

課題番号 49

## 染色体の脆弱性を抑制できるエネルギー代謝機構の解明

[1] 組織

代表者：増本 博司  
(長崎大学・医学部共同利用研究センター)  
対応者：安井 明  
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 13 万 5 千円, 旅費 6 万 5 千円

[2] 研究経過

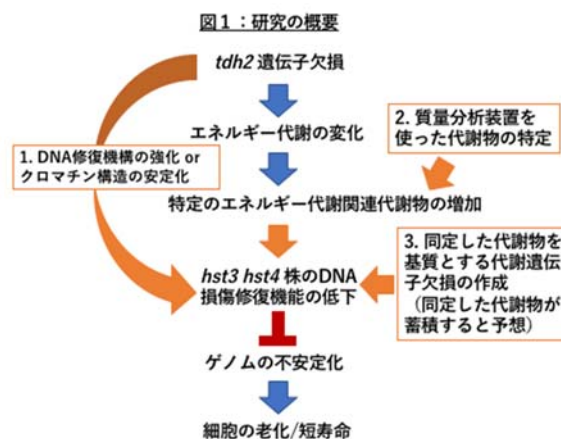
本研究では DNA 修復異常もしくはクロマチン構造維持異常に伴うゲノムの不安定化を抑制するエネルギー代謝の機能を明らかにすることを研究目的とした。

申請者は出芽酵母を研究材料に、その欠損によって DNA 修復遺伝子欠損によるゲノムの不安定化を回復できるエネルギー代謝関連遺伝子に着目した。申請者はヒストン H3 の 56 番目のリジンへの恒常的アセチル化を引き起こす NAD<sup>+</sup>依存性デアセチラーゼ *hst3 hst4* 二重遺伝子欠損株の DNA 損傷剤への感受性を、解糖系代謝酵素 GAPDH をコードする *tdh2* 遺伝子欠損によって部分的に回復できることを見いだした (Hachinohe, M. et al., (2013) *PLoS One*, 8, e54011)。

以下、研究の概要である (図 1)。

1. *tdh2* 遺伝子欠損によって *hst3 hst4* 欠損株で起こる H3-K56 のアセチル化レベルが変化するか調べた。さらに *tdh2* 欠損が *hst3 hst4* 欠損株で低下する DNA 修復能力を回復できるかどうか調べた。
2. 同定した代謝物を基質とする代謝酵素遺伝子欠損が、*tdh2* 欠損と同じく *hst3 hst4* 欠損株で低下する DNA 修復能力を回復できるかどうか調べた。

本研究の進展状況については、申請者が東北大・加齢医学研究所にて安井明加齢研フェローと研究討論を行った(令和元年 11 月 22-11 月 23 日)。



[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示すような研究成果を得た。

第 1 に、*tdh2* 欠損によって増減するエネルギー代謝由来の代謝物を Capillary electrophoresis-time of flight / mass-spectrometry (CE-TOF/MS) を用いて定量解析した。野生株もしくは *hst3 hst4* 株に対して、それぞれ *tdh2* 株もしくは *tdh2 hst3 hst4* 株で顕著に増加する代謝産物としてキノリン酸を同定した。キノリン酸はトリプトファンから新規に NAD<sup>+</sup> を合成するキヌレニン経路の中間代謝産物の一つである。キノリン酸を基質とする Quinolinate phosphoribosyl transferase をコードする *qpt1* 遺伝子の欠損は、*tdh2* 欠損と同じく、*hst3 hst4* 株が示す DNA 損傷剤への感受性を相補することができた。しかしながら *qpt1* 欠損株は野生株よりも細胞分裂寿命が短くなった。ヒトなど哺乳類ではキノリン酸の蓄積は、特に神経細胞において活性酸素種の蓄積を起し、細胞死を引き起こすことから、キノリン酸はゲノムの安定性の寄与よりも細胞毒性の副作用が強くなることが示唆された。

第 2 に、GAPDH は代謝酵素としての機能以外にも多様な細胞機能を示す“Moonlighting protein”としての機能があることが知られている。*tdh2* 欠損によって出芽酵母の主要な NAD<sup>+</sup> 産生経路である NAD<sup>+</sup> salvage pathway を構成する代謝酵素遺伝子群の転写量を上昇させることが分かった。また *tdh2* 欠損によ

って、NAD<sup>+</sup>合成量が増加しており、今回キノリン酸の細胞内に蓄積した原因は、活性化した NAD<sup>+</sup> salvage pathway へ供給される基質として、キノレン経路を経てキノリン酸が大量供給されたのではと推測される。

第3に、*hst3 hst4*株のDNA損傷剤感受性を相補する *tdh2* 欠損が複製フォークの停止に伴う染色体DNA鎖の切断や欠失といったゲノムの不安定化を抑制できるのか調べた。その結果、*tdh2*欠損は染色体上に存在するリピート配列間での不要な組換え機構を抑制していることがわかった。同様に *qpt1* 欠損でも同様にクロマチン上のリピート配列間での不要な組換えを抑制していることがわかった。このことからキノリン酸を主体とした代謝物が、有害なDNA鎖間の組換え反応を抑制することで、ゲノムの安定化に寄与していることを示唆している。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

GAPDH は解糖系／糖新生経路において重要な酵素であるが、代謝酵素としての機能以外にも、転写因子として機能するといった多様な細胞機能を示す“Moonlighting protein”としても知られている。今回研究に使用した *Tdh2* が、その欠損によってゲノムの安定化に加えて NAD<sup>+</sup> salvage pathway を構成する代謝酵素遺伝子群の転写量を上昇させるなど、*Tdh2* が Moonlighting protein としての機能することを示唆している。

さらに出芽酵母には三種類の GAPDH (*Tdh1/2/3*) が存在するが、*Tdh1/3* が解糖系、*Tdh2* が糖新生経路の活性化に関与し、寿命延長効果も *tdh2* 欠損にのみ生じる。*tdh2*欠損で現れるゲノムの安定化、細胞寿命に必要な NAD<sup>+</sup>の合成量の制御など、*Tdh2* の機能解析が細胞寿命の制御機構を解明する一助となる可能性を秘めている。

#### [4] 成果資料

1. A SNARE geranylgeranyltransferase essential for the organization of the Golgi apparatus.  
Ryutaro Shirakawa, Sakurako Goto-Ito, Kota Goto, Shonosuke Wakayama, Haremaru Kubo, Natsumi Sakata, Duc Anh Trinh, Atsushi Yamagata, Yusuke Sato, Hiroshi Masumoto, Jinglei Cheng, Toyoshi Fujimoto, Shuya Fukai, Hisanori Horiuchi  
The EMBO journal e104120 2020年3月3日
2. Deep sequence analysis of NS5A resistance-associated substitution changes in patients reinfected with the hepatitis C virus after liver transplantation.

Yamamichi S, Miura S, Wada T, Masumoto H, Kanda Y, Shibata H, Miyaaki H, Taura N, Ichikawa T, Yamamoto T, Nakao K  
Journal of viral hepatitis 2020年1月

3. CRISPR/Transposon gene integration (CRITGI) can manage gene expression in a retrotransposon-dependent manner.  
Hanasaki M, Masumoto H  
Scientific reports 9(1) 15300 2019年10月
4. Utilization of Natural Detergent Potassium Laurate for Decellularization in Lung Bioengineering.  
Obata T, Tsuchiya T, Akita S, Kawahara T, Matsumoto K, Miyazaki T, Masumoto H, Kobayashi E, Niklason LE, Nagayasu T  
Tissue engineering. Part C, Methods 25(8) 459-471 2019年8月
5. Bacteroides in colonic mucosa-associated microbiota affects the development of minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis.  
Haraguchi M, Miura S, Masumoto H, Ichikawa T, Kanda Y, Sasaki R, Fukushima M, Miyaaki H, Taura N, Nakao K  
Hepatology international 13(4) 482-489 2019年7月