

ゲノム動態研究部門 (形質統御遺伝子第二部門)

堀 内 嵩

本部門 (形質統御遺伝子第二部門) は、新部門として平成 3 年 12 月 2 日に設置された。10 年前は、ちょうど研究テーマが切り替わった時期に当たる。それまでは、大腸菌のゲノム上にある複製フォークの阻害部位 (Ter) の研究を行ってきた。Ter は特定方向のフォークの進行を阻害する部位で、同様の部位は細菌からヒトまで存在する。それまで Ter に関して、明らかに出来ることは全て明らかにしてきた。つまり Ter の DNA コンセンサス配列、Ter への特異的結合タンパク質 (Tus) の解析と構造遺伝子の同定、Ter・Tus 複合体の 3 次元構造等を明らかにし、*in vitro* での Ter 部位でのフォーク阻害を再現し、さらに Ter におけるフォーク阻害依存的な組換えのホットスポット活性を見出していた。ただフォーク阻害能欠損 (*tus*-) 株が何の異常も示さなかったことから、フォーク阻害点の生理機能だけが未解決のまま残された。それをなんとか知りた。大腸菌では無理かもと、出芽酵母に研究を拡張、酵母のフォーク阻害の解析を開始した。酵母の阻害点 (RFB) がリボゾーム RNA 遺伝子 (rDNA) リピート内にあることを除いては、基本的には大腸菌と同じで、*tus* に相当する *FOB1* を同定し、最終的には上述の大腸菌で解いた問題を酵母でも殆ど全て解いた。さらに大きな進展は、念願の生理機能が明らかになったことである。つまり、*fob1* 欠損株では、正常下で起こる rDNA のコピー数の増減が停止し、フリーズしたのである。よく知られているように真核生物の rDNA はタンデムリピート構造採っている。以前から、rDNA のコピー数は常時増減し、何らかの拍子にコピー数が激減しても、自然に回復することが知られていた。しかし、その機構は不明のままだった。*fob1* 株でコピー数がフリーズしたことから、フォーク阻害がコピー数の増減に関与するという生理機能が初めて示され、謎だった遺伝子増幅の機構解明への突破口が開かれた。その結果、この後遺伝子増幅が研究室のテーマの一つになった。

それまでは、rDNA のコピー数は制御できなかったが、*fob1* 変異はそれを可能とさせた。このことは、rDNA リピート内に任意の欠失の導入も可能にさせる。つまり 1~2 コピー rDNA に減少させた *fob1* 株を用意し、目的の欠失を挿入後、*FOB1* 遺伝子を導入し増幅させれば、全てのコピーがその欠失を有する株が作れる。この手法を駆使することで、これまで不可能だった rDNA リピート内のシス領域の生理機能を問うことが可能となった。実際この方法で、EXP と名付けられた、RFB を含む約 500 塩基領域が、増幅に必須であることを決定できた。それまで rDNA において pSir2 によるサイレンシングが知られており、特徴的なことは、遺伝子発現ばかりでなく、組換えも抑制されることであった。EXP 領域の解析から、その領域に非コーディング RNA の両方向へのプロモーターが存在し、サイレンシングによりその転写がまず抑制され、その結果それまで転写によって近傍に結合できなかったコ

ヘーシンが結合することで、姉妹染色体間が結ばれ、コピー数増減に必須な非対称的組換えが抑制されることが判明した。*sir2* 変異では逆反応が起こり、組換えが活性化されることになる。

一方、*fob1* 株では、上述のように rDNA コピー数がフリーズするが、これは非 rDNA 領域では考えにくいことである。というのは非 rDNA 領域では、リピートの存在が許されないほど、酵母の相同組換え活性が高いからである。つまり *fob1* のコピー数のフリーズは、未知の維持機構の存在を示唆した。そのため、*fob1* 株のコピー数を維持不能にする変異を求めたところ、ゲノムの凝縮と分配に関与するコンデンシン欠損であることが判明した。この株の解析から rDNA リピート維持にコンデンシンと *FOB1* が共に必須であり、その分子機構として、pFob1 依存的にコンデンシンが RFB へ特異的結合することを見出した。一般的にゲノムの凝縮と分配に関与するコンデンシンが、特異的部位に結合することと結合に必須なタンパクを同定したことは新発見である。この発見は、rDNA と非 rDNA 領域との性質の違いから見出されたものであり、特異的領域の解析の有効性を示す一例である。

遺伝子増幅産物には大きく分けて 2 種類ある。一つは、rDNA タイプで順位繰返し構造 (→→→→) を持ち、他はガン遺伝子や DHFR 遺伝子 (薬剤耐性遺伝子) タイプで、少なくとも一部に逆位繰返し構造 (→←→←) を持つ。我々が測定した rDNA の増幅速度は、1 コピー / 世代であった。これを 1 世代 24 時間の動物細胞に当てはめると、2 → 200 コピーの増幅に 200 日、つまり半年以上を要することになる。遺伝子増幅が環境変化への適応戦略の一つと考えれば、この速度は余りに遅いように思える。おそらくより早い増幅機構があり、それが DHFR タイプではないかと考えた。薬剤耐性遺伝子やガン遺伝子の増幅は、医学的に重要な現象であるため、盛んに機構解析が行われてきたが、複雑さの故に殆ど未解決で残されていた。この難題に挑戦すべく採った作戦は、これまでで発想法を変え、まず材料に酵母を用い、そこに「考え得る最速の増幅法をデザインした」。それが図 1 である。ダブルローリングサークル複製 (DRCR) を誘導できれば、1 細胞周期に無限の増幅が期待できる。この複製の開始を細胞内で誘導させるため、2 力所 (矢印) で DNA を切断させた。一方増幅したクローンの選択には、プロモーター変異を有する *LUE2* 遺伝子、*lue2d* を用い、*lue2d* が増幅したクローンだけ、ロイシン抜き培地で生育できる工夫をした。実験の結果、2 種類の増幅産物を有するクローンが得られた。(1) 染色体上に最高 100 コピー以上の逆位繰返し構造を有するクローンと (2) 逆位 2 コピーのミニ染色体を約 10 コピー有するクローンである。驚いたことは、相同組換え活性の高い酵母では、このような 100 コピー以上の増幅達成は初めてであり、さらに 2 種類の産物は動物細胞の増幅産物として良く知られた HSR と DM に酷似していたこ

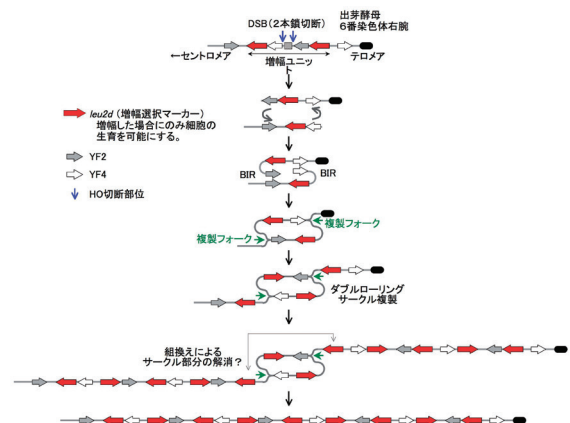


図 1. 新しい高速遺伝子増幅システム
ダブルローリングサークル複製 (DRCR) による増幅システム。増幅ユニット内に誘導した 2 本鎖切断 (DSB) から、生き残るための反応 (BIR) により DRCR が誘導され、サークル部分のみが果てしなく複製を繰り返し、リピートとして両側に伸長していく。最終的にサークル部分は組換えで除かれ、高度に増幅された染色体ができる。

幅法をデザインした」。それが図 1 である。ダブルローリングサークル複製 (DRCR) を誘導できれば、1 細胞周期に無限の増幅が期待できる。この複製の開始を細胞内で誘導させるため、2 力所 (矢印) で DNA を切断させた。一方増幅したクローンの選択には、プロモーター変異を有する *LUE2* 遺伝子、*lue2d* を用い、*lue2d* が増幅したクローンだけ、ロイシン抜き培地で生育できる工夫をした。実験の結果、2 種類の増幅産物を有するクローンが得られた。(1) 染色体上に最高 100 コピー以上の逆位繰返し構造を有するクローンと (2) 逆位 2 コピーのミニ染色体を約 10 コピー有するクローンである。驚いたことは、相同組換え活性の高い酵母では、このような 100 コピー以上の増幅達成は初めてであり、さらに 2 種類の産物は動物細胞の増幅産物として良く知られた HSR と DM に酷似していたこ

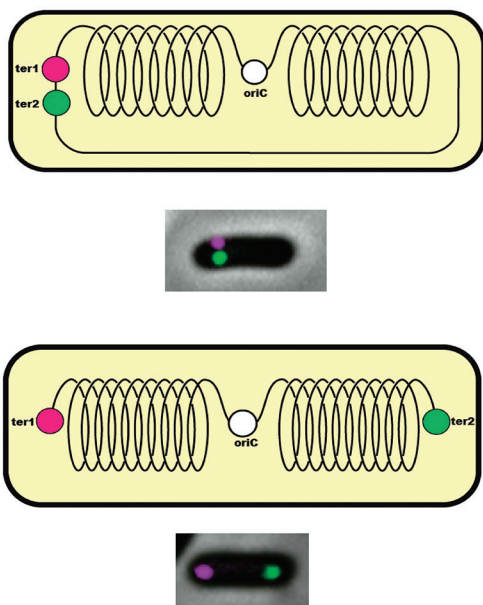


図2. 大腸菌の環状ゲノムの線状化。環状ゲノム上の近接した2地点が、線状化によって細胞の両極に分離する。

れた一例である。

大腸菌の環状ゲノムを線状化する試みは、以前からしたかったものの内のひとつである。ゲノムの線状と環状は、真核生物と原核生物に対応する。わずかの例外を除いて原核生物が環状であることの原因は不明である。それを知るには、両様態ゲノムの細菌を作り比較するのが賢明であろう。大腸菌のゲノムの線状化を試みたところ成功し、その株が生存することが判明した。培養液には環状ゲノム菌の混在は無く、環状ゲノム野生株と同じ増殖速度を示し、ゲノム構造も安定であった。他の性質も環状ゲノム菌と殆ど差のないことには驚いた。図2は線状化前と後の末端部分の細胞内局在を示している。今のところ、大腸菌の環状ゲノムの選択は偶然である可能性を排除できず、逆に線状ゲノム菌の自然界における生存の可能性も否定できない。ただ、線状化の末端場所は重要で、複製開始点が線状ゲノムの中央に来れば正常だが、偏れば偏るだけ生育は悪く、ある限度を超えると生存できないようである。この線状化大腸菌は今後も面白い課題を提供してくれそうである。

10年間に上げた研究成果は、以下の当部門のメンバーがいなければ得られなかった。謝してここに記す。日高真純君、小林武彦君、児玉颯一君、定塚勝樹君、林 晃司君、諸岡直樹君、大住克史君、Austen Ganley 君、崔泰林君、浦和博子さん、芹澤尚美さん、氏家義史君、渡邊孝明君、板津昌子さん。

参考文献

1. Cui, T., Moro-oka, N., Ohsumi, K., Kodama, K., Ohshima, T., Ogasawara, N., Mori, H., Wanner, B., Niki, H., and Horiuchi, T. (2007) *E. coli* with a linear genome. *EMBO Rep.* 8, 181-187.
2. Johzuka, K., Terasawa, M., Ogawa, H., Ogawa, T., and Horiuchi, H. (2006) Condensin loaded onto the replication fork barrier site in ribosomal DNA (rDNA) repeats during S-phase in a *FOB1*-dependent

とである。現在 DRCR モデル (図 2) が真の増幅機構か否かを知るため、動物細胞を用いて検討中である。

大腸菌ゲノムに関して2つの課題、「全ゲノム配列決定」と「環状ゲノムの線状化」に取り組んだ。前者は日米の競争の末、結果的に敗れたが、多数の協力者の努力を無にしないためと、中途半端で終わらせたくない気持ちから、その後主に基研でこつこつ配列決定し、より正確な全配列を米国とは独立に決定した。次いで日米の菌株 (W3110 と MG1655) 間の配列を比較し、見出した全矛盾した配列を再決定することで、ゲノム配列の正確度から間違いなく1、2を争うと自負できる二株の全配列を決定した。この成果が大腸菌や微生物研究の基盤としての役割以外に何の役に立つかと思いきや、最近驚くべき進歩を遂げているマイクロアレイを用いての近縁2株間の配列差違検出法の評価に使われているのには驚いた。本研究が直接生かされ

- fashion to prevent contraction of a long repeats in *S.cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2226-36.
3. Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T. Wanner, B. L., Mori H., and Horiuchi, T.(2006) Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol. Systems Biol.* doi:10.1038/msb100049:E1-E5
 4. Kobayashi, T. and Ganley, ARD.(2005) Recombination Regulation by Transcription-Induced Cohesin Dissociation in rDNA Repeats. *Science* 309, 1581-1584.
 5. Watanabe, T., and Horiuchi, T. (2005) A novel gene amplification system in yeast based on double rolling-circle replication. *EMBO J* 24, 190-198.
 6. Kobayashi, T., Horiuchi, T., Tongaonlar, T., Vu, L., Nomura, M. (2004) SIR2 regulates recombination between different rDNA repeats, but not recombination within individual rDNA genes in Yeast. *Cell* 77, 441-453.
 7. Kodama K, Kobayashi T, Niki H, Hiraga S, Oshima T, Mori H, Horiuchi T. (2002) Amplification of Hot DNA segments in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 45, 1575-88.
 8. Urawa, H., Hidaka, M., Ishiguro, S., Okada, Y., and Horiuchi, T. (2001) Enhanced homologous recombination caused by a non-transcriptional spacer of the ribosomal RNA genes in Arabidopsis. *Mol. Genet. Genomics* 266, 546-555
 9. Kobayashi, T., Nomura, M., and Horiuchi, T. (2001) Identification of DNA cis-elements essential for expansion of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 21, 136-147.
 10. Kobayashi, T., Heck, J. D., Nomura, M., and Horiuchi, T. (1998) Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev.* 12, 3821-3830.

