

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06056

研究課題名(和文)細胞の老化と若返りを支配するリボソームRNA遺伝子の不等分配に関する研究

研究課題名(英文) Asymmetric inheritance of ribosomal DNA that governs cellular aging and rejuvenation

研究代表者

堀籠 智洋 (Horigome, Chihiro)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：10771206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに我々は、出芽酵母においてリボソームRNA遺伝子(rDNA)に生じたDNA二本鎖切断が、核膜孔複合体まで移動して結合することを明らかにしている。本研究では、核膜孔とrDNAの結合を失う酵母株においてrDNAが不安定化することを明らかにした。また核膜孔とrDNAの結合には、DNA損傷チェックポイントタンパク質や、rDNAと核膜を橋渡しする機能を持つCohibinなどが必要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で注目している核膜孔とリボソームRNA遺伝子は、ヒトを含む全ての真核生物に保存されている細胞核構造および遺伝子である。酵母ではリボソームRNA遺伝子の安定性が細胞寿命をコントロールしていることが示唆されているが、ヒトの早期老化症の解析では核膜そしてゲノムの安定性がヒトの老化抑制に重要であることが示唆されている。本研究により明らかになった損傷を受けたリボソームRNA遺伝子が核膜孔に結合して安定化される機構は、酵母とヒトの老化の共通性を明らかにし、真核生物の寿命を支配する機構の包括理解につながる研究に発展すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We have shown that the ribosomal RNA genes (rDNA) in budding yeast are recruited to the nuclear pore upon the induction of DNA double-strand break. In this study, we found that rDNA stability was reduced in strains where this association with the nuclear envelope was prevented.

We further showed that rDNA binds to the nuclear pore in a manner dependent on DNA damage checkpoint kinase Tel1 and cohibin which associates rDNA to the nuclear envelope to maintain rDNA stability. We speculate that damaged rDNA is sequestered 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：酵母 リボソームRNA遺伝子 核膜 クロマチン動態 老化 若返り

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リボソーム RNA 遺伝子 (ribosomal RNA gene, ribosomal DNA: rDNA) は、真核生物ゲノムにおいて最大の反復配列を形成する。rDNA は核膜との結合によって安定に維持されており、その不安定化は細胞を老化させて寿命の短縮を導く。興味深いことに出芽酵母の細胞分裂では、母細胞に不安定な rDNA が分配されて老化が誘導され、娘細胞では安定な rDNA が分配されて寿命がリセットされる、という不等分裂がみられる。

rDNA は酵母ゲノムの約 12% を占める長大な反復配列であり、DNA 二本鎖切断のホットスポットである。われわれは rDNA が、DNA 二本鎖切断依存的に核膜孔に結合して安定に保たれていることを見出していた。rDNA と核膜孔の結合機構およびその寿命への影響は未解明であった。

### 2. 研究の目的

出芽酵母の細胞分裂では、母細胞が不安定な rDNA を引き受け、安定な rDNA を娘細胞に引き渡す機構が存在すると考えられる。rDNA の安定性は寿命と密接に関連していることが示されており、この rDNA の不等分配こそが母細胞・娘細胞における老化と若返りの原因である可能性がある。われわれは、損傷を受けた rDNA と結合する核膜孔がこのような不等分配に関与している可能性があると考えた。本研究では以下に示す二点の課題について解析を行い、『核膜と rDNA の結合が細胞老化と若返りの機構を支配している』という独自の仮説の正否を明らかにすることを目的とした。

課題 1 核膜が rDNA 安定化に果たす役割の解明

課題 2 マイクロ流体チップを用いた「老化・若返りの瞬間」の解析

### 3. 研究の方法

課題 1 核膜が rDNA 安定化に果たす役割の解明

本研究では、核膜孔と rDNA の結合を失わせる *nup120* 欠損株を用いて rDNA 安定性、そして寿命への影響を見る。寿命測定にはマイクロ流体チップを用いる。これまで主流であったマニピュレーターを用いた測定方法では解析に数週間かかったところを、マイクロ流体チップでは約 4 日間で寿命に関するデータを取得できる。

様々な変異株を用いて核膜と rDNA の結合に影響が出るか解析して、核膜と rDNA の結合に必要な因子を同定する。これまでに DNA 二本鎖切断と核膜の結合に欠陥を持つことが報告されている変異株や、rDNA が不安定化することが示されている変異株などが試験対象となる。

複数の核膜領域が rDNA 安定化に相補的に機能する場合、変異株を用いた解析ではその表現型が見えてこないことがある。そこでわれわれは、機能付加型のモデル実験系によっても解析を行う。rDNA 配列に LexA 結合配列を導入し、さらに LexA 融合型の Nup84 および Mps3 を発現させることで人為的に rDNA を核膜に結合させる。この株により rDNA の安定性と細胞寿命に正の作用が見られるか解析する。

課題 2 マイクロ流体チップを用いた「老化・若返りの瞬間」の解析

不安定な rDNA を持つ老化した母細胞から、安定な rDNA を持った娘細胞が生まれる瞬間を蛍光顕微鏡観察する。われわれは 150 コピーの rDNA リピート全てに *lacO* 配列を組み込み、LacI-GFP の共発現により rDNA を可視化できる酵母細胞株を作製し、生きた細胞での rDNA の局在解析を可能にしている。この rDNA 可視化細胞をマイクロ流体チップに捕捉させ、チップ上で分裂を繰り返させる。新たに分裂した娘細胞は培地とともに流れ去り、チップ上の捕捉トラップには老化してゆく母細胞だけが残るようになっている。このようにして多数の老化細胞を得ることができ、それを用いて rDNA と DNA 損傷のマーカー (Rad52、Mre11 など) との共局在の解析や、rDNA が不安定になると染色体から切り出されて生じる extrachromosomal rDNA circle (ERC) の出現について顕微鏡解析する。また、rDNA の損傷が分裂の瞬間に母細胞に留まるのかなどについて DNA 損傷マーカーを指標とした定量的顕微鏡法により解析する。ハイスループットな解析ができるよう、自動化したシステムで、3 次元かつ経時的に数千細胞を撮影する。

マイクロ流体チップを用いた解析のバックアップとして、細胞をビオチン標識して老化細胞を選別する方法を用い、顕微鏡解析を行う。ビオチン標識した細胞を分裂させて老化させたのち、ストレプトアビジン・マグネットビーズを用いて捕捉、洗浄をくりかえすことにより選別する。マイクロ流体チップを用いた方法のようなハイスループットな解析は難しいが、数十細胞での老化細胞の分裂観察は可能である。

## 4. 研究成果

### 課題1 核膜が rDNA 安定化に果たす役割の解明

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。この結合は複製複合体 Tof1 および DNA 損傷チェックポイントキナーゼ Mec1/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 の核膜孔結合の要因であることが示唆された。さらに、rDNA の安定化に機能することが分かっていた Sir2 や cohibin (Csm1, Lrs4) と呼ばれるタンパク質も核膜孔への結合に必要であることを示した。Cohibin は核膜タンパク質 Src1 および Nur1 と rDNA を繋ぐ橋渡しタンパク質であることが知られている。このことから、損傷を受けた rDNA の核膜結合には、核膜孔と核膜タンパク質が協調的に機能している可能性が示された。rDNA と核膜孔の結合に欠陥を持つ変異株において rDNA の安定性が低下したことから、核膜結合は rDNA の安定性維持に寄与していることが示唆された。興味深いことに、核膜孔と同様、DNA 二本鎖切断の核膜結合部位として知られる核膜 SUN ドメインタンパク質 Mps3 は rDNA の安定性には寄与しなかった。また、rDNA にエンドヌクレアーゼ I-SceI を用いて人為的に DNA 二本鎖切断を誘導したところ、切断を受けた rDNA が核膜に移動することが定量的顕微鏡解析により示された。

これらの成果を雑誌 *PLoS Genetics* に投稿し、平成 31 年 4 月に入り受理された。また、雑誌 *Current Genetics* にてその内容の科学的な位置づけを解説した (図 1)。

rDNA に *lacO* 配列を導入した株においてさらに LacI 融合型の Nup84 を発現させる機能付加型のモデル実験を行った。パルスフィールドゲル電気泳動による解析により、この株では rDNA の安定性に変化は見られないことが分かった。顕微鏡観察の結果、rDNA の核膜結合が見られなかったことから、この株では LacI 融合型の Nup84 による人為的核膜結合が不十分であり、そのため rDNA 安定性に変化が見られなかった可能性がある。

この研究の次の展開として、核膜と rDNA の結合が酵母分裂寿命に及ぼす影響を調べるためマイクロ流体チップを用いた解析を試みた。マイクロ流体チップでの寿命測定は野生株などにおいては成功したが、娘細胞が母細胞から離れる前に次の分裂が始まる一部の変異株 (*nup120* 欠損株など) においては技術的に解析が困難であることが明らかとなった。現在、チューリップ型から Y 字型にマイクロ流体チップのトラップの設計を変更して、寿命測定を行っている。また、ピオチン標識した細胞を分裂させて老化させたのち、ストレプトアビジン・マグネットビーズで選別する方法を改良して、マイクロ流体チップよりも高効率な寿命解析法の実現にむけて研究を進めている。

### 課題2 マイクロ流体チップを用いた「老化・若返りの瞬間」の解析

マイクロ流体チップを用いてロードする菌体量や液体培地の流速の最適化を行い、野生株において長時間培養し細胞寿命まで観察する技術を確認した。ただしマイクロ流体チップでは、細胞質分裂後の娘細胞が流れ去るため観察できず、また細胞死物分裂前の娘細胞も培地の流れにより常に動きをもっており、娘細胞に着目した若返りの解析が難しいことが分かった。

そこで計画でも予定していた細胞をピオチン標識して老化細胞を選別するバックアップの方法を中心に「老化・若返りの瞬間」の解析を進めることとした。顕微鏡解析により、老化細胞において rDNA 結合タンパク質 Net1 が蓄積すること、それが娘細胞に受け継がれないで母細胞に残る不均等分配を示した。酵母の細胞分裂では、rDNA が染色体外環状 DNA (ERC) として放出され、それが母細胞に偏って蓄積・増幅されることにより老化が誘導されると考えられている。われわれの顕微鏡解析では、Net1 の蛍光強度の違いとして ERC の不均等分配つまり老化と若返りの瞬間をとらえることが出来たと考えられ、今後、この不均等分配が何に依存しているかの解析が必要である。

rDNA の長さや安定性を顕微鏡下で定量解析する技術の確立も進めた。rDNA リピート全てに *lacO* 配列を組み込み、LacI-GFP の共発現により rDNA を可視化できる酵母細胞株を用い、蛍光顕微鏡下で rDNA リピートの長さを蛍光強度として定量する技術を確認した。この方法では 11 コピーと 14 コピーの rDNA の長さの違いも有意にとらえることが可能であった。また経時的蛍光顕微鏡観察と蛍光強度の解析により、rDNA の DNA 複製される様子を 1 細胞レベルで追跡できることを明らかにした。

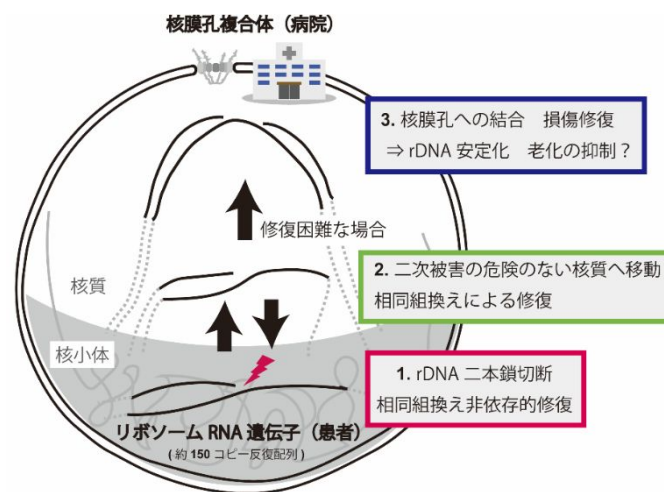


図 1. リボソーム RNA 遺伝子は核膜孔へ移動して、安定に保たれる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horigome Chihiro, Unozawa Eri, Ooki Takamasa, Kobayashi Takehiko	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 Genetics	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 Chihiro Horigome and Takehiko Kobayashi	4. 巻 66
2. 論文標題 Rejuvenation of ribosomal RNA gene repeats at the nuclear pore	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 7-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00294-019-01024-3	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 Kitagawa Saho, Kusakabe Masayuki, Takahashi Daisuke, Narimiya Takumi, Nakabayashi Yu, Seki Masayuki, Horigome Chihiro, Harata Masahiko	4. 巻 86
2. 論文標題 Analysis of the molecular evolution of histone variant H2A.Z using a linker-mediated complex strategy and yeast genetic complementation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 104 ~ 108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab190	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 折原行希、高橋大輔、小西辰紀、岡田大和、尾間由佳子、島田健士、Susan M. Gasser、原田昌彦、堀籠智洋
2. 発表標題 DNA損傷依存的な姉妹染色分体間接着には核膜孔との結合が必要である
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田大和、折原行希、高橋大輔、小西辰紀、尾間由佳子、島田健士、Susan M. Gasser、原田昌彦、堀籠智洋
2. 発表標題 DNA損傷誘導性姉妹染色分体間接着には損傷部位と核膜孔との結合が必要である
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部 第156回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀川和希、原田昌彦、堀籠智洋
2. 発表標題 老化した出芽酵母におけるDNA二本鎖切断の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部 第156回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田大和、折原行希、高橋大輔、小西辰紀、尾間由佳子、島田健士、Susan M. Gasser、原田昌彦、堀籠智洋
2. 発表標題 DNA損傷依存的な姉妹染色体分体間接着には核膜孔との結合が必要である
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀川和希、原田昌彦、堀籠智洋
2. 発表標題 老化した出芽酵母における DNA 二本鎖切断の核膜結合に関する解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 折原行希, 高橋大輔, 小西辰紀, 尾間由佳子, 島田健士, Susan M. Gasser, 原田昌彦, 堀籠智洋
2. 発表標題 DNA損傷依存的な姉妹染色分体間接着への核膜孔の関与
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021 年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 折原行希, 高橋大輔, 小西辰紀, 尾間由佳子, 島田健士, Susan M. Gasser, 原田昌彦, 堀籠智洋
2. 発表標題 DNA損傷依存的な姉妹染色分体間接着への核膜孔の関与
3. 学会等名 第38回染色体ワークショップ・第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀籠智洋, 小林武彦
2. 発表標題 細胞の老化と若返りを支配する、リボソームRNA遺伝子の不等分配に関する研究
3. 学会等名 第53回酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀籠智洋, 鶴之沢英理, 大木孝将, 小林武彦
2. 発表標題 DNA二本鎖切断を受けたリボソームRNA遺伝子は核膜孔に結合して安定化される
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀籠智洋、鶴之沢英理、大木孝将、小林武彦
2. 発表標題 DNA二本鎖切断を受けたリボソームRNA遺伝子は核膜孔に結合して安定化される
3. 学会等名 第52回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chihiro Horigome
2. 発表標題 The ribosomal RNA gene repeat associates with the nuclear pore complex after DNA damage during replication
3. 学会等名 The 11th 3R+3C Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>【新聞報道】「老化と若返りの鍵を握る遺伝子」は、自ら病院を訪れ、治療を受ける  <a href="http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/news/20190524/">http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/news/20190524/</a></p>
--

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

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
---------	---------