

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06176

研究課題名(和文)テロメアクライシスにおける染色体不安定化機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism of chromosome instability in telomere crisis

研究代表者

林 眞理 (Hayashi, Makoto)

京都大学・白眉センター・特定助教

研究者番号：90761099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,300,000円

研究成果の概要(和文)：単一の姉妹染色分体融合をX染色体に引き起こし、さらに蛍光タンパク質の発現を協調して誘導することで、そのような姉妹染色分体融合を持つ細胞をラベル可能な系を世界で初めて構築し、その系を利用した姉妹染色分体融合の運命解析を行った。その結果、単一の姉妹染色分体によって、微小核や染色体断片化といった異常が引き起こされることを明らかにした。また、独自に発見したM期テロメア脱保護現象の分子機構の解明に挑み、この現象に関与する因子として、テロメア結合タンパク質TRF1、DNAヘリケースBLMなどの因子を同定した。さらにTRF1とBLMの結合がこの現象に寄与することを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体の融合は、細胞のガン化と密接に関わっているが、染色体融合の種類、数、時期などを明確に制御する系が存在しなかったため、染色体融合の運命については複数の仮説が存在していた。本研究成果により、単一の姉妹染色分体融合の運命が解析可能となり、細胞ガン化のメカニズムの理解に貢献することが期待される。また、M期停止はある種の抗がん剤によって引き起こされるため、M期停止中のテロメア脱保護の分子機構の解析によって、抗がん剤の副作用の軽減や、効果的な併用療法などの開発が展望できる。

研究成果の概要(英文)：By using artificial DNA sequences, we constructed a unique system that is capable of labeling cells with a single sister chromatid fusion. We analyzed the fate of sister chromatid fusion using this system. We found that a single sister chromatid fusion is enough to induce chromosome aberrations such as micronuclei and chromosome scattering. Besides, we attempted to elucidate the molecular mechanism of mitotic telomere deprotection, which we originally discovered. We have successfully identified factors such as telomere binding protein TRF1 and DNA helicase BLM as factors involved in this phenomenon. Also, we found that the combination of TRF1 and BLM contributed to this phenomenon.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：テロメアクライシス テロメア脱保護 M期停止 細胞周期 BLM TRF1

## 1. 研究開始当初の背景

染色体の末端は単純なリピート配列とそこに結合するタンパク質群からなるテロメアという構造体によって、DNA 傷害として認識されることや、不必要な酵素反応を受けることから免れている。正常なヒト細胞は細胞周期を繰り返すとテロメア配列を失い、やがて保護機能を失ったテロメアが DNA 傷害反応を活性化し細胞周期を停止する[F Fagagna *et al.*, 2003, *Nature*]。これを細胞老化というが、この経路に異常をもつ細胞はその後も細胞周期を繰り返し、やがてテロメア配列を完全に失い、テロメアクライシス期に突入する。定説とされている Breakage-Fusion-Bridge(BFB)サイクル仮説は、1941年に McClintock がトウモロコシ細胞の観察から提唱したモデル[B McClintock, 1941, *Genetics*]を基とし、その後マウスの研究によって、テロメアクライシス期の染色体動態を説明する仮説として提唱された[SE Artandi *et al.*, 2000, *Nature*]。この仮説は、繰り返す染色体の融合と切断によってこの時期の染色体不安定化と細胞死を説明するモデルとして教科書などでも頻繁に記載されているが、直接的には証明されていない。我々は、融合した染色体が細胞周期の有糸分裂期(M期)停止を引き起こすことや[MT Hayashi *et al.*, 2015, *Nature*]、M期に停止した細胞ではテロメアが DNA 傷害部位として認識される(M期テロメア脱保護)ことを発見し[MT Hayashi *et al.*, 2012, *Nat Struct Mol Biol*]、BFB サイクル仮説に変わるテロメアクライシス期の細胞死と染色体不安定化を説明するモデルを提唱した。

しかし我々の研究を含め既存の方法では、集団として染色体融合の影響を解析するため、集団内の一部の細胞で誘導された染色体融合と、一部の細胞の挙動との間に明確な因果関係を結論付けることはできなかった。さらに染色体融合には、姉妹染色分体間が融合する場合と、別々の染色体間が融合する場合とがあり、本来であればこれら異なる種類の染色体融合とその影響を個別に考える必要があるが、考慮されていないのが実情である。これらの課題を克服するためには、個々の細胞における染色体融合の影響を追跡できる系が必要不可欠であるとの着想に至った。また染色体融合後に M 期停止した細胞の運命を明らかにする上で重要な現象である M 期テロメア脱保護の分子機構についても不明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

がん化のごく初期の過程であるテロメアクライシス期に、細胞の性質を決定する染色体がいかにして不安定化し、細胞の運命に影響を与えるかという課題に取り組んだ。テロメアクライシス期の染色体不安定化は、腫瘍の発生や多様化に多大な影響を及ぼし、その分子メカニズムは染色体末端の融合に端を発すると考えられている。本研究計画では自身らの独自の研究成果に着想を得て、染色体融合を個々の細胞レベルで追跡できる、この課題の解明に必要な全く新しい染色体改変系を構築し、染色体不安定化のメカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに、染色体融合の引き起こす現象の一つとして、M 期停止に着目し、M 期テロメア脱保護の分子機構の解明を目的とした。

### 3 . 研究の方法

上記の目的達成のため、以下の項目について研究を実施した。

#### 新しい染色体融合誘導系の構築

独自にデザインした人工 DNA 配列を、がん細胞の X 染色体末端付近に導入した。

#### 姉妹染色分体間の融合の運命解析

で構築した系を用いて、X 染色体の構造解析、動画解析、動画データの統計モデリング解析を行った。

#### M 期テロメア脱保護機構の解明

テロメア脱保護に関与する因子として、DNA を基質とする複数の酵素に着目し、shRNA 技術による機能喪失による表現型の探索や、レスキュー実験を行った。

### 4 . 研究成果

計画に従い、新しい染色体融合系として、Fusion Visualization system for Xp sister chromatid fusion (FuVis-XpSIS) を構築し、その評価を行った。世界に先駆けて、単一の X 染色体姉妹染色分体融合を、可視化できる細胞系の構築に成功した。

FuVis-XpSIS を用いて、X 染色体短腕における 1 つの姉妹染色分体融合の運命を解析した結果、融合した X 染色体の断片化が生じることが明らかとなった。また動画解析の結果から微小核と呼ばれる異常頻度が上昇することが分かった。さらに動画データを統計モデリングによって評価し、1 つの姉妹染色分体融合が、微小核の出現頻度を 10.3 倍程度上昇させるというモデルを提唱した。これらの成果は BioRxiv において公開した

(doi: <https://doi.org/10.1101/607341>)。

テロメア結合因子である TRF1、および、DNA ヘリケースの 1 種である BLM ヘリケースが、M 期テロメア脱保護の促進に関与することが明らかとなった。レスキュー実験から、BLM のヘリケース活性がこの反応に必要なことが明らかとなった。TRF1 上に存在する BLM 結合モチーフの変異解析から、TRF1 と BLM が直接結合することで、BLM がテロメアにリクルートされることが示唆された。さらに、当該結合モチーフ付近にあるリン酸化酵素の基質配列が、この反応に必要なことが示唆された。これらの結果から、M 期に TRF1 がリン酸化されることで BLM をリクルートすることで M 期テロメア脱保護が促進されるというモデルを提唱した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Masamsetti V, Pragathi, Low Ronnie Ren Jie, Mak Ka Sin, O' Connor Aisling, Riffkin Chris D., Lamm Noa, Crabbe Laure, Karlseder Jan, Huang David C. S., Hayashi Makoto T., Cesare Anthony J.	4. 巻 10
2. 論文標題 Replication stress induces mitotic death through parallel pathways regulated by WAPL and telomere deprotection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1038/s41467-019-12255-w">https://doi.org/10.1038/s41467-019-12255-w</a>	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 該当する

1. 著者名 Kagaya Katsushi, Noma Naoto, Yamamoto Io, Tashiro Sanki, Ishikawa Fuyuki, Hayashi Makoto T	4. 巻 -
2. 論文標題 A Single Defined Sister Chromatid Fusion Destabilizes Cell Cycle through Micronuclei Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1101/607341">https://doi.org/10.1101/607341</a>	査読の有無 無
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 林 真理	4. 巻 36
2. 論文標題 テロメアの生物学 老化・がん化の分子基盤	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学 増刊 染色体の新常識	6. 最初と最後の頁 44-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Makoto T Hayashi	4. 巻 92
2. 論文標題 Telomere biology in aging and cancer: early history and perspectives.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 107-118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266	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 林真理	4. 巻 88(6)
2. 論文標題 テロメアクライシス期におけるM期停止を介した細胞死機構	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 756-760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880756	査読の有無 無
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 林真理	4. 巻 74(9)
2. 論文標題 テロメア・テロメレースによる老化制御	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 日本臨牀 老化制御と疾患-エイジング研究の進歩-	6. 最初と最後の頁 1485-1490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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28件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 13件)

1. 発表者名 Makoto T Hayashi
2. 発表標題 A Single Defined Sister Chromatid Fusion Destabilizes Cell Cycle through Micronuclei Formation
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA-AACR joint Symposia) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto T Hayashi
2. 発表標題 A Single Defined Sister Chromatid Fusion Destabilizes Cell Cycle through Micronuclei Formation
3. 学会等名 ACCM2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto T Hayashi
2. 発表標題 Single Defined Sister Chromatid Fusion Destabilizes Cell Cycle through Micronuclei Formation
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Meeting Telomeres & Telomerase (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto T Hayashi
2. 発表標題 Epithelial-to-mesenchymal transition dictates cellular fate upon chromosome fusion
3. 学会等名 CEBST2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto T Hayashi
2. 発表標題 Sister Chromatid Fusion Visualization System Revealed Micronuclei Formation as an Initial Event
3. 学会等名 The 8th Meeting on GRANT-IN-AID FOR SCIENTIFIC RESEARCH ON INNOVATIVE AREAS "CHROMOSOME ORCHESTRATION SYSTEM" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto T Hayashi
2. 発表標題 Epithelial-mesenchymal state dictates cellular fate upon chromosome fusion
3. 学会等名 The 7th Meeting on GRANT-IN-AID FOR SCIENTIFIC RESEARCH ON INNOVATIVE AREAS "CHROMOSOME ORCHESTRATION SYSTEM" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto T Hayashi
2. 発表標題 Genetically Encoded Tool for Visualization of Sister Chromatid Fusion Revealed Micronuclei Formation as an Initial Event
3. 学会等名 3R & 3C meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto T Hayashi
2. 発表標題 Chromosome fusion delays S/G2 phase prior to mitotic arrest in human fibroblast cells
3. 学会等名 EMBO Workshop Telomere biology in health and human disease (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 眞理
2. 発表標題 上皮間葉転換における染色体融合の運命解析
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ、第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 眞理
2. 発表標題 染色体融合可視化システムによる姉妹染色分体融合の運命解析
3. 学会等名 第71回細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 真理
2. 発表標題 単一の姉妹染色分体融合によるゲノム不安定化メカニズム
3. 学会等名 国立遺伝学研究所研究会「染色体安定維持研究会」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 真理
2. 発表標題 姉妹染色分体可視化システムを用いた融合運命のベイズ解析
3. 学会等名 Genome Damage Network Workshop 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 真理
2. 発表標題 姉妹染色分体可視化システムを用いた融合運命のベイズ解析
3. 学会等名 国立遺伝学研究所研究集会 ゲノムの維持継承を支える分子基盤の包括的理解とその発展 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 真理
2. 発表標題 染色体融合可視化システムによる姉妹染色分体融合の運命解析
3. 学会等名 第36回染色体ワークショップ、第17回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Hayashi
2. 発表標題 Can aging be controlled?
3. 学会等名 Japanese-Canadian Frontiers of Science Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 眞理
2. 発表標題 染色体融合の運命解析
3. 学会等名 新学術領域研究「染色体オーケストレーションシステム」第5回領域班会議 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 眞理
2. 発表標題 染色体融合可視化システムによる姉妹染色分体融合の運命解析
3. 学会等名 ConBio2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 眞理
2. 発表標題 がん化初期過程であるテロメアクライシスにおける細胞死機構の解明
3. 学会等名 第10回Symphony (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 真理
2. 発表標題 染色体融合可視化システムによる姉妹染色体分体融合の運命解析
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 真理
2. 発表標題 異なる細胞種における染色体融合の運命解析
3. 学会等名 第35回染色体ワークショップ、第16回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 真理
2. 発表標題 染色体融合可視化システムによる姉妹染色体分体融合の運命解析
3. 学会等名 染色体構築と安定化を担う分子機構
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 真理
2. 発表標題 染色体融合の運命解析
3. 学会等名 新学術領域研究「染色体オーケストレーションシステム」第6回領域班会議
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Makoto T hayashi, Anthony J Cesare and Jan Karlseder
2. 発表標題 The Fate of Chromosome Fusion during Telomere Crisis
3. 学会等名 The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Makoto T hayashi, Anthony J Cesare and Jan Karlseder
2. 発表標題 Cell Death During Crisis Is Mediated by Mitotic Telomere Deprotection
3. 学会等名 The 32th RBC International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 林真理
2. 発表標題 染色体融合可視化システムによる姉妹染色分体融合の運命解析
3. 学会等名 第34回染色体ワークショップ・第15回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林真理
2. 発表標題 染色体融合可視化システムによる姉妹染色分体融合の運命解析
3. 学会等名 ワークショップ染色体研究の最前線
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林真理
2. 発表標題 染色体融合運命の継時的理解を目指して
3. 学会等名 新学術領域研究「染色体オーケストレーションシステム」第3回領域班会議
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Makoto Hayashi
2. 発表標題 Fate of sister chromatid fusion by fusion-visualization-system
3. 学会等名 The 4th Meeting on GRANT-IN-AID FOR SCIENTIFIC RESEARCH ON INNOVATIVE AREAS “ CHROMOSOME ORCHESTRATION SYSTEM ” (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

アウトリーチ活動 林 真理「テロメアから考える老化とがんのお話」 サイエンスバー、京都・出町柳ワインビストロ「アシュクルク」、2019年11月7日 林 真理「テロメアから考える細胞のがん化」 京都大学アカデミックデイ2019、京都大学、2019年9月15日 林 真理「老化とはなんだろう？」 京都大学ジュニアキャンパス2017、京都大学、2017年10月28日
--

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
研究協力者	加賀谷 勝史  (Kagaya Katsushi)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	野間（高安） 直十  (Noma-Takayasu Naoto)		
研究協力者	山本 唯央  (Yamamoto Io)		
研究協力者	田代 三喜  (Tashiro Sanki)		
研究協力者	ロメロザモラ ディアナ  (Romero Zamora Diana)		
研究協力者	壺井 まり  (Tsuboi Mari)		