

様式 F-7-1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（令和元年度）

所属研究機関名称	奈良先端科学技術大学院大学		機関番号	14603
研究代表者	部局	先端科学技術研究科		
	職	准教授		
	氏名	秋山 昌広		

1. 研究種目名 基盤研究(C)(一般)

2. 課題番号 18K06182

3. 研究課題名 チミン合成を阻害する薬剤により生じる劇的な細胞死におけるゲノム動態の役割

4. 補助事業期間 平成30年度～令和2年度

5. 研究実績の概要

複製フォークの進行は、細胞内の様々な生理的な要因によって阻害されて複製ストレスを生む。細胞が複製ストレスを適切に解消できないと、ゲノムの安定性が脅かされる。しかし、細胞内の複製フォーク進行の動態は、微生物でも真核生物でも未解明である。そのため、チミン飢餓による複製フォークの進行阻害によって生じる細胞死（チミン飢餓死）のメカニズムは、その発見から60年以上たっても不明である。それは、チミン合成の阻害によってチミン飢餓死を誘導する抗がん剤や抗腫瘍剤の改善や発展を妨げている。

大腸菌はDNA複製に働く酵素の動作原理の理解に大きく貢献してきた。しかし、大腸菌でも、細胞内の複製フォークの動態の解析は非常に困難であった。研究代表者は、細胞内の新生DNA鎖を解析する独自の実験法を開発して、大腸菌の複製フォーク動態をゲノム全域に渡って研究できる道を世界に先駆けて切り開いた。その結果、チミジン不足状態の細胞で、複製フォークが200kbのゲノム領域(FTZ)で遅延すること、そして、その領域がチミン飢餓死で消失するゲノム領域と相關することを見出した。これらの結果から、研究代表者は、「チミン飢餓では、染色体高次構造によりFTZで複製が遅延し、逆向き反復DNA配列での異常なDNA合成からゲノム消失を生じて、細胞が生存力を失う」という新しい仮説を立案した。本研究では、この仮説を検証して、チミン飢餓時のゲノム不安定性や細胞死の機構を解明する。2019年度までに(1)大腸菌のゲノムは、複製フォーク進行の動態が異なる4つのドメインに分かれ、その二つがFTZであること、(2)染色体の折り畳みに働くH-NSタンパク質が、チミジン不足状態におけるFTZでの複製フォークの進行遅延に関与すること、(3)染色体再編に繋がる異常なDNA複製(鋳型スイッチ)が、チミン飢餓時にFTZで亢進することを明らかにした。

6. キーワード

ゲノム複製 複製フォーク 複製遅延領域 ゲノム不安定性 チミン飢餓死 ヒストン様タンパク質 鋳型スイッチ 複製と転写の衝突

7. 現在までの進捗状況

区分 (2) おおむね順調に進展している。

理由

(1) H-NSタンパク質を欠損した変異型細胞の複製フォークの動態をゲノム全体で解析したところ、FTZ領域での複製フォークの進行遅延は野生型細胞と比較して大きく低下していた。この結果から、H-NSがFTZでの複製フォークの進行遅延に働くと結論した。H-NSは染色体DNAの折り畳みに働くので、おそらくH-NSにより形成される染色体高次構造が、FTZで複製フォークの進行を遅延させている可能性がある。H-NSは染色体DNA全体に結合しているが、FTZでだけ複製を遅延させる。このことから、H-NSはFTZの複製遅延の必要条件であるが、十分条件ではないことが示唆された。

(2) H-NSタンパク質はホモ二量体を形成するだけでなく、H-NSのパラログであるStpAタンパク質と結合してヘテロ複合体も形成する。そこで、StpAタンパク質もFTZでの複製フォークの進行遅延に働くかを明らかにするために、StpAの欠損変異株で複製フォーク進行を解析した。しかし、StpAはFTZ領域での複製フォークの進行遅延に関与していないかった。この結果から、H-NSとStpAのヘテロ二量体形成は、FTZの複製遅延に必須でないことが明らかとなった。

(3) レポーター変異遺伝子lacZ(QP5)を用いると、鋳型スイッチを遺伝学的に検出できる。このレポーター変異遺伝子をFTZ領域に挿入して、鋳型スイッチの発生頻度を解析した。その結果、チミン飢餓時に、鋳型スイッチはFTZで特異的に亢進することが明らかになった。さらに、FTZで複製遅延しないH-NS欠損細胞で、チミン飢餓時の鋳型スイッチをlacZ(QP5)を用いて同様に解析した。その結果、チミン飢餓時の鋳型スイッチの亢進が、FTZ領域で消失した。このことから、FTZでの鋳型スイッチは、H-NSにより進行阻害された複製フォークで生じていることが明らかとなった。

8. 今後の研究の推進方策

(1) 2019年度に、H-NSタンパク質はFTZの複製遅延に必要であるが、十分条件ではないことが明らかとなった。さらに、H-NSによる複製阻害の決定因子は、H-NSとStpAタンパク質の二量体形成ではなかった。H-NSと相互作用するタンパク質は、StpA以外にも報告されている。そこで、これらのタンパク質をコードする遺伝子の欠損細胞を用いて、H-NSによる複製阻害の決定因子である可能性を2020年度に検討する。また、H-NSは翻訳後修飾されることも報告されている。既知の修飾部位にアミノ置換を導入したH-NSをコードする変異遺伝子を作製して、H-NSの翻訳後修飾が複製阻害の決定因子である可能性についても検討する。

(2) FTZでの複製阻害には、H-NSによる染色体構造が関与することが示唆された。そこで、H-NSによってFTZで形成される高精細な染色体構造を明らかにすることを2019年度に試みた。しかし、通常のHi-C法では、FTZで三次元的に近接している染色体DNA領域を同定できなかった。2020年度は、改良型Hi-C法であるBridge-linker Hi-C法を用いて、FTZで形成される高精細な染色体構造を同定する。

(3) 複製開始点oriCからFTZ間の領域は、チミン飢餓時にゲノム不安定性を示す。一方、転写は、複製との衝突により複製ストレスを生じる主要な要因であり、oriC周辺には発現量の高い遺伝子が多い。そこで、複製フォークがFTZで止まる前に、oriCからFTZ間の領域をどのようにして通過するのか、さらに、この領域での転写による複製阻害がゲノム不安定性と関係するかを解析する。その際に、転写伸長因子に着目して、この領域で複製フォークと転写との衝突を回避するために働いている因子を同定する。そして、その因子を欠損させた細胞で、チミン飢餓時のこの領域のゲノム不安定性を解析する。

9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

3C法 (Chromosome Conformation Capture) は、染色体で三次元的に近接しているDNA領域を次世代シーケンサーで同定して、染色体高次構造を明らかにすることを計画した。2019年度に、H-NSタンパク質が、FTZ領域での複製フォーク停止に関与することが明らかとなつたので、3C法よりも高精細な染色体高次構造を決定できるHi-C法に実験計画を変更した。しかし、2019年度に、通常のHi-C法では十分なデータを得ることができなかつた。そのため、改良型のHi-C法であるBridge-linker Hi-C法に変更して2020年度に再度解析を行う。2020年度に繰り越す経費の大部分は、このBridge-linker Hi-C法による解析に用いる。

10. 研究発表（令和元年度の研究成果）

[雑誌論文] 計1件 (うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件)

1. 著者名	4. 巻
Lan Anh Thi Le, Sayaka Ando, Thomas M. Conrad, Shohei Nunose, Akiko Sakai, Haruka Uefune, Masahiro Tatsumi Akiyama, Asako Furkohri, and Hisaji Maki	-
2. 論文標題	5. 発行年
Nutritional conditions and oxygen concentrations affect spontaneous occurrence of homologous recombination events but not spontaneous mutagenesis in <i>Escherichia coli</i>	2020年
3. 雑誌名	6. 最初と最後の頁
Genes and Genetic Systems	-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)	査読の有無
なし	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	-

[学会発表] 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名
大橋慧也、唐住勇多、村尾雅司、原山(岡本)郁、秋山昌広、真木寿治
2. 発表標題
三種類のヌクレアーゼ活性による錆型スイッチの協調的抑制
3. 学会等名
第16回 21世紀大腸菌研究会
4. 発表年
2019年

〔図書〕 計0件

1 1 . 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件（うち出願0件／うち取得0件）

1 2 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

1 3 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

-

1 4 . 備考

-