

氏 名	渡邊 孝明
学位（専攻分野）	博士（理学）
学位記番号	総研大甲第 874 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 24 日
学位授与の要件	生命科学研究科 分子生物機構論専攻 学位規則第 6 条第 1 項該当
学位論文題目	A novel gene amplification system in yeast based on double rolling-circle replication : implications for amplification in higher eukaryotes
論文審査員	主 査 教授 山森 哲雄 教授 堀内 嵩 教授 飯田 滋 教授 野田 昌晴 教授 井上 弘一（埼玉大学）

## 論文内容の要旨

Gene amplification occurs in numerous organisms and has probably played an important role in genome evolution. The ribosomal RNA genes (rDNA) are tandemly repeated in most eukaryotes and must have been amplified at some point during evolution. Oncogene amplification is frequently observed in the process of cancer development. Gene amplification also occurs when cultured cells respond to selection for drug-resistance and when insects and plants acquire resistance to agricultural chemicals. In bacteria, amplification can be an essential intermediate in the adaptive mutation phenomenology. Gene amplification has been applied to the industrial production of therapeutic protein.

Models proposed to explain the amplification process include; unequal sister-chromatid exchange, localized over-replication, rolling-circle and double rolling-circle replication, extrachromosomal amplification and reintegration, and breakage-fusion-bridge (BFB) cycles. Despite great effort, the molecular mechanism responsible for the majority of amplification events remains unknown. For example, the gene amplification occurring in tissue-cultured cells during selection for resistance to methotrexate (MTX) is believed to be initiated by the BFB cycles. However rather complicated products are produced which may require additional kinds of amplification processes. The complexity of these structures has made it difficult to analyze the mechanism at a molecular level.

The mechanism responsible for amplification of rDNA is fairly well understood. In *S. cerevisiae*, rDNA amplification is initiated by a double-strand break (DSB) produced when a DNA replication fork encounters a replication fork barrier (RFB) present in each rDNA unit. This double-strand end enhances unequal sister chromatid recombination, resulting in rDNA amplification. The blocking of replication forks also causes gene amplification in *E. coli* at a recombinational hotspot, named Hot DNA. However, known chromosomal amplifications in *E. coli* and yeast are invariably direct tandem copies, while mammalian cells show a mixture of direct and inverted repeats. Thus, understanding of amplification in higher eukaryotes might be enhanced by development of a microbial system that generates products analogous to those observed in tumors and cultured cells.

The mechanisms underlying these gene amplifications in yeast and bacteria appear to be quite different. While yeast rDNA amplification occurs through unequal sister-chromatid recombination, bacterial Hot amplification seems to proceed through rolling-circle replication. However, it is possible that both processes are initiated by break-induced replication (BIR). While inter-chromatid unequal BIR could cause rDNA amplification in yeast, a similar intra-chromatid BIR could cause the rolling-circle type amplification of Hot DNA in *E. coli*.

The double rolling-circle replication (DRCR) is a continuous replication process in which two replication forks synthesize a circular DNA. This model was first proposed by Fitcher for amplification of yeast circular 2 $\mu$  plasmid and experimentally confirmed by Volkert and Broach. Later a similar model was proposed by Hyrien et al. to explain a case of drug-resistance gene amplification. However, the former DRCR depends on a 2 $\mu$ -specific site-specific recombination system (*FLP1/FRT*) and the latter model has not been examined experimentally. Thus far, no amplification system has shown to rely on DRCR.

Here, he uses double-strand breaks to study the sequences, structures and reactions required for in vivo gene amplification in *S. cerevisiae*. This system is based on the action of break-induced replication (BIR) and double rolling-circle replication (DRCR). BIR is a recombination-dependent replication process and starts as a one-ended recombination event. A broken chromosome end finds a homologous sequence, invades it to form a new replication fork, and initiate replication. In the system described here, a single chromosome is cut by HO endonuclease to generate two fragments designed to amplify a sequence by DRCR. Each fragment can act both as end donor and end recipient for BIR. If the two BIR forks start simultaneously, double rolling-circle replication (DRCR) should highly amplify the regions flanked by the replication forks within a single cell cycle.

The DRRCR process can terminate by recombination between *leu2d* genes on each bi-directionally elongated arm.

The system formed a single type of product containing 3-5 inverted copies of the amplification marker, *leu2d*, on a plasmid-derived artificial mini-chromosome, and it successfully produced three types of amplification products on a resident chromosome. Type-1 products contain 5-7 inverted copies of *leu2d*. Type-2 products contain 13-~100 copies of *leu2d* (up to ~730 kb increase) with a novel arrangement present as randomly oriented sequences flanked by inverted *leu2ds* copies. Type-3 products are acentric multi-copy mini-chromosomes carrying *leu2ds*. Structures of type-2 and -3 products resemble those of homogeneously staining region (HSR) and double minutes (DMs) of higher eukaryotes, respectively. Interestingly, products analogous to these were generated at low frequency without deliberate DNA cleavage. These features strongly suggest that the processes described here may contribute to natural gene amplification in higher eukaryotes. Utilization of this amplification system in mammalian cells has the potential to provide great savings of time and energy in the overproduction of recombinant proteins for medical uses.

## 論文審査結果の要旨

本論文は、出芽酵母を用い新しい遺伝子増幅系を構築し、それが作動することを確かめると共に、その産物の解析から増幅機構を明らかにしたものである。

遺伝子増幅は染色体ダイナミクスのなかでも、特に激しい変化を起こすものの一つである。多くの生物種で観察されてきたが、特に昆虫や植物の農薬に対する抵抗性獲得、ガンの悪性化や動物細胞の薬剤耐性獲得などに重要な役割をしている。しかしその機構については、殆ど分かっていないのが現状である。大きな理由は、高等動物等では増幅産物が余りに巨大で複雑すぎ、複数のプロセスを経ているらしいからである。

出願者は、遺伝子操作が容易で、ゲノムダイナミクスについても良く解析されている出芽酵母を選んだ。遺伝子増幅の機構としては、ダブルローリングサークル (DRCR) 型複製を採用し、それを誘導することで遺伝子増幅を達成しようとした。DRCRの採用理由は、ゲノム上で大量の増幅が可能なことと、1細胞周期でその増幅が完了すること、からである。特に後者は、生物が農薬など致死状況下で、抵抗性獲得には出来るだけ早い増幅が必要と考えたからである。

具体的には、増幅カセットを目的のゲノム上に挿入した酵母を用意し、DRCRを起こさせるために、HO エンドヌクレアーゼを誘導し、2本鎖切断を起こさせ、それが組換えにより修復される結果としてDRCRが起こることを予想した。増幅したクローンだけを選択するため、*leu2d* 遺伝子を利用した。この遺伝子は発現が弱く、1コピーではロイシン抜き培地では生育しないが、多コピーに増幅すると生育出来るようになる。

この遺伝子増幅系を、プラスミドを利用した人工ミニ染色体上と本来のゲノム上で作動するかどうか調べた。その結果、前者では *leu2d* 遺伝子の 3-5 コピーが inverted repeat 型の増幅産物を形成し、一方、後者では 3種類の増幅産物を作り出すことに成功した。Type-1では 5-7 コピーの *leu2d* 遺伝子が inverted repeat を形成していた。Type-2は 13-約 100 (増幅領域のみで約 730kb) コピーの *leu2d* 遺伝子を含み、*leu2d* の repeat 間に挟まれた配列には高頻度に逆位が起こっていた。Type-3は 2コピーの *leu2d* を含みセントロメアを持たないミニ染色体として多コピーで存在していた。Type-2 及び 3の構造は高等真核生物の遺伝子増幅において幅広く見られる homogeneously staining region (HSR) 及び double minutes (DMs) の構造に良く似ていた。興味深いことに、人工的に DNA を切断しないコントロール実験においても、Type-2 及び 3に類似した増幅産物が低頻度で形成された。これらの結果は、この増幅プロセスが自然界での高等真核生物の遺伝子増幅にも寄与していることを強く示唆している。さらにこの増幅系を動物細胞に応用できれば、医療用組換えタンパク質の大量生産に要する時間、コスト、労力を大幅に軽減する可能性があると言える。

これまでの遺伝子増幅機構の解析は、自然に増幅した遺伝子産物の構造を解析するか、簡単な構造 (パリンドローム構造等) や DNA 切断導入により増幅頻度を増加させ、その構造解析するかであった。本論文ほど、増幅反応を詳細にデザインした例はこれまでなかった。それがうまく機能し、遺伝子増幅が起き、想像外の再編が起こり、かつその産物が高等動物のそれと類似するなどの大きな成果を得、新しい発見も含まれている。本論文の内容は、出願者を筆頭著者とする原著論文 1 報として受理・公表されている。

以上の評価により、本論文の内容は、質・量共に、本課程の博士号に十分値するもので有ると判定された。