

課題番号 22

GAPDH の Moonlighting protein としての 細胞寿命延長効果のメカニズム

[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 6万 5千円，旅費 8万 5千円

[2] 研究経過

研究の背景：

出芽酵母 GAPDH には三種類のアイソフォーム (Tdh1/2/3) が存在する。このうち Tdh2 は糖新生経路の抑制に関与し、その遺伝子欠損は細胞の分裂寿命の延長を起こすほか、DNA 損傷剤への耐性 (染色体複製フォークの安定化) を起こす。エネルギー代謝の主要な代謝経路である解糖系酵素の欠損が、DNA 損傷剤への耐性および細胞寿命延長につながるのか、その機構は不明であった。

研究の目的：本研究では、*tdh2* 欠損によって蓄積する代謝産物の種類に着目し、増加する代謝産物と DNA 損傷剤への抵抗性との関係を明らかにする。

研究方法：*tdh2* 欠損株および野生株のエネルギー代謝を中心とした代謝産物を、Capillary electrophoresis-time of flight / mass-spectrometry (CE-TOF/MS) を用いて定量解析を行う。野生株と比較して、増減している代謝産物に着目し、DNA 損傷剤投与によって細胞内で起こる反応と、代謝産物との関連性を考察する。

加齢研側の受け入れ教員である安井明加齢研フェローおよび菅野新一郎講師とは、令和4年2月22日に加齢研を訪れ、今回の研究内容の発表を行うとともに、今後の研究の方向性についてディスカッションを行った。

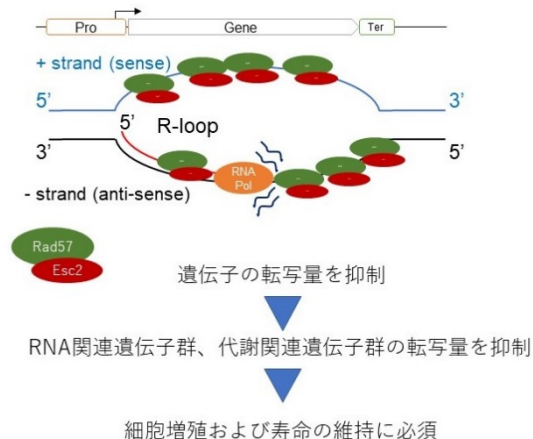
[3] 成果

(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、今年度は Tdh2 の Moonlighting protein としての機能に関して新しい研究成果を挙げる事ができなかった。

今年度の成果として、我々が行った別研究で明らかになった細胞の寿命制御に関連する新しい知見について報告する (図1)。

図1 今回の成果



転写活性が高い遺伝子領域でDNAヘリカーゼにより二本鎖DNAが乖離し、DNA:RNA二重鎖と一本鎖DNAで構成されるR-loop構造が形成される。R-loop構造に数種類の修復タンパクが局在するのは、転写フォークの進行の際に起こりうるDNA切断の修復のためだと考えられていた。

我々は出芽酵母レトロトランスポゾン Ty1 内部にサイレンシングを起こす領域があり、その制御遺伝子群として相同組換えを介したDNAの二本鎖切断修復に関与する Esc2, Rad57 の両因子を同定した (Hanasaki and Masumoto, 2019, Scientific Reports, 増本ら投稿準備中)。Chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq)解析か

ら、Esc2, Rad57 は転写が活発に行われている遺伝子領域に結合しており、その結合量は転写の活性化に依存することから R-loop 構造を認識・結合していることが示唆された（増本ら、未発表データ）。Strand-specific ChIP-seq により、Esc2, Rad57 はともに遺伝子のコード領域の+strand, -strand の両方に存在するが、dead Cas9 変異体との融合体を使い Esc2, Rad57 を遺伝子領域へ強制的に導入すると、-strand における Esc2, Rad57 の局在は遺伝子コード領域を停止させることが分かった。このことは Esc2, Rad57 が転写フォークの進行を抑制していることを示唆している。esc2 rad57 二重欠損では代謝関連遺伝子群、RNA 関連遺伝子群を中心に幅広い遺伝子群の転写量が増大していた。TDH2, TDH3 などの解糖系の遺伝子群の転写量が増加したにも関わらず、esc2 rad57 株の増殖スピードは低く、かつグルコース消費量も低下していた。さらに esc2 rad57 細胞の寿命は極端に短かった。これらの結果から Esc2, Rad57 が DNA 損傷修復機能に加えて、遺伝子の転写量の許容量を制限し、その制限を超えないように調整する転写リミッターとして機能していること、その転写抑制制御は細胞増殖および細胞の寿命において重要な役割を果た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

本研究で見出した R-loop を基盤とした遺伝子の転写抑制機構は、異なった転写調節を受ける様々な遺伝子の転写量を一括して制御できる上位の転写制御機構であり、細胞増殖、細胞の寿命など重要な生命機能に影響することを示している。

今回は Esc2, Rad57 の二つの DNA 修復関連遺伝子がこの転写制御に関与していることを示した。R-loop 構造に集合するタンパク群は多く、その機能が明らかになっていない因子も多い。今後他の因子(群)で Esc2, Rad57 と同じように R-loop 上での転写抑制に関与することを明らかにしていきたい。

また本研究は出芽酵母を研究モデルとして使用しているが、今回明らかになった R-loop における転写制御機構が、他の生物種、特に哺乳類でも保存されているか研究していきたい。II 型糖尿病患者の肝臓細胞では解糖系遺伝子群を中心に高い転写活性化状態にあるが、この異常な転写活性化と R-loop 上での転写抑制異常と関連するかどうか、興味を持っている。

[4] 成果資料

なし