

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H01443

研究課題名(和文) リボソームRNA反復遺伝子のコピー数管理システムの解析

研究課題名(英文) Analysis of rDNA copy number monitoring system

研究代表者

小林 武彦 (Kobayashi, Takehiko)

東京大学・定量生命科学研究所・教授

研究者番号：40270475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,600,000円

研究成果の概要(和文)：翻訳を担うリボソームは細胞内のタンパク質の半分以上を占め、その量を安定に維持することは重要である。リボソームRNAをコードする遺伝子(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形成している。リボソームを安定供給するためには、コピー数を常にモニターしその数を一定レベルに維持する機能が必要と考えられるが、そのメカニズムについて全くわかっていなかった。本研究では、リボソームRNAの転写の活性化に関わる因子(UAF)が、コピー数の低下を感知し増幅組換えを誘導、そして一定のコピー数で増幅を停止させる機構を制御していることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物にとってタンパク質を生産することは、生命が地球に誕生した時から続いている最も重要な生命活動である。タンパク質の生産はリボソームによって担われており、リボソームは細胞中で最も多量に存在するRNA/タンパク質複合体である。リボソームの安定供給には1つの細胞に100コピー以上存在するリボソームRNA遺伝子のコピー数を適正に維持することが重要である。本研究では、そのリボソームRNA遺伝子コピー数をモニターし、数が足りなくなった時には遺伝子増幅で回復させる機構の全貌を解明した。本成果は、全ての真核細胞が持つ最も基本的な生理作用の解明であり、非常に重要な発見である。

研究成果の概要(英文)：The ribosomal RNA genes (rDNA) are the most abundant gene in the eukaryotic cells and they make huge tandem clusters on the chromosome. Though the copy number maintenance is quite important for stable production of ribosome that translates mRNA to protein, the mechanism has not been elucidated. We identified the system for copy number monitoring, amplification induction and maintenance of the proper copy number by the rDNA transcription activating factor, UAF.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：リボソーム リボソームRNA遺伝子 遺伝子増幅 組換え UAF 転写活性化因子 SIR2 出芽酵母

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

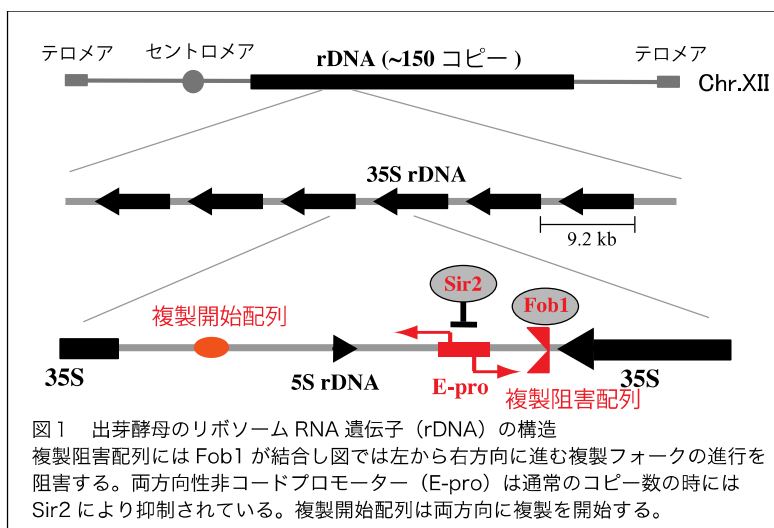
細胞にとってタンパク質を生産することは、生命が地球に誕生した時から続いている最も重要な生命活動の1つである。タンパク質の合成はリボソームによって担われている。リボソームはリボソームタンパク質とリボソーム RNA からなる RNA/タンパク質複合体であり、それらは細胞中で最も多量に存在するタンパク質および RNA でもある。タンパク質合成反応はリボソーム RNA によって触媒され、その構造は全ての生物で高度に保存されている。そのような理由から生物の種の分類に、リボソーム RNA の塩基配列が用いられるほどである。

細菌に比べて細胞のサイズが大きい真核細胞では、より多くのリボソームが必要となる。そのため1つの細胞にはリボソーム RNA を作る遺伝子(リボソーム RNA 遺伝子、rDNA)が100コピー以上が存在する。多くの生物で、rDNA は染色体上に巨大な反復遺伝子群を形成している(図1)。

rDNA に偶発的に起こる傷により rDNA のコピー数が減少してしまうことがある。興味深いことに、減少後すぐに rDNA の増幅反応が起こり、コピー数が元通りに回復する。このことは、次の2つのことを意味している。1つは細胞にとって適正な rDNA コピー数の維持は重要であり、常に維持されているということ、もう1つは、細胞はコピー数を常にモニターし、必要であれば遺伝子増幅を誘導する機構を有するということである。しかし両者について、その具体的なメカニズムについては全く解っていなかった。

2. 研究の目的

これまでに、報告者のグループが中心となり rDNA の増幅(コピー数の回復)を引き起こす DNA の組換え作用について、その基本的なメカニズムは解明されていた(図2)。しかしコピー数をモニターし適正な数にコピーを維持する「増幅を制御する機構」については全くわかっていなか

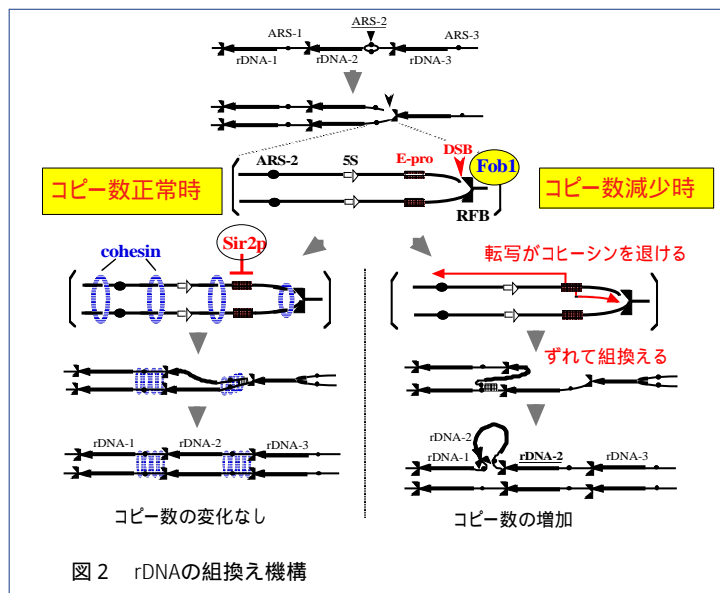


った。本研究の目的はその制御機構の解明である。

3. 研究の方法

rDNA の増幅機構は、図2に示すように複製阻害点による DNA の切断(DNA double strand break、DSB)と、その後の修復時の姉妹染色分体間の「ずれ」により引き起こされる。

細胞周期のS期(DNA合成期)にDNAの複製が複製開始点(ARS)から両方向に開始すると、図2(上から2段目)では右方向に進む複製が複製阻害点(RFB)に結合するFob1タンパク質の作用により停止する。複製が停止するとDNAの1本鎖の部分が切れてDNAがそこで切断される(DSB)、切断されたDNAはすぐに修復酵素により直され



る。その時にコピー数が減少している細胞では(図、右側)、rDNAの非コード領域にある転写のプロモーター(E-pro)が活性化し、コヒーシンという姉妹染色分体をつなぐリング状のタンパク質を除去する。すると切れたDNAは隣の姉妹染色分体と「ずれて」組換え、修復され、その結果同じコピーが2度複製されることになりコピー数が増幅する。図2では真ん中の「rDNA-2」が2回複製される。一方コピー数が正常の場合(図、左側)は、Sir2の作用によりE-proの発現が抑制され、姉妹染色分体はコヒーシンにより近くに寄せられ、切れたその場所で修復される。この場合コピー数の変動は起こらない。以上のようにrDNAコピー数の調整はE-proの転写により制御されている。

E-proの転写調節はSir2タンパク質によることがわかっている。Sir2はヒストン脱アセチル化酵素で転写抑制作用を持つ。コピー数が減少した株(rDNA低コピー株)ではSir2量が減り、正常なコピー数の株ではSir2の発現量が増加している。そのため、rDNAのコピー数の制御機構はSIR2遺伝子の転写調節とリンクしていると考えられ、そのメカニズムを解析した。

方法としてはSIR2のプロモーターにモニター遺伝子(薬剤耐性遺伝子)をつないだ株を作成し、その変異株を単離する「遺伝学的手法」を用いた。rDNA低コピー株ではSIR2プロモーターは抑制され、モニター遺伝子(薬剤耐性遺伝子)も発現せずに細胞は薬剤感受性になる。この細胞を変異原で処理し、低コピーの状態でも薬剤耐性になる、つまりSIR2プロモーターを抑制する因子に変異が入った変異株を単離し、その原因遺伝子を同定した。

4. 研究成果

単離された低rDNAコピーの状態でもSIR2遺伝子を抑制できない変異株の原因遺伝子を、次世代シーケンサーで全配列決定により同定した。その結果、興味深いことに全てが同じタンパク質複合体の構成因子の変異であった。それはUAF(Upstream Activating factor)というrDNAのプロモーターに結合する転写活性化因子複合体であった。UAFは6種の因子(UAF30、ヒストンH3、ヒストンH4、Rrn5、Rrn9、Rrn10)からなる複合体で、これまではrDNAのプロモーターに結合しRNAポリメラーゼIをリクルートする因子として知られていた。そこでまずUAFの結合部位を全ゲノムについて調べたところ、rDNAとSIR2のプロモーターのみが結合部位として同定された。さらに興味深いことには、UAFのSIR2プロモーターへの結合は、低rDNAコピー株での

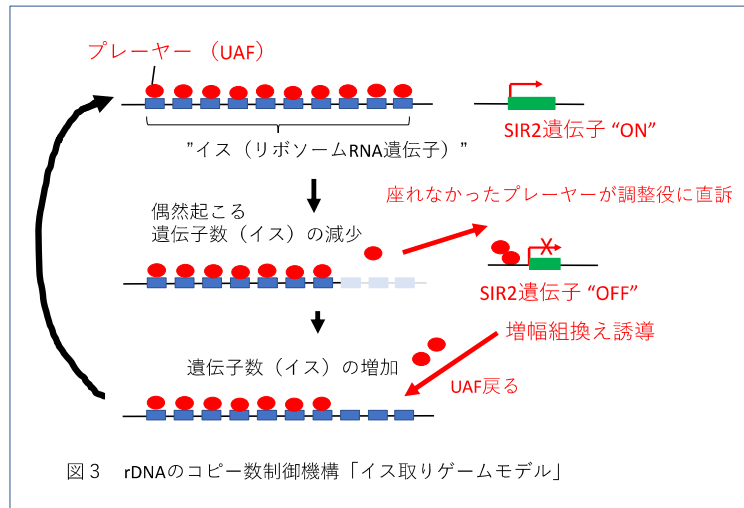
み検出された。一方 UAF の rDNA プロモーターへの結合は常に見られた。

以上の結果から、UAF による rDNA コピー数調節機構を説明するために「rDNA コピー数調節の椅子取りゲームモデル」を提唱した(図3)。モデルでは、コピー数が正常の細胞では、「プレイヤー」である UAF が全員座れる「椅子」(rDNA のコピー)が存在する。偶然 rDNA コピー数が減

少する(椅子が減ると)あぶれたプレイヤー(UAF)が、もう一つの「第2の結合部位」である *SIR2* のプロモーターに移動し、その発現を低下させる(図3の2段目)。すると *Sir2* に抑えられていた *E-pro* が活性化し、遺伝子増幅が誘導され、コピー数(椅子の数)が元に戻る。*SIR2* プロモーターに結合していた UAF は「第1の結合部位」である rDNA に戻り、再び *SIR2* は転写を再開し、*E-pro* を抑え、増幅組換えを停止する。以上のように UAF が伝達役となり *Sir2* の発現量を介して rDNA のコピー数が一定に保っている。

このモデルが正しければ、UAF の量が増えるとその分椅子が多く必要、つまりコピー数が高い状態で維持されるはずである。実際に全ての UAF の遺伝子を2倍にすると rDNA のコピー数も増加してそのレベルで安定に維持された。以上のことからこのモデルはおそらく正しく、しかも UAF の量が rDNA のコピー数を決定していることが判明した。

今回私たちが実験に用いた出芽酵母は約 150 コピーの rDNA をもつ。その数がいつもモニターされ維持されているということは、この酵母は 150 まで数が数えられることになる。酵母以外の生物も種により決まった rDNA のコピー数が維持されているので、同様のモニターメカニズム、つまり数を数えて維持する機構、が存在すると推察される。今後解析する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Goto, M., Sasaki, M., and Kobayashi, T.	4. 巻 41
2. 論文標題 The S-Phase Cyclin Clb5 Promotes rRNA Gene (rDNA) Stability by Maintaining Replication Initiation Efficiency in rDNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol. Cell. Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00324-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Iida, T. and Kobayashi, T.	4. 巻 96
2. 論文標題 Establishment of an “in saccharo” experimental system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 107-118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.21-00004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Iida, T. and Kobayashi, T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Evaluation of repair activity by quantification of ribonucleotides in the genome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 555-569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12871	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yanagi, S, Iida, T and Kobayashi, T.	4. 巻 -
2. 論文標題 RPS12 and UBC4 are related to senescence signal production in ribosomal RNA gene cluster	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol,	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mcb.00028-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hosoyamada, S., Sasaki, M., and Kobayashi, T.	4. 巻 40
2. 論文標題 The CCR4-NOT complex maintains stability and transcription of ribosomal RNA genes by repressing anti-sense transcripts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol. Cell. Biol.	6. 最初と最後の頁 e0032-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00320-19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mostofa M.G, Morshed, S., Shibata, R., Takeichi, Y., Rahman, M.A., Hosoyamada, S, Kobayashi T, and Ushimaru T.	4. 巻 28, 3423-3434
2. 論文標題 rDNA condensation promotes rDNA separation from nucleolar proteins degraded for nucleophagy after TORC1 inactivation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3423-3434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.08.059.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wakatsuki, T., Sasaki, M., and Kobayashi, T.	4. 巻 94
2. 論文標題 Defects in the NuA4 acetyltransferase complex increases stability of the ribosomal RNA gene and extends replicative lifespan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes Genet. Systems	6. 最初と最後の頁 197-206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.19-00022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horigome, C., Unozawa, E., Ooki, T., and Kobayashi, T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Ribosomal RNA gene repeats associate with the nuclear pore complex for maintenance after DNA damage.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Genet.	6. 最初と最後の頁 e1008103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iida, T. and Kobayashi, T	4. 巻 73
2. 論文標題 RNA Polymerase I activators count and adjust ribosomal RNA gene copy number	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 645-654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2018.11.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hizume Kohji, Endo Shizuko, Muramatsu Sachiko, Kobayashi Takehiko, Araki Hiroyuki	4. 巻 32
2. 論文標題 DNA polymerase -dependent modulation of the pausing property of the CMG helicase at the barrier	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 1315 ~ 1320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201706164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mostofa, M. G., Rahman, M. A., Koike, N., Yeasmin, A. M., Islam, N., Waliullah, T. M., Hosoyamada, S., Shimobayashi, M., Kobayashi, T., Hall, M. N., and Ushimaru, T.	4. 巻 217
2. 論文標題 CLIP and cohibin separate rDNA from nucleolar proteins destined for degradation by nucleophagy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cell Biology	6. 最初と最後の頁 2675-2690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201706164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki M., Kobayashi T	4. 巻 66
2. 論文標題 Ctf4 Prevents Genome Rearrangements by Suppressing DNA Double-Strand Break Formation and Its End Resection at Arrested Replication Forks.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 533-545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2017.04.020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi, T, Sasaki M	4. 巻 17
2. 論文標題 rDNA stability is supported by many "Buffer genes" -Introduction to the Yeast rDNA Stability Database.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEMS Yeast Research	6. 最初と最後の頁 fox001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsyr/fox001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watada, E., Li, S., Hori, Y, Fujiki, K., Shirahige, K., Inada, T., and Kobayashi, T.	4. 巻 40
2. 論文標題 Age-dependent ribosomal DNA variations in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol. Cell. Biol.	6. 最初と最後の頁 e00368-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00368-20	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 20件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Takehiko Kobayashi
2. 発表標題 Budding yeast as an aging model system
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 武彦
2. 発表標題 実験システムとしての酵母 - 老化研究を例に
3. 学会等名 酵母合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takehiko Kobayashi
2. 発表標題 DNA replication initiation affects stability of ribosomal RNA gene repeat and lifespan
3. 学会等名 Cold Spring Harbor, Asia meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯田哲史
2. 発表標題 ゲノム修復から見るゲノム安定性のプロファイル
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tetsushi Iida
2. 発表標題 Understanding the Genome Stress Response as a Cellular Risk Management System
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯田哲史
2. 発表標題 出芽酵母が適正なゲノム構造を維持するための記憶の分子機構
3. 学会等名 日本遺伝学会第 92 回大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林武彦
2. 発表標題 寿命はなぜ決まっているのか
3. 学会等名 九州大学公開セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林武彦
2. 発表標題 Stability of ribosomal RNA gene repeat and cellular senescence
3. 学会等名 International symposium on DNA Damage Response & Human Disease（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林武彦
2. 発表標題 寿命はなにが決められているのか
3. 学会等名 大隅科学創生財団第4回創発セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林武彦
2. 発表標題 寿命はなぜ決まっているのか？
3. 学会等名 千里ライフサイエンスフォーラム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林武彦
2. 発表標題 Ribosomal RNA gene instability, accumulation of circular DNA and cellular senescence
3. 学会等名 Circular DNA in normal development and disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林武彦
2. 発表標題 ゲノムの安定性と細胞老化
3. 学会等名 第63回日本生殖医学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細山田舜、佐々木真理子、小林武彦
2. 発表標題 反復配列の安定性を維持するRNA分解機構
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林武彦
2. 発表標題 遺伝学はこんなに面白い
3. 学会等名 日本遺伝学会市民公開講座 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林武彦
2. 発表標題 Non-coding transcription and maintenance of ribosomal RNA gene cluster
3. 学会等名 IFOM, Italy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林武彦
2. 発表標題 ハダカデバネズミから学ぶ長生きの秘訣
3. 学会等名 第一回 寺deサイエンス (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林武彦
2. 発表標題 Degradation of non-coding transcripts maintains rDNA stability and transcription
3. 学会等名 3R (Replication, Recombination and Repair) meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林武彦
2. 発表標題 Non-coding transcription and maintenance of ribosomal RNA gene cluster
3. 学会等名 EMBO meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Kobayashi
2. 発表標題 Non-coding transcription induces rDNA instability and cellular senescence
3. 学会等名 Naito conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Kobayashi
2. 発表標題 Studies of the ribosomal DNA repeats
3. 学会等名 GSA early carrier symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Kobayashi
2. 発表標題 Reprogramming in yeast
3. 学会等名 Columbia University seminar series (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Kobayashi
2. 発表標題 rDNA stability and cellular senescence
3. 学会等名 Memorial Sloan Kettering Cancer Center seminar series (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林武彦
2. 発表標題 リボソームRNA遺伝子のコピー数調節機構
3. 学会等名 DNA 複製、組換え、修復ワークショップ
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林武彦
2. 発表標題 寿命を決める非コードRNAの機能
3. 学会等名 日本分子生物学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 日本遺伝学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 456
3. 書名 改訂 遺伝単	

1. 著者名 堀優太郎、小林武彦、その他	4. 発行年 2022年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 460
3. 書名 生物の寿命延長 ~老化・長寿命の基盤研究最前線~	

1. 著者名 Mariko Sasaki and Takehiko Kobayashi、その他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Humana press	5. 総ページ数 557
3. 書名 HOMOLOGOUS RECOMBINATION: METHODS AND PROTOCOLS	

1. 著者名 小林武彦	4. 発行年 2017年
2. 出版社 講談社ブルーバックス	5. 総ページ数 206
3. 書名 DNAの98%は謎 生命の鍵を握る「非コードDNA」とは何か	

1. 著者名 日本遺伝学会	4. 発行年 2017年
2. 出版社 NTS	5. 総ページ数 371
3. 書名 遺伝単	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 人工染色体ベクターおよびその用途	発明者 小林武彦、飯田哲史	権利者 東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-039614	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

小林研究室
https://tako-lab.net
東京大学定量生命科学研究所
http://www.iam.u-tokyo.ac.jp

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	飯田 哲史 (Iida Tetsushi)		
研究協力者	佐々木 真理子 (Sasaki Mariko)		
研究協力者	堀籠 智洋 (Horigome Chihiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------