

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「ゲノムスケールの DNA 設計・合成  
による細胞制御技術の創出」  
研究課題「遺伝子増幅装置と染色体ベクターの  
構築」

## 研究終了報告書

研究期間 2019年10月～2025年03月

研究代表者：小林 武彦  
(東京大学 定量生命科学研究所  
教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

出芽酵母のリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) は遺伝子増幅および維持機構を持ち、100 コピー以上が常に維持されている。本課題の目標は、rDNA の増幅・維持機構を解明し、それを安定化することで多数の遺伝子を組み込むことができる「染色体ベクター」を作成することである。さらに実証実験として染色体ベクターに異なる生物のタンパク質複合体や代謝系に関わる遺伝子群を丸ごと組み込み、それらを酵母内で再構築する「*in saccharo* 実験系」を確立する。この実験系は、将来的には人工細胞の作成の基盤技術になると期待される。

現在の 4 つの研究項目を実施している。

- 1) rDNA の増幅およびその安定性維持機構の解析
- 2) メガレベルの染色体構築が可能な遺伝子増幅系の確立
- 3) 多数の異種遺伝子を組み込むことができる巨大染色体ベクターの作成
- 4) 染色体ベクターを用いた異種生物反応系の酵母内での再構築、解析系の確立

これまでの以下のようないい成果を得た。

1) rDNA の安定化に関わる多くの因子を発見しその分子メカニズムを解明した (Hosoyamada et al, 2019; Horigome et al, 2019; Wakatsuki et al, 2019; Iida & Kobayashi, 2019a; Goto et al, 2021; Yanagi et al, 2022; Hasegawa et al, 2023; Murai et al, 2024; Sasaki & Kobayashi, 2025; Futami et al, BioRxiv 2024; Ohhira et al, BioRxiv 2024) さらに rDNA が安定化に関わる非コード転写が細胞老化や寿命を決定していることを解明した (Hattori et al, 2022; Yokoyama et al, 2023)。

哺乳動物の rDNA の解析では、マウスの rDNA の加齢に伴う配列レベルでの不安定化を初めて捉えた (Watada et al, 2020)。またヒトの rDNA についてもその安定性を定量的に解析することに成功した (Hori et al, 2021)。これらの結果は 4 つの総説にまとめた (Iida & Kobayashi, 2019b; Horigome & Kobayashi, 2020; Hori et al, 2022; Sasaki & Kobayashi, 2023)。

2) rDNA の増幅を利用した *in vivo* PCR では、7 kb の DNA 断片でも 20 コピー以上に増幅可能なことを実証した (論文準備中)。さらに最終年から参画した分担者石川は、rDNA などの反復配列をクローニングできる菌株を作成した。 (Ishikawa & Hori, 2024)

3) 47 個のバーコードを搭載し、97 個の遺伝子を組み込むことができる世界最大級の染色体ベクターを完成させた (論文作成中)。原理や作成方法については、すでに論文化している (Iida & Kobayashi, 2021)。

4) 出芽酵母には存在しない RNA サイレンシングに関わる遺伝子群を、染色体ベクターにより導入している。現在分裂酵母の遺伝子の導入がほぼ完了し、それらの発現とサイレンシングに必要な siRNA の合成及びモニター遺伝子の発現抑制を確認している。また、若手チャレンジとして参画している研究協力者大屋は、染色体ベクターにヒトの DNA 修復の遺伝子を搭載し、出芽酵母内で活性を確認している。今後出芽酵母内でその活性を高める変異や化合物のスクリーニングを行う予定である。また分担者岩川は、植物のサイレンシング遺伝子 (SE、HYL1、DCL1) を染色体ベクター導入した酵母を作製し、small RNA の増加を確認している。

### (2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

#### 1. rDNA の維持機構の解明

概要: 酵母の rDNA 不安定化変異株を解析することで、rDNA の増幅・維持の分子メカニズム

を解明した。酵母は rDNA のコピー数をカウントするシステム(椅子取りゲームモデル)持つており、いつも一定数のコピーを維持することができる。さらにマウス・ヒトの細胞でも同様に rDNA 安定性やコピーを定量的に捉えることに成功した。

## 2. rDNA の加齢変容の解明

概要: 酵母のゲノム(rDNA)が加齢に伴い不安定化していくことを初めて捉えることに成功した。さらに rDNA の安定性の変化によって引き起こされる老化と若返りの分子メカニズムも解明した。またマウス・ヒトの細胞でも老化に伴う変化を捉えることに成功した。

## 3. 分裂酵母 RNA サイレンシング機構の出芽酵母での再構築

概要: 出芽酵母が過去に失ったヘテロクロマチン形成能力を、分裂酵母の関連する遺伝子群を、染色体ベクターを用いて出芽酵母に導入することで再構築することに成功した。出芽酵母は真核細胞でヘテロクロマチンを持たない貴重な生物である。ヘテロクロマチンを復活させることで、その生理的な意味について今後解明していく。

### <科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

#### 1. 97 個の遺伝子を組み込むことができる世界最大級の染色体ベクターを完成させた。

概要:これまでプラスミドを使ったベクターでは数個の遺伝子の搭載が限界で、またその維持には薬剤の選択などが必要となり、効率、コスト、環境負荷の面で問題があった。今回作成した染色体ベクターはこれらの問題を解決する。また、多くの遺伝子が導入可能になることで、異種の生物の反応系を丸ごと酵母内で再構築することができ、合成生物学の発展にも寄与する。

#### 2. クローニングしづらい配列のクローニングを可能にする技術を確立

概要: 特殊な細菌を使うことで反復配列などのクローニングしづらい配列のクローニングが可能になった。

#### 3.rDNA の增幅系を利用した、有用遺伝子の大量発現系の確立

概要: 有用遺伝子を酵母 rDNA の間に挟み込み、rDNA の増幅機構を利用してそのコピー数を増やし、有用タンパク質を大量発現する技術を開発した。酵母の有用タンパク質の場合には、細菌の遺伝子を含むベクターや異種生物の DNA を用いないため、そのまま食用にすることも可能である。

### <代表的な論文>

1. Hori, Y., Engel, C., and Kobayashi, T. (2022) Regulation of ribosomal RNA-gene transcription, copy number and nucleolus organization in eukaryotes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 24:414-429. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00573-9>

概要:これまで私たちが中心となり解明してきた rDNA コピー数の維持機構、その安定性と老化、疾患の関係をまとめた総説。Engel 博士はドイツのリボソームの構造の専門家で、共同で作成した。

2. Hori, Y., Shimamoto, A., and Kobayashi, T. (2021) The human ribosomal DNA array is composed of highly homogenized tandem clusters. *Genome Res.* 31: 1971-1982  
10.1101/gr.275838.121 プレスリリース

概要:長鎖シーケンサーでヒト rDNA のリピート構造とその安定性を初めて明らかにした。

3. Yokoyama, M., Sasaki, M., and Kobayashi, T. (2023) Spt4 promotes cellular senescence by activating non-coding RNA transcription in ribosomal RNA gene clusters. *Cell Reports*. 42: 11944I:<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111944e>. プレスリリース

概要:酵母の老化に伴う rDNA 不安定化に関わる遺伝子を同定した。

## § 2 研究実施体制

### (1)研究チームの体制について

#### ① 「小林」グループ

研究代表者:小林 武彦 (東京大学定量生命科学研究所 教授)

研究協力者:佐々木真理子、飯田哲史、堀籠智洋、堀優太郎、大屋恵理子、柳秀一  
研究項目

- rDNA 増幅、維持機構の解析
- in vivo* PCR 系の構築
- 染色体ベクターの構築
- 分裂酵母遺伝子を用いた *in saccharo* 実験系の構築

#### ② 「岩川」グループ

主たる共同研究者:岩川 弘宙(立教大学理学部生命理学科 准教授)

研究項目

- 植物の microRNA プロセッシング因子の酵母への *in saccharo* 実験系を用いた移植
- microRNA プロセッシング関連因子を導入した酵母から生み出される小分子 RNA の解析
- 小分子 RNA 増幅機構の酵母内再構成

#### ③ 「石川」グループ

主たる共同研究者:石川 聖人(長浜バイオ大学 准教授)

研究項目

- *in vivo* PCR 産物の受容細菌株の開発

### (2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

1、マイクロ流体による生細胞イメージング技術を、フランスの Gilles Charvin のグループと共同研究を実施。この新技術を用いて老化進行時の細胞動態を観察した結果を、共同研究の成果として論文発表(Hattori et al, 2023、日本遺伝学会優秀論文賞受賞)。

2、細胞が効率よく多量のリボゾームを作る仕組みについて、ドイツの Christoph Engel のグループと共同研究を実施。成果をまとめた総説を Nature Reviews Molecular Cell Biology 誌に掲載。

3、東京大学 TLO と協働して国際特許申請の手続きを開始。それに関係して、東京大学 TLO とすでに国内での特許申請済みの染色体ベクターおよび遺伝子增幅技術の産業利用について、複数の企業に対してセミナー等で紹介している。これまでに数社と面談し、内1社と共同研究を実施中。