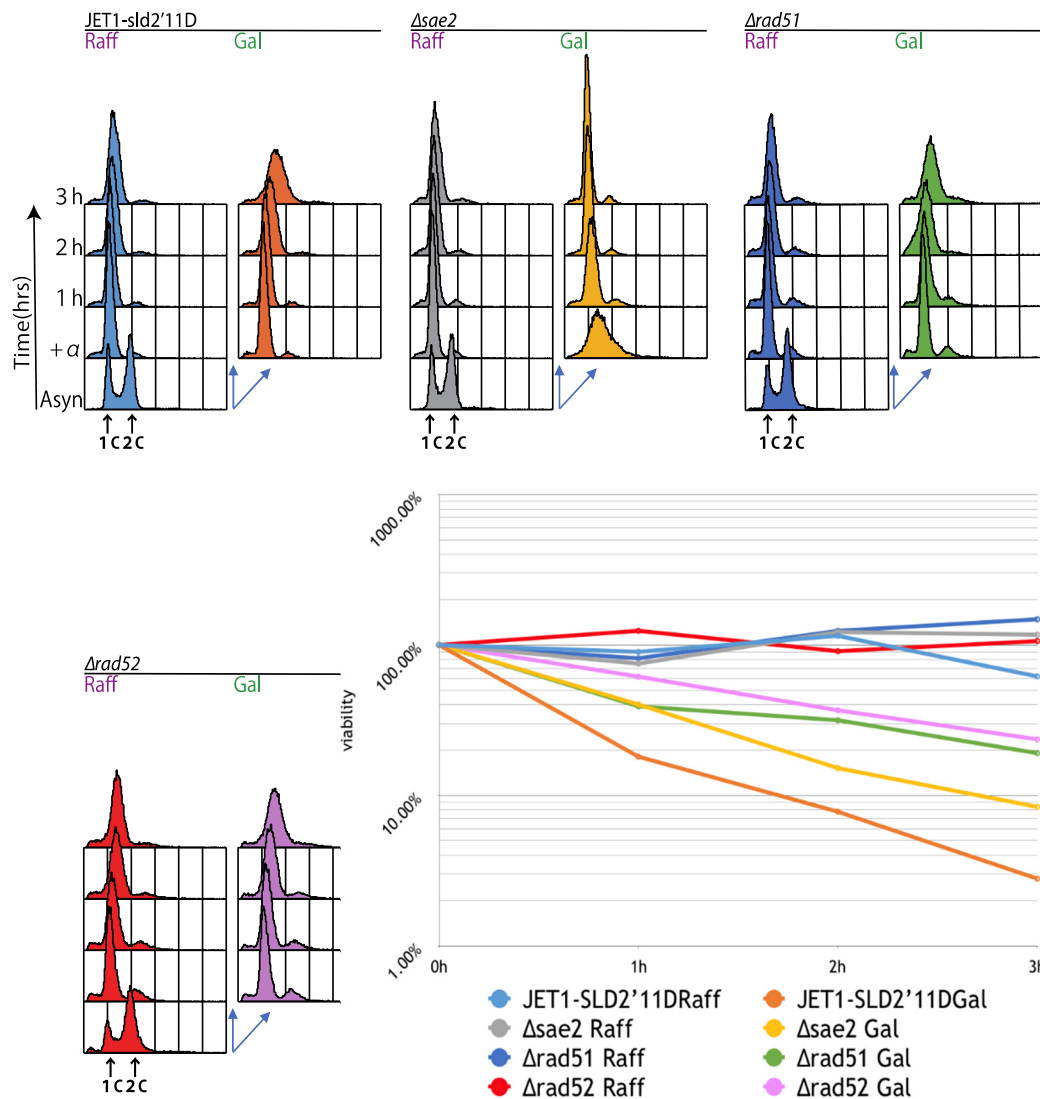


図5. Δ sae2、 Δ rad51、 Δ rad52株の同調培養によるG1期複製誘導と生存率のモニター

3. DDR 因子の欠損が過剰複製誘導後に出現するゲノム不安定化サバイバーの染色体構成に与える影響

過剰複製条件下で生じるサバイバークローンの多くは染色体不安定性を示すことがわかっている [7]。そこで、今回作製した各変異体についても同様の解析を行い、サバイバークローンの染色体構成を解析し、欠損遺伝子の違いが、サバイバーのゲノム不安定化のパターンや不安定化した染色体のプロファイルに影響を与えるかどうかを検討した。

ここでは、 Δ rad51、 Δ rad52株の解析結果について簡単に結果を紹介する。これらの株のサバイバーで、染色体異常を示したものの出現比率は、コントロール株と比べ低下していた。また、異常の全てが異数性であり、転座は見られなかった。いずれの株も過剰複製誘導後の生存率が高くなっていた (図3) ことから、この結果との関連は興味深い。転座を示す染色体が出現しなかったことは、過剰複製により生じる染色体転座は非相同末端結合により生じるものではなく、HRの産物であり、さらに、HR経路のせいで致死性になるような異常な構造・機能の染色体が生じ、より高い致死率となることを示唆する。今回の結果は、通常のDDRとは逆に、過剰複製が起きてしまっているような系では、HR修復経路が細胞にとって害をなすのではないかと驚きの結論を導くものである。

本研究成果は、一旦過剰複製が起きてしまうと、DDR経路が細胞生存率を下げることはあっても、生存に寄与できないという驚きの結果を導くものである。この結果は、細胞が複数の経路を持って、「確実に」過剰複製が起きないようにすることがいかに重要であるかということを逆説的に示すと同時に、何らかの理由で過剰複製が起きてしまった場合には、ゲノム不安定化は避けられない未来としてそこにあるため、HR経路を使って細胞生存率を下げることで、細胞集団内でのゲノム不安定化細胞の発生を抑えるという可能性まで考えられなくもないことを指摘しておきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、筆者の研究室（高知工科大学 環境理工学群 生命科学専攻 細胞増殖制御研究室）に所属している学生の岡本愛加である。

文 献

- 1) Arias EE, Walter JC. Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev.* 2007;21(5):497-518. Epub 2007/03/09. doi: 21/5/497 10.1101/gad.1508907. PMID: 17344412.
- 2) Blow JJ, Dutta A. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(6):476-86. Epub 2005/06/02. doi: nrm1663 10.1038/nrm1663. PMID: 15928711; PubMed Central PMCID: PMC2688777.
- 3) Diffley JF. Regulation of early events in chromosome replication. *Curr Biol.* 2004;14(18):R778-86. Epub 2004/09/24. doi: 10.1016/j.cub.2004.09.019. PMID: 15380092.
- 4) Siddiqui K, On KF, Diffley JF. Regulating DNA replication in eukarya. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2013;5(9). doi: 10.1101/cshperspect.a012930. PMID: 23838438.
- 5) Mimura S, Seki T, Tanaka S, Diffley JF. Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control. *Nature.* 2004;431(7012):1118-23. Epub 2004/10/22. doi: nature0302410.1038/nature03024. PMID: 15496876.
- 6) Nguyen VQ, Co C, Li JJ. Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature.* 2001;411(6841):1068-73. Epub 2001/06/29. doi: 10.1038/3508260035082600. PMID: 11429609.
- 7) Tanaka S, Araki H. Multiple regulatory mechanisms to inhibit untimely initiation of DNA replication are important for stable genome maintenance. *PLoS genetics.* 2011;7(6):e1002136. Epub 2011/06/24. doi: 10.1371/journal.pgen.1002136. PMID: 21698130.
- 8) Macheret M, Halazonetis TD. DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu Rev Pathol.* 2015;10:425-48. Epub 2015/01/27. doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040424. PMID: 25621662.
- 9) Hills SA, Diffley JF. DNA replication and oncogene-induced replicative stress. *Curr Biol.* 2014;24(10):R435-44. Epub 2014/05/23. doi: 10.1016/j.cub.2014.04.012. PMID: 24845676.
- 10) Tanaka S, Umemori T, Hirai K, Muramatsu S, Kamimura Y, Araki H. CDK-dependent phosphorylation of Ild2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature.* 2007;445(7125):328-32. Epub 2006/12/15. doi: nature05465 [pii]10.1038/nature05465. PubMed PMID: 17167415.