

DNA複製機構の破綻によるゲノム不安定性とがん化

東北大学 学際科学フロンティア研究所
大学 保一

1. 研究目的

細胞は分裂する際、ゲノム情報の担体であるDNAを迅速かつ正確に複製する必要があるが、DNA複製のエラーは特定の頻度で生じ、突然変異として遺伝情報に記録される。真核生物では10種類以上のDNAポリメラーゼが存在し、それぞれのポリメラーゼによるDNA合成反応の正確性や速度は異なるため、多くのポリメラーゼによる分業はゲノム情報の維持という点において重要な現象である。本研究では、ヒト細胞において全ゲノムを網羅して、個々のDNAポリメラーゼの合成領域を同定する実験系を構築し、DNAポリメラーゼがどのように協調して機能するかを包括的に解析する。ゲノム領域の大半を複製する2つのポリメラーゼPol ϵ (イプシロン)、Pol δ (デルタ)を対象として研究を実施し、ゲノム上に散在する様々な構造・特徴が及ぼす、DNAポリメラーゼ分業への影響を検証する。最近になり、がん細胞におけるゲノム不安定性とDNAポリメラーゼ機能の変化が深く関連することが様々な研究で示されている。よって、本研究で構築される実験系を用いることにより、がん細胞での染色体構造変化の起点となる領域(脆弱部位: fragile site)や突然変異率が高い領域にて、どのようにDNAポリメラーゼが使用されているかを検証し、がん発生過程における突然変異・染色体異常の起因となるDNA複製機構の変化を特定する。

現在までの分裂酵母研究から、ヒト細胞においてもPol ϵ 、Pol δ それぞれはリーディング鎖、および、ラギング鎖合成を行うと予想されるが、ゲノムサイズが格段に大きいヒト細胞では、1つの複製装置が合成する領域が長大になることから、実施者が現在まで研究対象とした分裂酵母で示される以上にDNAポリメラーゼの突発的な脱落や様々なゲノム上の障害による影響が大きいと予想される。従って、Pol ϵ 、Pol δ の機能が著しく変化する領域がゲノム上に存在するか、どのような特徴をもった領域であるかを検証する。

2. 研究方法

実施者は現在までに、分裂酵母を用い、DNAポリメラーゼ(Pol)の合成をゲノム上で網羅的に解析する実験系を開発し、ゲノムの大半を複製する2つのポリメラーゼPol ϵ 、Pol δ の詳細な機能プロファイルを得た(Daigaku et al 2015; 実験名Polymerase-usage: Pu-seq)。Pu-seq実験では、細胞内の特定のPolの活性部位を変異させ、対象となるPolによるゲノムDNA中へのリボヌクレオチドの取り込みを誘導することにより、取り込まれたリボヌクレオチドの分布から対象となるPolによって合成された領域を特定する。リボヌクレオチドが取り込まれた領域をアルカリ処理により断片化して、次世代シーケンサーによって解析し、対象となるPolが合成する領域を特定することができる。

本研究では、まず、ヒト細胞におけるPu-seq実験に必要な胞株の樹立を実施する。変異PolによるリボヌクレオチドのDNAへの取り込みを誘導するためには、対象となるPolの活性部位へ変異の導入、およ

び、DNAに取り込まれたリボヌクレオチドを除去するRNaseH2を一過的に不活性化する必要がある。この目的のために、遺伝子可塑性の高い大腸がん由来の細胞株（HCT116）を使用し、第一に、CRISPR/Cas9系を使用し、リボヌクレオチドを取り込むPol ϵ 、Pol δ の変異株をそれぞれ作成する。その後、作成した変異株にAIDタンパク質分解法（薬剤により標的タンパク質の分解誘導；Natsume et al. 2016）を応用し、細胞内でのRNaseH2の迅速な分解誘導を可能とする遺伝子修飾・導入を行う。これらのゲノム編集を受けた細胞株の樹立後、各DNAポリメラーゼを対象としたPu-seq実験の実施し、ゲノム網羅して個々のDNAポリメラーゼの機能分布明らかにするためのゲノム情報科学的な解析を実施する。

3. 研究結果

本助成金の支援期間内においては、上記の通り計画され研究において、DNA合成中にリボヌクレオチドの取り込みを誘導するDNAポリメラーゼ遺伝子への変異導入、および、得たら変異体の解析を実施した。その詳細を以下に示す。

リボヌクレオチドを取り込んでDNA合成を行うポリメラーゼ変異体の作成

ヒト細胞におけるPu-seq実験のその第一段階として、正常に2倍体を形成するHCT116細胞株を使用し、ゲノム複製の大半を担うPol δ （デルタ）、Pol ϵ （イプシロン）の触媒サブユニットをコードする遺伝子（POLD1、POLE1）へ、単一のアミノ酸を置換する変異を導入する実験を実施した。具体的には、CRISPR-Cas9システムによる標的遺伝子座での二重鎖切断の誘導と同時に、改変配列及びその周辺配列をもつ一本鎖DNAを細胞内に導入した。この実験操作後に形成されたHCT116細胞株のコロニーのうち、POLD1改変においては候補となる100クローン、POLE1改変においては200クロンのポリメラーゼ遺伝子の解析を行った。その結果、POLD1の単一遺伝子座へ変異が導入された1クローン、POLE1遺伝子の両遺伝子座への変異が導入されたものを12クローンを単離した。POLD1、POLE1遺伝子座の両方において、CRISPR-Cas9システムによる鎖切断は5%程度の細胞で起きていることから、POLD1遺伝子への変異導入頻度が低く、単一遺伝子座へのみ変異が導入されたことは、該当変異がPOLD1への機能を低減し、変異導入された細胞の生存率に影響を及ぼしたためであると考えられる。

DNAポリメラーゼ変異体でのゲノムDNAへのリボヌクレオチド取り込み量の検証

次に、上記の実験で得られたDNAポリメラーゼの変異体における、ゲノムDNAへ取り込まれたリボヌクレオチドを検証した。ゲノムDNA中のリボヌクレオチドはRNaseH2に除去されるので、リボヌクレオチドの蓄積を誘導するために、RNaseH2のコンポーネントであるRNaseH2AのsiRNAによるノックダウンを行った。ノックダウンを行ったDNAポリメラーゼ変異体、および、その親株からDNAを抽出し、アルカリ処理後によりリボヌクレオチドの部位での断裂を誘導し、電気泳動後に断片化した単鎖DNAを可視化した。この方法によりゲノムDNAへのリボヌクレオチドの取り込み量を解析した。この実験により、RNaseH2AのノックダウンがゲノムDNAへのリボヌクレオチドの蓄積を引き起こすことが確認されたのと同時に、親株に比べて、POLD1、POLE1変異株の両者において、ノックダウン後のリボヌクレオチド蓄積量増加していることが観察された。この結果は、実験デザインの通り、導入したPOLD1、POLE1の変異それぞれがPol δ 、Pol ϵ によるDNA合成領域でのリボヌクレオチドの取り込みを誘発したことを示す。

4. 今後の研究へ向けた考察

本研究においては、助成期間（1年）内にDNA合成中にリボヌクレオチドの取り込みを誘導す

るDNAポリメラーゼの変異をもつヒト培養細胞株の作成, および, 得たら変異株の解析を実施した. 今後は計画されている通りにAIDタンパク質分解を利用し, 効率的にRNaseH2の不活化する方法を確立すると同時に, siRNAによるRNaseH2Aのノックダウンによるリボヌクレオチドの取り込みの増加が, 作成した変異体を利用したDNAポリメラーゼの解析に十分なものであるかを検証する. ノックダウン後の細胞における, ゲノム上でのリボヌクレオチド取り込みを箇所を網羅的に特定する. そのために, アルカリによって誘起されるリボヌクレオチド部位の断裂によって得られる単鎖DNAから, 次世代シーケンサー解析のためのDNAライブラリーを作成し, 解析を行う予定である. これらの実験を通し, AIDタンパク質分解, および, siRNAによるノックダウンのどちらがRNaseH2の不活化する方法として効果的あるかを検証し, 変異DNAポリメラーゼ (Pol ϵ , Pol δ) によるリボヌクレオチドの取り込みの効率的に誘導する方法を同定する. 最終的に, ゲノムを網羅して変異ポリメラーゼによるリボヌクレオチドの取り込みの分布を明らかにし, 該当ポリメラーゼが合成を行う部分を明らかにする.

5. 参考文献

Daigaku Y, Keszthelyi A, Müller CA, Miyabe I, Brooks T, Retkute R, Hubank M, Nieduszyski CA, Carr AM. A global profile of replicative polymerase usage. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015, 22, 192-8

Natsume T, Kiyomitsu T, Saga Y, and Kanemaki MT Rapid protein depletion in human cells by auxin-inducible degron tagging with short homology donors. *Cell Reports*, 2016 15, 210-8.