

二本鎖 DNA を発現する新型遺伝子の発現機構の研究

A study for dsDNA expression from novel type genes

(日本遺伝学会推薦)

代表研究者	理化学研究所	飯田 哲史	RIKEN	Tetsushi IIDA
協同研究者	京都大学	古谷 寛治	Kyoto University	Kanji FURUYA

Genes on chromosomal DNA are expressed through RNA synthesis by transcription followed by protein synthesis. From DNA analysis of budding yeast by next-generation sequencing (NGS), we found a new type of gene that expresses extra-chromosomal DNAs. The DNA named specDNA (short paired extra-chromosomal DNA) has same sequence with a locus in the *S. cerevisiae* genome which overlap with *NAT1* and *SIR2* genes including the *SIR2* promoter region. To clarify the structural features of specDNA, we purified total DNA from cells. Digestion analysis of specDNA by a double-stranded DNA specific restriction enzyme revealed that specDNA is a linear double-stranded DNA. To analyze the function of specDNA in vivo, we constructed partial deletion strains of specDNA and the *SIR2* gene and analyzed. The cytoplasmic granule formation and mating defect phenotype had long been believed as the *sir2* deletion phenotype. The deletion mutant of the *SIR2* promoter region (*specDNAΔ* mutant), which can express *SIR2* from the replaced marker gene, significantly elevated cytoplasmic granule formation of abnormal proteins. While the *specDNAΔ* mutant shows normal mating as wild-type strain. These results of the specDNA gene suggest that specDNA is a novel DNA expressing gene and functions for suppression of cytoplasmic granule formation of abnormal proteins.

研究目的

ゲノム上の遺伝子情報は転写により RNA へと変換され、生成された RNA は機能性 RNA として機能したり、タンパク質へと翻訳されたりすることで生体機能を発揮する。一方で、レトロウイルスやレトロトランスポゾンなど、RNA が逆転写され DNA 断片としてゲノムに DNA が入り込む因子は知られておりゲノム不安定化の要因になっていることが報告されている。もし、ウイルスやトランスポゾン以外で、DNA 断片を発現する遺伝子が存在し、生体内で機能を持っているとすれば、その研究は新しい遺伝子の形態を提案する興味深い研究となる。

これまで、リピート遺伝子のコピー数制御機構およびゲノムの安定性維持の研究を行ってきたが(参考文献 1)、その過程で、次世代シーケンサー(NGS)を用いたゲノム維持の研究から、出芽酵母 *S. cerevisiae* の細胞内に、染色体やプラスミドとは異なる

比較的小さい DNA 断片が存在する可能性を見出した。本研究は、この DNA 断片が特定の遺伝子領域に由来すること、存在量が細胞の遺伝子型によって変化することから、遺伝子の発現産物である可能性に着目し、機能性 DNA 断片遺伝子の特徴を明らかにするとともに、生体内における機能に迫ることを目的とした。

また、この DNA 断片の遺伝子領域は、リボソーム RNA 遺伝子(rDNA)のコピー数に応答して、ゲノム安定性を制御する領域と重複する(参考文献 1)。そこで、rDNA のコピー数応答制御に関連して、DNA 断片遺伝子が機能している可能性を考え、rDNA の安定性維持に関わる因子を探索し、DNA 断片発現と関連するかを検討することとした。また、コピー数に応答に関連する遺伝子が細胞の分裂寿命に関連していることから、得られた因子と分裂寿命との関連を明らかにすることも目的とした。

研究経過

タンパク質のゲノムへの相互作用を解析する方法として「クロマチン免疫沈降シーケンシング法 (ChIP-seq 法)」が知られている。この解析法では、断片化したクロマチン(DNA にタンパク質が結合した高次構造)や DNA 断片を精製し、アダプターを付加することで、細胞やクロマチン抽出液から免疫沈降により濃縮された DNA を NGS 網羅的に同定することが可能となる。あるエピトープタグに特異的なモノクローナル抗体を用いて、出芽酵母 *S. cerevisiae* の特定のタンパク質にタグを付加していないコントロールとなる細胞株において、ChIP-seq 解析を行ったところ、ゲノム全体で一箇所のみ異常に DNA が濃縮されている領域を見出した。この領域では、抗体による免疫沈降で濃縮したサンプル・濃縮していないサンプルどちらにおいてもランダムに断片化されたはずの DNA 断片の末端が揃ってマップされており、決まった領域の特定の長さの DNA 断片が染色体外の DNA として存在する可能性を示唆していた。NGS で解析した DNA 配列(リード)が一致する領域から、DNA 断片の長さを推定したところ、*S. cerevisiae* の *NAT1* 遺伝子から *SIR2* 遺伝子にかけての 756 塩基の領域で、染色体外の DNA 断片が存在している可能性が示唆された。NGS を用いた解析では、一般的に DNA の断片化が必要であり、ゲノム DNA と染色体外の DNA を厳密に区別することが困難である。そこで、細胞から調製した断片化していない全 DNA をアガロースゲル電気泳動により分離後、DNA 断片が検出された領域と隣り合う同じ長さの領域のプロンプを用いて、サザン解析を行った。その結果、NGS で予測された領域にのみ、756 塩基対の DNA のシグナルが検出されたことから、*NAT1* 遺伝子から *SIR2* プロモーター、*SIR2* 遺伝子にまたがる領域と一致する染色体外 DNA が細胞内に存在していることが確認された(Fig. 1)。次に、調製した全 DNA を、二本鎖 DNA 特異的な制限酵素で処理し、断片化した DNA のパターンからその構造を解析した。この解析では、DNA を一箇所でのみ切断する二本鎖 DNA 特異的な制限酵素を選択することで、環状 DNA の場合はゲノム DNA のシグナルに加えて一本のシグナルが生じ、直鎖状 DNA の場合は二本のシグナルが生じる。実際に解析してみると、ゲノム DNA のシグナルに加えて予想された長さの二つの

DNA 断片のシグナルを検出したことから、染色体外の DNA 断片が直鎖状の二本鎖 DNA であることが明らかとなった。そこで、この染色体外 DNA を *specDNA* (short paired extra-chromosomal DNA)と名付け解析を進めた。

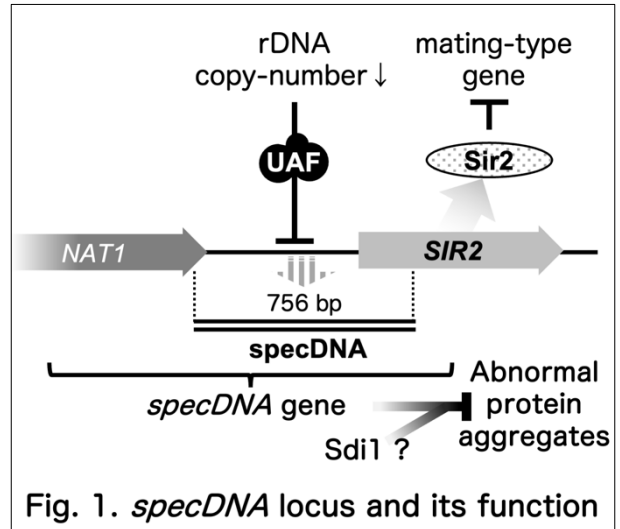


Fig. 1. *specDNA* locus and its function

specDNA をコードする領域は、*NAT1* 遺伝子の 3' 側の一部、*SIR2* プロモーターと *SIR2* の 5' 側約 250 塩基を含む(Fig. 1)。したがって、*specDNA* の機能が *SIR2* 遺伝子や *SIR2* プロモーターの機能と重複している可能性が考えられる。そこで、*specDNA* 遺伝子の細胞における機能を明らかにするため、*specDNA* 遺伝子の欠失変異として *SIR2* プロモーターの欠失変異を (*specDNA* Δ)、*SIR2* の欠失変異として *SIR2* のコード領域の 3' 側約半分の欠失変異 (*sir2* Δ C) を作成した。更に、*specDNA* と *SIR2* 遺伝子の二重変異として、これまで *SIR2* 遺伝子破壊株として一般的に用いられてきた *SIR2* の全コード領域の欠失変異 (*sir2* Δ) についても解析を行った。*specDNA* Δ は、野生型同様に生育したことから、*specDNA* Δ は、遺伝子欠損が細胞増殖にはほとんど影響を与えないと推察される。また、*specDNA* Δ においては、遺伝子破壊に用いたマーカー遺伝子 *URA3* の下流に機能未知遺伝子のプロモーターが存在するため、このプロモーターからの転写により正常な *SIR2* を発現することが可能である。従って、*specDNA* Δ は、*SIR2* 欠失変異と機能を区別することが可能である。これらの変異体を利用して、*SIR2* 遺伝子破壊株の表現型として知られる、接合不能性 (参考文献 2) とハンチントン舞踏病原因タンパク質発現による細胞質の異常タンパク質顆粒形成 (参考文献 3) を観察した。接合不能性は、*sir2* Δ と *sir2* Δ C が示したことから、*specDNA* Δ は、*SIR2* 遺伝子の機能を維持していることが確認された。異常タンパク質顆

粒形成は、ハンチントン舞踏病原因タンパク質(Htt)のポリグルタミン配列を含む Htt103QP-GFP を細胞内で発現させ、細胞内に凝集体形成による輝点形成頻度を蛍光顕微鏡下で解析した(参考文献 4)。野生型に対して、*specDNAΔ* と *sir2Δ* では、細胞内に Htt103QP-GFP の凝集体形成率が二倍程度に上昇し、*sir2ΔC* では野生型と同程度の凝集体形成しか観察されなかった。このことは、これまで *SIR2* 遺伝子の機能とされてきた異常タンパク質顆粒形成の抑制こそが、*specDNA* 遺伝子特異的な機能であり(Fig. 1)、*SIR2* 遺伝子の機能とは区別できることを示している。また、これまで *sir2Δ* を用いてのみ *SIR2* 遺伝子機能を解析してきた研究は、厳密には *SIR2* 遺伝子の機能を解析出来ていなかったことを示唆している。

NGS の解析とサザン解析の結果では、非常に少量ながら、*NAT1* 側に延長した DNA 断片の存在が示唆されていた。このことは、*specDNA* が発現する際、何らかの課程を経て、長い前駆体から成熟した *specDNA* が生成される可能性や、*specDNA* 遺伝子発現には、プロモーターのような制御領域が必要である可能性を示唆している。そこで、異常タンパク質顆粒形成の抑制の機能が *specDNA* 遺伝子によるものであることに着目し、Htt103QP-GFP の凝集体形成率を指標に、*specDNA* 遺伝子の機能に必要な遺伝子領域の特定を行った。*specDNA* 遺伝子を含むさまざまな DNA 断片を調製し、*specDNAΔ* の表現型を相補するかを調べた。その結果、*specDNA* 遺伝子から *SIR2* 側更に 250 塩基、*NAT1* 側更に 500 塩基を含む断片が、野生型レベルまで *specDNAΔ* の表現型を相補することがわかった。この結果から、*specDNA* 遺伝子の機能には隣接する領域が必要であることが示唆された(Fig. 1)。今回同定された *specDNA* 遺伝子の機能に必要な領域は、*specDNA* 遺伝子にプロモーターやターミネーターのような制御領域が必要である可能性を示唆している。

一般に、直鎖状の二本鎖 DNA は、細胞内で DNA 二本鎖切断として認識され、DNA 修復因子により分解や修飾を受ける。*specDNA* が、全 DNA からゲノム DNA と比較可能な量で検出できることは、*specDNA* が何らかの方法で、DNA 異常の感知機構から逃れている可能性を示唆している。そこで、*specDNA* が特定のタンパク質と相互作用し機能することで、細胞内で安定に維持されている可能性に着目した。NGS を用いた解析では特定のモノクローナ

ル抗体を用いることで *specDNA* を濃縮できることから、このモノクローナル抗体を用いた *specDNA*-タンパク質複合体の精製を試みた。モノクローナル抗体を用いて、細胞抽出液に対して免疫沈降により複合体を精製した後、共沈降してきたタンパク質を質量分析により同定したところ 100 以上のタンパク質が候補として検出された。これらの候補遺伝子に簡易精製が可能な TAP タグを付加し細胞内で発現後、複合体精製物の中に *specDNA* が含まれているかを検討した。その結果、種間で高度に保存されたタンパク質一つについて、精製した画分に *specDNA* が濃縮されていることがわかった。このタンパク質をコードする遺伝子 *SDII* (*specDNA* interactor1)は細胞増殖に必須であり、遺伝子破壊は出来ない。そこで、既に報告されている温度感受性変異の導入を検討しているが、現在使用している細胞株の系統では致死となるなど *specDNA* 遺伝子の機能解析に使用可能な変異体は現存しない。今後は、*specDNAΔ* に関連した表現型を示す *SDII* 遺伝子の変異体を探索し、*specDNA* 遺伝子の機能解析を進めたい。

specDNA 遺伝子領域は、*SIR2* プロモーターにおける rDNA コピー数制御領域を含むことから、rDNA リピートの安定性制御に関与する可能性が考えられた。そこで、*specDNA* 遺伝子の解析と平行して、rDNA の安定性に関わる因子のスクリーニングにより *specDNA* に関連する因子の探索も行った。*specDNA* 遺伝子領域も単離される可能性のある変異体のスクリーニングを行った結果、*specDNA* に関連する因子は単離されなかったが、細胞分裂寿命に関わる二つの因子を同定し報告した(誌上発表 1)。

考察

specDNA 遺伝子が rDNA コピー数制御領域を含む形で存在することから、当初 *specDNA* が *SIR2* を介した rDNA 安定性制御に関与することを想定して研究を開始したが、結果として、*specDNA* 遺伝子は *SIR2* とは独立した機能を有していることが明らかとなった。この結果は、老化に関連するさまざまな機能が *SIR2* 遺伝子にあるという先入観を取り除くものであり、細胞老化に関連した異常タンパク質によるストレス応答の機能を *specDNA* が担っていることを明らかにした本研究の意義は大きい。直鎖状の染色体外 DNA は、細胞内で不安定であることが知られている。従って、*specDNA* の複合体として精製された Sdi1 タ

ンパク質は、specDNA とともに異常タンパク質の凝集体形成を抑えている可能性が考えられる。Sdi1 はさまざまなタンパク質と相互作用していることが知られており、specDNA は Sdi1 の新しいパートナーとして Sdi の機能を制御する DNA サブユニットとして機能するモデルも考えられる。今後、specDNA-Sdi1 複合体の機能を生化学的に明らかにするとともに、細胞内のどこで機能しているのかについても解析を進めたい。未だ、specDNA の発現機構は不明であるが、相補性試験で見出された *NATI* 側の断片は、specDNA 発現がプロモーター様の領域により制御されている可能性が考えられる。今後、他生物においても DNA 断片発現遺伝子を探索し、DNA を発現する新たな遺伝子カテゴリーを提案する研究に発展したい。

参考文献

1. Iida T, Kobayashi T. "RNA Polymerase I Activators Count and Adjust Ribosomal RNA Gene Copy Number." *Mol Cell*. 2019 Feb 21;73(4):645-654.e13. doi: 10.1016/j.molcel.2018.11.029. PMID: 30612878
2. Gartenberg MR. "The Sir proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: mediators of transcriptional silencing and much more." *Curr Opin Microbiol*. 2000 Apr;3(2): 132-7. doi: 10.1016/s1369-5274(00)00064-3. PMID: 10744999.
3. Song J, et al. "Essential genetic interactors of SIR2 required for spatial sequestration and asymmetrical inheritance of protein aggregates." *PLoS Genet*. 2014 Jul 31;10(7):e1004539. doi: 10.1371/journal.pgen.1004539. PMID: 25079602
4. Higgins R, et al. "The absence of specific yeast heat-shock proteins leads to abnormal aggregation and compromised autophagic clearance of mutant Huntingtin proteins." *PLoS One*. 2018 Jan 18;13(1):e0191490. doi: 10.1371/journal.pone.0191490. PMID: 29346421

研究の発表

口頭発表

1. 飯田哲史：出芽酵母が持つゲノムの記憶の分子機構、国立遺伝学研究所 研究集会、オンライン、2020年11月
2. Tetsushi Iida: Mechanism of genome recovery by a copy-number surveillance system of the ribosomal RNA genes, 日本分子生物学会 第43回年会、オンライン、2020年12月

誌上発表

1. Yanagi S, Iida T, Kobayashi T. "*RPS12* and *UBC4* Are Related to Senescence Signal Production in the Ribosomal RNA Gene Cluster." *Mol Cell Biol*. 2022 Apr 6:e0002822. doi: 10.1128/mcb.00028-22. PMID: 35384721.