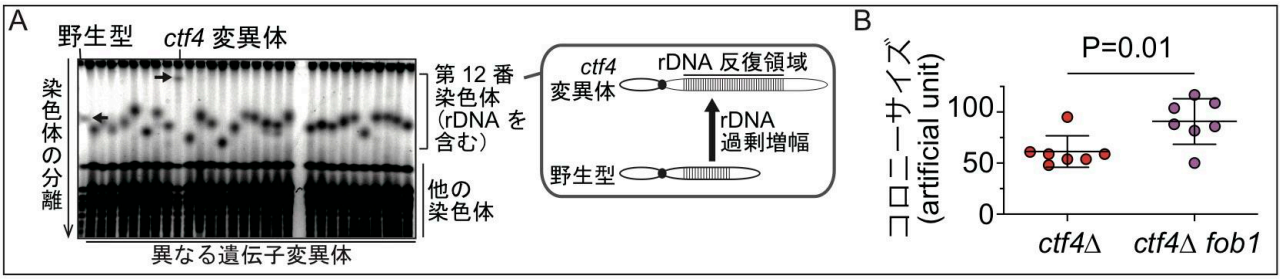
207　DNA複製阻害時のDNA切断からゲノム恒常性を維持する機構	佐々木　真理子

【目的】DNA 複製では、全 DNA 配列を正確にコピーする必要がある。しかし、DNA 上には様々な障害が存在するため複製装置の進行は頻繁に阻害され、最も危険な DNA 損傷である DNA 二本鎖切断（DNA double-strand break：DSB）が生じる。DSB は誤って直されるとゲノム再編成を誘導しゲノムを不安定化し、がんや多くのゲノム疾患を引き起こす。細胞周期の中で S 期は、複製阻害によって DSB が最も頻繁にできやすい時期である。しかしこれまで複製阻害時の DSB を高頻度で検出できる領域が見つかっていなかったため、その修復過程を DNA レベルで解析することが難しく複製阻害時の DSB 修復機構は不明であった。リボソーム RNA 遺伝子（rDNA）は真核生物で保存された反復配列であり、出芽酵母の rDNA は約 150 個の rDNA 配列からなる巨大なクラスターを形成している。rDNA 配列は、リボソーム RNA 転写ユニットの他に複製開始点と複製阻害点が存在する。そして複製開始点から開始した複製は、複製阻害点に結合している Fob1 タンパク質によって進行阻害を受け、その結果 DSB が生じる。DSB の修復過程で 異常が起こると rDNA コピー数変動が起こりやすく rDNA 領域が不安定になると考えられているが、DSB 修復機構は不明であった。研究代表者は先行研究において、rDNA 領域で生じる DSB をサザンブロッティングによって　検出しその修復過程を DNA レベルで解析する実験系を立ち上げた。そして DSB 修復に必要な因子を調べたところ、複製阻害時の DSB 修復には S 期以外の DSB 修復に必要な非相同末端結合や相同組換え因子は必要ではなかったことから、この DSB は新規の経路によって修復されることを明らかにした。そこで本研究課題では、この新規 DSB 修復機構を明らかにすることにより、複製阻害時の DSB からゲノム恒常性を維持する機構を明らかにすることを目指した。出芽酵母の rDNA 領域で生じる DSB の修復因子が欠損した細胞は、Fob1 発現時には DSB が生じその修復ができないため増殖阻害を示すが、Fob1 が発現しない条件では野生型と同様の増殖能を示すと予想される。そこで当初の研究実施計画では、この表現型を示す遺伝子欠損株を網羅的に探索することによって DSB 修復因子を同定するスクリーニングを行う予定であった。しかし、その前に DSB 修復因子欠損株において予想される増殖パターンが観察されることを確認することにした。

【方法】研究代表者は先行研究において、複製装置の構成因子である Ctf4 タンパク質は DSB の修復過程で作用し、DSB 修復時に rDNA 過剰増幅が起こることを防ぐ因子であることを明らかにした。そこで、*ctf4* 遺伝子欠損株と *ctf4 fob1* 二重変異株の増殖能を比較した。そのため、*CTF4* 遺伝子と *FOB1* 遺伝子の変異をヘテロに持つ二倍体を構築し四分子解析を行うことによって、*ctf4* 遺伝子欠損株と *ctf4 fob1* 二重変異株を単離しそのコロニーサイズを比較した。

【結果】すると *ctf4Δ*変異株は、野生型に比べて増殖阻害を示した。そしてこの増殖阻害は、*ctf4Δ fob1* 二重変異株においては抑制されていた。よって、DSB 修復に関与する Ctf4 タンパク質が欠損した細胞は *FOB1* 遺伝子の発現によって増殖阻害が誘導されることが明らかとなった。よって今後の研究においては、*FOB1* 遺伝子の発現によって増殖阻害が引き起こされる遺伝子欠損株を網羅的に探索するスクリーニングを行う予定である。

Ctf4 タンパク質は DSB 修復制御因子であり rDNA 過剰増幅を抑制する



207. DNA 複製阻害時の DNA 切断からゲノム恒常性を維持する機構

佐々木　真理子

*東京大学 分子細胞生物学研究所 ゲノム再生研究分野

Key words：DNA 複製，複製阻害，ゲノム安定性，DNA 二本鎖切断，rDNA

緒　言

DNA 複製は、遺伝情報を正確にコピーし娘細胞に伝えるために必須である。しかし、複製の鋳型となる DNA 上には、DNA 損傷、DNA に強固に結合しているタンパク質、DNA の二次構造など様々な障害が存在する。DNA 複製装置はこれらの障害に遭遇すると、そこで進行が止まる（図 1）。そしてこの障害を解消して複製を再開できなければ、未複製の領域ができるだけでなく、最も危険な DNA 損傷である DNA 二本鎖切断（DNA double-strand break：DSB）が生じる。DSB は誤って修復されると、DNA 配列の重複や欠失、染色体転座などを含むゲノム再編成を誘発しゲノム不安定化を引き起こす。そしてゲノム不安定化は、がんや多くのゲノム疾患を引き起こす原因となると考えられている（図 1）[1]。よって複製阻害時の DSB 修復機構を明らかにすることは、これらの疾患の原因を明らかにするために重要である。

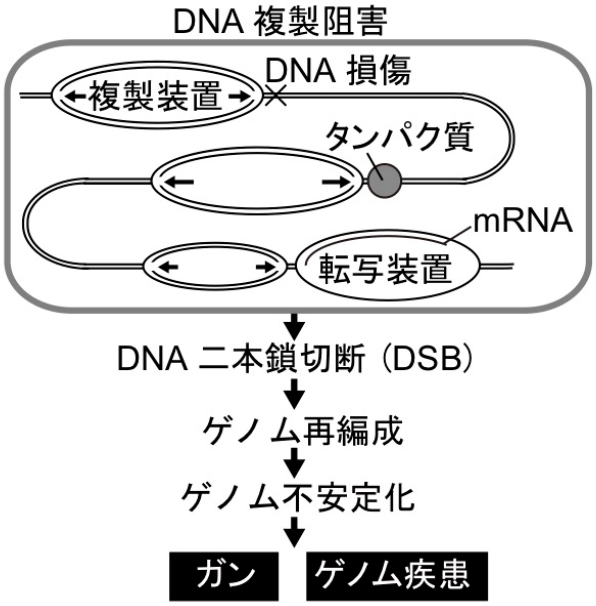


図 1. 複製阻害によって生じる DSB

DNA 複製装置（矢印）は、鋳型鎖上に存在する様々な障害によって進行阻害を受ける。複製阻害が起こると、DSB が生じやすくなる。DSB は誤って直されるとゲノム再編成を誘導しゲノムを不安定化し、がんやゲノム疾患を引き起こす。

*現在の所属：東京大学 定量生命科学研究所 ゲノム再生研究分野

DSB は、細胞周期の異なる時期において異なる頻度で生じる。G1 期や G2／M 期では、DSB は非常に低い頻度でしか生じない。しかし、これらの時期に配列特異的エンドヌクレアーゼを人為的に発現させて強制的に DSB を生じさせてその修復過程を解析する先行研究から、G1 期において DSB はその末端をつなぎ合わせる非相同末端結合によって修復されることが明らかになった（図 2)。さらに、G2／M 期では非相同末端結合の他に、姉妹染色分体上の相同配列を用いて組換え反応を行うことによってDSBを修復する相同組換え経路が働くことが明らかとなった(図2)。これらの時期に比べて、複製期は複製阻害によってDSBが最も頻繁に生じる時期である。しかし、複製阻害はゲノム上のランダムな場所で起こることが多いため、DSB を高頻度で検出しその修復過程を解析することが困難であった。そしてこのことが原因で、複製阻害によって生じるDSBの修復機構は不明であった。

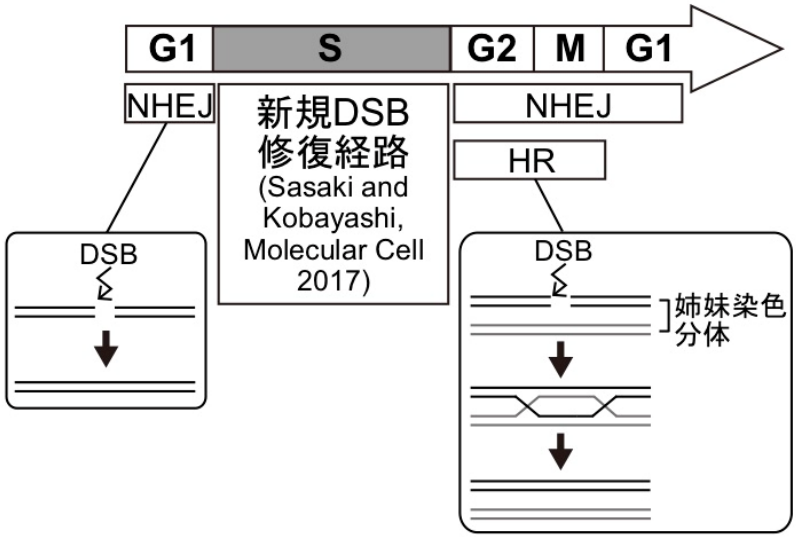


図 2. DSB 修復経路

細胞周期の G1 期に生じた DSB は、その末端をつなぎ合わせる非相同末端結合によって修復される。G2／M 期には、姉妹染色分体上の配列を鋳型にしてDSBを修復する相同組換えによってDSB は修復される。これまで S 期における DSB 修復機構は不明であったが、研究代表者は先行研究においてS期では相同組換えや非相同末端結合に依存しない新規の修復経路によってDSBが修復されることを明らかにした［2］。

研究代表者は先行研究において、出芽酵母のリボソーム RNA 遺伝子（rDNA）領域を用いて複製阻害時の DSB 修復機構を明らかにすることを目指した。rDNA は、真核生物で保存された反復配列である。出芽酵母の rDNA は、約 150 個の rDNA 配列からなる巨大なクラスターを形成している（図 3)。rDNA 配列には、リボソーム RNA 転写ユニットの他に複製開始点と複製阻害点が存在する[3]。S 期になるとDNA複製が複製開始点から両方向に行われる。しかし、35S rDNA と逆方向に進む複製装置は複製阻害点に結合している Fob1 タンパク質によってその進行が阻害されDSBが生じる（図 3)。また出芽酵母の rDNA 領域は、Fob1 タンパク質依存的な rDNA コピー数変動が起こりやすい。DSB はゲノム再編成を誘導する一番の原因であると考えられていることから、複製阻害によって生じたDSBの修復過程でrDNA不安定化が起こると考えられてきた。

先行研究から rDNA コピー数が激減した細胞では、コピー数を通常コピー数にまで回復するために相同組換え因子に依存したコピー数増加が起こることが知られている［4]。相同組換えは細胞周期の G2／M 期における DSB 修復機構であることから、複製阻害によって生じる DSB も相同組換えによって修復されると考えられてきた。しかし、このことを示す直接的な実験結果は得られておらず、複製阻害時の DSB 修復機構およびその制御機構は不明のままであった。

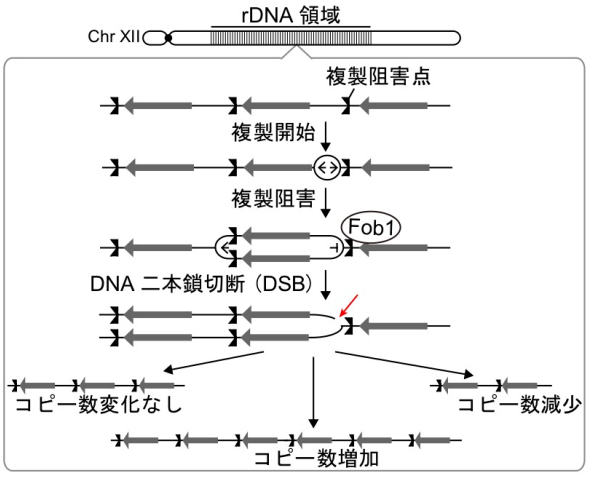


図 3. 出芽酵母の rDNA 領域の複製

S 期になると DNA 複製が複製開始点から両方向に行われるが、右方向に進む複製装置は複製阻害点に結合した Fob1 タンパク質によって進行が阻害される。そしてその結果、DSB が生じる。DSB が正しく修復されないと、rDNA コピー数変動が起こる。

研究代表者は rDNA で複製阻害の結果生じる DSB およびその修復過程を DNA レベルで解析する実験系を立ち上げ、DSB 修復過程で生じる中間体を解析した。さらに相同組換え因子が DSB 修復に必要かどうかを調べた。すると、これまで複製阻害時の DSB 修復に必要であると信じられてきた相同組換え因子は、DSB 修復には必要ではないというこれまでの概念を覆す結果を得た［2］。つまり複製阻害時には、これまで知られていない新規の経路によって DSB が修復されることを突き止めた（図 2）［2］。そこで本研究課題では、この新規 DSB 修復機構を明らかにすることにより、複製阻害時の DSB からゲノムの恒常性を維持する機構を明らかにすることを目指した。

方　法

1.　rDNA 不安定性の Fob1 依存性の解析

先行研究において rDNA 領域の安定性維持に関与することが明らかになった遺伝子（Your Favorite Gene : YFG）を、野生型と *fob1* 変異株から欠失させた。そして *yfgΔ*および *yfgΔ fob1* 変異株を YPD 液体培地（1% yeast extract、2% peptone、2% glucose）で一晩培養した。そして先行研究と同様にこれらの細胞からゲノム DNA を抽出し、パルスフィールドゲル電気泳動によって染色体を分離後、ゲルをエチジウムブロマイドによって染色し DNA を検出した［2］。そして、第 12 番染色体のバンドのスメア度を比較した。*yfgΔ*においては rDNA 領域が不安定になることから第 12 番染色体のバンドはスメアになった。そしてこのスメア度が *yfgΔ fob1* 変異株の DNA サンプルにおいて抑制されていた場合、*yfgΔ*変異株における rDNA 不安定性は Fob1 に依存していると判断した。

2.　*ctf4Δ*変異株と *ctf4Δ fob1* 変異株の構築および細胞増殖能の比較

*ctf4Δ*変異株と *ctf4Δ fob1* 二重変異株のコロニーサイズを比較するために、*CTF4* 遺伝子と *FOB1* 遺伝子がヘテロに欠失している酵母の二倍体（*MATa/alpha*、*ctf4Δ::kanMX/CTF4*、*fob1::LEU2/FOB1*）を構築した。そしてこの酵母を 0.01% potassium acetate で培養することによって減数分裂期に導入し、一倍体の胞子形成を誘導した。そして胞子形成後 2 日目のプレートをスキャナーを用いてスキャンした。そして ImageJ（NIH）を用いて、各コロニーのサイズを定量した。次にこのプレートを選択培地にレプリカプレートすることによって、各コロニーの遺伝子型を決定した。そして、*ctf4Δ*変異株と *ctf4Δ fob1* 二重変異株のコロニーサイズを比較し、Unpaired t-test を用いた統計的解析を行った。

結果および考察

1. rDNA 領域の安定性維持に関与する遺伝子の同定

出芽酵母の rDNA 領域では、Fob1 タンパク質によって複製阻害が起き DSB 形成が誘導される。このことから、細胞は DSB 修復能の有無によって以下の異なる表現型を示すと予想した（図 4）。

- DSB 修復因子が欠損した細胞は Fob1 タンパク質が発現していない時と比べて、Fob1 発現時には DSB を修復できないため増殖阻害を示す。
- DSB 修復能を持つ細胞は、Fob1 発現の有無によって増殖に影響は受けない。

そこで当初の実験実施計画では、Fob1 発現時に増殖阻害を示す遺伝子変異株を探索することによって複製阻害時の DSB 修復因子を同定することを計画した。そしてその際、出芽酵母の二倍体の細胞において対立遺伝子の片方が破壊されたヘテロ型遺伝子破壊株ライブラリーを用いた合成致死スクリーニング法 dSLAM（heterozygote diploid-based synthetic lethality analysis with microarray）を用いたゲノムワイドスクリーニングを行う予定であった。



図 4. 出芽酵母 rDNA における DSB 修復に必要な因子の同定
rDNA 領域では Fob1 タンパク質による複製阻害の結果 DSB が生じる。この DSB を修復できない細胞は、Fob1 を発現すると DSB を修復できないことから増殖阻害を示し、コロニーサイズが小さくなる。一方で DSB を修復できる細胞は、Fob1 の発現の有無によって増殖に影響は受けない。この表現型の違いを利用して当初の研究実施計画では、Fob1 発現時に増殖阻害を示す変異株を同定するゲノムワイドなスクリーニングを遂行する予定であった。

しかし、ゲノムワイドスクリーニングを行う前にまず、複製阻害応答欠損細胞において上記の表現型が確認できるかを調べる予備実験を行うことにした。研究代表者は先行研究において、パルスフィールドゲル電気泳動法を用いて出芽酵母の rDNA 領域が不安定になる変異株を探索するゲノムワイドスクリーニングを遂行した［5］。出芽酵母の rDNA 領域は第 12 番染色体上に存在しており、この染色体の約半分を占めている（図 3）。rDNA 領域が安定な細胞を増殖すると、集団中のすべての細胞において第 12 番染色体の大きさは均一である。よってゲノム DNA を抽出しパルスフィールドゲル電気泳動によって染色体を分離すると、第 12 番染色体のバンドはシャープに見える。一方で、rDNA 領域が不安定な細胞ではコピー数の変動が起こることから、細胞集団中の第 12 番染色体の大きさは不均一になるため、第 12 番染色体のバンドはスメアになる。そこで、出芽酵母の約 6,000 個の遺伝子のうちの約 4,800 個の非必須遺伝子を欠損させた変異株ライブラリー全てからゲノム DNA を抽出しパルスフィールドゲル電気泳動によって染色体を分離し、第 12 番染色体の挙動を解析した。その結果、野生型と比較して rDNA 領域が不安定になる変異株が約 700 個同定された［5］。

そこで、まずこれらの変異株において rDNA 不安定化の再現性を確認し、rDNA 不安定化が Fob1 による複製阻害に依存して起こるかどうかを調べた。その結果、ヒストン脱アセチル化酵素 Sir2、複製装置の構成因子 Ctf4、複製依存的ヌクレオソーム再構築因子 CAF-1 複合体、mRNA 分解酵素 CCR4-NOT 複合体などが欠損すると、Fob1 依存的に rDNA 不安定化が起こることを明らかにした（図 5）［2、5、6］。つまりこれらの因子は、Fob1 による複製阻害によって生じる DSB 修復過程で作用する候補因子であることを明らかにした。

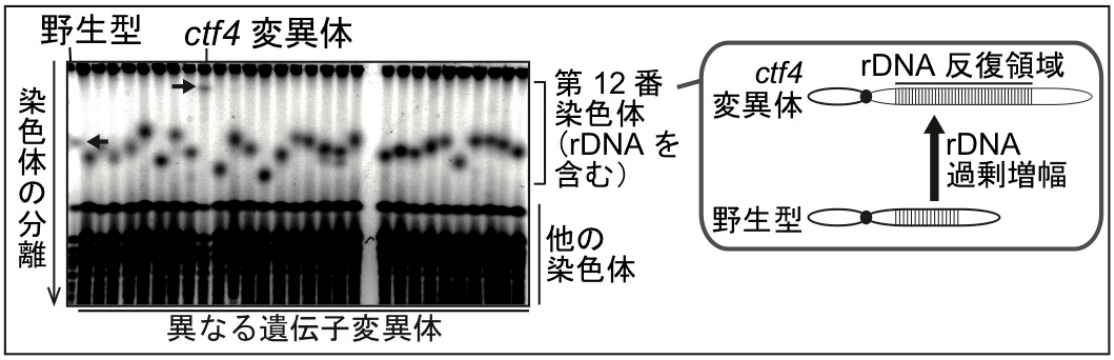


図 5. 出芽酵母 rDNA 領域が不安定になる変異体の探索

出芽酵母の約 4,800 個の非必須遺伝子欠損株ライブラリーからゲノム DNA を抽出しパルスフィールドゲル電気泳動によって染色体を分離後、エチジウムブロマイドによって DNA を染色した。一番左のレーンには野生型（W）から抽出した DNA を流した。それ以外のレーンには異なる遺伝子欠損株から抽出した DNA を流した。その結果、*ctf4* 遺伝子欠損株では rDNA の過剰増幅が起こることが判明した［5］。

2. *CTF4* 遺伝子欠損株における *FOB1* 遺伝子発現時の細胞増殖能の解析

複製装置の構成因子をコードしている *CTF4* 遺伝子が欠損すると、Fob1 依存的に rDNA 過剰増幅が起こることが明らかとなった。研究代表者は先行研究において、Ctf4 タンパク質が DSB 修復に関与するかを調べた。その結果、Ctf4 タンパク質が存在すると DSB は新規の経路によって修復され rDNA 安定性が維持されるのに対して、Ctf4 タンパク質が欠損すると DSB は通常 G2／M 期で作用する相同組換えによって修復されるが rDNA 再編成が誘導されることが判明した。つまり、Ctf4 タンパク質は DSB 修復を制御する因子であることが明らかとなった［2］。そこで、*ctf4Δ*変異株の増殖が *FOB1* 遺伝子の発現の有無によって変化するかどうかを調べた。*ctf4Δ*変異株は野生型に比べると増殖阻害を示したが（data not shown）、これは *FOB1* 遺伝子に変異を導入することによって改善された（図 6）。この結果は、Ctf4 タンパク質が DSB 修復制御因子であるということから予想される結果であった。今後、上記の解析で同定された CAF-1 複合体や CCR4-NOT 複合体の構成因子についても増殖パターンを解析するとともに DSB 修復能についても解析する予定である。そしてこれらの因子が同様のパターンを示すことが明らかとなったら、当初の計画であるゲノムワイドなスクリーニングを行う予定である。

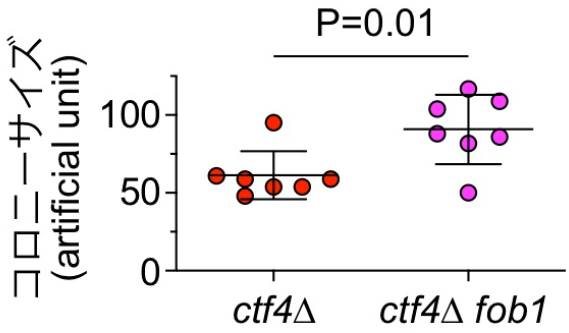


図 6. *FOB1* 遺伝子発現による *ctf4Δ*変異株の増殖能の変化

先行研究から *ctf4Δ*変異株では Fob1 依存的に rDNA 不安定化が起こることが明らかになった。そこで、*ctf4Δ*と *ctf4Δ fob1* 変異株のコロニーサイズを比較した。*ctf4Δ*変異株は野生型に比べてコロニーサイズが小さい（data not shown）ことから増殖阻害を示した。この増殖阻害は、rDNA 領域の複製阻害を誘導する *FOB1* 遺伝子に変異を導入すると抑制された（Unpaired t test、P = 0.013）。

共同研究者・謝辞

本研究を行うに当たり所属研究室長である東京大学定量生命科学研究所ゲノム再生研究分野の小林武彦教授、および実験補助をしていただいた津村真知子技術補佐員に感謝の意を表します。

文　献

1) Sasaki M, Lange J, Keeney S. 2010. Genome destabilization by homologous recombination in the germ line. Nature Reviews Molecular Cell Biology 11: 182–195. PMID: 20164840 DOI: 10.1038/nrm2849

2) Sasaki M, Kobayashi T. 2017. Ctf4 Prevents Genome Rearrangements by Suppressing DNA Double-Strand Break Formation and Its End Resection at Arrested Replication Forks. Molecular cell 66: 533-545.e535. PMID: 28525744 DOI: 10.1016/j.molcel.2017.04.020.

3) Kobayashi T, Sasaki M. 2017. Ribosomal DNA stability is supported by many 'buffer genes'-introduction to the Yeast rDNA Stability Database. FEMS yeast research 17. PMID: 28087673 DOI: 10.1093/femsyr/fox001.

4) Kobayashi T, Horiuchi T, Tongaonkar P, Vu L, Nomura M. 2004. SIR2 regulates recombination between different rDNA repeats, but not recombination within individual rRNA genes in yeast. Cell 117: 441-453. PMID: 15137938 DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00414-3.

5) Saka K, Takahashi A, Sasaki M, Kobayashi T. 2016. More than 10% of yeast genes are related to genome stability and influence cellular senescence via rDNA maintenance. Nucleic acids research 44: 4211-4221. PMID: 26912831 DOI: 10.1093/nar/gkw110.

6) Hosoyamada S, Sasaki M, Kobayashi T. 2019. The CCR4-NOT complex maintains stability and transcription of rRNA genes by repressing antisense transcripts. Molecular and Cellular Biology 40: e00320-19. PMID: 31611247 DOI: 10.1128/MCB.00320-19.