

平成22年 5月10日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17080010

研究課題名（和文） 複製フォークと相同組換えの共役による遺伝子増幅制御の研究

研究課題名（英文） Analysis of gene amplification that is promoted by DNA replication and homologous recombination

研究代表者

小林 武彦 (KOBAYASHI TAKEHIKO)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授

研究者番号：40270475

研究成果の概要（和文）：リボソーム RNA 遺伝子（rDNA）は真核細胞では100コピー以上がタンデムに連なった巨大反復遺伝子群を染色体上に形成している。そのため rDNA はリピート間での組換えや異常な高次構造を作りやすく、染色体中で最も不安定な領域の一つである。報告者は rDNA には特殊な遺伝子増幅機構があり、リピート間での組換えにより脱落したコピー数を常に補い、多コピーの状態を安定に維持していることを解明した。さらに rDNA はその不安定性から細胞老化の原因となっていることも判明した。

研究成果の概要（英文）：The ribosomal RNA genes (rDNA) are one of the most fragile sites for deletional recombination. Even though the rDNA is susceptible to this kind of instability, each organism maintains a specific copy number of rDNA, thereby indicating presence of a mechanism for the maintenance of copy number. I revealed that there is a gene amplification system to maintain the copy number. Moreover, I found that rDNA instability was a cause of cellular senescence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	15,300,000	0	15,300,000
2006年度	11,600,000	0	11,600,000
2007年度	11,500,000	0	11,500,000
2008年度	18,150,000	0	18,150,000
2009年度	8,200,000	0	8,200,000
総計	64,750,000	0	64,750,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学および分子生物学

キーワード：リボソーム RNA 遺伝子、遺伝子増幅、ゲノムの安定性、非コード転写、細胞老化

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子には、自身の数を増やす遺伝子増幅作用と呼ばれる働きがある。この作用は進化

の過程で生物に多様性や複雑さをもたらしてきた。現在でも周囲の環境等が変化し細胞にストレスが加わると、それに抵抗性を与える遺伝子の数が増え、ストレスに順応できる

ようになることが知られている。また人類にとって好ましくない例もある。例えば癌細胞における癌遺伝子増幅はその悪性を加速し、またその治療に用いる制癌剤は、薬剤耐性遺伝子の増幅を促し制癌の効果を弱める。

このように遺伝子増幅は重要な生命現象であるにも関わらずその分子機構については、誘導可能な系が少ないこと、また増幅単位が数十 Kb から数百 Kb と巨大なことから解析が進んでいない。

遺伝子増幅のメカニズムとしては、最低限 2 つの要素が必要と考えられる。一つは DNA 複製開始活性で、これは遺伝子の量を増やすために必要である。もう一つは、組換えのホットスポット活性で、この活性は増えた遺伝子を染色体上に整然と並べ安定に保持するために必須と考えられる。実際に増幅が知られているいくつかの遺伝子で、この 2 つの活性が見つかった。

## 2. 研究の目的

本研究では増幅誘導が可能なリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の増幅機構を中心に、DNA 複製と組換えが如何に共役して遺伝子を増やしていくのか、その分子レベルでの解明を目指す。

rDNA は文字通りリボソーム RNA をコードする遺伝子である。リボソーム RNA はリボソームの骨格をなす RNA 分子で、細胞内の RNA の約 60% を占める非常に多量に存在する分子である。そのため 1 個の遺伝子では生産が間に合わず、真核細胞では 100 コピー以上がタンデムに連なった巨大反復遺伝子群を染色体上に形成している。rDNA はその構造の特殊性からリピート間での組換えによるコピーの脱落、異常な高次構造の形成による DNA 複製障害や染色体分配異常を起こしやすく、染色体中で最も不安定な領域の一つとなっている。しかし細胞には rDNA を安定に保つための機構が存在し、生物種ごとに固有のコピー数が維持されている。安定化機構の 1 つは遺伝子の増幅作用で、コピー間での組換えによる脱落分を常に補っている。本特定領域研究では、その組換え調節機構について解明する。

また、rDNA は細胞の老化現象にも関わっていることが示唆されており、rDNA の一体何が細胞老化を誘導するのか？ rDNA と細胞老化の関係について解明する。

## 3. 研究の方法

出芽酵母の近縁種の rDNA 配列を決定し、それらを比較することで rDNA の遺伝子間領域で保存された DNA 配列を抽出する。保存された配列は何らかの重要な機能を持ってい

ると考えられる。次に通常 150 コピーある rDNA を 2 コピーまで減らした株を用いてその保存された配列を欠損させ、増幅に与える影響を調べる。このようにして同定した増幅に必要な配列の機能をそこに結合するタンパク質等の解析により解明する。さらに既に増幅に必須であることが判明している DNA 複製阻害配列及びそこに特異的に結合するタンパク質 Fob1 の活性を解析し増幅組換えの分子機構を明らかにする。

また DNA と細胞老化との関係については rDNA の組換え機構を操作して rDNA の安定性を変化させ、寿命に与える影響を解析する。

## 4. 研究成果

### 成果 1、rDNA の増幅組換え機構の解析

報告者のこれまでの研究により、rDNA の増幅組換え機構について以下のような知見が既に得られていた。細胞周期の DNA 合成期において、rDNA に存在する複製阻害配列に Fob1 タンパク質が特異的に結合すると、そこで複製フォークの進行阻害が起こり DNA の 2 本鎖切断が引き起こされる。その切断末端が姉妹染色分体と組換えて修復されるが、その時にずれた組換え (不等価組換え) を起こすと 2 本鎖切断点から組換え点までの rDNA が再度複製されることになり、その分のコピー数が増加する。本研究ではその組換え調節が如何に行われているのか解明した。まず 150 コピーある rDNA を 2 コピーまで減らした株を用いて欠損解析を行い増幅に必須な noncoding プロモーター (E-pro と命名) を同定した (Kobayashi & Ganley, 2005, Science)。E-pro は DNA 複製阻害配列近傍に存在する双方向性のプロモーターで、ヒストン脱アセチル化酵素 Sir2 により調節され増幅誘導に関わっていた。つまり、rDNA のコピー数が減少すると Sir2 による E-pro の転写抑制が解除されそこからの転写が開始される。すると周囲の姉妹染色分体連結タンパク質 cohesin の結合が阻害され、2 本鎖切断修復時の姉妹染色分体間の不等価組換えが誘導される。またコピー数が正常なレベルまでに回復すると Sir2 による E-pro の転写抑制が再開し、cohesin の結合により姉妹染色分体間の等価組換えが誘導されコピー数の増加が停止する。

### 成果 2、rDNA と細胞老化の関係の解析

rDNA はゲノム中で最も不安定ないわゆる脆弱部位 (ぜいじゃくぶい) であり、その状態 (コピー数、安定性) は細胞の機能に影響を与えると予想されるが、具体的なメカニズムについては不明であった。報告者のこれま

での研究で rDNA の増幅組換え機構が解明され、その安定性やコピー数を改変した株の作成が可能になった。それらを用いて rDNA の持つリボソーム RNA を生産する以外の機能 (extra-coding 機能と命名) について、特に老化との関係を解析した。

rDNA の安定性が低下した株では細胞老化が促進され、短寿命になることが判明した (Ganley et al., 2009, Mol. Cell)。さらに細胞分裂により、老化現象を示す母細胞から、リセットされ若返りを起こす娘細胞が生み出される際に、rDNA の安定性の回復が見られた。そのことから rDNA はテロメア同様、細胞老化の「スイッチ」として働いていると推定される。

また rDNA のコピー数を 3 分の 1 以下に減少させた株も作製し、その細胞機能へ影響を調べた。それら低コピー株の生育は正常だが、DNA 損傷に対して強い感受性になることが判明した。原因は通常 rDNA のコピーの約半数を占める転写されていないコピーが、低コピー株では失われたためであることが判明した。この感受性となるメカニズムとしては、転写されていないコピーがコンデンシン等の修復酵素の反応の「足場」として働き、それがなくなると DNA 損傷を修復できず、感受性になっていることが判明した (Ide et al., 2010, Science)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

原著論文 (すべて査読有り)

1. Ide S, Miyazaki T, Maki H., Kobayashi T. Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science* 327: 693-696, 2010.
2. Ganley ARD, Ide S, Saka K, Kobayashi T. The effect of replication initiation on gene amplification in the rDNA and its relationship to aging. *Mol. Cell* 35: 683-693, 2009.
3. Ganley ARD, Kobayashi T. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Research* 17: 184-191, 2007
4. Kasahara K, Ohtsuki K, Ki S, Kobayashi T. Shirahige K, Kokubo T. Assembly of regulatory factors on rRNA and ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27: 6686-6705, 2007
5. Ide S, Watanabe K, Watanabe H, Shirahige K, Kobayashi T. Maki H. Abnormality in initiation program of DNA replication is monitored by the highly repetitive rRNA gene array on chromosome XII in budding yeast. *Mol. Cell. Biol.* 27: 568-578, 2007.
6. Kobayashi T. Ganley ARD. Recombination regulation by transcription-induced cohesin dissociation in rDNA repeats. *Science* 309, 1581-1584, 2005.
7. Ganley ARD, Hayashi, K, Horiuchi T. Kobayashi T. Identifying gene-independent noncoding functional elements in the yeast ribosomal DNA by phylogenetic footprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 11787-11792, 2005.
8. Ide S, Kobayashi T. Analysis of DNA Replication in *S. cerevisiae* by Two-Dimensional and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Curr. Prot.* In press.
9. Kobayashi T. A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus- rDNA instability maintains genome integrity-. *BioEssays* 30: 267-272, 2008
10. Ganley ARD, Kobayashi T. Phylogenetic footprinting to find functional DNA elements. *Methods in Molecular Biology*, Humana press: 367-379, 2007
11. Kobayashi T. Strategies to maintain the stability of the ribosomal RNA gene repeats. *Genes Genet. Syst.* 81: 155-161, 2006.

英文総説 (すべて査読有り)

8. Ide S, Kobayashi T. Analysis of DNA Replication in *S. cerevisiae* by Two-Dimensional and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Curr. Prot.* In press.
9. Kobayashi T. A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus- rDNA instability maintains genome integrity-. *BioEssays* 30: 267-272, 2008
10. Ganley ARD, Kobayashi T. Phylogenetic footprinting to find functional DNA elements. *Methods in Molecular Biology*, Humana press: 367-379, 2007
11. Kobayashi T. Strategies to maintain the stability of the ribosomal RNA gene repeats. *Genes Genet. Syst.* 81: 155-161, 2006.

和文総説

12. 小林武彦 リボソーム RNA 遺伝子の新しい機能 *化学と生物*, 47・2, pp104-110, 2009 (日本農芸化学会)
13. 小林武彦 複製、組換え、転写のコラボレーションによる遺伝子増幅 *蛋白質・核酸・酵素*, 2009 (共立出版)
14. 小林武彦, ガンレイ オーステン 系統発生的フットプリントによる機能性 DNA 配列の同定 *遺伝*, 21, pp265-268, 2007 (エヌ・ティー・エス)
15. 小林武彦 複製フォークと組換えの共役による遺伝子増幅の制御 *実験医学*, 25, pp635-641, 2007 (羊土社)
16. 小林武彦 noncoding な転写が rDNA のコピー数を調節する *蛋白質・核酸・酵素*, 51, pp2141-2143, 2006 (共立出版)
17. 小林武彦 rDNA の恒常性の維持機構 *細胞工学*, 25, 481-485, 2006 (秀潤社)
18. 小林武彦 酵母の老化制御機構 *医学のあゆみ*, 217 巻, 7 号, pp743-747, 2006 (医歯薬出版)
19. 小林武彦 酵母を使った老化研究-rDNA 仮説を中心に *基礎老化研究* 29, pp7-11, 2005 (基礎老化学会)

〔学会発表〕(計34件)

1. 小林武彦 Recovery of rDNA stability contributes to rejuvenation in yeast. 分子生物学会シンポジウム(招待講演)2009年12月横浜
2. 小林武彦 The effect of replication initiation on gene amplification in the rDNA and its relationship to aging. International Symposium on chromosome cycle and genome dynamics (招待講演)2009年11月栃木県那須
3. 小林武彦 rDNA の不安定化と細胞老化複製組換え修復ワークショップ2009年11月滋賀
4. 小林武彦 リボソーム RNA 遺伝子の Extra copy の機能酵母遺伝学フォーラム2009年7月つくば市
5. 小林武彦 リボソーム RNA 遺伝子が過剰に存在する理由分子生物学会シンポジウム(招待講演)2008年12月神戸
6. 小林武彦 The effect of replication initiation on gene amplification in the rDNA and its relationship to aging. International Symposium for 3R (招待講演)2008年10月静岡県掛川市
7. 小林武彦 リボソーム RNA 遺伝子の安定性と細胞の老化機構酵母遺伝学フォーラム2008年9月札幌
8. 小林武彦 The effect of replication initiation on gene amplification in the rDNA and its relationship to aging. International Symposium on Chromosome Dynamics (招待講演)2008年5月三重県伊勢市
9. 小林武彦 リボソーム RNA 遺伝子の安定性と細胞の老化機構 DNA 組換え、複製合同ワークショップ2008年3月修善寺
10. 小林武彦 リボソーム RNA 遺伝子のゲノム維持における役割 第30回日本分子生物学会 BMB2007 (招待)2007年12月横浜
11. 小林武彦 リボソーム RNA 遺伝子のゲノム維持における役割 International Symposium, Genome Stability & Instability (招待)2007年11月大阪
12. 小林武彦 Strategies to maintain the stability of the ribosomal RNA gene repeats RNA polymerase I transcription (招待)2007年10月レーゲンスブルグ ドイツ
13. 小林武彦 リボソーム RNA 遺伝子の不安定性をもたらす細胞の老化機構 第79回日本遺伝学会シンポジウムリボソーム(招待)2007年9月岡山
14. 小林武彦 リボソーム RNA 遺伝子のゲノム維持における役割 酵母遺伝学フォーラム2007年9月大阪
15. 小林武彦 rDNA のコピー数調節機構と Extracoding function RNA 若手の会(招待)2007年9月神戸
16. 小林武彦 Extra-coding functions of ribosomal RNA gene repeats 国際酵母遺伝学会メルボルン オーストラリア
17. 小林武彦 Strategies to maintain the stability of the ribosomal RNA gene repeats, Ribosomes: from structure to gene expression and beyond (招待)2007年4月アーバイン、米国
18. 小林武彦 リボソーム RNA 遺伝子の Extra-coding 機構 日本分子生物学会 2006 フォーラム2006年12月名古屋
19. 小林武彦 複製と組み換えの共役による遺伝子増幅機構の解析 組換え、染色体再編ワークショップ2006年11月兵庫県淡路島
20. 小林武彦 複製開始活性が遺伝子の増幅に与える影響 第18回 DNA 複製・分配ワークショップ2006年10月熱海市
21. 小林武彦 系統発生的フットプリント法による機能性 DNA 配列の同定 日本遺伝学会第78回大会2006年9月つくば市
22. 小林武彦 DNA 複製開始活性は rDNA の増幅に必要である 酵母遺伝学フォーラム2006年7月三島市
23. 小林武彦 Replication initiation regulates rDNA amplification 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology 2006年6月京都
24. 小林武彦 Replication initiation regulates rDNA amplification The Chromosome Cycle (招待)2006年6月東京
25. 小林武彦 How are repeated genes maintained? パスツール研究所招待セミナー(招待)2006年5月パリ、フランス
26. 小林武彦 Strategies to maintain the stability of the ribosomal RNA gene repeats IGH, CNRS 研究所招待セミナー(招待)2006年5月モンペリエ、フランス
27. 小林武彦 Recombination Regulation by Transcription-induced Cohesin Dissociation in Yeast rDNA repeats 第28回日本分子生物学会2005年

- 1 2月福岡
28. 小林武彦 Mechanisms to keep the stability of the ribosomal RNA gene cluster in yeast The 5th International symposium on DNA Replication, Recombination and Repair (3R) (招待) 2005年11月淡路島
  29. 小林武彦 Gene amplification regulated by noncoding transcription International symposium New aspect of Gene Amplification (招待) 2005年11月岡崎
  30. 小林武彦 組換えを制御する新しい転写機構の発見 第77回日本遺伝学会 2005年9月東京
  31. 小林武彦 組換えを制御する新しい転写機構の発見 酵母遺伝学フォーラム 2005年9月千葉
  32. 小林武彦 The nucleolus, rDNA and Aging 第26回基礎老化学会シンポジウム (招待) 2005年6月東京
  33. 小林武彦 How are repeated gene cluster maintained? The ICGEB Conference on "DNA replication and cell division (招待) 2005年5月トリエステ、イタリア
  34. 小林武彦 Aging study in yeast 国立長寿医療センター研究所公開セミナー (招待) 2005年4月大府市

[図書] (計1件)

1. 小林武彦 老化モデルー酵母 **新老年学** 第3版、2章2.4、pp265-271、2010 (東京大学出版会)

[その他]

新聞報道 (計8件)

1. 朝日新聞 平成22年2月16日
2. 科学新聞 平成22年2月
3. 朝日新聞 平成21年9月25日
4. 科学新聞 平成21年10月2日
5. 中日新聞 平成21年9月11日
6. 東京新聞 平成21年9月11日
7. 静岡新聞 平成21年9月11日
8. 静岡新聞 平成20年10月26日

研究成果の公表を行うホームページ  
<http://www.nig.ac.jp/labs/CytoGen/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 武彦 (KOBAYASHI TAKEHIKO)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授  
研究者番号：40270475

### (2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者  
なし