

課題番号 88

DNA 損傷修復因子による遺伝子の転写を介した 細胞老化抑制機構の解明

[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・分子腫瘍学研究

分野 安井研究室・シニアフェロー)

分担者：なし

研究費：物件費 8 万 2 千円，旅費 4 万 8 千円

[2] 研究経過

研究の背景：

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 (Hanasaki, et al., *Scientific reports* (2019))、そのサイレンシング制御因子として 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 (増本ら、未発表データ)。

Chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) 解析から、これらの因子は転写が活発に行われている遺伝子領域 (ハウスキーピング遺伝子群など) に局在している (増本ら、未発表データ)。この局在は遺伝子領域で転写フォーク通過時に形成される一本鎖 DNA, DNA-RNA のハイブリッド二重鎖で形成される R-loop 構造を Esc2, Rad57 が認識・結合していることを意味しており、R-loop 上で起こりうる DNA 鎖の切断修復に関与するためと考えられた。

興味深いことに *esc2 rad57* 二重欠損では本来転写活性が高い遺伝子領域：リボゾーム、転写、翻訳関連遺伝子群や解糖系を中心とした代謝系遺伝子群の転写が大幅に増加したことから、Esc2, Rad57 が R-loop 上で起こりうる DNA 損傷修復だけでなく転写調節に関与していることがわかった。

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下し、かつグルコー

ス消費量が低下した。さらには *esc2 rad57* 株は極端に短い細胞寿命を示した。これらの結果から Esc2, Rad57 が遺伝子の転写量の限界値を規定し、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、その制御は細胞増殖および細胞の寿命にも大きな影響を与えていることを示唆している。

研究の目的：本研究では *esc2 rad57* 細胞での遺伝子転写制御異常が短寿命を起こす原因であるという仮説を立てた。まずは遺伝子転写制御における Esc2, Rad57 の役割を明らかにするために、Esc2, Rad57 と遺伝学的に相互作用する遺伝子群をスクリーニングする必要がある。

研究方法：*esc2 rad57* 二重欠損と合成致死を引き起こす遺伝子変異のスクリーニングを行った。*esc2 rad57* 株に変異源処理を行い、RAD57 野生型遺伝子をもつプラスミドを失うと生育できない *esc2 rad57* の合成致死変異株を単離した。酵母のゲノムライブラリーを合成致死変異株に導入し、生育を相補できる遺伝子を同定した。さらに Esc2, Rad57 との遺伝子領域での共局在の有無を確認するため、同定した遺伝子産物について ChIP-seq を行った。

加齢研側の受け入れ教員である安井 明シニアフェローおよび菅野新一郎講師は、令和 5 年 3 月 1 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。

esc2 rad57 二重遺伝子欠損と合成致死となる遺伝子のスクリーニングを行い、下記の遺伝子群を単離した。

1. *SIT4*: A型セリン/スレオニン脱リン酸化酵素であり、ヘキソキナーゼの脱リン酸化を初めとした様々なタンパクの脱リン酸化を行う。補酵素としてセラミドを必要とする。

2. *PTC2*: C型セリン/スレオニン脱リン酸化酵素であり、RNA Pol I と遺伝学的相互作用がある。

3. *FPR3*: プロリンのシス型からトランス型へ変換する酵素であり、キナーゼあるいは脱リン酸化酵素とともにセリン/スレオニン-プロリンのアミノ酸配列を認識、リン酸化あるいは脱リン酸化を促進する。

4. *Glk1*: グルコースをリン酸化しグルコース 6 リン酸を生成するヘキソキナーゼをコードする。

いずれの遺伝子においても変異部位を同定した。*SIT4*, *PTC2*, *GLK1* ではそれぞれの酵素活性部位に変異が確認された。*FPR3* 遺伝子本体には変異は確認されず、*esc2 rad57* 株の低い増殖速度を補填する遺伝子として単離された。

さらに *Sit4* と *Fpr3* については ChIP-seq を行い、この二つの因子が *Esc2*, *Rad57* と同じく転写が活発な遺伝子領域に局在していた。対照的に *Ptc2* はトランスポゾン領域以外ではゲノムへの結合は確認できなかった。

(3-2) 波及効果と発展性など
本研究で見出した *Sit4*, *Fpr3* の組み合わせは、セリ

ン/スレオニン+プロリンの配列をもつリン酸化基質タンパクを優先的に脱リン酸化することが推測される。この配列をもち転写に関与するタンパクとしてその C 末端ドメイン (C-terminal domain; CTD) がアミノ酸配列: Tyr-ser-pro-thr-ser-pro-ser の繰り返し構造である RNA ポリメラーゼ II が候補として考えられる (図 1)。

今後、遺伝子の転写量を決定するのはプロモーター領域に結合する転写因子群の活性に依存するだけでなく、R-loop 上に結合した *Rad57*, *Esc2* および *Sit4*, *Fpr3* によって RNA pol II の CTD のリン酸化状態 (およびセリン/スレオニン+プロリンのリン酸化部位を持つ転写関連因子群) をコントロールして転写を調節している可能性を探っていきたい。

本研究で単離された *Sit4* のヒトホモログは PP6 であることが知られている。PP6 は DNA 損傷時の γ -H2Ax の脱リン酸化や解糖系利用に必須なグルコース 6 リン酸を作るヘキソキナーゼの脱リン酸化に加えて、様々な細胞機能: 抗炎症効果、白血球の発生、皮膚がんの悪性化に関与していることが報告されている。現在のところ PP6 が転写制御に関与していることを示す研究報告はないが、今回の研究で明らかになりつつある *Sit4* による RNA Pol II の制御を PP6 も行っているのであれば、PP6 が関与する多様な細胞機能の中には転写制御が関与する可能性が高い。

[4] 成果資料

なし

図1: *Esc2*, *Rad57*-*Sit4*, *Fpr3*による転写量調節機構 (予想図)

