

特集：リボソームの機能調節と疾患

I. 核小体・rDNA 構造とリボソーム RNA 転写

I-1 リボソーム RNA 遺伝子の不安定性と生理作用

—出芽酵母を中心にして—

小林 武彦, 赤松 由布子

真核細胞のリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) はゲノムの特徴的な領域の一つで、同じ遺伝子が 100 コピー以上繰り返して存在する。通常、このような反復配列は配列間の組換えや高次構造の形成により複製や分配に異常が起こりやすくコピー数の減少や染色体の不分離を引き起こしやすい。しかし実際には rDNA の安定化機構によりそれぞれの種が固有のコピー数を安定に維持している。本総説では rDNA 安定化機構が最もよく調べられている出芽酵母を例に、その維持機構と細胞老化の関係について概説する。さらにヒトの rDNA と疾患との関係についても最近の知見を含めて紹介する。

1. はじめに

リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) は文字どおりリボソーム RNA の遺伝子である。リボソーム RNA はリボソームの骨格をなす RNA 分子で、タンパク質合成の中樞を担う全生物にとって必須の分子である。リボソーム RNA は量的にも細胞中の全 RNA の約 60% を占める最多の RNA 分子で、加えてその遺伝子 rDNA も真核細胞では最多の 100 コピー以上が存在する。このように rDNA は質、量の両面において最も重要な遺伝子の一つであり、遺伝子の「王様」的存在である。ただこの王様遺伝子にも弱点があり、それはその構造と巨大さゆえに不安定なゲノム領域になることである。本稿ではその不安定性に対抗してコピー数を維持するメカニズム、さらには rDNA の不安定性が引き起こす細胞老化機構について紹介する。

2. rDNA の構造は非常にユニーク

真核生物の rDNA は巨大直列反復構造である。ここでは一番よく調べられている出芽酵母を例に解説する。出芽酵母の rDNA は 12 番染色体に約 1.4 Mb の巨大反復遺伝子群 (クラスター) を形成している (図 1)。これは酵母ゲノムの約 12% に相当する量である。一つの反復単位は 9.1 kb で、これが直列に繰り返して約 150 個存在する。一つの反復単位には二つの遺伝子 (35S と 5S rDNA) と二つの非コード領域 (IGS1, 2: intergenic spacer 1, 2) が存在し、RNA ポリメラーゼ I によって 35S rDNA から転写される 35S rRNA 前駆体はその後プロセッシングを受け三つの rRNA (18S, 5.8S, 25S) となり、RNA ポリメラーゼ III によって転写される 5S rRNA とともにリボソームの構成成分となる。また 150 コピーすべてが転写されているわけではなく、約半分は激しく転写されるが、残りはまったく転写されていないことが電子顕微鏡により観察されている¹⁾。最近の筆者らの研究により、転写されていないコピーは DNA 修復酵素の足場となり、rDNA にできた傷の修復に必須の役割を担っていることが判明している²⁾。そのためコピー数を減らし転写されないコピーをなくした株では、紫外線や DNA 損傷薬剤に対して高感受性になる。つまりいわゆる発がん物質のような薬剤に対する細胞の抵

国立遺伝学研究所細胞遺伝研究部門/総合研究大学院大学遺伝学専攻 (〒411-8540 三島市谷田 1111)

Instability of the ribosomal RNA gene cluster and its physiological functions

Takehiko Kobayashi and Yufuko Akamatsu (Division of Cytogenetics, National Institute of Genetics / The Graduate University for Advanced Studies, SOKENDAI, 1111 Yata, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan)

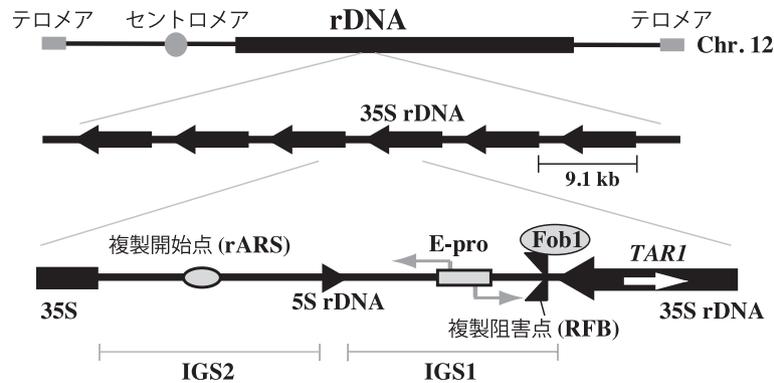


図1 酵母のrDNAの構造

出芽酵母は12番染色体に約150個のリボソーム遺伝子を持っている。詳しくは本文参照。TARI遺伝子は35S rDNAの25S rRNAコード領域に存在する。

抗性はrDNAのコピー数が決めているのである。

rDNAの特徴的な配列として35S rDNAの3'付近に複製阻害配列(RFB: replication fork barrier)が存在する。Fob1タンパク質はRFBに結合し、IGS2の複製開始点から両方向に始まった複製フォークのうち、転写と逆方向(図1でいうと右方向)に進む複製フォークを止める働きを持つ。fob1欠損株で複製フォークと転写の衝突が上昇するとDNA複製フォークの進行が遅くなり、異常な組換えが上昇することから³⁾RFBの存在理由の一つは35S rDNAの転写と複製フォークの衝突の回避にあると考えられている。もう一つのrDNAのユニークな配列であるE-proは双方向性非コードプロモーターで、rDNAのコピー数が減少したときに発現が誘導され遺伝子の増幅を誘導する⁴⁾(次節参照)。E-proとRFBは次に述べるrDNAの安定性維持機構において中心的役割を担っている。そのほかにも出芽酵母では、真核細胞にはまれなオーバーラップ遺伝子TARIが25S rDNAと重なって存在する⁵⁾。ただし転写方向は逆となる。TARIはRNAポリメラーゼIIにより転写される構造遺伝子でその産物はミトコンドリアに局在することがわかっているが、機能については不明である。

3. rDNAの安定性維持機構

以上のようなユニークな配列がrDNAに存在する理由は、rDNAがほかではみられない特徴を持つためと考えられる。その一つはコピー数の変動である。rDNAに限らず反復遺伝子は切断などの損傷を受けると別のコピーと相同性を利用して修復する場合がある(図2)。その際にDNA鎖が入れ代わる「交差型」タイプの相同組換えが生じると環状のDNA分子が染色体から切り出され、その分コピー数が減少する。また、一本鎖DNAアニーリング経路では、切断末端からDNAが削られ、露出した二つの一本鎖DNAが相補的にアニーリングして修復を行う。このとき

アニーリングした相同配列間に存在したコピーが消失する^{6,7)}。高いコピー数を維持するためには、このような修復機構を抑制するか、あるいは常にコピー数を回復させるようなメカニズムが必要となる。実際に酵母はその両方を持っており、我々のグループはコピー数維持機構について以下のようなモデルを提唱している⁷⁾(図3)。細胞周期のS期に複製フォークがRFBで停止するとDNA二重鎖切断が生じ、組換えが誘導される。十分に多コピーのrDNAが維持されている場合には、ヒストン脱アセチル化酵素Sir2の働きでE-proの転写が抑制されており、DNA複製後の姉妹染色分体にはコヒーシンが結合して異常な組換えを抑制する。しかしrDNAのコピー数が減少した時には、Sir2によるE-proの転写抑制が解除され、E-proの発現はコヒーシンの結合を阻害する。その結果、DNA切断末端が別のコピーと「ずれた」組換えを起こして修復されると、そのコピーでは再複製が起こり、コピー数が増加する。やがてコピー数が通常レベルまで回復すると、再びSir2によってE-proの転写が抑制される。このようにSir2によるE-proの転写調節がコピー数を一定レベルに調整している。

4. rDNAと細胞老化

出芽酵母は出芽によって細胞分裂するため、母細胞と娘細胞を見分けることが出来る老化研究の優れたモデル生物である。一つの酵母(母細胞)は娘細胞を出芽する毎に老化が進み、約15個の娘細胞を生み出すころ、つまり約15回の細胞分裂の後に老化現象が現れ始め、細胞周期が遅くなり、液胞が大きくなり、接合能力が低下する。約20回を過ぎると完全に分裂を中止し約2日間の短い生涯を終える。

前節で述べたように細胞はrDNAのコピー数を維持する機構を持つが、頻繁に起こるコピーの消失と増加から、

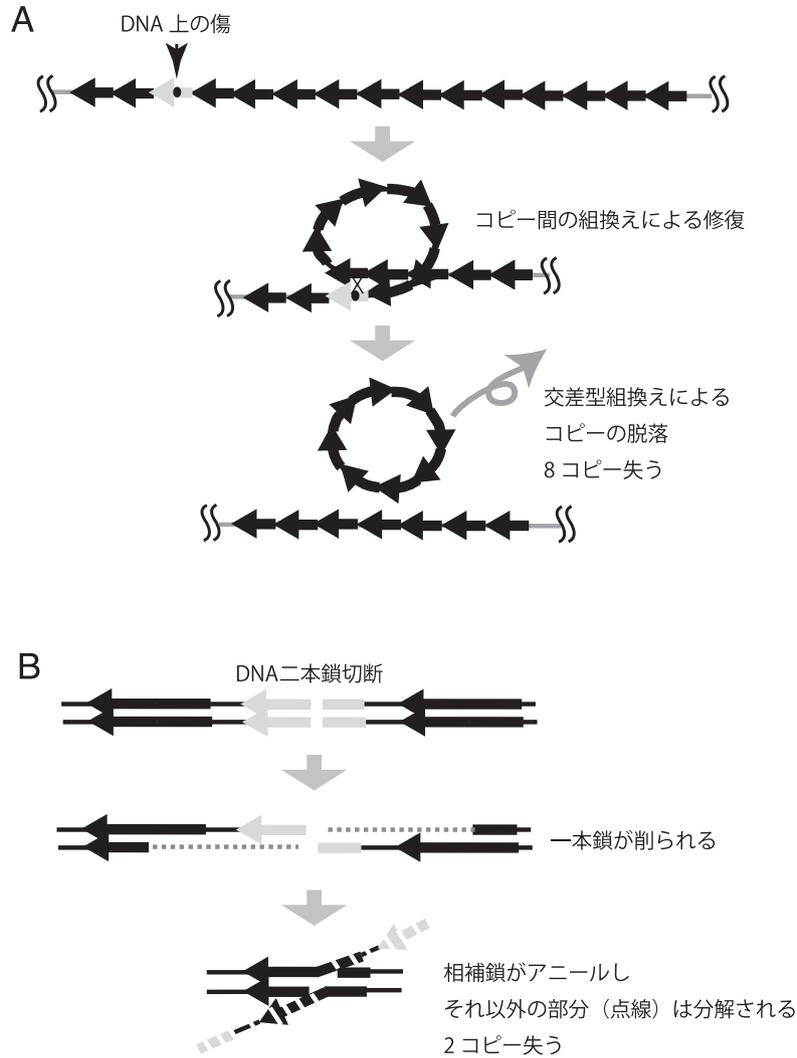


図2 直列反復配列でのDNA修復機構
 (A) 同じ染色体の別のコピーをドナーとして相同組換えにより傷を修復する場合。交差型組換えが起こると一部反復配列が切り出される。図では8コピーが失われる。(B) 一本鎖DNAアニール経路によるDNA二重鎖切断修復。切断末端から一本鎖DNAが消化され相同配列が出現したところでそれらがアニールする。はみ出た部分が削られて図の場合では2コピーが消失する。文献6より改変。

rDNAはゲノム中で最も不安定な領域であり、細胞機能に影響を与えている。その最も顕著な例は老化である。ゲノムの安定性の低下が細胞老化、あるいは個体の老化に影響を与えていることはヒトをはじめ多くの生物で知られている。出芽酵母ではrDNAが全ゲノムの約12%を占め、不安定なゲノム領域の中心的存在となり老化を促進すると考えられる。例えば*fobl*欠損株では、rDNAのDNA切断が誘導されないため、コピー数の変動が停止し、rDNAが安定化する。すると酵母の寿命は60%ほど延びて約30回まで分裂できるようになる^{3,8)}。これとは逆に*SIR2*遺伝子を破壊するとE-proの転写が誘導されて、rDNAの異常な組換えが上昇する。その結果、rDNAは不安定化し、寿命は

約10回となり半減する⁹⁾。また*SIR2*遺伝子を過剰に発現させると寿命が延長する⁹⁾。以上のようにrDNAの安定性(コピー数の変動)は寿命とリンクしておりrDNAが細胞の老化速度を決定する「ペースメーカー」として働いている(細胞老化のrDNA仮説¹⁰⁾)。

5. 細胞の若返りにもrDNAが関係している

rDNAによる老化促進作用にはさらに面白い側面がある。それは老化の反対の若返りに関してである。細胞がすべて老化すると当然のことながらやがて種が絶滅する。つまり老化する細胞があれば逆に若返る細胞もないといけない。出芽酵母の母細胞は分裂のたびに老化するが、そこか

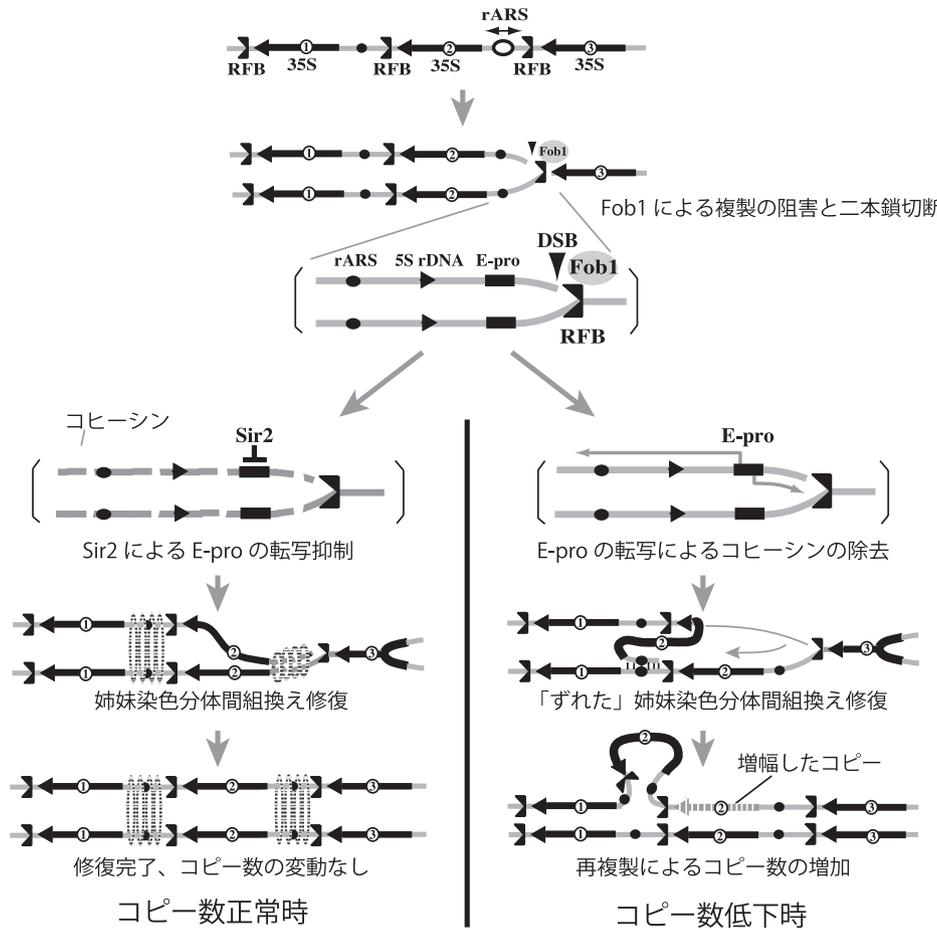


図3 rDNA コピー数維持機構

rDNAではコピー数が減少した場合、増幅機構が誘導されて常に一定のコピー数が維持されている。詳しくは本文参照。文献7より改変。

ら生まれる娘細胞はリセットされ、また新たに20回分裂する能力を回復する。これはヒトで母親の年齢とその赤ちゃんの寿命が無関係であるのと同じで、いわゆる「世代交代」による若返りである。それでは若返りとrDNAの安定性の関係は一体どうなっているのだろうか。我々は細胞分裂直後の母細胞と娘細胞をそれぞれ多数集め、そのDNAを回収しrDNAの安定性を比較した。その結果、興味深いことに娘細胞のrDNAは母細胞に比べて安定であり、不安定化したrDNAは母細胞に特異的に蓄積していた¹¹⁾。sir2欠損株ではこの差がさらに顕著であり、娘細胞のrDNAが安定であるのに対して、母細胞では異常な構造のrDNAが増加していた。これらのことから、不安定化した異常なrDNAは非対称分裂によって母細胞のみに蓄積されて老化を引き起こすが、娘細胞では安定なrDNAが継承されて若返り、母細胞の分裂回数加里セットされると考えられる(図4, rDNA仮説)。

6. ヒトにおけるrDNAの安定性維持機構

ヒトでは、1細胞あたり約400コピーのrDNAが存在

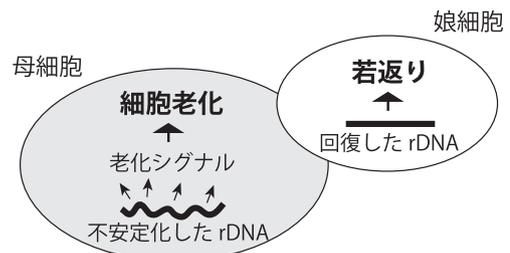


図4 出芽酵母の老化のrDNA仮説

母細胞では分裂のたびにrDNAが不安定化しそこから発せられる老化シグナルにより老化が誘導される。娘細胞ではrDNAの不安定性が回復し老化シグナルも消え若返る。

し、アクロセントリック染色体(13, 14, 15, 21および22番)の短腕に直列配列からなる10個のrDNAクラスターを形成している(図5A)。1ユニットのrDNAは約43kbであり、47S rRNA前駆体をコードする13kbと転写調節領域などを含む約30kbの非コード領域(IGS: intergenic spacer)で構成される。酵母と違い5S rDNAは独立したクラスターを形成している。rDNA(47S)クラスターの長さには多型が存在し、70kb程度から長いものでは6Mb

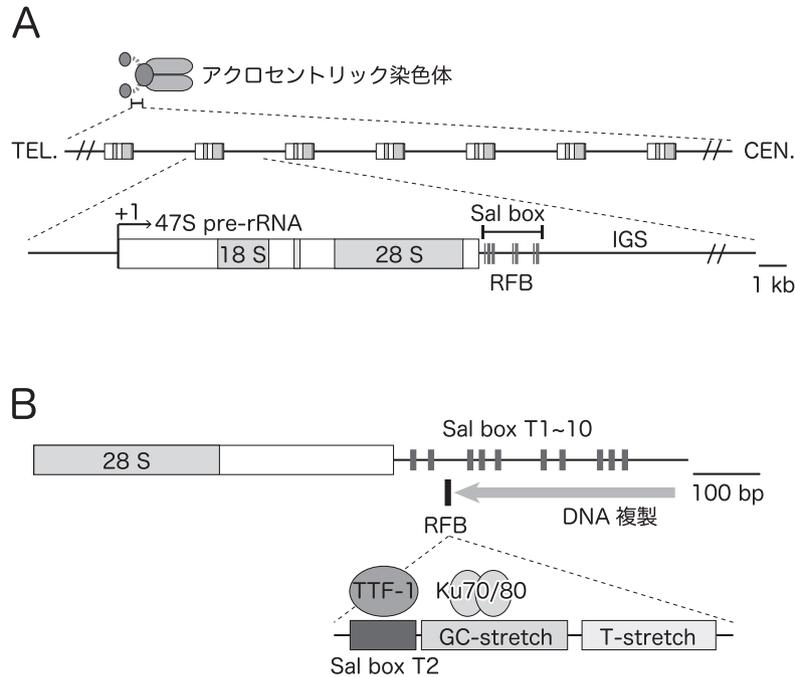


図5 哺乳動物のrDNA

(A) ヒトのrDNAの構造。rDNA直列反復配列はアクロセントリック染色体短腕の二次狭窄部分に存在する。47S rRNA前駆体コード領域の3'側には転写終結エレメントSal boxが複数存在する。この近傍にRFBが存在しDNA複製フォークの進行を阻害する。(B) マウスにおけるRFBのモデル。Sal box T2に結合したTTF-1とGC-stretchに結合したKu70/80複合体が、rRNA転写と逆方向から進行するDNA複製フォークを阻害する。また、T-stretchはRFB活性を促進すると考えられている。

以上がある。つまり長いrDNAクラスター上には140コピー以上のrDNAの反復配列が存在する。ヒトのrDNAクラスターは、大規模な反復構造の特徴に加えて、rRNA合成のための非常に活発な転写活性やIGSに散在する非B型DNAと予測される単純反復配列などから、出芽酵母と同様に、異常な組換えを頻発する不安定なゲノム領域であると考えられる。しかしながら正常細胞においてrDNAの構造は、細胞分裂を通じて安定に維持されており、rDNAクラスター安定性維持機構の存在が示唆される。興味深いことに、いくつかの疾患ではrDNAの再編成が報告されている。まれな症例ではあるが筋ジストロフィーの患者で、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)遺伝子との転座のbreakpointが28S rRNA領域にマップされている¹²⁾。さらに近年、ヒトの肺および大腸から採取されたがん組織の半数以上に、非がん組織ではみられないrDNAクラスターの再編成が観察されている¹³⁾。このことからrDNAの安定性維持機構がこれらのがん細胞で異常になっている可能性が考えられる。これまでに、がんを頻発する遺伝病の原因遺伝子であるBLMやATM、rDNAのサイレンシングに関わるDNAメチルトランスフェラーゼやTIP5などがrDNAの安定性維持に関与することが示唆されている。これ

らの遺伝子の機能からDNA複製、修復、チェックポイントとヘテロクロマチン形成などがrDNAの安定性維持に機能していると考えられるが、その詳細についてはよくわかっていない。

前述のように酵母ではFob1依存的なDNA複製阻害が、rDNAコピー数の回復に重要な役割を果たす一方で、異常な組換えを誘発しrDNA反復配列の再編成の原因にもなっている。DNA複製阻害は現象として進化的に保存されており、ヒト細胞ではrRNAの転写終結エレメントであるSal boxの近傍にDNA複製フォークの進行阻害活性が観察されている。FOB1のオーソログは哺乳動物で見つからないが、マウスのrDNAを使った*in vitro*の実験結果からrRNAの転写終結に働くTTF-1とDNA非相同末端結合に働くKu70/80複合体が、転写終結エレメントSal box T2とその近傍のGC-stretchに結合し、これらが協調してrRNA転写と逆方向から進行するDNA複製フォークを停止するモデルが提案されている^{14,15)}(図5B)。このモデルについては、*in vivo*での実験的な証明が待たれるが、ヒトのがん細胞でみられるrDNAクラスター再編成にもDNA複製阻害が関与している可能性が考えられる。

7. おわりに

rDNAの不安定性は、それが老化を引き起こすことからrDNAの「弱点」と捉えることもできるが、逆に老化を必要な生理作用と考えると、「長所」として考えることもできる。特に多細胞生物においては、細胞老化はがん化を抑制する重要な役割を担う。rDNAの不安定化を認識し、細胞の老化を誘導するための「老化シグナル」の実体解明は今後の研究課題であり、がん抑制機構との関連が示唆されるため大変重要な問題である。

リボソームRNA遺伝子はすべての生物が持っている最も基本的な遺伝子で細胞の進化とともに歩んできた「長老」格の遺伝子である。経験豊富な長老であるrDNAは、自身が不安定化することで細胞に「そろそろ潮時」であることを告げる、重要な役割を担っているのだろう。

文 献

- 1) French, S.L., Osheim, Y.N., Cioci, F., Nomura, M., & Beyer, A.L. (2003) *Mol. Cell Biol.*, **23**, 1558–1568.
- 2) Ide, S., Miyazaki, T., Maki, H., & Kobayashi, T. (2010) *Science*, **327**, 693–696.
- 3) Takeuchi, Y., Horiuchi, T., & Kobayashi, T. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 1497–1506.
- 4) Kobayashi, T. & Ganley, A.R.D. (2005) *Science*, **309**, 1581–1584.
- 5) Coelho, P.S., Bryan, A.C., Kumar, A., Shadel, G.S., & Snyder, M. (2002) *Genes Dev.*, **16**, 2755–2760.
- 6) Fishman-Lobell, J., Rudin, N., & Haber, J.E. (1992) *Mol. Cell Biol.*, **12**, 1291–1303.
- 7) Kobayashi, T. (2011) *Cell. Mol. Life Sci.*, **68**, 1395–1403.
- 8) Defossez, P.A., Prusty, R., Kaerberlein, M., Lin, S.J., Ferrigno, P., Silver, P.A., Keil, R.L., & Guarente, L. (1999) *Mol. Cell*, **3**, 447–455.
- 9) Kaerberlein, M., McVey, M., & Guarente, L. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 2570–2580.
- 10) Kobayashi, T. (2008) *BioEssays*, **30**, 267–272.
- 11) Ganley, A.R.D., Ide, S., Saka, K., & Kobayashi, T. (2009) *Mol. Cell*, **35**, 683–693.
- 12) Bodrug, S.E., Ray, P.N., Gonzalez, I.L., Schmickel, R.D., Sylvester, J.E., & Worton, R.G. (1987) *Science*, **237**, 1620–1624.
- 13) Stults, D.M., Killen, M.W., Williamson, E.P., Hourigan, J.S., Vargas, H.D., Arnold, S.M., Moscow, J.A., & Pierce, A.J. (2009) *Cancer Res.*, **69**, 9096–9104.
- 14) Gerber, J.K., Gögel, E., Berger, C., Wallisch, M., Müller, F., Grummt, I., & Grummt, F. (1997) *Cell*, **90**, 559–567.
- 15) Wallisch, M., Kunkel, E., Hoehn, K., & Grummt, F. (2002) *Biol. Chem.*, **383**, 765–771.