

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻

平成 23 年度 博士課程入学

氏名 増田 晃士

指導教官名 白髭 克彦

論文題目

分裂酵母における複製起点決定因子の解明

序論

細胞の遺伝情報が正確に継承されるためには、細胞の持つ DNA が正確に倍加することが必須である。母細胞で複製された DNA は、それぞれの娘細胞に等しく分配されることで正しく継承される。そのため、細胞のもつ全てのゲノム DNA は細胞周期ごとに正確に一度だけ複製されなければならない。複製回数の過不足は遺伝情報の欠落・重複を引き起こしてしまう。また、倍加が部分的にしかおきていない複製途中の染色体は、構造的に非常に不安定であることが知られる。実際、DNA 複製に関わる遺伝子の変異が様々な疾患の原因遺伝子として報告されている。従って、DNA 複製機構の理解は生物学的な興味のみならず、疾患の原因解明においても非常に重要である。

DNA 複製は複製起点と呼ばれるゲノム DNA 上の特定領域から開始される。大きなゲノム DNA を有する真核生物ではゲノム DNA の大きさに応じて数百から数万ヶ所の複製起点が存在することが知られている。DNA 複製の破綻は細胞にとって致命的であるため、複製の開始から完了までは厳密に制御されたステップからなる。最初のステップは複製起点に複製起点認識タンパク質 (Origin Recognition Complex, ORC) が結合することである。次にこれらの ORC 結合領域からいくつかを選択され、MCM2-7 ヘリケースと呼ばれる六量体のリング状タンパク質をはじめとする複数のタンパク質因子が段階的に複製起点にリクルートされる。以上の過程を経て複製前複合体 (pre-replicative complex, pre-RC) が複製開始までに複製起点に形成される (図 1)。このような複製前複合体形成から複製の完了までのタンパク質側の詳細な分子機構が明らかとなってきている一方で、ゲノム DNA 上のどこが複製起点として機能するのかという問題、すなわち複製起点の規定因子については必ずしも明らかでない。

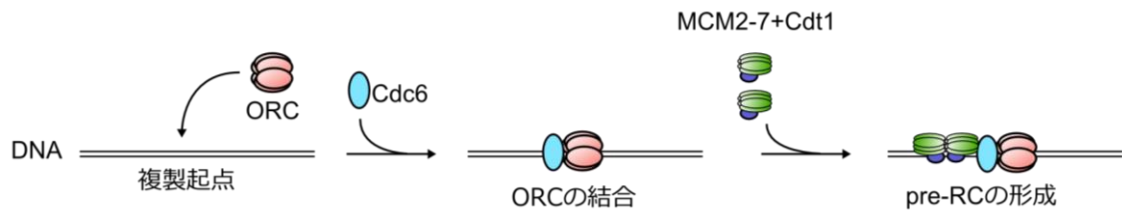


図 1. 複製の開始段階の模式図。

歴史的に最初に複製起点が同定された真核生物は出芽酵母であり、プラスミドの自己複製を誘導できる DNA 領域として同定された。この DNA 領域は特徴的な 11 bp のコンセンサス配列を有し、ORC はこのコンセンサス配列を認識して複製起点に結合することが知られる。すなわち、出芽酵母では DNA 配列によって複製起点が規定されている。面白いことに、他の真核生物種では ORC 複合体は存在するにもかかわらずこのようなコンセンサス配列が見出されない。DNA 配列とは異なる別のメカニズムによる複製起点の決定が行なわれていることがわかってきた。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* において複製起点として同定された DNA 領域は、A・T リッチであること、非遺伝子領域に存在することが知られている (Heichinger et al., 2006)。しかし、そのような特徴を満たす領域はゲノム DNA 上に数千か所存在しており、実際に複製が開始される複製起点の数よりも大幅に多い。そのため、複製起点の cis 決定因子の普遍的な理解が進んだとは言いがたい状況にある。本研究の目的は、分裂酵母における複製起点をゲノムワイドに解析し、複製起点を規定する因子を明らかにすることである。

近年利用可能となった大量並列型シーケンサーを活用することでゲノム上の複製起点の位置を網羅的に、かつこれまでにない高解像度で決定することが可能となってきている (ChIP-seq 法)。分裂酵母 *Orc4* (ORC サブユニット) と *Mcm2* (MCM ヘリケースサブユニット) の ChIP-seq 解析を行うため、染色体上のこれら遺伝子の C 末端に PK エピトープタグを付加した細胞株を作製し、G 1 期に同調した細胞を用いて抗 PK 抗体を用いた ChIP-seq 解析を行った。

分裂酵母ゲノムにおける複製起点の同定

ChIP-seq データが妥当であるか確認するため、これまでに報告された代表的な複製起点における ChIP-seq プロファイル調べたところ、予想通り *Orc4* と *Mcm2* はともに染色体に結合していることが確かめられた。次に、複製起点のゲノムワイドな分布を明らかにするため、全ゲノム上での *Orc4* と *Mcm2* のピーク同定を行った。*Orc4* については 756 ヶ所、*Mcm2* については 380 ヶ所の結合部位が同定され、*Orc4* と *Mcm2* の両方が存在するピークを pre-RC ピークと呼ぶことにした。本研究で同定された複製起点は既報のものと同一致を示すことが確かめられた。本研究では、これまでに同定されていない pre-RC も 64 ヶ所同定された。これらの新規同定部位が確かに pre-RC ピークであることは、ChIP-定量 PCR 解析により確認されている。大量並列型シーケンサーを用いたことにより、これま

での報告よりも網羅性と解像度の両方でより優れた複製起点のマッピングができたものと考えられる。以降では、この同定された複製起点を基に、複製起点の *cis* 規定因子の探索を行なった。

ORC の染色体への結合はポリ (dA/dT) トラック数に相関する

複製起点の形成は ORC が染色体に結合することから始まる。本研究で同定された複製起点にコンセンサス配列が存在するかを検討するため、ORC ピークにおけるモチーフ解析を行った。この解析では、全ての *Orc4* ピークをインプットとして用い、結合領域 DNA 中に保存されているモチーフ配列が存在するかを検討した。その結果、*Orc4* ピークにおいて A または T 塩基が少なくとも 3 つ連続する特徴的なモチーフ配列 (AAA[A/T]AAA[A/T]AAA[A/T]AAA) を同定し、ポリ (dA/dT) トラックと呼ぶことにした。*Orc4* ピーク周辺のモチーフ配列数を調べたところ、1 つの *Orc4* ピークに対して 2 つ以上のモチーフ配列が存在するケースが多く見られた。さらに、*Orc4* の染色体結合効率とポリ (dA/dT) トラックの数に相関を調べたところ、*Orc4* の染色体への結合効率はポリ (dA/dT) トラックの数が多いほど高くなった。この結果から ORC の染色体上での存在確率がポリ (dA/dT) トラックの数に相関することを示された。

pre-RC は divergent な転写領域で優先的に形成される

多細胞生物の複製起点ではコンセンサス配列は報告されていない。これまで報告されている多細胞生物の複製起点の特徴は、複製起点と転写領域との相関である。ハエ、マウス、そしてヒトの転写開始点周辺で複製の開始が見られる傾向があることや、ゲノムワイドな解析により転写活性の高い領域と複製領域との相関が高いことが報告されている。しかしながら、いずれも相関関係を示すことにとどまっており、複製起点形成と転写の因果関係は不明である。分裂酵母において、遺伝子の転写が複製起点を規定しうるか調べるため、複製起点周辺遺伝子の転写方向を解析した。その結果、pre-RC の周辺では複製起点がない場合に比べて、両隣の遺伝子が複製起点から離れる方向に転写される divergent 転写領域の割合が大きかった。この結果は原核生物のほとんどの遺伝子がリーディング鎖にコードされており、複製装置の進行方向と遺伝子の転写方向が同一である、という構造を想起させる。もしこの構造が分裂酵母にも当てはまるのならば、複製起点周辺の転写方向の偏りは、両隣の遺伝子にとどまらず複製の終結点までみられると予想される。そこで、複製起点から 2 番目に近傍の遺伝子についても、転写方向の偏りがみられるかどうか調べた。興味深いことに複製起点から 2 番目に近い遺伝子ではそのような転写方向の偏りは全く見られなかった。すなわち、遺伝子の転写方向の偏りは複製起点の両隣の遺伝子に限られていることが示された。従って分裂酵母では、原核生物のように複製装置の進行方向と転写方向を同じとなるような偏りがあるのではなく、遺伝子上流領域が pre-RC の形成に好ましい構造であることが示唆された。

転写方向の反転は pre-RC の形成を阻害する

pre-RC の両隣の遺伝子として divergent 転写領域が好まれることから、転写している遺伝子上流領域が pre-RC の形成を促進する、という仮説が考えられた。その仮説を検証するため、複製起点両隣の内在性遺伝子の転写方向を反転させたときに、pre-RC の形成が阻害されるかを調べた。複製起点の両隣で 2 つの遺伝子が同じ方向に転写される tandem 転写領域のうちの一つの遺伝子(*urg1*)の転写方向を反転させ、両方の遺伝子の転写方向が複製起点に向かう convergent 転写領域に変換したときの pre-RC の形成を調べた。その結果、転写方向を反転させた遺伝子の隣の複製起点では、Mcm2 の結合量は約 60%程まで減少した。一方、転写方向を反転させても、ORC の結合量は変わらなかった。Convergent 転写領域では複製起点側に遺伝子上流領域が無い場合、pre-RC の効率的な形成には少なくとも一つの遺伝子上流領域が必要であることが示された。これは、複製起点両隣の遺伝子の転写が pre-RC の形成を制御することを示す、初めての直接的な証拠であった。

結論

本研究では、分裂酵母における複製起点の決定因子の探索を行った。Orc4 と Mcm2 の ChIP-seq のデータ解析の結果、ORC はポリ(dA/dT)トラック依存的に染色体へ結合することが示された。また、遺伝子上流領域が pre-RC の形成にとって好ましい領域であること、pre-RC 近傍遺伝子の転写方向の反転によって pre-RC の形成が阻害されたことが見いだされた。転写開始点上流に作り出されるクロマチン環境、例えば負の DNA 超らせん構造が蓄積するような環境が、ポリ(dA/dT)トラックに加えて複製起点決定因子として機能していることが強く示唆された。

参考文献

Heichinger, C., Penkett, C.J., Bähler, J., and Nurse, P. (2006). Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. *EMBO J.* 25, 5171–5179.