

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770009

研究課題名（和文） 哺乳動物細胞における rDNA クラスター維持機構の研究

研究課題名（英文） Mechanism of structural maintenance of mammalian rDNA cluster

研究代表者

赤松 由布子（AKAMATSU YUFUKO）

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教

研究者番号：50381661

研究成果の概要（和文）：

哺乳動物細胞における rDNA クラスター安定性維持機構の解明を目指して、主に rRNA 遺伝子転写終結点近傍の DNA 複製フォーク進行阻害点(RFB)の解析を行った。二次元電気泳動法で DNA 複製フォーク中間体を詳細に観察した結果、複数の RFB が存在すること、さらにこれまで提唱されていた TTF-1 依存的な RFB 以外に新規の RFB が存在することが明らかになった。このことは、rDNA では複数のメカニズムが働き DNA 複製と rRNA 転写の衝突を回避することを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

To understand molecular mechanism maintaining mammalian rDNA cluster, DNA replication fork barrier (RFB) at 3' end of rRNA coding region was investigated. Using two-dimensional gel electrophoresis method, DNA replication fork movement was visualized. In mammalian cells, multiple RFB signals were detected and a part of them, as previously reported, were TTF1 dependent to block movement of replication fork. The other RFB, however, did not involve TTF-1, rather previously unknown mechanism functions. These results imply that collision between replication fork and rRNA transcription is prevented through multiple pathways in mammalian rDNA cluster.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝ゲノム動態

キーワード：rDNA、DNA 複製、複製フォーク進行阻害、ゲノム再編成

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は、タンパク質合成に必要な十分量のリボソームを供給するため、ゲノム上に多コピー（ヒトでは 200~400 コピー）のリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子をコードし、大規模なリピート構造からなるクラスター(rDNA

クラスター)を形成している。rDNA クラスターは、同じ塩基配列の大規模な繰り返し構造と、DNA 複製フォークの進行阻害の頻発という問題をはらみ、異常な染色体再編成を誘発する領域であると考えられる。一般的にリピート配列は、相同な塩基配列間で起こる

intra-chromosomal recombination や non-allelic recombination などのメカニズムによって、染色体再編成を誘発する。ヒトでは肺と大腸の腫瘍で rDNA クラスター構造の再編成を示す例が報告されており、rRNA 遺伝子のリピート配列が組換えのホットスポットになると考察されている。細胞はガン化の過程で mutator phenotype を獲得し、染色体再編成を上昇すると考えられているが、rDNA クラスターを形成する大規模なリピート配列は、細胞のゲノム不安定性が特に顕著に反映される領域であることが示唆される。また、rRNA 遺伝子は細胞内で最も転写が活発な領域であるが、DNA 複製フォークは向かい合う方向からの転写装置との衝突によって進行を阻害される。酵母からヒトまで保存されているメカニズムとして、rRNA 遺伝子の転写終結点には replication fork barrier (RFB) が存在し、複製フォークの進行を停止し転写装置との衝突を回避する。複製フォークの進行停止や阻害は、しばしば組換えを誘導し、染色体再編成の原因となることが議論されている。

rDNA クラスターの研究は、遺伝学的解析が容易な出芽酵母で先駆的に研究が行われてきた。興味深いことに、出芽酵母では rRNA 遺伝子のコピー数がホメオスタシスによって維持され、さらに rRNA 遺伝子のコピー数が減少した場合には増幅機構が働くことが明らかになっている。

Fob1 タンパク質は RFB に結合し、DNA 複製フォークの進行を停止、DNA 二重鎖切断を形成し、姉妹染色体間の相同組換え反応を誘導する。この時、Sir2 タンパク質は姉妹染色体間の cohesion を促しリピート配列間の再編成を抑制するが、増幅機構では、Sir2 タンパク質の消失により cohesion が解消されると、DNA 鎖交換反応がリピート配列間

でずれ、一部のリピート配列に再複製が誘導され、rRNA 遺伝子のコピー数が増幅する。これは厳密に制御された機構であるが、Fob1 依存的に誘導される DNA 複製フォーク上の DNA 二重鎖切断は、しばしば rDNA クラスター再編成の原因となることが分かっている。

これらのメカニズムは他の生物では全く明らかになっていないが、ヒトでは、ゲノムの安定性に関わる BLM(ブルーム症候群原因遺伝子)や ATM(毛細血管拡張性運動失調症)の遺伝子欠損、rDNA 領域のメチル化異常が、rDNA クラスターの再編成を上昇することが報告されている。このことは、哺乳動物細胞において rDNA リピートの恒常性を維持するメカニズムが存在することを示唆している。さらに、Fob1 のオーソログは哺乳動物には存在しないが、45S rRNA 前駆体の転写終結点近傍には cis エlement が存在し、Ttf1 (transcription termination factor) 依存的に複製フォークを停止することが解っており、Ttf1 依存的な DNA 複製フォーク進行停止と rDNA クラスター再編成の関係性は大変興味深い。

## 2. 研究の目的

近年、rRNA 遺伝子のヘテロクロマチン化を担う DNA メチルトランスフェラーゼや核小体クロマチンリモデリング複合体の Tip5 タンパク質が、rDNA クラスターの構造維持に働くことが示唆されている。また、BLM や ATM など DNA 損傷修復に関わる遺伝子の関与も報告されている。しかしながら rDNA クラスターの再編成抑制の分子メカニズムについては全く理解が進んでいない。哺乳動物細胞における rDNA クラスターの安定性維持機構の解明の第一歩として、以下の解析を行った。

(1) rDNA クラスターは、高度繰り返し配

列という特徴から、ゲノムプロジェクトでは rDNA クラスターは解読されておらず、その全体的な構造は解明されていない。そこで rDNA クラスターの構造を観察し、一部分においては新たに塩基配列決定を行った。

- (2) rDNA クラスターの安定性維持機構を検証するために、rRNA 遺伝子内に DNA 二重鎖切断を起こし、rDNA クラスター再編成を誘導、経過の観察を行う実験系の構築を目指した。
- (3) DNA 複製フォーク進行阻害は DNA 二重鎖切断を誘導し、rDNA クラスター再編成を促進する可能性が考えられる。そのため、特に rRNA 遺伝子の転写終結領域近傍に存在する RFB のメカニズムに注目して解析を行った。

### 3. 研究の方法

- (1) 哺乳動物細胞の rDNA クラスターの全長を把握するために、rDNA クラスター内で認識配列を持たない制限酵素でゲノム DNA を処理し、パルスフィールド電気泳動法によって制限酵素断片を分離後、rRNA 遺伝子をプローブとして、サザンブロッティングを行った。
- (2) rRNA 遺伝子は、保存された 15bp のホーミングエンドヌクレアーゼ *I-Ppo I* の認識配列を持つ。細胞内で *I-Ppo I* を発現することにより、rRNA 遺伝子に DNA 二重鎖切断が導入され DNA 修復機構が誘導されるという報告があった。(Berkovich E. et al., 2008) そこで、細胞内で *I-Ppo I* を一過的に発現し、rDNA クラスターに DNA 二重鎖切断を導入、意図的に再編成を誘発し、時間を追って、クラスター構造を観察した。
- (3) 2 次元電気泳動後、サザンブロッティングを行い、rRNA 遺伝子転写終結点近

傍における DNA 複製フォーク中間体を検出、RFB を観察した。遺伝子ノックダウンの実験から、RFB 活性に必要なタンパク質を解析した。

RFB の位置を同定するために、ヒト細胞内に導入したエピソーム上で RFB を観察する実験系を構築した。Epstein-Barr ウイルスの OriP を持つプラスミドベクターに候補配列をクローニングし、細胞内に導入後、EBNA-1 の発現によって複製を誘導、2 次元電気泳動法によって DNA 複製フォーク中間体を観察した。

### 4. 研究成果

- (1) ヒト培養細胞の rDNA クラスター長を調べたところ、6Mb 以上から 1Mb 以下の長さにわたって、異なる長さのバンドが複数本観察され、細胞によってクラスター長の長さのパターンが異なっていた。近交系マウスの rDNA クラスター長を調べたところ、遺伝的には均一であるにも関わらず、rDNA クラスター長のパターンに個体差が見られた。従って、動物細胞では、各個体に特徴的な長さの rDNA クラスターが存在することが分かった。ヒト培養細胞のうち、U2OS、SaOS-2、SUSM-1、VA-13 細胞は主に 1Mb 以下の短い rDNA クラスターがラダー上に観察された。これらの細胞は、共通して Alternative lengthening of telomere 機構でテロメラーゼに依存せずにテロメアを伸長し、heterogeneous な長さのテロメア長を示す。従って、rDNA クラスターの安定性維持機構とテロメアとの関連が考えられ大変興味深い。
- (2) 培養細胞内で *I-Ppo I* を発現し、パルスフィールド電気泳動により、実際に

rDNA クラスターに DNA 二重鎖切断が導入されたのを確認した。しかし *I-Ppo I* の厳密な発現制御が難しく rDNA クラスターの再編成誘導は困難であった。*I-Ppo I* の速やかな誘導と分解を可能にする発現システムを構築する必要がある。

- (3) rRNA 遺伝子転写終結点近傍の RFB を二次元電気泳動法で解析したところ、ヒト細胞では複数の RFB が存在することを確認した。この領域が複製されるとき、DNA 複製フォークは、転写と逆方向から進行する場合と転写と同じ方向と両方から進行し、どちらの方向性でも RFB のシグナルが観察された。また、マウス細胞では、2 個の明瞭な RFB を観察した。TTF1 タンパク質をノックダウンしたところ、一部の RFB の活性が低下した。このことから、RFB は、TTF 依存的機構と非依存的機構により形成されていることが明らかになった。以前から酵母では、DNA 複製フォークの安定化に関与する Tof1-Csm3 複合体が RFB での複製フォーク進行停止に重要であることが報告されていたので、Tof1 のヒトホモログ Tim の関与を調べたところ、複数の RFB のうちの一部が Tim 依存的であることを見いだした。

RFB を含む DNA 領域を Epstein-Barr virus の oriP 配列を持つプラスミドにクローニングし、293EBNA 細胞に導入、ヒト細胞内でエピソームとして複製を誘導し RFB を解析したところ、ヒトの RFB のうち一部が rRNA 遺伝子転写終結の下流にあるリピート配列、Sal variation repeat の中で起こることが分かった。また、一方で SV40 複製系を利用したアッセイでは、

RFB の活性が見られなかった。このことは、rDNA の RFB が普遍的に複製を阻害するのではなく、内在的な DNA 複製タンパク質との機能的相互作用が DNA 複製フォークの進行阻害に重要な役割を果たすことを示唆している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Rad51 presynaptic filament stabilization function of the mouse Swi5-Sfr1 heterodimeric complex. Shang-Pu Tsai, Guan-Chin Su, Sheng-Wei Lin, Chan-I. Chung, Xiaoyu Xue, Myun Hwa Dunlop, Yufuko Akamatsu, Maria Jasin, Patrick Sung and Peter Chi *Nucleic Acids Research.* (2012) 40 (14): 6558-6569.  
doi: 10.1093/nar/gks305  
査読あり

[学会発表] (計 1 件)

- ① Characterization of the mammalian rDNA replication fork barrier Yufuko Akamatsu The 8th 3R Symposium 淡路夢舞台国際会議場 2012 年 11 月 25 日～11 月 28 日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

赤松 由布子 (AKAMATSU YUFUKO)  
国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教  
研究者番号：50381661

##### (2) 研究分担者

無し

##### (3) 連携研究者

無し