

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月6日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2012

課題番号：21247003

研究課題名（和文）リボソームRNA遺伝子のゲノムの安定性維持における役割

研究課題名（英文）Roles of the ribosomal RNA gene to maintain genome stability

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) は最も多く存在する遺伝子で、染色体上に 100 コピー以上からなる巨大反復遺伝子群を形成している。rDNA は反復構造故に恒常的に組換え (コピー数変動) を起こす染色体中で最も不安定な領域であり、その動態は少なからず細胞の機能に影響を与えていると考えられてきた。本研究では人為的に rDNA を不安定化させる系を確立し、rDNA の安定性が寿命の長さを左右することを発見した。さらに rDNA は発ガン物質などによる DNA ダメージに対する感受性を決めており、特に転写されない余分なコピーは rDNA 上にできた傷を直す重要な「足場」として働いていることを発見した。また、rDNA のコピー数が染色体の分配速度にも影響を与えていることを解明した。

研究成果の概要（英文）：

The genes encoding ribosomal RNA are the most abundant genes in the eukaryotic genome. They reside in tandem repetitive clusters, in some cases totaling hundreds of copies. Due to their repetitive structure, the ribosomal RNA gene repeats are some of the most fragile sites in the chromosome. The unusual nature of ribosomal RNA gene repeats affects cellular functions. In this study, we established a system in which rDNA stability is artificially manipulated and found that rDNA stability affects the yeast lifespan. In addition, we found that the copy number determines sensitivity to DNA damage, especially, non-transcribed copies function as “foothold” for repair enzymes. Moreover, repeat length affect the chromosome segregation rate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2011年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2012年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
総計	34,200,000	10,260,000	44,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 遺伝・ゲノム動態

キーワード：リボソーム RNA 遺伝子、ゲノムの安定性、細胞老化、染色体分配、出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) は最も多く存在する遺伝子で、染色体上に 100 コピー以上からなる巨大反復遺伝子群を形成している。そこから作られるリボソーム RNA はタンパク質の合成を担うリボソームの構成成分であり、細胞中の RNA の約 80%を占める。そのため rDNA は質、量共に細胞の生育をささえる中心的な遺伝子 (ハウスキーピング遺伝子) である。ただ rDNA の唯一の「弱点」はその反復構造故に恒常的に組換え (コピー数変動) を起こし、染色体中で最も不安定な領域となっていることである。その結果 rDNA の安定性やコピー数は少なからず細胞の機能に影響を与えていると考えられてきたが実体は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では rDNA が染色体最も不安定な領域であることから、リボソーム RNA を生産する以外の機能を持っていると考え、特に 1) 細胞老化、2) ゲノム全体の安定性、3) 染色体分配、へ与える影響について明らかにする。実験はすべて出芽酵母を用いて行った。

3. 研究の方法

これまでに申請者が開発した rDNA のコピー数を人為的に操作する方法を用いて、様々なコピー数や安定性を持つ rDNA を作成し、それらの表現型を解析する。

(1) rDNA が不安定化した株の作成

以前作成した rDNA を 2 コピーまで減少させた株 (これは増幅を防ぐため *FOB1* を破壊してある) の DNA 複製開始点の一部を欠損させ開始活性を弱めて、その後 *Fob1* を供給し増幅を誘導してコピー数を回復させた。この株ではすべての DNA 複製開始点が弱まっており rDNA が不安定化している。さらにこの株では、老化を促進すると考えられている rDNA 環状分子が複製できず出現しないため、rDNA の安定性と老化との直接的関係を

観察することが出来る。

(2) 様々なコピー数を持つ株の作成

申請者らのこれまでの研究で、複製阻害タンパク質 *Fob1* は rDNA の転写終結点近傍に結合し、DNA 複製を阻害することで DNA に 2 本鎖切断を入れ、姉妹染色分体間での不等価組換え (「ずれた」組換え) を誘導し、rDNA コピー数を増加させる働きがあることが判明している。以前作成した rDNA を 2 コピーまで減少させた株 (これは増幅を防ぐため *FOB1* を破壊してある) にプラスミドから *Fob1* を供給し増幅を誘導する。30、80、120 回分裂させた後 *FOB1* プラスミドを除き、様々な rDNA コピー数を安定に持つ株を選び出した。

(3) rDNA 全体が蛍光を発する株の作成

染色体分配等の染色体の細胞周期を通じた「動き」を生きたまま捉えるため、rDNA のすべてのコピーに *lac O* あるいは *tet O* の配列を挿入した株を作成した。方法としてはやはり 2 コピーまで rDNA のコピー数を減らした株を利用して、*lac O* あるいは *tet O* の配列を挿入後、*Fob1* を供給し増幅を誘導する。その結果すべてのコピーに *lac O* あるいは *tet O* の挿入された rDNA を持つ株を作成した。

4. 研究成果

(1) 細胞老化と rDNA の関係

まず rDNA のコピー数と寿命の関係について調べた。30、80、150 コピーの rDNA を有する株の寿命 (分裂回数) を測定した。その結果平均寿命はそれぞれ 24.48、25.26、26.49 回とコピー数の増加に伴い若干のびてはいるが、統計学上、有意差は認められなかった (坂ら、投稿中)。

次に rDNA の不安定性と寿命の関係について調べた。rDNA の複製開始点を削って不安定化させた株では下の図 1 に示すように約 30% の寿命の短縮を観察できた。またこの rDNA 不安定化株の *FOB1* を欠損させ rDNA を安定化

すると寿命が回復したことから、明らかに rDNA の不安定性が原因となり寿命の短縮が引き起こされていると結論した (Ganley et al., 2009, Mol. Cell)。

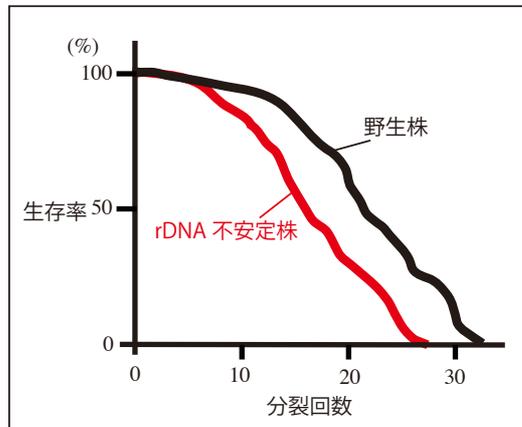


図1 生存曲線。rDNA 不安定化株の寿命は野生株に比べて約 30%短い。

さらにこの結果、つまり rDNA の不安定性が寿命の短縮に関わっていること、から新たな解決しなければならない問題が生じた。それは娘細胞の若返り現象である。出芽酵母は不等分裂で増え、母細胞は分裂の度に老化し約 20 回の分裂で半数以上が死んでしまう。それに対して娘細胞は、リセット (若返り) が起こり新たに 20 回分裂する能力を回復する。もし rDNA の不安定性で老化を説明するとすると、娘の若返り時に rDNA の安定性も娘細胞で回復している必要がある。それを確かめるために、エルトリエーター遠心機で分裂直後の母と娘細胞を分離し、それぞれの rDNA の安定性を調べた。その結果予想通り、rDNA の安定性は娘細胞でのみ完全に回復していた (Ganley et al., 2009, Mol Cell)。現在そのメカニズムについて検討中である。

(2) rDNA とゲノム全体の安定性

次に rDNA の状態がゲノム全体の安定性に与える影響について解析した。rDNA の状態をいろいろ変化した株で発ガン物質等の DNA にダメージを与える物質に対する感受性を調べた。その結果興味深いことに rDNA コピ

一数が減少するに従って DNA ダメージ感受性が上昇した (Ide et al., 2010, Science)。そのメカニズムをさらに詳細に調べたところ、rDNA の転写されていないコピーの減少がこの感受性の増加に関係していることが判明した。出芽酵母の rDNA は約 150 コピーあるがその約半数は転写されていない。ヒトの細胞でも同様な現象が観察されている。この使われていないコピーが一体何の為に存在するのか長年の謎であったが、今回の解析でこれらは DNA のダメージを修復する酵素群の「足場」として重要な働きがあることが判った。さらに rDNA は他のゲノム領域に比べて DNA ダメージに対して脆弱であり、rDNA の安定性がゲノム全体の安定性を決めて、細胞の DNA ダメージに対する感受性も決めていることが判明した。

(3) rDNA のコピー数と染色体分配

最後に rDNA のコピー数が染色体分配に与える影響を調べた。rDNA は組換えを起こしやすい領域で細胞分裂時に最後まで姉妹染色分体が分離せずに残っている領域と考えられている。それを検証するために 2 倍体の酵母で rDNA の乗っている 12 番染色体の 1 本を 150 コピー、もう 1 本を短い 60 コピーに固定してそれぞれ lac0-LacI-GFP と teto-TetR-RFP でラベルして、生細胞で蛍光発色により判別可能にした。その細胞の分裂時の染色体の挙動を観察したところ興味深いことに長い方の染色体が常に分離が遅れることが判明した。

(4) まとめ

今回の研究から当初予想していた通り、rDNA はその脆弱性と巨大さ故に、ゲノム全体の安定性に影響を与える「ゲノムの劣等生」的な存在であることが判った。しかしこの劣等生は足を引っ張るだけではなく、重要な役割も担っていると申請者は考えている。例えば rDNA は DNA ダメージに対して非常に弱くそのため rDNA の感受性が律速段階となって細胞は死んでしまうが、仮に逆に強いと仮定する

と rDNA 以外のところに変異が入り、多細胞生物にとって致命傷であるがん化を引き起こすことになる。老化についても同様であり、rDNA の最初に不安定化し老化を誘導するが、逆に rDNA がなかなか不安定化しないと、確かに寿命は延びるが、同時に他のゲノム領域に変異が入る確率が増え、がん化等の発生病リスクを上昇させる。以上のことから rDNA の脆弱性には実は細胞にとって重要であり、例えて言うなら「ダメージセンサー」としていち早く不安定化し細胞が異常になる前に細胞を殺す働きを持つと考えられる。

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 17 件)

- ① Ide S, Saka K, Kobayashi T. (2013) Rtt109 prevents hyper-amplification of ribosomal RNA genes through histone modification in budding yeast. *PLoS Genet.* 9: e1003410. doi: 10.1371/journal.pgen.1003410. (査読有り)
- ② Iida T., Iida N, Tsutsui Y, Yamao F, Kobayashi T. (2012) RNA interference regulates the cell cycle checkpoint through the RNA export factor, Ptr1, in fission yeast. *BBRC.* 427, 143-147 (査読有り)
- ③ Poole AM, Kobayashi T., Ganley AR. (2012) A positive role for yeast extrachromosomal rDNA circles? *Bioessays.* 34,725-729. doi: 10.1002/bies.201200037 (査読有り)
- ④ Ganley AR, Breitenbach M, Kennedy BK, Kobayashi T. (2012) Yeast hypertrophy: cause or consequence of aging? Reply to Bilinski et al *FEMS Yeast Res.* 12, 267-268. doi: 10.1111/j.1567-1364.2012.00796.x. (査読有り)
- ⑤ 小林武彦 (2012) 「概論-今開かれる非コード DNA 領域の世界」実験医学 30、2202-2208(査読なし)
- ⑥ 小林武彦 (2012) 「rDNA 巨大反復遺伝子群による細胞老化制御」実験医学 30、2228-2233 (査読なし)
- ⑦ Kobayashi T. (2011) How does genome instability affect lifespan?: roles of rDNA and telomeres. *Genes Cells.* 16, 617-624 . doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01519.x (査読有り)
- ⑧ Ganley AR, Kobayashi T. (2011) Monitoring the Rate and Dynamics of Concerted Evolution in the Ribosomal DNA Repeats of *Saccharomyces cerevisiae* Using Experimental Evolution. *Mol Biol Evol.* 28, 2883-2891. doi: 10.1093/molbev/msr117(査読有り)
- ⑨ Miyazaki T, Kobayashi T. (2011) Visualization of the dynamic behavior of ribosomal RNA gene repeats in living yeast cells. *Genes Cells.* 16, 491-502 doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01506.x. (査読有り)
- ⑩ Kobayashi T. (2011) Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. *Cell Mol Life Sci.* 68, 1395-1403. doi:10.1007/s00018-010-0613-2 (査読有り)
- ⑪ Ide S., Kobayashi T. (2010) Analysis of DNA Replication in *S. cerevisiae* by Two-Dimensional and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Curr. Prot. Sup49* UNIT22.14.1-12. doi: 10.1002/0471143030.cb2214s49 (査読有り)
- ⑫ Ide, S., Miyazaki, T., Maki, H., and Kobayashi T. (2010) Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science* 327, 693-696. doi: 10.1126/science.1179044. (査読有り)
- ⑬ Kobayashi T. (2010) A role for an untranscribed gene. *G.I.T.lab.J Europe* 14, 16-18(査読なし)

- ⑭ 小林武彦、井手聖 (2010) 「rDNA のゲノム維持における役割」細胞工学, 29, 895-900. (査読なし)
- ⑮ Ganley ARD, Ide S, Saka K, Kobayashi T. (2009) The effect of replication initiation on gene amplification in the rDNA and its relationship to aging. *Mol. Cell*, 35, 683-693. doi:10.1016/j.molcel.2009.07.012 (査読有り)
- ⑯ 小林武彦 (2009). 「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、54・4、537-542(査読なし)
- ⑰ 小林武彦 (2009) 「リボソーム RNA 遺伝子の新しい機能」化学と生物、47・2、104-110(査読なし)

[学会発表] (計 19 件)

- ① 小林武彦 遺伝研研究会「単細胞システムの構築とその維持機構の研究」2013年3月28~29日、三島
- ② Kobayashi T. "rDNA instability and cellular senescence" The 8th 3R Symposium (招待講演) 2012年11月25~28日 Awaji, Japan
- ③ 小林武彦 「いきものの寿命—ヒトは何歳まで生きられるか—」第12回学習院大学生命科学シンポジウム (招待講演) 2012年11月10日、東京
- ④ Kobayashi T. "DNA stability and cellular senescence" The 34th Japan Society for Biomedical Gerontology Symposium & Micro-Nano Global COE (招待講演) 2012年10月16日 Nagoya, Japan
- ⑤ Kobayashi T. "rDNA instability and cellular senescence" FASEB Yeast, Chromosome Structure, Replication & Segregation (招待講演) 2012年07月15~20日、Steamboat Springs, Co USA
- ⑥ Kobayashi T. "rDNA recombination and cellular senescence" EMBO Workshop Recombination Mechanisms and Genome

- Instability (招待講演) 2012年5月21~25日、Jerez de la Frontera, Spain
- ⑦ 小林武彦 「リボソームRNA遺伝子と細胞老化」日本農芸化学会 (招待講演) 2012年3月25日 京都
- ⑧ 小林武彦 「rDNAの安定性と細胞老化」リボソーム研究会 2012年3月15日、東広島市
- ⑨ 小林武彦 「RTT109はrDNAの異常増幅を防ぐ」染色体ワークショップ2012年1月26日宮城県
- ⑩ Kobayashi T. "Recovery of rDNA stability contributes to rejuvenation in yeast" 日本分子生物学会シンポジウム (招待講演) 2011年12月15日、横浜市
- ⑪ Kobayashi T. "Maintenance of the ribosomal RNA gene repeat and its role in cellular senescence" The 5th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest (招待講演) 2011年10月24日、Okinawa
- ⑫ 小林武彦 「ヒストン修飾とリボソームRNA遺伝子のコピー数制御」酵母遺伝学フォーラム 2011年9月6日、福岡市
- ⑬ Kobayashi T. "Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast "OIST Workshop(QECG2011): Linkage and Recombination in Genome sequences (招待講演) 2011年5月25日、Okinawa
- ⑭ 小林武彦 "A role for an untranscribed gene" 第4回 FANTASY (招待講演)、2011年2月5日、東京
- ⑮ 小林武彦 "A role for an untranscribed gene" 日本分子生物学会年会シンポジウム (招待講演)、2010年12月9日、神戸
- ⑯ Kobayashi T. "Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity in yeast" International Symposium on Fungal and Yeast Cell Biology. (招待講演) 2010年

- 11月28-29日 Auckland, New Zealand
- ⑰ Kobayashi T. “Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity in yeast” The 57th NIBB International conference on “Genome dynamics”. (招待講演) 2010年10月 14-16日 Okazaki, Japan
- ⑱ 小林武彦 「rDNAの安定性の回復が細胞の若返りに関与する」日本分子生物学会年会シンポジウム(招待講演)、2009年12月11日、横浜
- ⑲ Kobayashi T. “Recovery of rDNA stability contributes to rejuvenation in yeast” International Symposium on Chromosome cycle and genome dynamics. (招待講演) 2009年11月10日、Nasu

[図書] (計5件)

- ① 巖佐庸 (2013) 岩波書店 岩波 生物学辞典 第5版 総ページ数 2171
- ② 小林武彦、坂季美子 (2011) 実験医学別冊「核酸実験の原理とプロトコール」羊土社 p85-91
- ③ 小林武彦 (2011) 「核小体の新機能」生体の科学「細胞核-構造と機能」vol. 62 医学書院、p412-415
- ④ 小林武彦 (2011) 「リボソーム RNA 遺伝子の安定性と細胞老化」生体の科学「細胞核-構造と機能」vol. 62 医学書院、p416-417
- ⑤ 小林武彦 (2010) 老化モデル「酵母」新老年学 第3版、2章2. 4、東京大学出版会 p265-271

[その他]

- (1) 受賞 (2件)
- ① 第29回井上學術賞受賞 (2013)
- ② 平成24年度 文部科学大臣表彰(研究部門) 受賞 (2012)
- (2) 研究成果を発表しているホームページ

<http://www.nig.ac.jp/labs/CytoGen/index.html>

(3) 研究成果の新聞報道 (6件)

- ① 朝日新聞(科学面)、「余分な遺伝子は実はDNAを守っていた」2010年2月16日掲載
- ② 科学新聞(2面)、「働かない遺伝子の役割」2010年2月掲載
- ③ 朝日新聞(科学面)、「細胞老化に関与の遺伝子」2009年9月25日掲載
- ④ 東京新聞(科学面)、「細胞老化の鍵ゲノム特定領域に」2009年9月11日掲載
- ⑤ 中日新聞(1面)、「細胞老化に関する遺伝子領域を特定」2009年9月11日掲載
- ⑥ 静岡新聞(科学面)、「細胞若返りの鍵ゲノム領域」2009年9月11日掲載

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 (1名)

飯田 哲史 (IIDA TETSUSHI)
国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教
研究者番号：60391851