

180. セントロメア領域の転写による染色体異常の発生機構

中川 拓郎

大阪大学 大学院理学研究科 生物科学専攻

Key words : 染色体異常, セントロメア, 転写, DNA-RNA 二本鎖, DNA 反復配列

緒言

転座などの染色体異常は、癌や自閉症などの遺伝性疾患の要因となる。染色体のクロマチン構造は、弛緩して転写が活発に起きるユークロマチンと凝縮して転写が起きないヘテロクロマチンに大別される。ヘテロクロマチンはヒストン H3 の 9 残基目リシン (H3K9) のメチル化修飾を基盤にしたエピジェネティック制御により形成される。DNA 反復配列が存在するセントロメアなどの染色体領域は恒常的にヘテロクロマチン構造を形成する。しかし、タンパク質をコードしないセントロメア領域を転写抑制する生理学的意義は明らかとなっていない。我々は、分裂酵母を用いて H3K9 のメチル化修飾酵素 *Clr4* などの染色体異常への影響を解析した。その結果、ヘテロクロマチンはセントロメア反復配列を「のりしろ」にした染色体異常の発生を阻止することを明らかにした。また、*clr4* 破壊株で起きる染色体異常は RNA ポリメラーゼ II に変異を導入することで大きく減少した [1, 2]。このことから、ヘテロクロマチン欠損細胞では転写によって染色体異常が引き起こされると考えられる。しかし、転写が染色体異常を誘発する分子メカニズムは明らかになっていない。

転写により合成された RNA が鋳型 DNA と相互作用することで DNA-RNA 二本鎖を形成することができる。DNA-RNA 二本鎖は染色体の不安定化を誘発すると考えられている。そこで、DNA-RNA 二本鎖特異的な抗体 S9.6 を用いて、染色体クロマチン上に形成する DNA-RNA 二本鎖を検出した。その結果、H3K9 メチル化酵素 *Clr4* を破壊するとセントロメア領域特異的に DNA-RNA 二本鎖が蓄積することが分かった。DNA-RNA 二本鎖が染色体異常の原因であるのかを明らかにするために、DNA-RNA 二本鎖特異的な RNA 分解酵素 RNaseH1 を過剰発現した。その結果、RNaseH1 の過剰発現により DNA-RNA 二本鎖の減少と染色体異常の発生頻度の低下が見られた。また、転写の進行停止を促進する *Seb1* や転写の進行再開を促進する *Tfs1/TIIS* やユビキチン分解酵素 *Ubp3* を変異すると DNA-RNA 二本鎖が減少し、セントロメア領域での染色体異常の発生頻度も低下した。これらの結果から、ヘテロクロマチン欠損細胞ではセントロメア領域で転写進行の停止と再開が繰り返し起きることで DNA-RNA 二本鎖が蓄積し、染色体異常が発生すると考えられる。

方法および結果

1. DNA-RNA 二本鎖による染色体異常の発生

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の *clr4* 破壊株では、ヘテロクロマチンが形成されないためセントロメア反復配列の転写が起きる。その結果、セントロメア領域の逆向き反復配列を介した染色体異常が起り、左右の染色体腕が鏡像関係となった同腕染色体が高頻度に形成される [1, 2]。転写が DNA-RNA 二本鎖を形成することで染色体異常を引き起こす可能性を検証するために、我々は DNA-RNA 二本鎖に特異的に結合する S9.6 抗体を用いて DNA-RNA 免疫沈降 (DNA-RNA immunoprecipitation : DRIP) を行った。その結果、野生株に比べて、*clr4* 破壊株ではセントロメア領域特異的に DNA-RNA 二本鎖が蓄積することが分かった (図 1a)。次に、*clr4* 破壊株で蓄積する DNA-RNA 二本鎖が染色体異常に関与するのかを明らかにするために、DNA-RNA 二本鎖特異的な RNA 分解酵素 RNaseH1 を強力な *adh1* 遺伝子のプロモーターを用いて過剰発現した。その結果、RNaseH1 を過剰発現すると *clr4* 破壊株で蓄積

していた DNA-RNA 二本鎖が減少することが確認された。また、3 番染色体由来のエキストラ染色体 ChL を利用した染色体異常の検出系 [3] を用いた結果、RNaseH1 を過剰発現すると *clr4* 破壊株で増加していた同染色体も減少することが分かった。RNase 活性がない変異型 RNaseH1 の過剰発現では、DNA-RNA 二本鎖と染色体異常に有意な変化は見られなかった。これらの結果から、ヘテロクロマチン欠損細胞ではセントロメア領域で DNA-RNA 二本鎖が形成されることにより染色体異常が発生すると考えられる。

2. 転写の進行停止と再開による DNA-RNA 二本鎖の形成

RNA ポリメラーゼ II の触媒活性を担う Rpb1 に変異を導入すると、*clr4* 破壊株で蓄積する DNA-RNA 二本鎖が減少した。このことから、RNA ポリメラーゼ II の転写により DNA-RNA 二本鎖が生じると考えられる。次に、転写進行を促進する PAF1 複合体サブユニット Leo1 や転写の進行再開を促進する Tfs1 や Ubp3 を破壊した。その結果、Tfs1 と Ubp3 が特異的に DNA-RNA 二本鎖の形成に必要であることが分かった (図 1a)。そこで、セントロメア領域での転写の進行停止を促進する *Seb1* について解析したところ、*Seb1* も DNA-RNA 二本鎖の形成を促進することが分かった (図 1a)。また、ChL 染色体を用いた解析から、Tfs1 と Ubp3 に加え [1, 2]、*Seb1* も染色体異常の発生に必要であることが分かった (図 1b)。これらの結果から、セントロメア領域では転写の進行停止と再開が繰り返し起きることで DNA-RNA 二本鎖が蓄積すると考えられる。

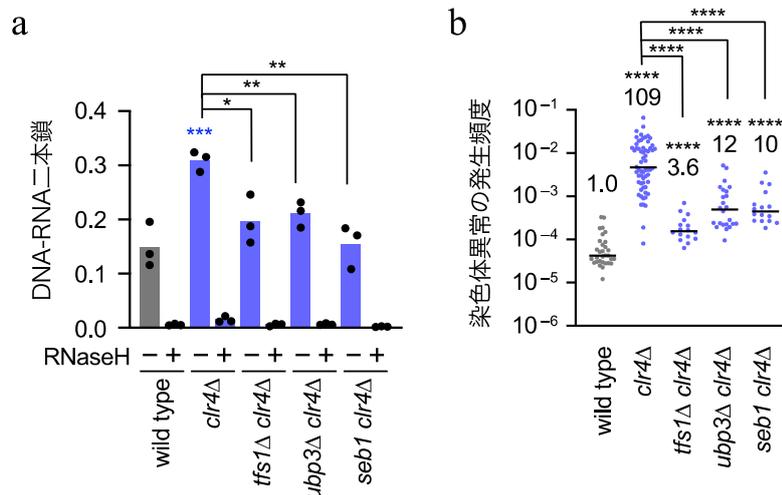


図 1. セントロメア領域での DNA-RNA 二本鎖の形成と染色体異常の発生頻度

- a) DRIP 法により精製した DNA-RNA 二本鎖をリアルタイム PCR により定量した結果。各実験、免疫沈降の前に RNaseH 処理することで DNA-RNA 二本鎖を除去したサンプルをコントロールとする。
- b) 染色体異常の発生頻度。1 細胞分裂あたりの発生頻度を示す。
- * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (Mann-Whitney 検定)。

考 察

本研究により、セントロメア領域で転写の停止と再開が繰り返すことで DNA-RNA 二本鎖が形成されることが明らかとなった。近年の研究から、ヒトに於いてもセントロメア領域は最も DNA 切断が起きる不安定な領域であることが示された [4]。ヒトの場合にも、転写の進行停止と再開により DNA-RNA 二本鎖が形成されることでセントロメア領域が不安定化する可能性が考えられる。

文 献

- 1) Okita AK, Zafar F, Su J, Weerasekara D, Kajitani T, Takahashi TS, Kimura H, Murakami Y, Masukata H, Nakagawa T. Heterochromatin suppresses gross chromosomal rearrangements at centromeres by repressing Tfs1/TFIIS-dependent transcription. *Commun Biol.* 2019 Jan 11;2:17. Epub 20190111. PMID: 30652128 DOI: 10.1038/s42003-018-0251-z
- 2) Nakagawa T, Okita AK. Transcriptional silencing of centromere repeats by heterochromatin safeguards chromosome integrity. *Curr Genet.* 2019 April 17;65(5):1089-98. Epub 20190417. PMID: 30997531 DOI: 10.1007/s00294-019-00975-x
- 3) Nakamura K, Okamoto A, Katou Y, Yadani C, Shitanda T, Kaweeteerawat C, Takahashi TS, Itoh T, Shirahige K, Masukata H, Nakagawa T. Rad51 suppresses gross chromosomal rearrangement at centromere in *Schizosaccharomyces pombe*. *The EMBO journal.* 2008 Nov 19;27(22):3036-46. Epub 20081016. PMID: 18923422 DOI: 10.1038/emboj.2008.215
- 4) Xu R, Pan Z, Nakagawa T. Gross Chromosomal Rearrangement at Centromeres. *Biomolecules.* 2023 Dec 24;14(1):28. Epub 20231224. PMID: 38254628 DOI: 10.3390/biom14010028