

論文の内容の要旨

論文題目；酸化ストレス耐性における 転写の忠実度の維持機構の役割

氏名；小山宏史

序章

1. 酸化ストレスと転写の忠実度

活性酸素種は、好気呼吸など正常な生命活動を行う際のみならず、外界の環境的な要因によっても生じる。RNA 合成の基質であるリボヌクレオシド3リン酸 (NTPs) は酸化の標的となる。酸化型フォームの NTPs が誤って RNA 中に取り込まれると異常な RNA が生じ、さらにはアミノ酸置換を持つようなタンパクの産生を誘発する。変異タンパクが時として細胞に害を与えるような活性をもつことや、異常タンパクの蓄積が様々な疾患の原因となることから、転写段階において忠実度を維持することは細胞の恒常性を維持する上で重要であると私は考えている。しかしながら、酸化ストレスによる転写エラーを防ぐ機構や、忠実度の低下が細胞の増殖 / 生存に及ぼす効果は明らかではない。そこで、これらの疑問点を解決するために以下に示す転写の忠実度の維持機構に着目した。

2. 転写の忠実度の維持機構

RNA polymerase II (RNAPII) は誤ったヌクレオチドを取り込むと、第一段階として、エラーを認識して転写の一時的な中断を起こす。第二段階として、RNAPII 自身もつ ribonuclease (cleavage) 活性によって誤ったヌクレオチドが除去され、その結果、忠実度が維持されることが試験管内転写系を用いた解析から考えられている。本論文では、これら二つの過程からなる一連の忠実度の維持機構に働く因子群に着目して、酸化ストレス下での役割の解明を試みた。

結果と考察

1. S-IIは酸化ストレスによる転写の忠実度の低下を防ぐ

S-IIはRNAPIIのCleavage活性を促進することで転写の忠実度の維持に寄与することが試験管内転写系を用いた解析から明らかになっている。また、私は修士課程においてS-IIが酵母細胞の酸化ストレス下での増殖に必須であることを見いだしていた。そこで、S-IIが酸化ストレスによる転写の忠実度の低下を防ぐ機能を有しているのではないかと考えて検証した。

酵母細胞内での転写の忠実度の評価する系として、点変異を導入した*lacZ*遺伝子をレポーター遺伝子として用いた(図1)。点変異によって終止コドンが導入されているため、正しく転写されると活性をもった β -galactosidase は発現しない。しかし、変異部位で誤ってGTPや酸化型NTPである8-oxo GTPが取り込まれると、グルタミン酸として翻訳されて活性を持った β -galactosidaseが発現する。したがって、転写の忠実度が低下した細胞は、高い β -galactosidase活性をしめすことが期待される。

S-II欠損株を用いて解析を行ったところ、酸化ストレスを与える薬剤であるメナジオンの処理によって、 β -galactosidase活性の上昇が見られた(図2A)。すなわち、エラーが増加(=忠実度が低下)したと考えられる。この条件において、*lacZ*のmRNA量をNorthern hybridization法によって調べたところ、メナジオン添加によってむしろ減少した(図2B)。また、点変異*lacZ*遺伝子の代わりに野生型*lacZ*遺伝子を用いたときにはメナジオン添加によって β -galactosidase活性は減少した(図2C)。したがって、点変異*lacZ*遺伝子を用いたときのメナジオン添加による β -galactosidase活性の上昇は、*lacZ*遺伝子の発現上昇によるものではなく転写の忠実度の低下によるものと考えられる。

忠実度を評価する指標として、野生型*lacZ*遺伝子を用いたときの活性に対する、点変異*lacZ*遺伝子を用いたときの活性の比を「**Error rate**」と定義し、用いることにした。S-II欠損株では、メナジオン添加によってError rateが上昇した(図2D)。すなわち、忠実度が低下することが明らかとなった。

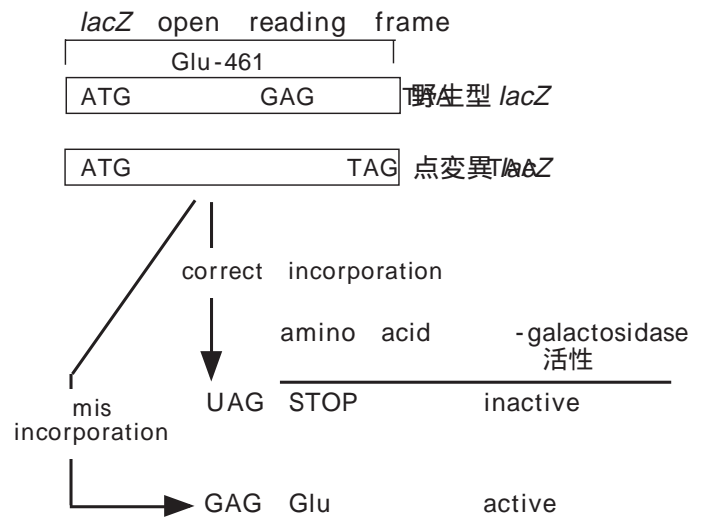


図1. *in vivo*での転写の忠実度のアッセイ系

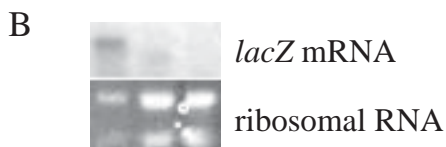
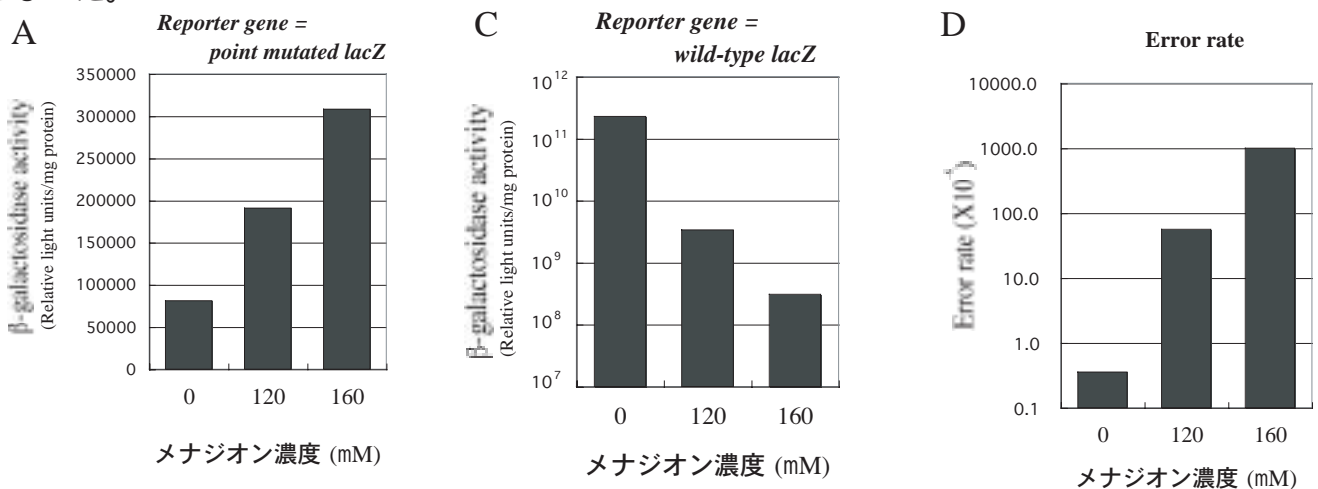


図2. S-II欠損株における、酸化ストレス下での転写の忠実度

次に、S-IIが酸化ストレスによる忠実度の低下を防ぐ機能を有するかを検証した。S-II欠損株と野生株との間の Error rate を比較したところ、通常条件（好気条件）ではS-II欠損株が野生株の約4倍高いError rateを示したのに対して、メナジオン添加時には両株の差が約70倍にまで増幅された（図3）。したがって、S-IIが酸化ストレス下での忠実度の維持に寄与していることが明らかとなった。

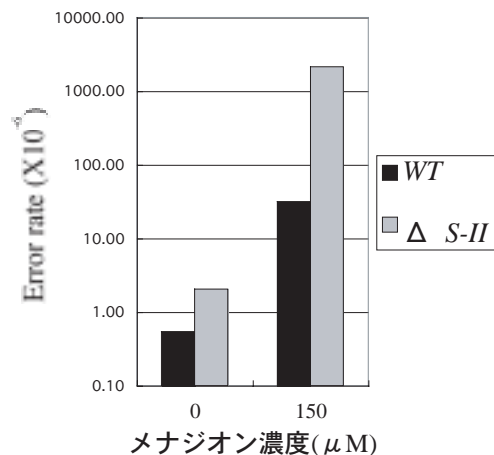


図3. S-IIは酸化ストレスによる転写の忠実度の低下を防ぐ

2. S-IIの Cleavage 促進活性の寄与

次に、S-IIによる酵母細胞内における忠実度の維持が、Cleavage 促進活性で説明されるかを検証した。試験管内転写系において、Cleavage 促進活性を欠失することが示されている変異体 S-II(Mt3)を発現する株では、S-II欠損株と同様に低忠実度とメナジオン感受性を示した。したがって、S-IIのCleavage 促進活性が酵母細胞内での忠実度の維持と酸化ストレス耐性に必要であると考えられる。

3. S-IIの Cleavage 促進活性を増強する因子 Rpb9 の寄与

S-IIのCleavage 促進活性が忠実度の維持と酸化ストレス耐性に機能するという考えが正しいのであれば、S-IIのCleavage 促進活性に影響する因子もS-IIと同様にこれら二つの細胞機能に寄与することが予想される。Rpb9は、試験管内転写系でS-IIのCleavage 促進活性を増強する活性を有するが、転写の忠実度の維持における寄与は明らかではない。

RPB9欠損株を用いた解析を行ったところ、野生株と比べて忠実度が低下し、なおかつメナジオン感受性を示した。そこで次に、これらの表現型に対してCleavage 増強活性が寄与しているかを検証した（図4）。試験管内転写系を用いた解析から、Cleavage 増強活性に異常をもつ変異Rpb9が知られていた。Cleavage 増強活性を保持する変異Rpb9を導入した株では忠実度の顕著な回復が見られたのに対して（カラム5,6,7）、Cleavage 増強活性を失った変異Rpb9を導入した株においては、忠実度が全く回復しないか（カラム3）、もしくは回復は部分的であった（カラム4）。メナジオン感受性についても同様であった。

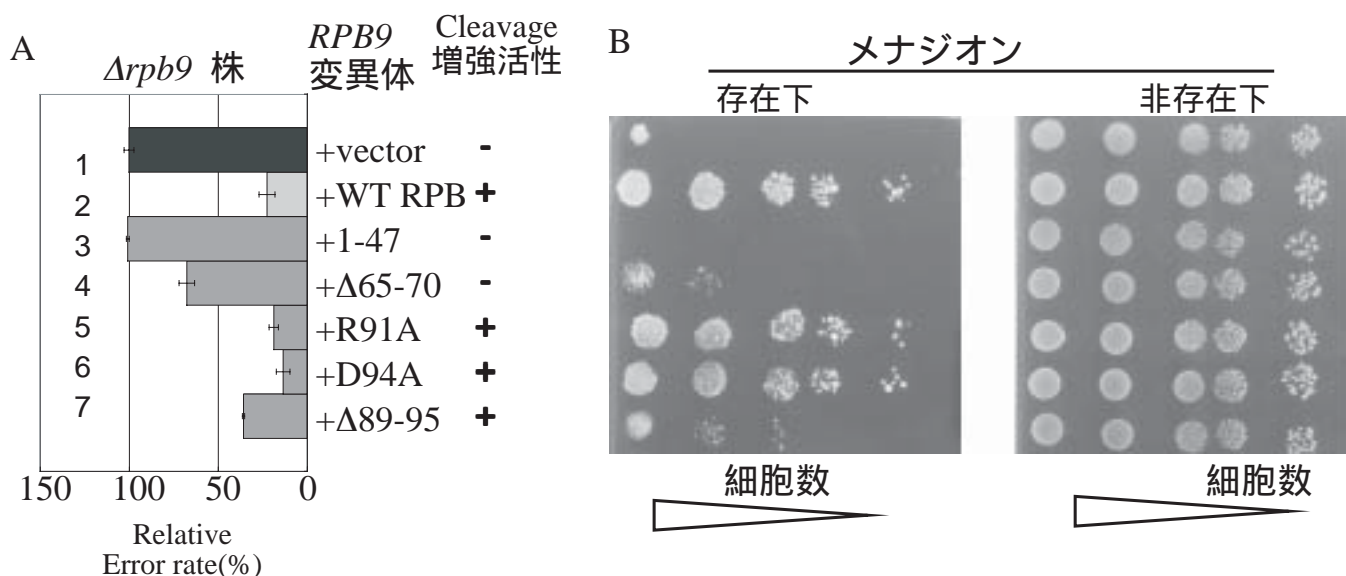


図4. 種々のRpb9変異体発現酵母株の転写の忠実度(A)とメナジオン耐性度(B)

したがって、S-II の Cleavage 促進活性を増強する Rpb9 の活性が、酵母細胞における忠実度の維持と酸化的ストレス耐性に寄与していると考えられる。

一方で、65-70 変異体は Cleavage 増強活性を欠失しているにもかかわらず、その導入によってメナジオン感受性及び忠実度が部分的に回復した。この結果から、Rpb9 は、S-II による Cleavage 促進を増強する活性のみならず、S-II との相互作用を必要としない別の機構によってもメナジオン耐性並びに忠実度の維持に寄与している可能性を私は考えた。

4. Rpb9 の S-II を必要としない機能の寄与

Rpb9 が、S-II を必要とする活性である Cleavage 増強活性以外で忠実度の維持に寄与しているのであれば、S-II 遺伝子を欠損した遺伝的背景においても、Rpb9 は忠実度の維持に働くことができるのではないかと私は考えた。Rpb9 は転写中断を誘導する活性を有することが知られているが、この活性の発揮には S-II を必要としない。また、序章で述べたように中断誘導は転写エラーの認識と密接な関係にあると考えられている。そこで、Rpb9 の中断誘導活性が忠実度の維持に寄与している可能性を私は考えた。

S-II 遺伝子を欠損した遺伝的背景においてさらに RPB9 を欠損させたところ、忠実度とメナジオン感受性がより増悪した。したがって、Rpb9 が S-II を必要としない機構によってもこれらの細胞機能に寄与しているがわかった。次に、Rpb9 の忠実度の維持機構がメナジオン耐性に寄与しているのではないかと私は考えた。3. で用いた変異 Rpb9 を S-II と RPB9 の二重欠損株に導入して解析したところ、忠実度の回復の程度とメナジオン感受性の回復の程度との間に相関が見られた(図5)。したがって、Rpb9 の忠実度を回復させる機能と酸化的ストレス耐性を導く機能が一致していると考えられる。

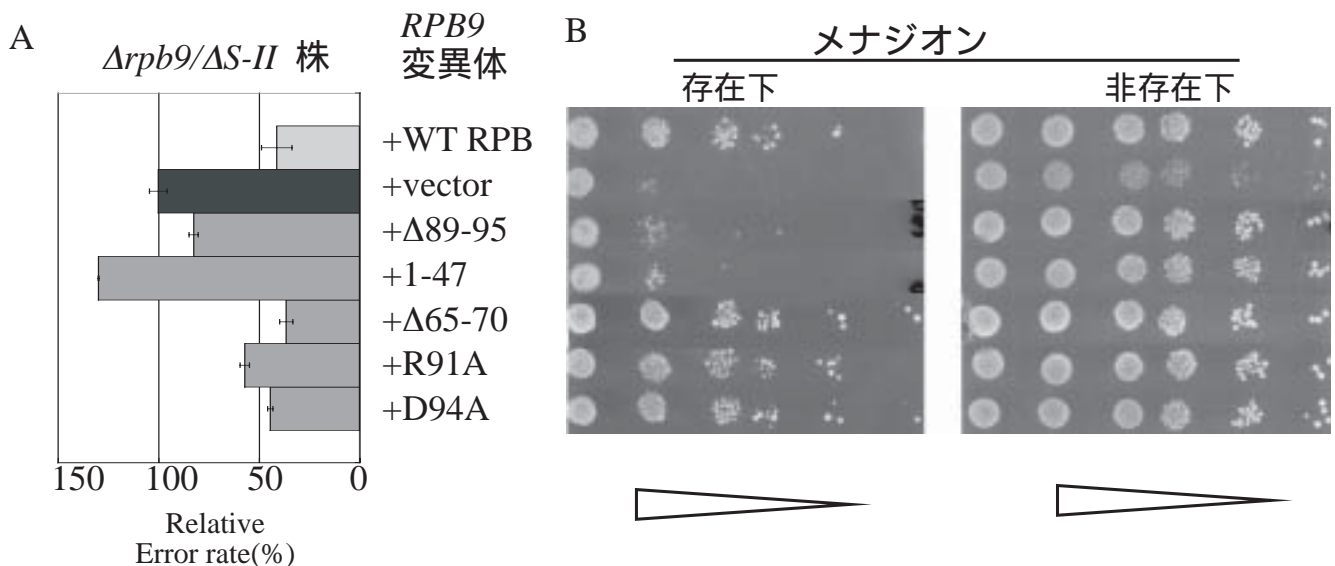


図5. 種々のRpb9 変異体発現酵母株の転写の忠実度(A)とメナジオン耐性度(B)

5. 転写中断の誘導の寄与

4.の結果から、転写中断の誘導が忠実度を上昇させることが示唆された。この点を確認するために、Rpb9とは異なる方法によって中断誘導したときの忠実度に与える効果を検証した。6-azauracilは中断を誘導する薬剤である。また、転写因子Spt4またはElonginの欠損も中断を誘導する。これらの薬剤ならびに遺伝子変異を酵母細胞に与えたところ、いずれの場合にも忠実度の回復が見られた(図6)。したがって、転写中断を誘導することが忠実度の上昇に寄与すると考えられる。

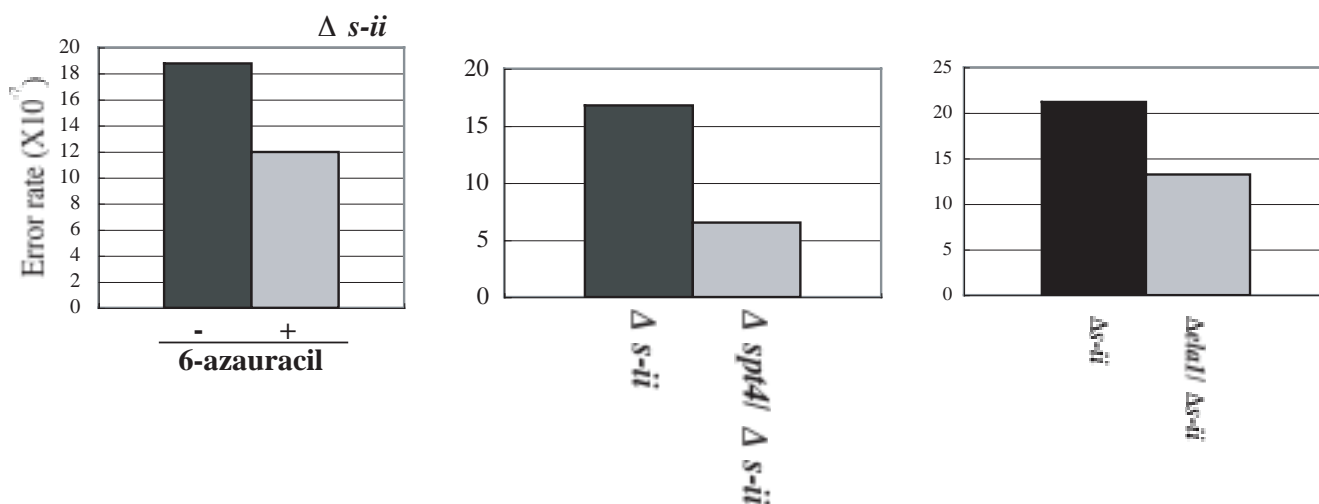


図6. 転写中断の誘導が忠実度に与える効果

結論

私は、生体内において、酸化ストレスによる転写エラーの防御に、転写中断の誘導(Rpb9)とCleavage(S-IIならびにRpb9)という一連の過程が機能することを明らかにした。また、これらの過程が酸化ストレス下での正常な細胞の増殖に寄与することを示唆する証拠を示した。転写エラーが引き起こす細胞増殖の停止を防ぐ機構の存在を初めて明らかにしたものである。今後、異常タンパクの蓄積が原因とされる疾患に対して、転写の忠実度の低下が及ぼす影響を明らかにすることが課題として挙げられる。