

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20987

研究課題名(和文) リボソームRNA遺伝子の核膜結合とその機能

研究課題名(英文) Binding of ribosomal RNA genes to the nuclear periphery in budding yeast

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母においてリボソームRNA遺伝子(rDNA)は巨大な反復配列を形成している。rDNAでは、複製障害点RFBに結合するタンパク質Fob1に依存して複製フォークの停止とDNA二本鎖切断(DSB)が引き起こされる。

我々はクロマチン免疫沈降法により、rDNAが核膜孔複合体と結合することを明らかにした。この結合はFob1とDNA損傷チェックポイントタンパク質に依存していたことから、複製障害とそれに引き続くDSBに起因する現象であると考えられる。核膜孔への結合に欠損を持つ変異株においてrDNAが不安定になっていたことから、核膜孔結合がrDNAの安定性に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The ribosomal RNA genes (rDNA) in budding yeast are organized into a single tandem array of about 150 repeats. Fob1 unidirectionally inhibits replication fork progression at the replication fork barrier and induces DNA double-strand break (DSB) in the rDNA. The DSB leads to unequal sister-chromatid recombination and hence rDNA instability.

We performed chromatin immunoprecipitation assay to determine the localization of rDNA within the nucleus. We showed that rDNA binds to the nuclear pore in a manner dependent on Fob1 and DNA damage checkpoint kinase Tel1. The factors which are required for the rDNA-nuclear envelope binding are also important for the rDNA stability. We speculate that Fob1 sequesters rDNA at the nuclear periphery to inhibit aberrant recombination events.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：リボソームRNA遺伝子 核膜 老化

1. 研究開始当初の背景

DNA二本鎖切断(DNA double-strand break: DSB)は、ゲノムの不安定化や発がん、細胞死に至る可能性を持つ重篤な損傷である。これまでにDSBの修復機構はよく分かってきたが、その場所や動態については不明な点が多かった。近年、修復が困難なDSBが核膜辺縁に移動して、核膜孔Nup84複合体および核膜タンパク質Mps3と結合することが明らかとなった(*Science*, 322: 597-602, 2008; *Mol Cell*, 33: 335-343, 2009; *Genes Dev*, 23: 912-927, 2009)。研究代表者はこの核膜結合に必要なクロマチン再構成因子を同定し、それらがDSBの結合部位決定に機能することを示した。また、Mps3によるDSBの保護と、核膜孔によるDNA修復促進という二つの経路が、相補的に細胞生存に寄与していることを示した(Horigome *et al.*, *Mol Cell*, 55: 626-639, 2014)。

真核生物ゲノム最大の反復配列であるrDNAは、組み換えのホットスポットとして非常に動的で不安定である。しかしながら、複製阻害によるDNA二本鎖切断とDNA組み換えが共役した遺伝子増幅機構の存在により、rDNAのコピー数は一定に維持されている(*Genes Genet Syst*, 81: 155-161, 2006)。当研究室ではクロマチン免疫沈降法により、rDNAがFob1依存的にNup84複合体およびMps3に結合することを明らかにした。Fob1はrDNA反復配列に存在する複製阻害点(Replication Fork Barrier: RFB)に結合することにより一方向のみの複製反応を阻害してDNA二本鎖切断を引き起こすタンパク質である。このことから、核膜とrDNAの結合はDNA二本鎖切断により誘導されていると考えられる。興味深いことに、当研究室が行った4800種の非必須遺伝子破壊株を用いた網羅的解析により、rDNAの安定性が低下する破壊株として、DSBと核膜との結合に欠陥を持つ破壊株が多数取得されている(Saka *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 44: 4211-4221, 2016)。このことから、rDNAにDNA二本鎖切断を生じた際に、核膜に結合することによりrDNAの安定性が保たれるという機構の存在が予想された。

rDNAの安定性に関わる遺伝子SIR2とFob1の変異株において、それぞれ細胞寿命の短縮、延長が観察されている(*Genes Dev*, 13: 2570-2580, 1999; *Genes Dev*, 17: 1497-1506, 2003)。我々はrDNAに存在する複製開始点(rARS)に変異を導入する実験法により、rDNAの安定性を直接低下させる系を開発し、rDNAの安定性そのものが寿命を支配していることを証明した(*Mol Cell*, 35: 683-693, 2009)。一方、核膜の高次クロマチン構築機能が老化に関与していることが、近年明らかにされてきている。顕著な例として、早老症の一種ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群(HGPS)はラミンA/C遺伝子のひとつの塩基置換で引き起

されること(*Nature*, 423: 293-298, 2003)。早老症患者や健康な高齢者の核では形態異常やDNA損傷の増加が見られることなどが報告されている(*Science*, 312: 1059-1063, 2006)。rDNA安定性が寿命を支配している機構において、核膜とrDNAの結合が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究ではrDNA反復配列を2コピーまで減らして単純化したモデル系を用い、定量的顕微鏡法によりrDNAと核膜の結合機構を解明する。また、核膜結合がrDNAの安定性に果たす役割を明らかにする。

3. 研究の方法

rDNAのコピー数を人為的に2コピーにまで減らし、そのRFB近傍に*lacO*配列を導入、さらにGFP-LacIを共発現させた株を用いる。通常rDNA反復配列の局在は『不定形の線』として観察されるため、核内での空間的情報の定量が困難であるが、2コピーrDNAでは位置の定量解析が可能な『点』として観察できることを確認してある。またこの株でFob1の発現を誘導すると、2コピーのrDNAにおいて複製阻害とDNA組み換えの共役機構が発動し、150コピーまで遺伝子増幅することが示されている(*Genes Cells* 16: 491-502, 2011)。本研究では、核膜との位置関係を解析するためRFPを融合した核膜孔タンパク質Nup49を共発現する株を新たに構築する。2コピーrDNAでは、不足するリボソームRNAをヘルパープラスミドに導入したrDNAからの発現によりサポートしている。このヘルパーrDNAにはRFBが含まれていないため2コピーrDNA内にあるRFB一箇所のみがFob1の結合部位となり、Fob1の発現を誘導すると、2コピーrDNA部位のみで切断と増幅が開始される。

Fob1誘導前と後の2コピーrDNAの位置をゾーニング法と呼ばれる手法により定量的に解析する(Horigome *et al.*, *Methods Mol Biol*, 1292: 77-96, 2015)。rDNAと核膜の結合についてクロマチン免疫沈降法(ChIP)でも確認する。ChIP法では、Fob1誘導前後におけるRFBと核膜孔およびMps3との結合を特異的に検出する。これまでにDNA二本鎖切断の核膜結合に必要であることが同定されている因子を中心に、破壊株・変異株を用いてrDNAと核膜の結合への影響を解析する。

rDNAの核膜結合による安定性への影響を調べるために、パルスフィールド電気泳動によりrDNAのコピー数の変動を見る。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

本研究では、定量的顕微鏡法およびクロマチン免疫沈降法によりrDNAと核膜との結合について解析した。

DNA損傷修復タンパク質Rad52を指標とした蛍光顕微鏡解析により、rDNAにおいてDNA

二本鎖切断の発生する頻度が当初の予想よりも低いことが明らかとなった。低頻度で起きる現象を顕微鏡法で検出することは困難であることから、バックアップとして計画していたクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) に主要な解析手段を切り替えた。

ChIP 法により、rDNA が核膜孔および核膜タンパク質 Mps3 と結合することを明らかにした。核膜孔との結合は複製阻害点結合タンパク質 Fob1 と DNA 損傷チェックポイントタンパク質である Tel1 に依存していたことから、複製阻害とそれに引き続く DNA 二本鎖切断が rDNA と核膜孔の結合の要因となっていると考えられる (図 1)。

これまでの人為的に誘導した DNA 二本鎖切断と核膜の結合に関わることが示されていた Arp5 が、rDNA と核膜の結合にも必要であったことから、rDNA の核膜結合はこれまで報告のあった DNA 二本鎖切断と核膜の結合とその機構を共有していることが示唆された。rDNA にコンデンシンをリクルートするタンパク質 Tof2, Csm1, Lrs4 (*Mol Cell*, 34: 26-35, 2009) もまた rDNA の核膜結合に必須であった。

rDNA の核膜結合がゲノムの安定性に果たす役割について調べるため、パルスフィールドゲル電気泳動法を行った。rDNA と核膜孔の結合に欠損を持つ変異株において rDNA が不安定になっていたことから、核膜孔結合が rDNA の安定性に重要な役割を果たすことが示唆された。

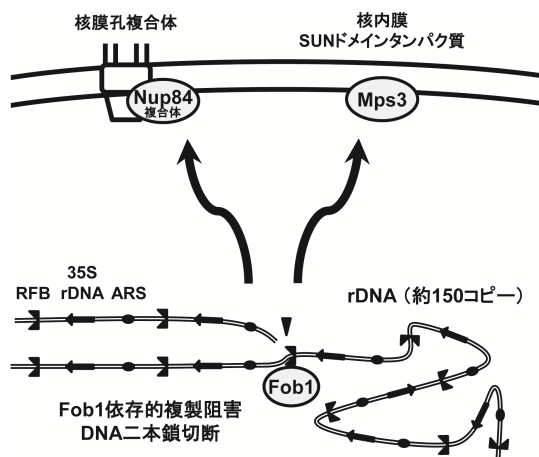


図 1 rDNA は複製阻害点結合タンパク質 Fob1 依存的に核膜と結合する

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

これまでの核膜の結合に関する研究では、人為的に導入した修復困難な DNA 二本鎖切断を用いて解析が行われてきた。今回の解析により生理的な条件においても DNA 損傷が核膜と結合すること、そしてその結合がゲノムの安定性の維持に寄与していることが初めて明らかになった。

(3) 今後の展望

DNA 二本鎖切断が核内を移動する現象は、酵母に限らず他の生物でも観察されている (*Trend Genet.*, 33: 86-100, 2017)。いずれの場合も核膜結合がゲノムの安定性に重要であることが示されている。核膜結合に必要な因子を同定し、その移動と結合のメカニズムを解明することが重要であり、世界中で多数の研究が進行中である (Horigome *et al.*, *Genes Dev.* 30, 931-945, 2016)。核膜上では特定の修復経路の活性化および抑制が行われている可能性があり、核膜上での DNA 損傷修復経路の制御機構の解明が待たれる (Horigome and Gasser, *Cell Cycle* 15, 3011-3013, 2016)。本研究により DNA 二本鎖切断の核膜結合が、生理的な条件における rDNA でも引き起こされていることが明らかとなった。ゲノム最大の不安定領域である rDNA の安定性維持における核膜結合の役割についての解析、さらには細胞老化と rDNA の核膜結合の関連についての解析が必要である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 堀籠智洋 “Fob1-dependent binding of ribosomal RNA genes to the nuclear periphery in budding yeast” 第 55 回日本生物物理学会年会, 2017

(2) 堀籠智洋 「リボソーム RNA 遺伝子は DNA 複製阻害タンパク質 Fob1 に依存して核膜に結合する」 第 50 回酵母遺伝学フォーラム, 2017

(3) 堀籠智洋 「リボソーム RNA 遺伝子は DNA 複製阻害タンパク質 Fob1 に依存して核膜に結合する」第 39 回日本分子生物学会年会, 2016

(4) Chihiro Horigome “Fob1-dependent binding of ribosomal RNA genes to the nuclear periphery in budding yeast.” 10th 3R International Symposium, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

研究室ウェブサイト

<http://lafula-com.info/kobayashiken/CytoGen/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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