

課題番号 10

DNA 損傷修復因子による転写伸長反応中の RNA ポリメラーゼを間引く機構の解明

〔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：75,650 円 旅費：124,350 円

〔2〕研究経過

出芽酵母レトロトランスポゾン Ty1 内部にはサイレンシングを誘導する領域が存在し (Hanasaki et al., 2019)、そのサイレンシング制御因子として、DNA 二本鎖切断修復に関与する Esc2 および Rad57 を同定した (Masumoto et al., 2024)。

我々はさらに、DNA 二本鎖切断修復に関与する出芽酵母因子 Esc2 および Rad57 が、活発に転写されている遺伝子領域に結合し、当該遺伝子の転写量を減衰させることを見出した。この転写抑制機構は、RNA polymerase II (Pol II) を遺伝子領域から排除することで、特定遺伝子の過剰な転写を防ぐ防御的制御機構である。我々は、Pol II の排除には Esc2、Rad57 に

加え、脱リン酸化酵素 Sit4 およびプロリルイソメラーゼをコードする Rrd1 が必要であることを明らかにした。また、この転写減衰機構の破綻が、細胞増殖や寿命に深刻な影響を及ぼすことも示している (増本ら、投稿中)。

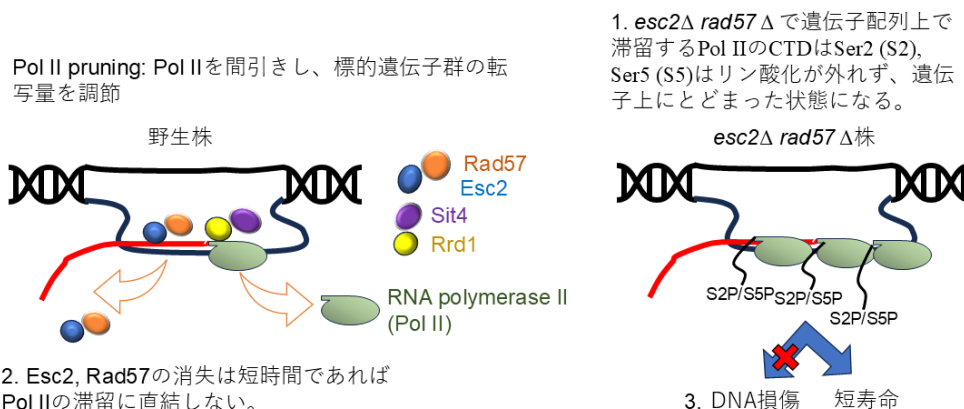
研究の目的: *esc2Δ rad57Δ* 欠損株で Pol II が蓄積し、その一部が不活化する機構を明らかにするとともに、Esc2 と Rad57 による Pol II の間引き機構を解明する。

本研究では、以下の二項目について検討を行う。

1. 遺伝子の転写を担う Pol II の C 末端領域 (carboxyl-terminal domain: CTD) は、複数のセリン残基でリン酸化修飾を受ける。Pol II は転写開始から伸長、終結に至る過程で CTD のリン酸化パターンが変化する。転写開始時には CTD の 5 番目のセリン (Ser5) のリン酸化が主要であるが、Pol II が RNA を合成しながら終結点へ向かうにつれて、Ser5 から 2 番目のセリン (Ser2) のリン酸化へと移行する。CTD がリン酸化されていない Pol II は転写に参加していないと考えられる。そこで、*esc2Δ rad57Δ* 欠損株で蓄積した Pol II の CTD リン酸化レベルを野生株と比較し、転写に参加している Pol II の割合を算出する。

2. Pol II は核内で liquid-liquid phase separation

図1. まとめ: Esc2, Rad57経路によるSit4, Rrd1を介した
Pol II間引き(pruning) 機構



(LLPS) を形成し、Pol II をはじめとする転写因子群の局所濃度を高めることで、その領域内の遺伝子転写を増幅させることが知られている。そこで、*esc2Δ rad57Δ* 欠損株において特定遺伝子領域でみられる Pol II の蓄積と転写量の増加が、LLPS 制御の一環であるかどうかを考察する。

研究方法：

Pol II に対する抗体、ならびに Pol II CTD の Ser5 および Ser2 のリン酸化に対する抗体を用いて chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) を行い、Pol II のリン酸化／脱リン酸化の比率を算出することで、野生株と比較した *esc2Δ rad57Δ* 欠損株における Pol II の脱リン酸化状態を調べる。さらに、CTD 脱リン酸化酵素が *esc2Δ rad57Δ* 欠損によって遺伝子領域へアクセスしやすくなるかについても、ChIP-seq により検討する。

なお、本研究の共同研究先である加齢研において、受入教員の安井 明 シニアフェローおよび菅野 新一郎 講師と、令和8年3月3日および4日に面会し、本研究内容の発表と今後の研究の方向性について議論を行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下の成果を得た（概略図参照）。

1. 遺伝子上の Pol II CTD Ser5 および Ser2 の局在パターンについて、WT 株と *esc2Δ rad57Δ* 二重欠損株と比較した。

その結果、Pol II の Ser5 リン酸化は WT 株では TSS 近傍で集積がみられたのに対し、*esc2Δ rad57Δ* では遺伝子本体にかけてなだらかなピークを示した。Ser2 リン酸化については、WT 株では TES 付近でピークを示したが、*esc2Δ rad57Δ* では遺伝子本体にかけてなだらかなピークを示した。これらの結果は、*esc2Δ rad57Δ* では転写に必要なリン酸化修飾を受けた Pol II が遺伝子領域に滞留していることを示している。

2. Esc2 および Rad57 を急性に消失させた場合の転写への影響を調べるため、Anchor-away 法を用いて疑似的に *esc2Δ rad57Δ* 欠損状態を作製し、遺伝子発現変化を RNA-seq により解析した。

その結果、ラパマイシン処理 5 時間後（出芽酵母の細胞周期は約 2 時間）であっても、RNA 量は未処理時と比較して大きな変化を示さなかった。この結果は、Esc2 および Rad57 を急性に染色体上から排除しても、短時間では顕著な転写変動が生じないことを示している。

3. Rad53 のリン酸化シフトを利用した DNA 損傷検出系では、WT 株および *esc2Δ rad57Δ* 株のいずれに

においても、染色体上に顕著な DNA 損傷は観察されなかった。

しかし、母細胞の分裂回数を計測する pedigree analysis により、*esc2Δ rad57Δ* 株は著しく短い分裂寿命を示した。これらの結果は、Esc2、Rad57 欠損による細胞機能の破綻が、少なくとも顕著な DNA 損傷の蓄積としては検出されない一方で、細胞寿命には深刻な影響を及ぼすことを示している。

結論 (図1)：

以上の結果より、Esc2、Rad57 による Pol II の間引き機構は、遺伝子領域に滞留する転写途中の Pol II を排除する機構であることが支持された。また、Pol II の滞留は顕著な DNA 損傷を引き起こさない一方で、細胞寿命には深刻な影響を及ぼすことが明らかとなった。さらに、Esc2 および Rad57 の急速な排除は、短時間では直ちに大きな転写変動を引き起こさなかった。以上より、Pol II pruning 機構は、転写途中の Pol II の過剰滞留を抑えることで、長期的な細胞恒常性の維持に寄与する機構であると考えられる。なお、本年度の結果からは、Pol II pruning を LLPS によって直接説明する根拠は得られていない。

(3-2) 波及効果と発展性など

Pol II 間引き機構は、特定因子の新規機能にとどまらず、転写伸長段階にも Pol II を適切に整理する制御層が存在する可能性を示している。とくに本機構は、活発な遺伝子群への Pol II の過度な集中を防ぎ、遺伝子群の間で Pol II を適切に配分することで、細胞全体の転写バランスとホメオスタシスの維持に寄与している可能性がある。関連因子はヒトにもホモログが存在することから、哺乳類での検証は、遺伝子発現異常を転写伸長制御の異常として捉える新たな視点につながると思われる。

[4] 成果資料

学会発表

(1) 増本ら、DNA 損傷修復因子は遺伝子領域から転写複合体を排除することで転写抑制に関与する、第 28 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、KKR ホテル熱海、2025 年 5 月 28-30 日、口頭発表