

リボソーム RNA 遺伝子の増幅と転移因子由来タンパク質 Fob1

リボソーマル RNA (rRNA) は生物の細胞内で最も数の多い RNA 分子である。これに対応して多くの生物では、多数の rRNA 遺伝子のコピーがゲノム中に存在している。我々ヒトでは 500 コピー程度、出芽酵母では 150 コピー程度、原核生物でも 1 から 10 コピーと複数持っているものが多い。ほとんどの真核生物では、rRNA 遺伝子をコードする DNA 領域すなわち rDNA は顕著な縦列反復配列である。多くの真核生物では、18S (small subunit, SSU) rRNA、5.8S rRNA、28S (large subunit, LSU) rRNA の 3 つは一つの RNA として転写され、その後切断される。前駆体は 35S rRNA と呼ばれ、RNA ポリメラーゼ I によって転写される。一方、5S rRNA は別の座位に反復していることが多い。5S rRNA は RNA ポリメラーゼ III によって転写される。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では第 12 番染色体上に 18S、5.8S、28S に加えて 5S もまとまっており 9.1kb の反復単位を構成している。35S rRNA と 5S rRNA は逆方向に転写され、下流同士が向き合っている間が NTS1 (non-transcribed spacer 1, あるいは intergenic spacer 1, IGS1)、上流同士が向き合っている間が NTS2 (IGS2) と名付けられている。NTS2 には複製開始点 ARS、NTS1 には、一方向からの DNA 複製を停止させる RFB (replication fork barrier) が存在する。RFB では近くの ARS からの複製フォークが停止するが、逆方向から来た複製フォークは阻害されない。RFB は組み換えのホットスポットである HOT1 領域の内部に含まれている。HOT1 は RNA ポリメラーゼ I のエンハンサーとプロモーターの 2 つの領域から構成されており、RFB はエンハンサーと隣り合っている。

RFB と HOT1 が重なっていることから、RFB での複製フォークの停止と組み換えとは互いに関連していると考えられていた。実際、変異体のスクリーニングから、第 4 番染色体にコードされている Fob1 というタンパク質が、RFB での複製フォークの停止と HOT1 での組み換えの両方に必要であることが明らかとなった (Kobayashi and Horiuchi 1996)。

続いて、Kobayashi らは遺伝子破壊株を用いて rDNA のコピー数の変動を観察する系を構築し、Fob1 の働きを解析した (Kobayashi et al. 1998)。RNA ポリメラーゼ I が破壊された株 (RNA ポリメラーゼ II のプロモーターの下流に 35S rDNA をつないだプラスミドを入れているため生存可能) では、rDNA のコピー数が徐々に減少する。この株に RNA ポリメラーゼ I をプラスミドによって補ってやると徐々に rDNA が増加し、野生株と同じレベルに落ち着く。一方、Fob1 を破壊すると rDNA のコピー数の回復は起こらない。順番を逆にして、Fob1 を破壊した後に RNA ポリメラーゼ I を破壊すると rDNA のコピー数の減少そのも

のが起こらなくなった。これらの結果からは、RNA ポリメラーゼ I は、rDNA のコピー数を野生株のレベルに固定するのに必要であり、Fob1 はコピー数を変動させるのに必要なタンパク質であることがわかる。

Fob1 の機能の 1 つとして、RFB で複製フォークを止めて複製と転写の衝突を回避する機能が想定される。rDNA の複製は NTS2 中の ARS から始まり、双方向に進む。一つの rDNA 単位内では、この複製と衝突しないように 5S rRNA と 35S rRNA の転写の向きは決められている。rDNA の反復単位の間を隔てているのが RFB であり、Fob1 が RFB で 5S rRNA 側から進んできた複製フォークの進行を阻害するため、隣の単位の 35S rRNA の転写との衝突を回避できる。このように想定されるが、実際には Fob1 の破壊株でも転写と複製の衝突は観察されていない。

Takeuchi らはこの原因を、rDNA の全てが転写されているわけではないためと考えた。そこで、rDNA のコピー数を 20 程度まで減少させた酵母を作成し、全てのコピーが転写されているような状態を作った (Takeuchi et al. 2003)。この株では、rDNA のコピー数を固定するために Fob1 遺伝子が破壊されている。この株では、複製フォークの進行が遅くなっていることが二次元電気泳動で確認できた。RNA ポリメラーゼ I を破壊すると、複製フォークの速度低下が観察されなくなり、これに RNA ポリメラーゼ I を戻した株では速度低下が観察された。また、rDNA のコピー数が少ない株では Fob1 を破壊した場合でも ERC や rDNA のコピー数の変化が観察され、これも RNA ポリメラーゼ I に依存していた。以上から、RNA ポリメラーゼ I によって 35S rRNA の転写が活発に起こっていると複製フォークが停止し、組み換えが促進されることがわかった。

Fob1 の非存在下では複製フォークは RFB では停止せず、RNA ポリメラーゼ I による 35S rRNA 遺伝子の転写と衝突することになる。この衝突によって複製フォークは停止し、組み換えが誘発され、ERC の形成や rDNA のコピー数の変動が引き起こされる。この結果は確かに Fob1 が複製と衝突の回避の機能を果たしていることを示しているが、同時に通常の rDNA のコピー数ではその必要がないことも明らかにしている。

Kobayashi は、ChIP、原子間力顕微鏡、DNaseI footprinting、ゲルシフトなどの解析を併用して、Fob1 が RFB の 2 カ所に直接結合していることを示した

(Kobayashi 2003)。Fob1 の結合する RFB の 2 カ所は 90 塩基ほど離れており、その間の DNA は Fob1 の周囲を巻いているらしい。また、Fob1 の RFB への結合には、ジンクフィンガーが働いている。どうやら、Fob1 は RFB と強固に結合することで複製フォークの進行を物理的に阻害しているらしい。その結果、RFB で DNA が切断され、別の rDNA 単位との間違ったアニーリングにより rDNA のコピー数が増加したり、環状 DNA (extrachromosomal rDNA circle, ERC) として

取り除かれたりすることによって rDNA のコピー数が増減するというのが現在考えられているモデルである。

Fob1 は発見当初はどの遺伝子とも類似性が報告されなかった (Kobayashi and Horiuchi 1996) が、その後、LTR レトロトランスポゾンや Polinton のインテグラーゼとある程度の相同性を持つことが明らかとなった (Gao and Voytas 2005)。共通する N 末側のジンクフィンガーは、RFB との結合に働いている。一方、インテグラーゼの触媒活性を担う catalytic core 領域も似ているが、活性残基は保存されていない。Fob1 が DNA の切断を触媒する可能性もまだ否定されてはいないが、期待は出来なさそうだ。おそらく、Fob1 は LTR レトロトランスポゾン、あるいは Polinton から取り込まれ、DNA 結合能だけを残して rDNA の維持を担うようになった遺伝子なのだろう。

Kobayashi T, Horiuchi T.

A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities.

Genes Cells. 1996 May;1(5):465-474.

Kobayashi T, Heck DJ, Nomura M, Horiuchi T.

Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I.

Genes Dev. 1998 Dec 15;12(24):3821-3830.

Takeuchi Y, Horiuchi T, Kobayashi T.

Transcription-dependent recombination and the role of fork collision in yeast rDNA.

Genes Dev. 2003 Jun 15;17(12):1497-1506.

Kobayashi T.

The replication fork barrier site forms a unique structure with Fob1p and inhibits the replication fork.

Mol Cell Biol. 2003 Dec;23(24):9178-9188.

Gao X, Voytas DF.

A eukaryotic gene family related to retroelement integrases.

Trends Genet. 2005 Mar;21(3):133-137.

2011/06/10

小島 健司 著

禁 無断複写転載