

平成23年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

研究テーマ名称	ガン遺伝子増幅の機構は、遺伝子進化の機構足り得るか？
応募事業区分	公募型共同研究 (A) 共同研究支援
申請代表者氏名	渡邊 孝明

○ 研究状況報告

遺伝子増幅は生きた細胞内である遺伝子領域のコピー数が増加することを意味し、薬剤耐性現象、癌の悪性化、ゲノム進化等、多くの生物現象に関わっているが、遺伝子増幅の分子メカニズムには不明な点が多く残されている。我々はデザインした染色体構造・増幅反応を基にまず出芽酵母に遺伝子増幅を誘導し、自然に見られる増幅産物を形成し得るかを検証するユニークなアプローチに取り組んできた。その結果、高速な増幅が可能な **double rolling-circle replication(DRCR)**がガン遺伝子の増幅に重要な役割を果たす可能性が高いこと、**DRCR** 増幅は組換え頻度を大幅に上昇させ増幅領域に激しい染色体再編を伴うことが分かった。

以上からガン遺伝子増幅に関わる **DRCR** 増幅が遺伝子の多様化を促し遺伝子進化のメカニズムとしても貢献しているのではないかと考え、(1)動物細胞でのガン遺伝子増幅モデルの証明、(2)**DRCR** 増幅に伴う組換えの活性化機構の解析、(3)減数分裂期の増幅遺伝子特異的な変異導入の検証、について取り組んだ。平成23年度の(1)~(3)の進捗状況は以下の通りである。

- (1)計画した内容をほぼ実施できた。モデル証明のための染色体構造の構築や増幅細胞の薬剤選択を計画通り行ったが、増幅産物の詳細な **FISH** 解析は未実施である。一方、平成24年度に予定していたリアルタイム増幅観察系の構築や、計画外ではあるがタンパク質増産による増幅検出を行った。
- (2)計画の半分程度の進捗に留まった。クロマチン免疫沈降により増幅領域とコヒーシや組換え関連タンパク質の相互作用を調べるための準備はほぼ完了した。進捗を妨げる問題は無かったが他の実験項目に割く時間が多く計画の完遂に至らなかった。
- (3)計画の半分程度の進捗に留まった。不安定化ドメインを利用した変異検出マーカーの作成が予想以上に困難であった。

なお研究代表者の米国異動に伴い、当課題分担者である生命共生体進化学専攻の田辺秀之准教授が当課題の成果を基礎に研究内容・組織を刷新し、平成25年度以降に新規研究課題として応募予定である。

○ 当該事業年度において達成された研究成果

(1)増幅モデルの証明

(様式 3)

平成23年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

動物細胞での薬剤耐性現象やガンの悪性化の増幅初期には BFB(Breakage-Fusion-Bredge)サイクルという増幅過程が重要な働きをしていると考えられているが、その後増幅単位が短縮し構造が複雑化するメカニズムは全く不明である(図1)。我々は高速な増幅が可能なダブルローリング型複製(図2)に着目し、BFBサイクルにより増幅初期に形成される構造を FAIR(four alternate inverted repeat: $\rightarrow\leftarrow\rightarrow\leftarrow$)と名付け、この構造から動物細胞で見られる典型的な染色体内外の増幅産物が形成されるモデルを構築した(図3)。出芽酵母では実際にこの FAIR 構造から動物細胞の増幅産物に良く似た産物が得られている。本研究ではこれを動物細胞で確認することを目指した。実際の増幅単位の長さ(数百 kb)に近づけるためバクテリア人工染色体(BAC)を単位として、二種類の部位特異的組換え系(Flp-FRT、Cre-lox)、およびゲノムを特異的に切断しヘアピン構造を形成する

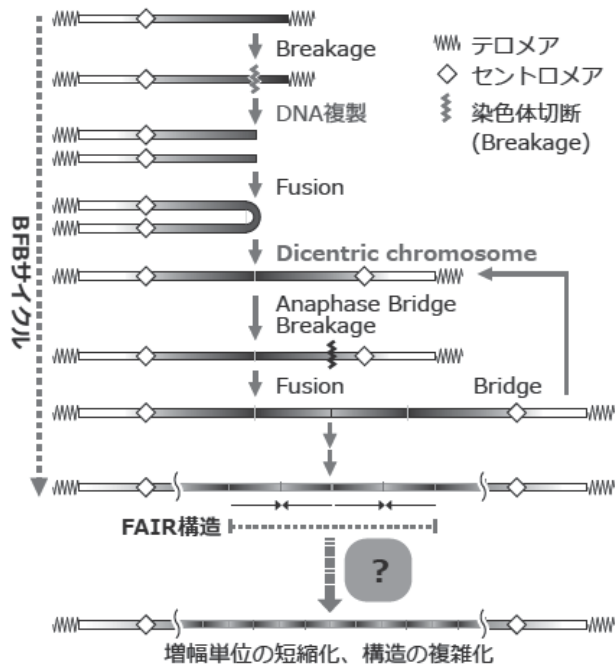


図1 BFBサイクルとその後。切断を受けた染色体断片が複製され、末端が結合してdicentric chromosomeが生じる。これが細胞分裂後期に両極に引っ張られ再び切断される。これが繰り返されinverted repeatからなる増幅産物が染色体上に形成される。増幅初期に見られるFAIR構造から急速に増幅単位の短縮化、構造の複雑化が進むがその機構は不明。

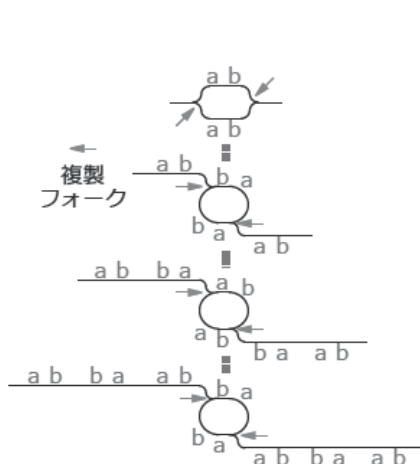


図2 ダブルローリングサークル複製。2つの複製フォークが追いかかけ合いDNAを連続的に複製する。

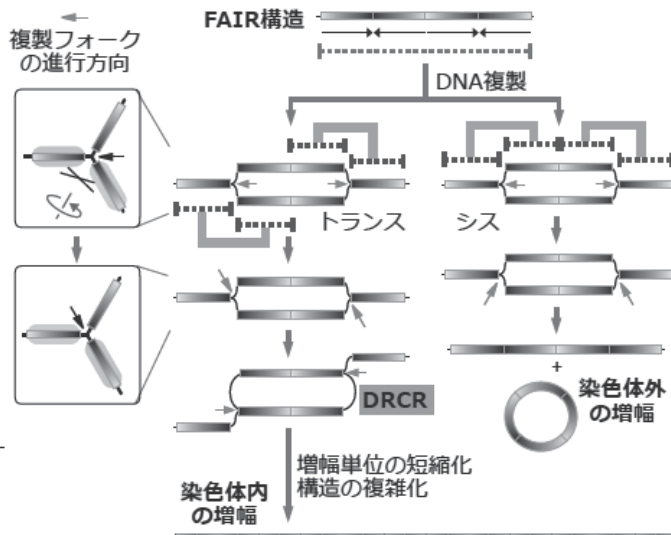


図3 FAIR構造からの増幅モデル。一例として複製と組換えの共役反応を挙げる。未複製の領域(青)と複製済み領域(赤)で何らかの組換え反応が起こると複製済みの領域が再度複製される。これが両方向に進んだフォークに起こる場合、シスとトランスの2通りの位置関係が可能である。トランスの場合にはDRCRを経て劇的な染色体再編成を受けながら主にinverted repeatsからなる染色体内の増幅産物ができる。シスの場合には複製が収束し環状の染色体外の増幅産物が形成される。

tos-TelN 系を利用して FAIR 構造の構築した(図 4)。

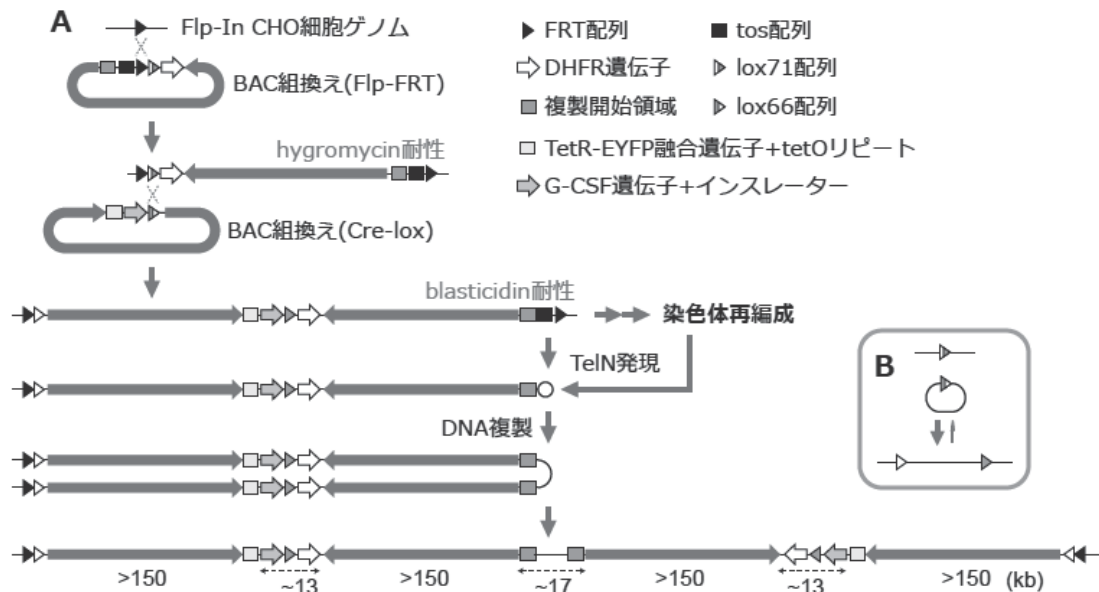


図4 (A)BACの挿入とFAIR構造構築。Flp-FRT系とCre-lox系を利用してBACを二度挿入した。本研究では結果的に図7のようなさらなる染色体再編成も生じた。これらの構造の一端に配置されたtos配列はTelNにより切断されヘアピン構造を作り、DNA複製を経てdicentric chromosomeを形成する。(B)lox71、lox66は変異lox配列である。組換えにより生じるloxPとlox71/66の間では組換えが起こらないため本系では挿入反応が優先に起こる。

まず初めに tos-TelN 系が機能するかを検証した。大腸菌に感染する N15 と呼ばれる溶原化ファージの感染・溶原化により生産されるタンパク質 TelN は、tos と呼ばれる DNA 配列を認識して DNA の 2 重らせんを切断し、その端がヘアピン状に折り返された後、切断面を繋ぎ直す能力を有している。Chinese hamster ovary(CHO)細胞ゲノム上にこの tos 配列を含む BAC を挿入し TelN 発現ベクターを導入することで、ヘアピン状末端を形成し DNA 複製によって dicentric chromosome(二動原体染色体)を形成できるかを調べた(図 5)。分裂期 FISH 法により tos 配列を含む構造を蛍光標識した結果、通常の染色体と比べ tos-TelN 系を働かせた場合に特徴的な染色体像が現れた(図 6)。これらは tos 配列の領域を中心に動原体を含む領域が倍加した対象構造をとる二動原体染色体(A1~A3)、TelN が作用した直後のヘアピン状末端をもつ中間体(B1~B4)、二動原体染色体形成により増幅を開始した二動原体染色体(C1~C4)であると思われる。以上は薬剤等により二動原体染色体を積極的に選択していないにもかかわらず、全体の 1~5%程度の分裂期像に見られた。従って自然の増幅現象より相当高い頻度で二動原体染色体が生じていると考えられた。

次に計画に沿って tos 配列、増幅選択マーカーDHFR 遺伝子、複製開始領域、増幅のリアルタイム検出のための TetR-EYFP 遺伝子、タンパク質増産を指標に増幅を検出するためのインスレーター配列に挟まれた G-CSF 遺伝子等を CHO 細胞染色体に BAC を介して挿入した(図 4 A)。細胞は転写が活発なゲノム領域に予め FRT 配列が挿入された CHO 細胞を利用し、第一段階では Flp-FRT 組換えにより hygromycin 耐性遺伝子を活性化し BAC に配置した GFP 遺伝子(図 4 には非表示)の発現を指標に単離した。第二段階では変異型 lox 配列を用い挿入反応が優先的に起こるよう工夫し(図 4 B)、組換えによる blasticidin 耐性の

(様式 3)

平成23年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

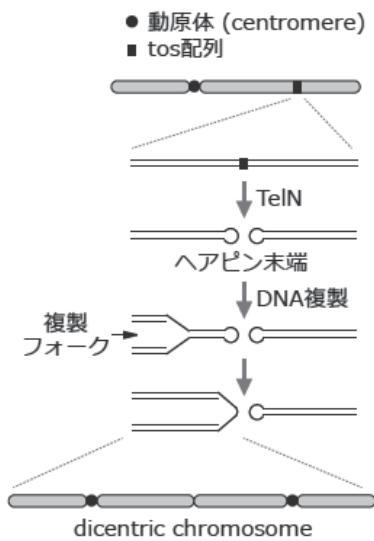


図5 Dicentric chromosome(二動原体染色体)作製。図4 Aの第一段階のように染色体上に部位特異的組換えFlp-FRT系を利用してtos配列を含むBACを挿入しTelNタンパク質を作用させる。生じたヘアピン末端をもつ染色体はDNA複製により二動原体染色体となる。

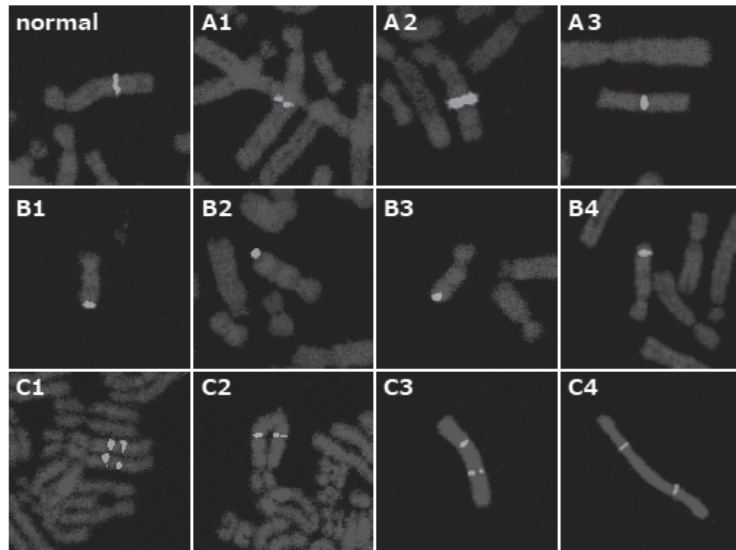


図6 Dicentric chromosome(二動原体染色体)の形成。分裂期FISH法により挿入した構造が緑に蛍光標識され、染色体がDAPIで青に染色されている。通常の染色体と比べるとtos-TelN系を働かせた場合(A-C)には特徴的な像が見られる。A1~A3はtos-TelN系により動原体を含む領域が倍加し対象性のある染色体像の中央に蛍光シグナルが見られる。B1~B4はtos-TelN系が作用した直後の像で末端の蛍光シグナルの部分はヘアピン構造をとっていると思われる。C1~C4は二動原体染色体が形成されたことで増幅プロセスが開始していると思われる。以上は薬剤選択等を行っていないにもかかわらず、全体の数%の分裂期像に見られる。従って自然の増幅現象と比較して極めて高い頻度で二動原体染色体が生じていると言える。

活性化と mCherry 赤色蛍光タンパク質(図4には非表示)を利用して単離した。

しかし、その染色体構造を分裂期 FISH 法により解析したところ、予想される BAC 挿入染色体に加え、二動原体染色体と思われる対称性のある像にシグナルが得られた(図7)。

TelN 発現誘導前のこの時点では二動原体染色体は形成されないはずであるが、BAC 挿入により形成された 150kb 以上に及ぶ長大な逆位反復配列が tos-TelN 系の働きを代行して一部の細胞で二動原体染色体が形成され、増えた blasticidin 耐性遺伝子により増殖優位性を獲得したと考えられる。非組換え細胞を確実に除くため 30 μ g/mL の blasticidin で選択を行ったが、初期の選択以降はその濃度を半減する等して染色体再編成の出現を避けるべきであった。今回の結果は増幅初期に形成される構造がさらなる増幅を促すポテンシャルをもつこと、想定よりも高い頻度でゲノム不安定化を引き起こす可能性があること、を示唆した

初めての例である。本来このような染色体再編成を起こしていない細胞に対し MTX による増幅選択を開始すべきであるが、予想される BAC 挿入位置に加え二動原体染色体の少なくとも一方にも tos 配列が含まれる可能性が高く、TelN 発現誘導によ

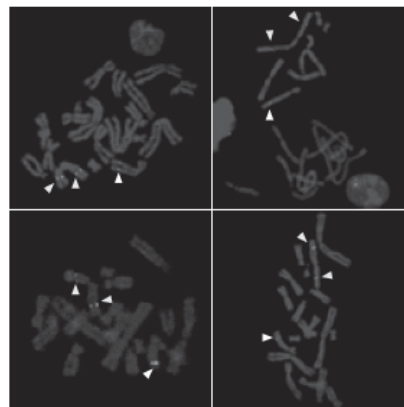


図7 BAC挿入細胞の染色体。分裂期FISH法により挿入したBACが緑に蛍光標識され、染色体がDAPIで青に染色されている。予想されたBAC挿入位置(白の矢頭)に加え、2カ所にシグナル(黄の矢頭)が見られる。染色体像やシグナル位置に対称性があり、TelN誘導前にも関わらずdicentric chromosome形成が起きたと考えられる。

(様式 3)

平成23年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

りさらなる遺伝子増幅が期待できることから、この細胞を基に増幅選択を試みた。

上記細胞に *TelN* 発現ベクターを導入し、二日後に 0、200、350、500nM で MTX 選択を開始した。350、500nM では生存細胞が少なく増殖を継続できなかったが、200nM では選択可能であった。*TelN* 発現誘導により生存細胞が僅かに増加する傾向は見られたが明確な差異は無かった。これは blasticidin 選択時点で DHFR 遺伝子を含む BAC 挿入領域が最大 3 コピーまで増幅したため(図 7)、MTX 耐性のバックグラウンドが上昇してしまったためと考えられる。200nM 選択下では増殖速度が低いため、細胞集団を集めて 2-3 週間を目安に改めて 100、200、300nM で継代培養を行い馴化させた。MTX 濃度、*TelN* 発現誘導の有無が異なる計 6 点の細胞集団と、MTX 選択前の細胞の培養上清を回収し、市販の ELISA キットを用いて G-CSF 生産性を評価した。その結果、*TelN* 発現誘導により生産性が向上すること、200nM 以上で生産性が増すことが分かった(図 8)。MTX 選択前に既に最大 3 コピーまで増幅したため(図 7)、MTX 選択による生産性の増加幅は大きくないが、インスレーターの利用によりいずれの細胞群でも安定したタンパク質発現が実現していた。

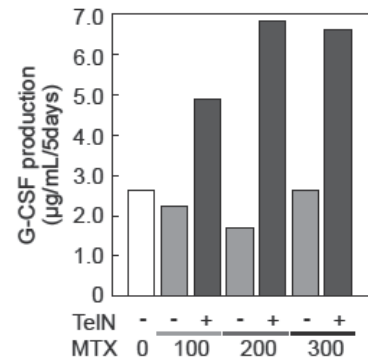


図 8 G-CSF 生産性。TelN 発現誘導により生産性が向上している。

以上のように FAIR 構造の作成に染色体再構成を伴ったものの、一定期間を要する増幅選択まで実施することができた。

(2) DRCCR 増幅に伴う組換えの活性化機構の解析

DRCCR 自体が recombinogenic なプロセスであると考え、DRCCR を含む Rolling-circle 型複製では姉妹染色分体の接着に関わるコヒーシが増幅領域に存在しなくなることが組換え活性化の鍵となると仮定した(図 9)。これを DRCCR の ON/OFF を制御可能な 2µ プラスミド系で解析するため、まずコヒーシンの温度感受性変異株(*smc3-42*, *scc1-73*, *smc1-259*, *scc2-4*)を K. Nasmyth 研究室より入手し、コヒーシン不活化の最適条件を確立した。これによりコヒーシン不活化が DRCCR による組換えを増強することや DRCCR 非依存的にも組換えを活性化できることを検証できる。またクロマチン免疫沈降法により増幅領域でのコヒーシンや組換え修復タンパク質の存在量を解析するため、SCC1、RAD52 遺伝子に HA タグを融合させることに取り組み、後者については構築を完了した。

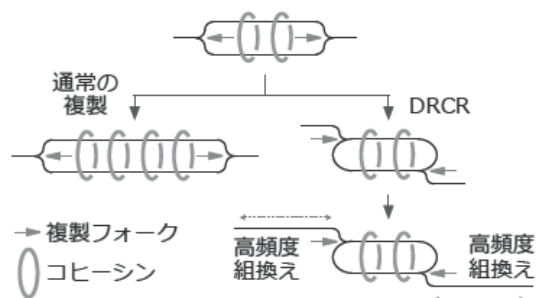


図 9 コヒーシン不足領域モデル。通常の複製では姉妹染色分体がコヒーシンに接着されていくが、DRCCRでは一方の染色分体が複製の鋳型として使われるため、他方は接着されず露出したままとなる。

(3) 減数分裂期の増幅遺伝子特異的な変異導入の検証

(様式 3)

平成23年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

RIP 現象とは、アカパンカビにおいて一倍体間での細胞融合の後に重複遺伝子に多数の点突然変異が導入される現象である。最初、遺伝子進化に働いていると期待されたがアカパンカビの全ゲノム配列や変異頻度の余りの高さから、ゲノム中のウイルスやトランスポゾンを抑制するための機能であると現在では考えられている。しかし、遺伝子進化や昆虫の農薬耐性現象等では減数分裂期に増幅と変異導入がリンクすることが不可欠であること、アカパンカビと同様の真菌類である酵母7種でも弱いRIP活性が報告されたことから、出芽酵母を用いて遺伝子進化の実験的な検証が可能ではないかと考えた。

平成23年度は変異を検出するマーカーの構築を行った。まずFKBP12タンパク質変異体を膜透過性リガンドShield1により安定化し可逆的な調節ができる系に取り組んだが、出芽酵母ではShield1非存在下でも効率良く分解されないことが判明し、平成23年9月に他のグループからも同様の報告がなされた(Bioorg Med Chem Lett. 2011, 21:4965)。これは変異導入以前に多数の細胞が高いバックグラウンドとして生存できることを意味し致命的な問題である。そこで我々は出芽酵母での実績があるAuxin依存的分解ドメイン(AID)の利用に着手した(図10)。現在kanamycin, hygromycinの耐性遺伝子にAIDを融合させて解析し、我々の出芽酵母株では一般的な50 μ Mよりも高濃度のAuxinが分解に必要であることが判明しつつある。

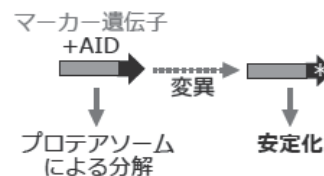


図10 変異検出系。マーカー遺伝子(hphNT等)のC末側に不安定化ドメイン(Auxin-induced degron, AID)を融合させる。AIDへの変異により構造が変化し分解効率が低下したコピーをもつ細胞が選択される。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付)

研究手法の一部は以下の発表論文と関連している。

Nucleic Acid Res., 2011, 39, e106.