

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05790

研究課題名(和文) 慢性的DNA損傷ストレス耐性におけるリボソームの役割

研究課題名(英文) Exploration of the novel function of the ribosome in tolerance to chronic DNA damage stress

研究代表者

赤沼 元気 (Genki, Akanuma)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：30580063

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)：DNA損傷ストレスが出芽酵母のリボソームに与える影響を調査した結果、DNA損傷ストレスはリボソームの翻訳活性を低下させること、DNAストレス条件下では、パラログタンパク質と入れ替わるリボソームタンパク質が存在する可能性が示された。また、リボソームタンパク質欠損株はパラログタンパク質がコードされている染色体の異数化によって増殖速度が回復すること、それによってDNA損傷ストレス耐性が低下することが分かった。さらに、リボソームタンパク質の欠損により染色体分配異常が生じやすくなり、結果としてサプレッサー変異株の出現頻度が向上することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、DNA損傷ストレスがリボソームの活性や複合体の構成に影響を与えることが明らかになった。この成果はこれまであまり注目されていなかったリボソームとゲノム安定性との関係を示すものであり、新たな研究分野に発展する可能性を秘めている。また、リボソームタンパク質の欠損が染色体分配異常を引き起こすとともに、パラログ遺伝子の重複により細胞内翻訳活性を補完するという新たな発見は、染色体恒常性維持にリボソームが重要な役割を果たすことを示すとともに、異数化による遺伝子機能相補の一般性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Investigation of the effects of DNA damage stress on the ribosomes of budding yeast showed that DNA damage stress reduces the translational activity of ribosomes and that under DNA stress conditions there may be ribosomal proteins that are replaced by paralogous proteins. In addition, deletion mutant of ribosomal protein gene recovered their growth rate by aneuploidy of the chromosome encoding the paralog protein, thereby reducing their DNA damage stress tolerance. In addition, it was found that ribosomal protein deficiency increases the susceptibility to chromosomal partitioning abnormalities, resulting in an increased frequency of suppressor mutant strains.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：リボソーム

### 1. 研究開始当初の背景

自然界には様々な DNA 損傷ストレスが存在し、それを受ける細胞内では日常的に DNA 損傷が起きている。そこで生物はゲノムの安定性を維持しながら増殖する能力、即ち DNA 損傷ストレス耐性を進化の過程で獲得してきた。その一方で、長期に渡る DNA 損傷ストレスへの曝露は、むしろゲノム不安定性を引き起こすことが知られており、ヒトの発がんや老化の主要因となっている。したがって人類の健康維持を考える上でも、細胞の DNA 損傷ストレス耐性機構を理解することは極めて重要な課題であると言える。

当研究室では慢性的な低レベル紫外線 (CLUV) 環境下で酵母細胞を培養できる実験系を開発した。この系を活用した研究により、従来の急性紫外線照射条件下ではヌクレオチド除去修復 (NER) 経路が生存に必須であるのに対して、CLUV 環境下では DNA 複製阻害の解消に関与する DNA 損傷トレランス (DDT) 経路や DNA 相同組換え (HR) 経路が増殖に必須であることが分ってきた。つまり生物は、DNA 損傷ストレスに対して、NER、DDT、HR に加え、細胞周期制御機構を複合的に機能させることで耐性を獲得しているが、受けるストレスの強度や時間の違いによって適応戦略を複雑に変化させていると言える。しかし、これらの適応戦略を制御するメカニズム、特に細胞質からのシグナル経路については不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

DNA の損傷と修復は核内で起こるイベントだが、損傷ストレス耐性には核外の機能も重要であることが分ってきた。その一端を担うのがリボソームである。生命活動に欠かせない翻訳機能を担うリボソームは、rRNA とリボソームタンパク質から構成され、真核生物では 40S と 60S サブユニットが会合して翻訳活性を持つ 80S リボソームを形成する。一見すると DNA 損傷ストレス耐性には関与しないように思えるリボソームだが、翻訳特異性の変化や活性制御に加えて、遊離したリボソームタンパク質の翻訳外機能も損傷ストレス耐性に重要であることが分ってきた。例えば、リボソームタンパク質の一つである S3 が直接 DNA 修復に関与することが明らかにされてきた。したがってリボソームを形成するリボソームタンパク質や翻訳制御因子には損傷ストレス耐性機構に関与する未知の因子が多く含まれていることが予想される。そこで本研究では、DNA 損傷ストレスを受けた細胞のリボソームの複合体形成状態変化と、リボソームのタンパク質構成変動を検出するとともに、遺伝的スクリーニングによってストレス耐性因子を同定し、機能解明に取り組むことで、DNA 損傷ストレス耐性に関与する新たな因子を発掘し、その作用機構を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) DNA 損傷ストレスがリボソームの複合体形成状態に与える影響を把握するため、DNA 損傷ストレス存在下で培養した出芽酵母から細胞粗抽出液を調製し、ショ糖密度勾配超遠心法でリボソームを分離した。このときの各サブユニット (40S、60S)、80S リボソーム、polysome (翻訳中の 80S が mRNA に複数結合した状態) の量比を、ストレスを受けていない細胞と比較した。

(2) DNA 損傷ストレスによるリボソームのタンパク質構成変化を明らかにするため、DNA 損傷ストレス存在下で培養した出芽酵母から 80S フラクシオンを調製し、80S リボソームを構成するタンパク質を RFHR 二次元電気泳動で分離、比較した。検出されたタンパク質は MALDI-TOF/MS で質量分析し、データベースと照合することで同定した。

(3) 遺伝的スクリーニングにより DNA 損傷ストレス耐性因子を同定するため、出芽酵母の遺伝子破壊株ライブラリーを用いて、DNA 損傷ストレス耐性に関わるリボソームタンパク質を探索した。出芽酵母ゲノムにはリボソームタンパク質をコードする遺伝子が 137 種存在するが、このうち 116 種が細胞増殖に必須ではないことが分っている。そこでこの 116 種の破壊株を対象に、DNA 損傷ストレス存在下における細胞増殖への影響を観察した。

### 4. 研究成果

(1) DNA 損傷ストレスが出芽酵母のリボソームに与える影響を調査するため、DNA 損傷剤である MMS を培地に添加した際のリボソーム複合体形成状態と、リボソームタンパク質の構成変化を観察した。低濃度の MMS (0.005%) を添加した条件では複合体形成に影響は見られなかったが、0.03% まで MMS 濃度を増加させた場合、細胞内翻訳活性の指標となるポリソーム量の減少が認められた (図 1)。その一方で 80S を含むリボソームの総量は大きく低下しなかったことから、DNA 損傷ストレス条件下ではリボソームが翻訳抑制制御を受けることが示唆された。

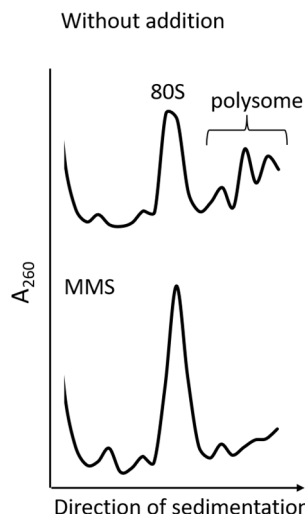


図 1. DNA 損傷ストレスによる翻訳抑制効果

(2) リボソームの複合体形成に影響が見られた条件において、

80S リボソーム及び polysome フラクションを精製し、RFHR 二次元電気泳動法により分離した。しかし、DNA 損傷ストレスの有無に関わらず、リボソームタンパク質の泳動パターンに大きな変化は認められなかった。ただし、検出されたタンパク質スポットを MALDI-TOF/MS を用いて同定したところ、DNA 損傷ストレス後にはパラログタンパク質が含まれるスポットがいくつか検出された。この結果は、DNA ストレス条件下でパラログタンパク質と入れ替わるリボソームタンパク質が存在することを示唆するものである。

(3) 出芽酵母の遺伝子破壊株ライブラリーを用いてリボソームタンパク質欠損株の MMS 感受性を調査した結果、L42B を含むいくつかのリボソームタンパク質欠損株で影響が認められた(図2)。そこで L42B 欠損株についてさらに解析を進めたところ、ライブラリーの L42B 欠損株には増殖速度を回復させるサプレッサー変異 (*sl42B*) が含まれていたこと、およびサプレッサー変異によって MMS 感受性が引き起こされていたことが判明した。このサプレッサー変異には L42B のパラログである L42A 発現量を促進し、リボソーム量を回復させる効果が認められた。さらに詳細なゲノム解析から、サプレッサー変異が L42A 遺伝子を含む 14 番染色体が重複して存在する、いわば異数化であることが分かった。

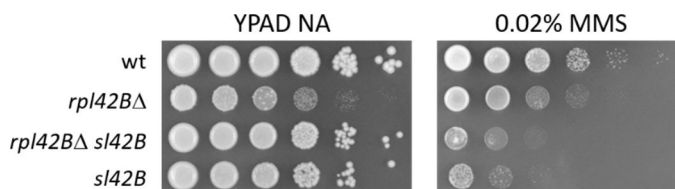


図2. L42B サプレッサー変異 (*sl42B*) による DNA 損傷剤感受性向上

出芽酵母は通常 1 倍体として増殖するが、2 倍体化することで環境に適応する例が知られている。L42B 欠損株でも 2 倍体化によりパラログ遺伝子が 2 コピーとなるため、増殖速度の回復が予想されるが、L42B 欠損株から細胞増殖速度が回復した 2 倍体は得られていない。そこで、2 倍体細胞の L42B と L42A の遺伝子コピー数を制限した株を作製して調査した。L42A 遺伝子のみ 2 コピー保持する 2 倍体株の増殖速度は 1 倍体の L42B 欠損株とほとんど変わらず、80S や polysome の含有量の増加も認められなかった。恐らく 2 コピーの L42A 遺伝子では 2 倍体細胞に十分な量のリボソームタンパク質を供給できないことが原因と考えられる。つまり、出芽酵母のリボソームタンパク質欠損株のサプレッサー変異体の多くは異数化するものと予想した。これらの結果を受け、リボソームタンパク質 L42B 欠損株以外にも、5 種のリボソームタンパク質欠損株について、染色体異数化による増殖速度回復が見られるかを検討し、全てのサプレッサー変異株でパラログ遺伝子がコードされている染色体が倍加していることを PFGE によって確認した(図3)。これらの株では、DNA 損傷剤や複製阻害剤への感受性増加が認められたが、感受性増加の程度は株によって大きく異なっており、増加した染色体とパラログ遺伝子の種類によって DNA 損傷ストレス耐性への影響は変化すると考えられた。

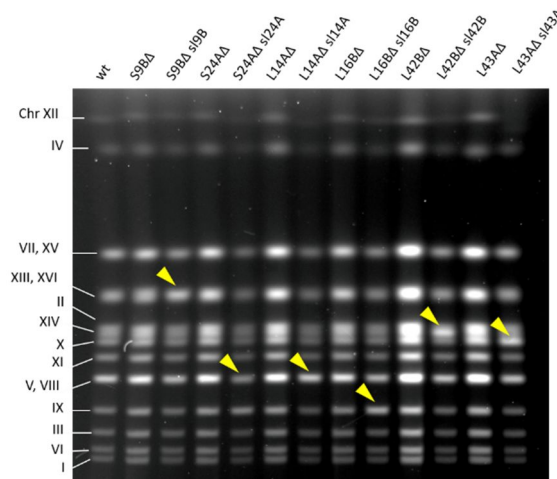


図3. PFGE によるリボソームタンパク質欠損 サプレッサー変異株の染色体異数化確認

リボソームタンパク質欠損株のサプレッサー変異体の出現頻度は、元株とサプレッサー変異株の増殖速度の差から正確には求められないが、 $10^{-3}$  ~  $10^{-4}$  程度であり、突然変異頻度と比較して高い頻度で観察された。そこで、リボソームタンパク質欠損により異数化が生じやすくなっていると予想し、二倍体を用いて染色体喪失頻度を指標として評価した。その結果、評価した全てのリボソームタンパク質欠損株で野生株よりも高い頻度で染色体喪失が起きることが分かった。染色体分配異常を起こすメカニズムは解明できていないが、rRNA や tRNA の転写と染色体分配の関係を示す報告があることから、リボソームタンパク質遺伝子欠損によるリボソーム合成量の低下が一因であると考えている。

さらに、L42B 欠損株のサプレッサー変異株では DNA 損傷ストレス耐性が低下するが、この表現型を抑圧する変異株の単離を試みた。サプレッサー変異株から MMS 耐性株を選択し、そこから異数性が解消された株を除いた。これらの株のゲノム塩基配列を次世代シーケンサーで解析したところ、多くの変異がリボソーム合成や翻訳に関わる遺伝子から検出された。今回の結果は細胞の翻訳活性低下がタンパク質の不均衡解消に一定の効果があることを示すものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akanuma Genki, Kawamura Fujio, Watanabe Satoru, Watanabe Masaki, Okawa Fumiya, Natori Yousuke, Nanamiya Hideaki, Asai Kei, Chibazakura Taku, Yoshikawa Hirofumi, Soma Akiko, Hishida Takashi, Kato-Yamada Yasuyuki	4. 巻 203
2. 論文標題 Evolution of Ribosomal Protein S14 Demonstrated by the Reconstruction of Chimeric Ribosomes in <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00599-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00599-20	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 Akanuma Genki	4. 巻 85
2. 論文標題 Diverse relationships between metal ions and the ribosome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1582 ~ 1593
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab070	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 Hayashi Masafumi, Keyamura Kenji, Yoshida Asami, Ariyoshi Mariko, Akanuma Genki, Hishida Takashi	4. 巻 41
2. 論文標題 A Conserved Histone H3-H4 Interface Regulates DNA Damage Tolerance and Homologous Recombination during the Recovery from Replication Stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00044-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00044-20	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 Akanuma Genki, Kawamura Fujio, Watanabe Satoru, Watanabe Masaki, Okawa Fumiya, Natori Yousuke, Nanamiya Hideaki, Asai Kei, Chibazakura Taku, Yoshikawa Hirofumi, Soma Akiko, Hishida Takashi, Kato-Yamada Yasuyuki	4. 巻 203
2. 論文標題 Evolution of Ribosomal Protein S14 Demonstrated by the Reconstruction of Chimeric Ribosomes in <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00599-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00599-20	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 Ohtsuka Hokuto, Kobayashi Mikuto, Shimasaki Takafumi, Sato Teppei, Akanuma Genki, Kitaura Yasuyuki, Otsubo Yoko, Yamashita Akira, Aiba Hirofumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Magnesium depletion extends fission yeast lifespan via general amino acid control activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 MicrobiologyOpen	6. 最初と最後の頁 e1176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mbo3.1176	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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