

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2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3年度

## 5. 研究実績の概要

複製フォークの進行は、細胞内の生理的必要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解消できないと、ゲノムの安定性が脅されて突然変異や発がんにつながる。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り、染色体上の複製フォーク動態とゲノム不安定性の関係は、ゲノムワイドなレベルで明らかでない。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）やゲノム不安定性のメカニズムは、その発見から60年以上たっても謎のままである。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菌剤の改善や発展を妨げている。

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、チミン不足状態の細胞の複製フォークは、複製開始点oriCの近傍に位置する200kbのFTZ領域で他のゲノム領域よりも阻害されやすいこと、および、そのFTZ領域はチミン飢餓で消失するゲノム領域と相関することを見出した。そして、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、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の機構を解明する。

2019年度までの本研究において、研究代表者は、染色体構造タンパク質のH-NSがチミン不足時のFTZでの複製阻害に関与すること等を明らかにした。さらに、2020年度には、転写伸長因子DksAを欠損すると、チミン不足時に複製フォークがoriCからFTZに到達できずFTZで進行停止しなくなること、および、チミン飢餓時にoriC周辺のゲノム領域が不安定になることを新たに見出した。

## 6. キーワード

ゲノム複製 DNA複製フォーク 複製遅延 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 染色体高次構造

## 7. 現在までの進捗状況

区分 (3) やや遅れている。

理由  
2019年度までに、(1) 大腸菌のゲノムは、複製フォーク動態が異なる二つのドメインに分かれ、それらの境界がFTZであること、(2) 染色体構造タンパク質のH-NSが、チミン不足時のFTZでの複製遅延に関与すること、(3) 逆向き反復配列での異常なDNA合成が、チミン飢餓時にFTZで亢進することなどを明らかにした。2020年度は以下の3つの結果を得た。

(1) 微生物では先進的なBridge-linker Hi-C法を用いて、チミン不足状態で培養した大腸菌で、ゲノムの高精細な染色体構造領域を解析した。しかし、この方法の高解像度でも、FTZと明らかな関連性を示す染色体構造領域を特定できなかった。

(2) FTZは複製開始点oriCから約100kb離れている。そこで、チミン不足時に、複製フォークがoriCからFTZ間の領域をどの様にしてスムーズに通過してFTZに到達するのかを解析した。そして、oriCからFTZ間の領域では、転写伸長因子DksAがチミン不足時のスムーズな複製進行のために重要であることを明らかにした。さらに、DksAを欠損した大腸菌のゲノムの遺伝子量を解析したところ、チミン飢餓時に、oriC周辺のゲノム領域が不安定になることを見出した。このことは、チミン不足時に、複製フォークと転写との衝突の回避が重要であることを示唆する。

(3) FTZで複製遅延しないH-NS欠損細胞では、チミン飢餓時に、FTZでの異常なDNA合成の頻度が減少する。一方、FTZの下流領域では異常なDNA合成が上昇した。これらの結果は、チミン飢餓時にFTZで複製を遅延できないと、ゲノムが不安定になることを示す。

2020年度は、FTZの複製遅延とゲノム不安定性の関係を明らかにしたが、当初の予定どおりに国際科学雑誌に本研究の成果を発表することができなかった。そのため、進捗状況はやや遅れていると判断した。

5 版

#### 8. 今後の研究の推進方策

本研究で得られた成果を国際科学雑誌に発表するために、2021年度は、本研究で得られた結果の再現性を確かめること、さらに、結果の精度を高めることに取り組む。具体的には、(1) 次世代シーケンサーを用いた複製フォークの動態解析を再度行い、結果の再現性と精度を確認する、(2) DksAを欠損した大腸菌で見出した、チミン飢餓時に生じるoriC周辺のゲノム不安定性について、顕微鏡を用いて細胞レベルでも解析し、結果の精度を高める。顕微鏡を用いた解析には、複製開始点oriCと複製集結点terを蛍光タンパク質で標識できる大腸菌細胞を作製して用いる。

#### 9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

2020年度までに本研究で得られた成果を国際科学雑誌に発表できなかった。そのために、2020年度の経費を繰り越して、論文の英文校閲費用と投稿費用に使用する。また、繰り越す経費は、本研究で得られた結果の再現性を確かめるための次世代シーケンスを用いた解析の費用、および、ゲノム不安定性の結果の精度を高めるために顕微鏡解析実験の消耗品購入にも使用する。

#### 10. 研究発表（令和2年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

#### 11. 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）

#### 12. 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

#### 13. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

-

#### 14. 備考

-