

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23114002

研究課題名（和文）rDNAの不安定性が染色体及び細胞機能に与える影響

研究課題名（英文）Effect of rDNA instability to chromosome and cellular functions

研究代表者

小林 武彦（KOBAYASHI, Takehiko）

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：40270475

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 120,600,000円

研究成果の概要（和文）：巨大非コードDNA領域であるリボソームRNA遺伝子（rDNA）の安定性にかかわる変異株を出芽酵母遺伝子欠損ライブラリーより検索し、全遺伝子数の10%以上に相当する708の変異株を同定した。その1つである、ヒストンアセチル化酵素Rtt109がrDNAの非コード領域に作用しDNAの修復に働いていることを発見した。また、rDNA間に存在する非コードプロモーターがrDNAの安定性を介して、細胞の分裂寿命を制御していることを発見した。さらに、動物細胞におけるrDNAの安定性に関わる非コード機能性配列及びそこに特異的に結合しDNA複製の進行をとめるタンパク質を同定した。

研究成果の概要（英文）：We identified 708 rDNA unstable mutants. The number corresponds to ~10 % of total genes. In one of the rDNA unstable mutants rtt109, that codes a histone acetylase, we found that recombination repair process of damaged rDNA doesn't work and rolling circle type replication is induced. By analysis of other rDNA unstable mutants, such as tel1, we found that damaged rDNA was relocated to the nuclear pore from nucleolus. The relocation is thought to be important to prevent improper recombination that induces rDNA instability. In terms of the relationship between rDNA stability and lifespan, we got direct evidence that rDNA instability caused by non-coding transcription rDNA reduces replicative lifespan. We also identified some non-coding functional element and the associating proteins in the rDNA in mammalian cells. They inhibit DNA replication and prevent the collision between DNA replication and rDNA transcription.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：非コードDNA リボソームRNA遺伝子 細胞老化 ゲノムの安定性 クロマチン 反復配列 複製阻害 DNAの組換え修復

1. 研究開始当初の背景

リボソーム RNA 遺伝子(rDNA)は、同一配列が 100 回以上繰り返して存在し、染色体の大きな領域(酵母の場合は12番染色体の60%、ゲノム全体の10%)を占める巨大反復遺伝子群である。そのため遺伝子間の非コードDNA領域中には、染色体維持に必要な機能性配列(インターメア)が集中して存在し、非コードDNA領域の機能を知る上で絶好のモデル領域である。またrDNAは最大級の脆弱部位でもあり、その安定性やコピー数の変化が、細胞老化の促進やDNAダメージ耐性の低下を引き起こすことが知られている。

2. 研究の目的

本研究ではrDNAの安定化に関わる因子を網羅的に同定し、申請者が開発した全てのコピーで特定配列の改変が可能な系を用いて非コード領域の染色体維持に果たす役割について解明する。さらにrDNAに起因した染色体全体の安定性の低下を包括的に防ぐネットワーク機構、その破綻が細胞機能に与える影響について酵母と動物細胞を用いて解析する。

3. 研究の方法

(1) rDNAの安定性に関わる因子の網羅的解析：rDNAの安定性が変化するとコピー数が著しく変動するため、パルスフィールド電気泳動法でその染色体全体の長さの変化として容易に検出することができる。酵母の遺伝子欠損ライブラリー(4800株)全株のrDNAの安定性を調べ、rDNAの安定性に関わる遺伝子を同定する。得られた遺伝子の情報は領域内で共有し、個々の遺伝子のrDNA維持における役割について解析する。

(2) rDNAの安定化機構の解析：(1)で同定された遺伝子の機能をバイオインフォマティクス、遺伝学、生化学、バイオイメーキングの手法により、領域内での連携を駆使して解析し、rDNAを中心とした染色体維持の遺伝

子ネットワークを解析する。さらに動物細胞でホモログ遺伝子のノックダウンを行い、rDNAの安定性に与える影響を調べる。

(3) rDNAの状態の変化が細胞に及ぼす影響の解析：(2)で作製したrDNAの安定性やコピー数を変化させた細胞の表現型を特に細胞老化、DNAダメージ耐性等に着目し観察する。最終的にrDNA及びその非コードDNA領域の持つ新しい機能の同定を目指す。

4. 研究成果

(1) rDNAの安定性に関わる因子の網羅的解析：酵母の遺伝子欠損ライブラリー4800株のrDNAの安定性を調べ(図1)、結果をデータベース化し一般公開した<http://lafula-com.info/kobayashiken/geldata/index.php>。データベースでは、rDNAの不安定性をランク付けし、検索エンジンによるソート機能を付加し、さらにすべての遺伝子を酵母遺伝子データベース(SGD)とリンクすることで、遺伝子の既知の情報に簡単にアクセスできるようにした利用者の使いやすいデータベースを構築した。

(2) rDNAの安定化機構の解析：

(1)で同定されたrDNAの安定性に関わる708の遺伝子についてバイオインフォマティクスを駆使して機能による分類を行い、どのような遺伝子関わっているのか解析した。結果として、これまで予想されていたDNA複製や組換え修復に関わる遺伝子のみならず遺伝子の転写やヒストン修飾、膜タンパク質など、多様な機能の遺伝子がrDNAの安定性に関わっていることが判明した(Saka et al., 2016)。またこのスクリーニングの結果見つかったいくつかの特徴的な変異株を解析した。例えば *rtt109* 変異株はrDNAが不安定なことに加えてコピー数が通常の約3倍に増加していた。*Rtt109*はヒストンアセチル化作用を持っており、この変異株ではDNAに

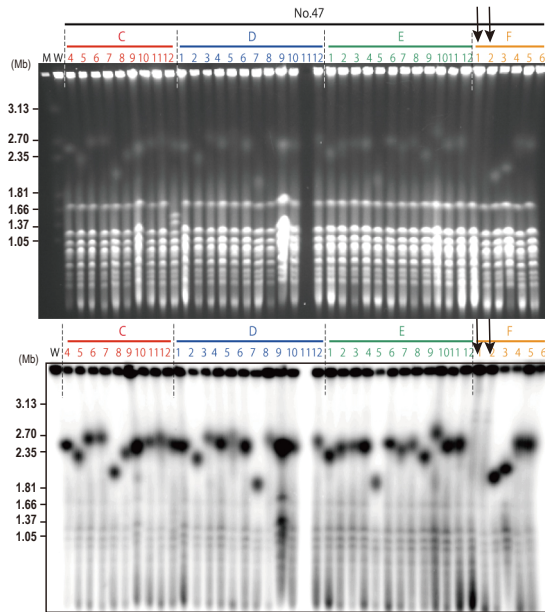


図1 rDNA不安定株の検索(例)

4,800遺伝子欠損株のDNAをパルスフィールド電気泳動で解析した結果の一部(40株)。上がエチジウムブロマイド染色、下がそのrDNAプローブによるサザン解析(12番染色体)。矢印のレーンがrDNA不安定株(sir2変異株)。一番左のレーンが野生株。

切断が生じた際、自身の染色体、あるいは環状のrDNA分子と組換え、その後ローリングサークル型の複製が生じることでコピー数の異常増加が起こっていることが判明した(Ide et al., 2013)。つまりRtt109の分子機能としては、DNAの2本鎖切断後の修復組換えで、正しい「鋳型」と組換えるのに必要な働き有すると考えられる。

また、同様にスクリーニングで見つかったrDNAが非常に不安定なTEL1欠損株の解析から、興味深いことに損傷を受けたrDNAはTel1依存的に核膜孔に移動し、そこで「隔離」されることにより異常なコピー間での組換えを防いでいることが判った(鶴之沢英理博士論文、2016)。

(3) rDNAの状態の変化が細胞に及ぼす影響の解析:

rDNAが不安定な変異株では寿命の短縮が見られることから、rDNAの不安定性と寿命との関連性が指摘されていた。その関係性を直接捉えるためにrDNAの安定性に関わる非コード機能性配列(インターメア)である非コードプロモーターをすべてのコピーで人為的に誘導可能なGalプロモーターと置き換

えて、rDNAの安定性を自在に変えられる株を作成した。その結果GalプロモーターをONにしrDNAを不安定にすると、同時に寿命の短縮が観察された。また逆にGalプロモーターをOFFにしrDNAを安定化すると寿命が延長した(Saka et al., 2013)。以上のことからrDNAの安定性が細胞の老化速度に影響し、寿命を決定していることが判明した。

(4) 動物細胞でのrDNAのインターメア解析

rDNAの構造は、酵母からヒトの細胞に至るまで高度に保存されていることから動物細胞でも酵母と同様な生理機能が期待される。そこで動物細胞のrDNAの組換えに関わる因子の同定を試みた。その結果ヒト及びマウスのrDNAの複製阻害配列のクローニングに成功し、その特異的に結合するタンパク質TTF1を同定した(Akamatsu & Kobayashi, 2015)。TTF1をノックダウンすると確かに複製阻害活性の顕著な減少が観察された。また動物細胞特有の現象としては、転写されるコピーとされないコピーがエピジェネティックな制御を受けており、さらに転写されるコピーのみで複製阻害活性が観察された。TTF1はrDNAの転写の活性化にも関わっていることから、転写開始と複製阻害をカップリングさせることで、複製と転写の衝突を回避しrDNAの安定性を維持していると考えられる。今後rDNAの安定性と細胞老化の関係についても解析する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計22件)

- 1 Kobayashi T, Sasaki M (査読有) (2017) rDNA stability is supported by many "Buffer genes" -Introduction to the Yeast rDNA Stability Database. *FEMS yeast res.* <http://dx.doi.org/10.1093/femsyr/fox001>
- 2 Saka K, Takahashi A, Sasaki M, Kobayashi T (査読有) (2016). More than 10% of yeast genes are related to genome stability and influence cellular senescence via rDNA maintenance. *Nuclei Acid Res.* 44: 4211-4221 doi: 10.1093/nar/gkw110
- 3 Akamatsu Y, Kobayashi T (査読有) (2015). The Human PolI Transcription Terminator Complex Acts as a Replication Fork Barrier that Coordinates the Progress of Replication with rRNA Transcription

- Activity. *Mol. Cell. Biol.* 35, 1871-1881
doi: 10.1128/MCB.01521-14.
- 4 Kobayashi T (査読有) (2014) Ribosomal RNA gene repeats, their stability and cellular senescence. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 90,119-129. <http://doi.org/10.2183/pjab.90.119>
 - 5 Fawcett JA, Iida T, et al. (11名中8番目) (査読有) (2014) Population Genomics of the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* 9: e104241*equal contribution
doi:10.1371/journal.pone.0104241
 - 6 Ganley AR, Kobayashi T (査読有) (2014) Ribosomal DNA and cellular senescence: new evidence supporting the connection between rDNA and aging. *FEMS Yeast Res*14,49-59.doi:10.1111/1567-1364.12133
 - 7 Saka K, Ide S, Ganley AR, Kobayashi T, (査読有) (2013) Cellular senescence in yeast is regulated by rDNA noncoding transcription. *Curr Biol* 23, 1794-1798. doi:10.1016/j.cub.2013.07.048 **F1000 recommended.**
 - 8 小林武彦、赤松由布子 (査読無) (2013) リボソーム RNA 遺伝子の不安定性と生理作用 生化学 84 巻 pp839-844
 - 9 Ide S, Saka K, Kobayashi T (査読有) (2013). Rtt109 prevents hyper-amplification of ribosomal RNA genes through histone modification in budding yeast. *PLoS Genet.* 9: e1003410. doi.org/10.1371/journal.pgen.1003410
 - 10 小林武彦 (査読無) (2013) 「染色体安定性の鍵を握る反復配列の維持機構」実験医学 31、2573-2577
 - 11 Poole AM, Kobayashi T, Ganley AR (査読有) (2012). A positive role for yeast extrachromosomal rDNA circles? *Bioessays* 34: 725-729.doi: 10.1002/bies.201200037.
 - 12 Ganley AR, Breitenbach M, Kennedy BK, Kobayashi T (査読有) (2012). Yeast hypertrophy: cause or consequence of aging? Reply to Bilinski *et al.* *FEMS Yeast Res.* 12: 267-268. doi: 10.1111/j.1567-1364.2012.00796.x
 - 13 Iida T, Iida N, Tsutsui Y, Yamao F, Kobayashi T (査読有) (2012) RNA interference regulates the cell cycle checkpoint through the RNA export factor, Ptr1, in fission yeast. *BBRC* 427, 143-147. doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.027
 - 14 小林武彦 (査読無) (2012) 「概論-今開かれる非コードDNA領域の世界」実験医学 30、2202-2208
 - 15 小林武彦 (査読無) (2012) 「rDNA 巨大反復遺伝子群による細胞老化制御」実験医学 30、2228-2233
 - 16 Kobayashi T (査読有) (2011). How does genome instability affect lifespan?: roles of rDNA and telomeres. *Genes Cells* 16: 617-624. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01519.x.
 - 17 Ganley AR, Kobayashi T (査読有) (2011). Monitoring the rate and dynamics of concerted evolution in the ribosomal DNA repeats of *Saccharomyces cerevisiae* using experimental evolution. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2883-2891. doi: 10.1093/molbev/msr117
 - 18 Miyazaki, T, Kobayashi, T. (査読有) (2011). Visualization of the dynamic behavior of ribosomal RNA gene repeats in living yeast cells. *Genes Cells* 16: 491-502. doi: 10.1093/molbev/msr117
 - 19 Kobayashi, T. (査読有) (2011). Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 1395-1403. **F1000 recommended.** doi: 10.1007/s00018-010-0613-2.
 - 20 小林武彦、坂季美子 (実験書、査読無) (2011) 実験医学 別冊「核酸実験の原理とプロトコール」羊土社 p85-91
 - 21 小林武彦 (総説、査読無) (2011) 「核小体の新機能」生体の科学「細胞核-構造と機能」医学書院、vol. 62: 412-415
 - 22 小林武彦 (総説、査読無) (2011) 「リボソームRNA 遺伝子の安定性と細胞老化」生体の科学「細胞核-構造と機能」医学書院、vol. 62: 416-417
- [学会発表] (計 27 件)
1. Kobayashi T (招待講演) rDNA stability determines the fate of cell 国際シンポジウム Molecular Biology of Ageing、オランダ、フローリンゲン 2015 年 10 月 25-28 日
 2. 小林武彦 第 23 回 DNA 複製、組み換え、修復ワークショップ 全遺伝子の約 10%がゲノムの安定性に関わっている、焼津グランドホテル (焼津市) 2015 年 10 月 19-21 日
 3. Kobayashi T (招待講演) More than 10 % of yeast genes are related to genome stability and influence cellular senescence via rDNA maintenance. 国際シンポジウム Non-coding DNA and Chromosomal Integrity、夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市) 2015 年 8 月 7-8 日
 4. Kobayashi T (招待講演) "Reprogramming in yeast"大阪大学蛋白研究所セミナー、大阪大 (吹田市) 2015 年 5 月 18-19 日
 5. Kobayashi T (招待講演) 「細胞老化とエピジェネティクス」第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会、一橋講堂 (東京都) 2015 年 5 月 25-26 日
 6. Kobayashi T (招待講演) 「細胞の若返

- りの分子機構」第15回日本抗加齢医学会総会、福岡国際会議場（福岡市）2015年5月29日
7. 小林武彦（招待講演）「若返りの分子機構」分生研シンポジウム、東京大（東京都）2014年12月15日
 8. Kobayashi T（招待講演）”rDNA stability and cellular senescence” Vienna Biocenter conference オーストリア、ウィーン 2014年12月4-6日
 9. Kobayashi T（招待講演）”Instability of repetitive sequence and cellular senescence” 日本分子生物学会シンポジウム、パシフィコ横浜（横浜市）2014年11月25-27日
 10. 小林武彦（招待講演）”rDNA stability and cellular senescence”熊本大リエゾンラボ研究会、熊本大（熊本市）2014年10月14-15日
 11. 小林武彦（招待講演）「ゲノムの安定性と細胞老化」日本生化学会大会シンポジウム、京都国際会議場（京都市）2014年10月7-10日
 12. 小林武彦「核膜近傍のタンパク質がrDNAの安定性に寄与する」酵母遺伝学フォーラム、東京大（東京都）2014年9月1-3日
 13. Kobayashi T（招待講演）”rDNA stability and cellular senescence”ゴードン会議、香港、2014年7月6-11日
 14. 小林武彦、坂季美子、井手聖、オーステンガンレイ「非コードの転写と細胞老化」第46回酵母遺伝学フォーラム東北学院大（仙台市）2013年9月8-10日
 15. Kobayashi T（招待講演）”Noncoding transcription regulates senescence in yeast”国際シンポジウム Evolution of non-coding DNA region 湘南国際村（横須賀市）2013年8月18日
 16. 小林武彦（招待講演）公開シンポジウム“遺伝情報場“非コードDNA領域が制御する細胞老化機構”東京ステーションコンファレンス（東京都）2013年1月11日
 17. 坂季美子、オーステンガンレイ、井手聖、小林武彦「rDNAと細胞老化」第45回酵母遺伝学フォーラム・第20回酵母合同シンポジウム、京都大（京都府宇治市）2012年4-6日
 18. 小林武彦「rDNAの安定性と細胞老化」第1回リボソームミーティング、広島大（東広島市）2012年3月15日
 19. 小林武彦（招待講演）「リボソームRNA遺伝子と細胞老化」日本農芸化学会シンポジウム、京都女子大（京都市）2012年3月2日
 20. Kobayashi T（招待講演）“rDNA recombination and cellular senescence” EMBO Workshop、セビリアSpain 2012年5月21~25日、
 21. Kobayashi T（招待講演）“rDNA instability and cellular senescence” FASEB meeting コロラド米国2012年7月15~20日
 22. Kobayashi T（招待講演）“rDNA instability and cellular senescence” The 8th 3R Symposium 夢舞台国際会議場（兵庫県淡路市）2012年11月25~28日
 23. 小林武彦「RTT109はrDNAの異常増幅を防ぐ」第29回染色体ワークショップ、ニュー水戸屋（仙台市）2012年1月26日
 24. Kobayashi T（招待講演）”Recovery of rDNA stability contributes to rejuvenation in yeast” 日本分子生物学会シンポジウム、パシフィコ横浜（横浜市）2011年12月15日、
 25. 小林武彦「ヒストン修飾とリボソームRNA遺伝子のコピー数制御」酵母遺伝学フォーラム第44回研究報告会、九州大（福岡市）2011年9月6日
 26. Kobayashi T（招待講演）“Maintenance of the ribosomal RNA gene repeat and its role in cellular senescence” The 5th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. OIST（沖縄県恩納村）2011年10月24日、
 27. Kobayashi T（招待講演）“Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast” OIST Workshop(QECG2011): Linkage and Recombination in Genome sequences. 2011年5月25日、OIST（沖縄県恩納村）
- 〔図書〕（計6件）
1. 小林武彦（著書）“寿命は何かが決めるのか～長生き遺伝子のヒミツ～”岩波ジュニア新書 2016年2月
 2. Kobayashi, T.（著書、共著）Genome Instability of Repetitive Sequence: Lesson from the Ribosomal RNA Gene Repeat. In “DNA Replication, Recombination, and Repair” Hanaoka, F and Sugawara K. ed. Springer Part IV, Chapter 10; pp235-247. 2016年1月 DOI10.1007/978-4-431-55873-6
 3. 小林武彦（著書、編集）ゲノムを司るインターメア～非コードDNAの新たな展開～化学同人 2015年11月
 4. 小林武彦（著書、共著）“遺伝子が語る生命 38億年の謎”悠書館、国立遺伝研編、2014年6月
 5. 小林武彦（著書、共著）岩波書店 岩波生物学辞典 第5版 2013年3月
 6. 小林武彦（著書、共著）”遺伝子図鑑”悠書館、国立遺伝研編、2013年10月

〔その他〕
ホームページ

小林研究室

<http://lafula-com.info/kobayashiken/CytoG/en/index.html>

新学術領域「非コードDNA」

<http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~jnakayam/ncDNA.html>

rDNA 安定性データベース 2016年2月公開

<http://lafula-com.info/kobayashiken/geldata/index.php>

アウトリーチ活動

①三島市図書館講演会「なぜゾウはなぜネズミより長生きか？」2015年2月28日

②高校生職場体験「生命科学への誘い」(2011-2015) 毎夏、計5回

③高校生対象市民公開講座「ゲノムの調べ」神奈川、横浜 2015年2月8日

④地域 FM ラジオ局ボイスキュー「サイエンスナウ」ボランティアパーソナリティー、2011-2015年、年12回出演

⑤三島市民公開講演会「生き物の寿命」、三島市、2013年11月

研究成果の公開等

<プレスリリース>

①2013年8月29日@文部科学省記者クラブ「サーチュイン遺伝子は、本当に長寿遺伝子だった。ゲノムを安定化することで老化を防ぐ長寿を実現する作用機序を解明」

<テレビ> (2013年)

①8月30日 NHKニュース「おはよう日本」

②8月30日 テレビ朝日「やじうまテレビ」

③8月30日 テレビ朝日「モーニングバード」

④8月30日 テレビ朝日「ANNニュース」

<新聞> (2013年)

①9月5日毎日新聞朝刊、

②9月3日日本経済新聞、

③9月3日日経産業新聞、

④9月3日日刊工業新聞、

⑤8月30日静岡新聞、

⑥8月30日宮崎新聞

<雑誌> (2013年)

①9月9日日経バイオテク

②10月20日パンプキン11月号

<ネットニュース> (2013年)

①8月30日Yahoo ニュース

②8月30日時事ドットコム

③8月30日ウォール・ストリート・ジャーナル

④8月30日ニコニコニュース

その他のマスコミ報道・取材対応

①2016年2月6日人間は何歳まで生きられるのか? ウェブジャーナル「日経グッデイ」

②2015年3月21日老化を防ぐ「若返り薬」実現間近? ウェブジャーナル「R25」

③2015年3月22日「薄毛は隔世遺伝」は嘘だった!? ウェブジャーナル「R25」

④2015年4月29日縄文顔/弥生顔って本当にあるの? ウェブジャーナル「R25」

⑤2015年5月6日人の“恐怖心”は遺伝する

のか? ウェブジャーナル「R25」

⑥2015年5月11日プチ断食が健康にいいって本当? ウェブジャーナル「R25」

⑦2015年3月14日テレビ朝日「ミライの鏡」出演

⑧2015年2月24日NHKBSプレミアム「関口宏のそもそも」出演

コメント、ミニレビュー

①小林武彦 「細胞はいかに若返るか」建築保全センター「Re」特集「アンチエイジング」p52-55、2016年1月

②小林武彦 「本当は楽しいドケチ研究」教えてエコ実験 returns 実験医学 vol.33 p2290-2293 2015年9月

③小林武彦 長寿遺伝子の正体 Medical Science Digest vol.40 p666-667、2014年

国際シンポジウムの主催

①3R(DNA replication, recombination and repair) symposium、2014年11月静岡県御殿場市御殿場高原ホテル

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 武彦 (KOBAYASHI, Takehiko)
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
研究者番号: 40270475

(2)連携研究者

①飯田 哲史 (IIDA, Tetsushi)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号: 60391851

②赤松 由布子 (AKAMATSU, Yufuko)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号: 50381661

③佐々木 真理子 (SASAKI, Mariko)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号: 50722013

④堀籠 智洋 (HORIGOME, Chihiro)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号: 10771206

(3) 研究協力者

①坂 季美子 (SAKA, Kimiko)
国立遺伝学研究所・技術支援員

②柴岩 春奈 (HAEIWA, Haruna)
総合研究大学院大学・大学院生

③鵜之沢 英理 (UNOZAWA, Eri)
総合研究大学院大学・大学院生

④高橋 明大 (TAKAHASHI, Akihiro)
総合研究大学院大学・大学院生

⑤若月 剛 (WAKATSUKI, Tsuyoshi)
東京工業大学大学院・大学院生

⑥鈴木 雄 (SUZUKI, Yu)
東京工業大学大学院・大学院生