

氏 名 岡本 治子

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1437 号

学位授与の日付 平成 23 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 ダブルローリングサークル複製は高頻度組換えを伴う

論文審査委員 主 査 教授 西村 幹夫
教授 堀内 嵩
教授 山森 哲雄
教授 岩崎 博史 東京工業大学

論文内容の要旨

本研究では、ダブルローリングサークル複製 (double rolling-circle replication, DRCR) が極めて高頻度の組換えを起こすプロセスであることを強く示唆する結果を得たので、ここに報告する。

出願者たちの研究室では、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いて遺伝子増幅の分子機構を明らかにする目的で研究を行ってきた。遺伝子増幅とは染色体上のある領域のコピー数が上昇する現象である。ヒトのがん遺伝子や、薬剤耐性遺伝子などで遺伝子増幅が起きる事はよく知られている。これまで増幅の過程を明らかにしようと得られた増幅産物の構造解析がなされてきたが、余りに複雑であるため、解明に成功していない。そのため出願者たちの研究室では遺伝子増幅がダブルローリングサークル複製 (DRCR) によると仮定した増幅系を構築し、働かしたところ、動物細胞による遺伝子増幅産物と酷似した産物を得ることに成功した。この産物の構造を解析した結果、予想外の構造変化が起きている事が判明した。つまり逆向き反復配列 ($\rightarrow\leftarrow$) 間の反転 (inversion) が、高頻度で起きていたのである。通常の高頻度の反転が起きることはまれであり、この現象が生じる機構は謎として残された。

そこで本研究では、この高頻度の反転を含む相同組み換え全般と DRDCR との関係明らかにすることを目指した。材料として、自然界で DRDCR によって増える出芽酵母の 2 ミクロンプラスミドを用いた。このプラスミドは部位特異的組換え系として、Cre-*lox* 系と類似の Flp1-*FRT* 系を有する。この Flp1-*FRT* 系の組み換えに伴い、複製フォークの進行方向が変わることにより DRDCR が誘導される。この組換え系が欠損すると DRDCR は抑えられ、通常の高頻度の複製のみが起きる。そのためこの系を用いれば、高頻度組換え現象が DRDCR 依存的に起きるかどうかを調べる事が出来る。まず反転反応が活性化されるかを調べるために、トランスポゾンの Tn5 を利用した。Tn5 は中央のユニーク配列を挟んで、逆位一対の IS50 と呼ばれる断片が挟む構造を有する。この Tn5 を 2 ミクロンプラスミドに挿入し、反転の頻度を調べた。その結果、野生型 2 ミクロンプラスミドでは高頻度の反転が起こったが、Flp1-*FRT* 系組換え系が欠損した場合は、反転は全く起こらなかった。次に他の組換えの反応である欠失や重複についても調べた。そのために先の 2 ミクロンプラスミド上の Tn5 の構造の内、逆位にある IS50 の一つを人工的に反転することで、順位反復配列 ($\rightarrow\rightarrow$) を有する Tn5 の誘導体を作成して調べた。その結果、野生型 2 ミクロンプラスミドでは高頻度の欠失および重複が確かに生じたのに対し、Flp1-*FRT* 系組換え系が欠損した場合は、そのような組換えは全く起こらなかった。以上の結果から 2 ミクロンプラスミドにおいては、反転、欠失および重複という全てのタイプの相同組換えが DRDCR 依存的に著しく活性化されることが明らかとなった。上述したように、以前出芽酵母染色体に誘導した DRDCR によって、高頻度に反転反応が活性化されることを見てきた。そこでここでは、欠失および重複反応も同様に活性化されるか

どうかを検証した。染色体上で DRCR を誘導する系は以前開発したものをを用いた。染色体上で DRCR によって増幅する産物は2種類あり、動物細胞での産物である HSR (homogeneously staining region) と DMs (double minutes)に酷似している。以前と異なるのは、増幅ユニット内に直列反復配列 (→→) を挿入したことである。増幅後 HSR タイプの産物を制限酵素と電気泳動により解析したところ、増幅ユニットのメインバンドに加え、欠失および重複によるバンドがメインバンドの上下に認められた。それに対しコントロールの産物では認められなかった。このことから染色体上でも、直列反復配列間の欠失および重複は DRCR 依存的に起きることが判明した。今回の研究により、何れのゲノムにおいても、反転、欠失、重複という全てのタイプの組換えの活性化と DRCR が分離できなかった。

今回見いだされた DRCR 依存的な高頻度組換えにはどのような生物学的意義があるのだろうか。染色体上で DRCR によって増幅した領域は、巨大なパリンドローム構造をとる。このような構造は不安定であると予想され、反転反応はその安定化に寄与していると考えられよう。一方、動物培養細胞において観察されてきたことだが、増幅初期の染色体上では長大な増幅ユニットであったものが、選択圧が増すにつれてユニットの短小化と目的遺伝子のコピー数の増加が急激に起こる。しかしこれらの急激な構造変化の原因はこれまで不明であった。高等生物のゲノムにはレトロトランスポゾンなどに由来する繰り返し配列が大量に存在する。選択圧下で DRCR がこれらの繰り返し配列を含むゲノムで起こると、不要な配列は欠失によって急速に取り除かれ、目的遺伝子が残るため、ユニットの短縮化と多コピー化が予想される。このように急激なゲノムの再編が、今回の研究により説明できると考えられる。多くのがん細胞においてはがん遺伝子の遺伝子増幅がみられ、がんの悪性化の原因と考えられる。増幅領域は不安定で構造変化を起こしやすく、構造変化が進むにつれがんの悪性度が増すが、その原因は不明な点が多い。今回得られた DRCR に伴い組換えが活性化するという知見により、がんで見られるゲノム不安定性のうち、反転および欠失が高頻度で生じる原因について説明できるかもしれない。また、自然界には葉緑体 DNA や単純ヘルペスウイルス-1 (HSV-1)など高頻度で組換えを起こし、2つ以上のアイソフォームを等量持つゲノムが存在するが、これらの高頻度の組換えの原因は今も分かっていない。興味深いことにこれらのゲノムは DRCR を誘導可能な構造を有している。これらのゲノムでも DRCR とそれに伴う組換えの活性化が生じていると考えれば、アイソフォームの形成をうまく説明できる。2ミクロプラスミド以外にも同様の機構を有するゲノムが自然界に広く存在している可能性を示す例であり、今後興味深い問題である。最期に DRCR がどのように組換えを活性化するかが残された問題である。それに関するモデルを提案したい。

生物における DNA 複製には、通常の複製以外に、ダブルローリングサークルタイプの複製 (DRCR) と呼ばれるものがある。出願者の研究室では、これまでガン遺伝子や薬剤耐性遺伝子の増幅には、DRCR が中心として働いていることを明らかにしてきた。その実験から、DRCR によって得られた増幅産物では、高頻度の組換えが起こり、高い場合には、100%の頻度 (つまり産物が 1 : 1 の比になる) にまで達していた。「DRCR」とこの「高頻度組換え」との関係調べたのが本論文である。

実験には DRCR を行う唯一のゲノムとして知られる酵母 2 ミクロンプラスミドを用いた。環状の 2 ミクロン DNA が DRCR を行うのは、*Cre-Lox* 類似の *FLP1-FRT* 部位特異的組換え系による。この組換えが複製中に起こることで、DRCR が誘導される。そのため、*FLP1-FRT* 組換え系を破壊したプラスミドは、通常の複製だけで増える。まず野性型プラスミド DNA にトランスポゾン *Tn5* を転移させた。*Tn5* は逆位構造を有しており、高頻度の相同組換えは *Tn5* の反転反応で知ることが出来る。野性型プラスミドでは、DRCR と共に *Tn5* の反転反応が起こったが、*FLP1-FRT* 組換え系を破壊したプラスミドでは、DRCR と同時に *Tn5* の反転も起こらなくなった。次に *Tn5* の逆位構造の一方を人工的に反転させ、*direct repeat* 配列を有するプラスミドを作成し、同様の実験を行ったところ、野性型プラスミドでは、*direct repeat* 間での組換えにより欠失と倍化が起こった。一方、*FLP1-FRT* 組換え系を破壊すると、DRCR と共に組換えも消失した。

一方、出願者は酵母染色体での DRCR 誘導方法をすでに確立している。上述の DRCR による逆位構造間の組換えの活性化は染色体の増幅産物で観察したが、ここでは欠失・倍化の活性化の有無を調べた。方法は酵母染色体 XI 右端に、増幅カセットを構築し、その中に *direct repeat* 配列を埋め込んだ後、DRCR を誘導したところ、増幅産物に欠失と倍化が生じた。以上の結果から DRCR 依存的な組換え活性化の存在はまちがいないことを結論した。

実際の動物細胞を用いた薬剤耐性遺伝子の増幅では、増幅初期に見られる少コピー・長大な増幅単位は、薬剤濃度を段階的に高めるに従い、多コピー・短小増幅単位に劇的に変化するが、機構は不明であった。興味深いことに、動物染色体はその 20~30% が転移因子により占められている。DRCR の誘導により、多数の転移因子間での高頻度でランダムな組換えにより、有利な遺伝子は残り、中性又は有害な遺伝子 (またはスペーサー) は除去されると考えるとこの激しい構造変化もうまく説明出来る。さらに本論文ではこの DRCR 依存的な組換えの活性化に関するモデルも提案している。

本論文は、(1) DRCR が組換えを活性化するとの予想外の性質を初めて明らかにしたことが最も重要な発見である。それに加え (2) この性質から、従来説明不能だった動物細胞での増幅に伴う激しい構造変化を合理的に説明出来たこと、(3) DRCR に依存した相同組換えの活性化モデルを提案したこと、(4) モデルからコヒーシスが組換え活性を抑制するとの新しい役割を示唆したこと等この分野の進展に寄与したことから、審査委員会は本論文が博士号に相応しい質と内容を有することと判定した。