

課題番号 14

## 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：35,120 円 旅費：64,880 円

### [2] 研究経過

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、投稿中)。

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示唆しており、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。

しかし *esc2rad57* 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予想された。

解糖系の遺伝子群の転写量が増加したにも関わらず *esc2rad57* 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。これらの結果から解糖系などハウスキーピング遺伝子群の過剰な転写量増加は、細胞の増殖および寿命に悪影響を与えることから、Esc2, Rad57 が遺伝子の過剰な転写量を抑制するために、積極的に転写を抑制するリミッターとして機能していることを示唆している。

研究の目的： Esc2, Rad57 と RNA ポリメラーゼを中心とした転写複合体の關係に着目し、遺伝子の転写抑制での Esc2, Rad57 の役割を明らかにする。

研究方法： ChIP-seq を中心に *esc2rad57* 二重欠損によって、RNA polymerase II (R pol II) の遺伝子領域での挙動を調べる。さらにその変異によって *esc2rad57* と合成致死を起こす遺伝子として A 型脱リン酸化酵素 Sit4 に着目し、Esc2, Rad57 および Sit4 による R pol II の遺伝子領域に与える影響を検証する。

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とは、令和 6 年 2 月 27 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

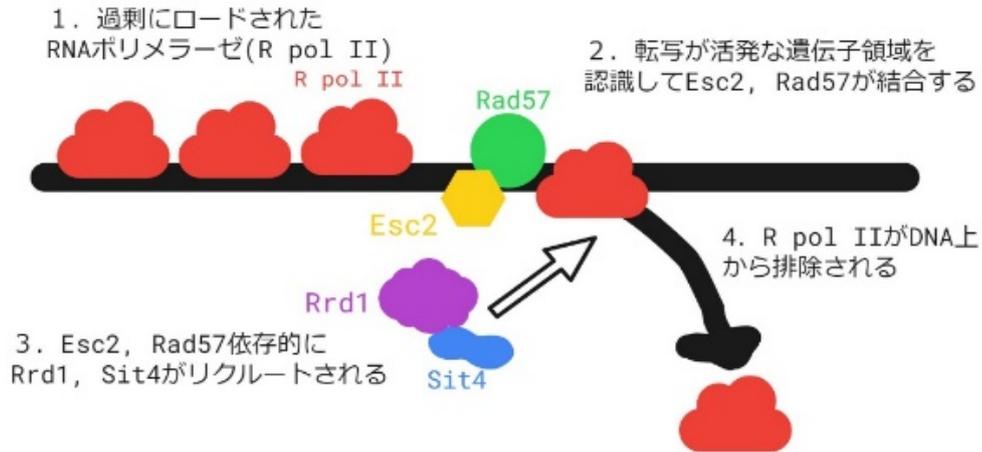
#### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示すような研究成果を得た (概略図参照)。

1. mRNA 合成を司る RNA polymerase II (R pol II) を中心とした転写複合体の遺伝子領域への局在に Esc2, Rad57 が与える影響を、R pol II に対する ChIP-seq を中心に解析を行った。野生株では R pol II は転写開始点部位に局在した後、転写終結点に急速に移動する。しかし *esc2rad57* 株では R pol II が遺伝子領域の中間点で蓄積することから、転写の伸長反応で遅延もしくは渋滞が起こっていることがわかった。なお R pol II の蓄積が起こる遺伝子群は、ほぼ *esc2rad57* 株で転写量が増加する遺伝子群と一致した。
2. *esc2rad57* と合成致死になるスクリーニング系を利用して単離した A 型セリン/スレオニン脱リン酸化酵素である Sit4 は、ペプチジルプロリルイソメラーゼ Peptidylprolylisomerase (PPIase) である Rrd1 と複合体を形成する (Douville J, et

## 研究成果（概略図）

Esc2, Rad57はRrd1, Sit4をリクルートしてDNA上のRNAポリメラーゼを排除する



al. *Curr Genet.* (2004)。Rrd1 は遺伝子領域に結合し、R pol II をクロマチンから引き剥がす活性を持つ (Jouvet N. et al., *BMC Mol. Biol.* (2010))。我々は Esc2, Rad57 が Sit4, Rrd1 を遺伝子領域にリクルートすることで、R pol II を遺伝子領域から排除しているという仮説を立てた。この仮説をサポートする以下の研究成果を得た。

- Sit4, Rrd1 が局在する遺伝子群は、Esc2, Rad57 が局在する遺伝子群とほぼ一致する。また Sit4, Rrd1 の遺伝子領域への結合は、*esc2 rad57* 株では大きく減少したことから、Sit4/Rrd1 の遺伝子領域局在は Esc2/Rad57 に依存する。
- 出芽酵母から精製した Sit4p および Rrd1p を使い、Esc2 と Rad57 が相乗的に単離したクロマチンから R pol II を排除することを確認した。さらに *esc2 rad57* 株に Esc2, Rad57 を過剰に発現させた場合に、遺伝子上の R pol II が減少することがわかった。

### (3-2) 波及効果と発展性など

R pol II に対する転写コントロールは、1. プロモーター領域へのローディング、2. 転写開始点でのアイドリリング、3. 転写終結点での R pol II の鋳型 DNA からの乖離である。

本研究で明らかになったのは、Esc2, Rad57 が転写が活発な遺伝子領域に結合し、Sit4/Rrd1 をローディングし、過剰な R pol II を排除するという機能である。この機能は過剰に活性化する危険性のある遺伝子群の転写量を抑制する新しい機能であり、また転写の伸長反応でも調節機構が存在することを示している。

R pol II を中心とした基本転写因子群は真核生物間

で高度に保存されている。この転写の伸長反応をターゲットとした転写調整機構は、出芽酵母だけでなくヒトを初めとした様々な真核生物で保存されていると予想される。

### [4] 成果資料 学会発表

(1) 増本博司ら、出芽酵母 DNA 修復因子 Rad57 と Esc2 は遺伝子領域で RNA ポリメラーゼを排除することで転写抑制を行っている、第 56 回酵母遺伝学フォーラム、新潟大学 五十嵐キャンパス、2023 年 8 月 30 日-9 月 1 日、口頭発表

(2) Hiroshi Masumoto, et al., DNA repair proteins at the R loop modulate the level of gene transcription, 2023 Cold Spring Harbor Asia Conference, Yeast and Life Science, Matue, Shimane, Japan. October 9 - October 13, 2023, Talk.