

令和 6 年 9 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0339

研究課題名（和文）凝集体を介した染色体転座発生メカニズムの解明

研究課題名（英文）The mechanism for gene fusion mediated by condensates

研究代表者

安原 崇哲（Yasuhara, Takaaki）

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：90757056

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：当研究を通して、「なぜ転写領域において染色体転座が起きるのか」また、もし転写領域に染色体転座が本来的に起きやすいとすれば「転写に関連したクロマチンの構造が遺伝子融合を起こしやすい環境を作っているのか」という問いに対して、転写機構とゲノム異常の発生の関係性を様々な角度から解析することで、液-液相分離を介した凝集体の関与が示された。これにより、がんゲノム異常が発生するメカニズムの一端を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当研究によって、細胞内の核小体に形成されるタンパク質の集合体によって、がんを引き起こしうる染色体転座が発生することが判明した。このようなメカニズムは、なぜある特定のタイプのゲノム異常が、特定の種類のがんで起こるのかという問いに対して、一つの答えを与えたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have investigated why chromosomal translocations occur in transcribed regions and how the genome structures associated with transcription create an environment in which gene fusions are more likely to occur. We found that condensates formed at nucleoli through liquid-liquid phase separation play a critical role in the occurrence of gene fusions at transcriptionally active regions. Thus, we uncover a mechanism by which cancer acquires genome abnormalities.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：凝集体 ゲノム異常 染色体転座

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

当研究の基課題となった若手研究「DNA 損傷シグナリングを誘導する R-loop 構造を介したゲノム安定性維持機構」では、ヒト細胞において DNA 二重鎖切断発生後のごく初期の時間帯に R-loop 構造の形成が見られること、さらに R-loop 構造の形成・解消を起点として、G1 期、S/G2 期で異なる経路によって DNA 二重鎖切断が正確に修復されることが明らかとなった。これらの転写共役型相同組換え修復を阻害すると、ゲノム異常の発生が顕著に増加したことから、これらの機構がゲノム安定性の維持に大きく寄与することが示された。特に G1 期の修復経路に関するプロジェクトは、マサチューセッツ総合病院(MGH)がんセンターLee Zou 教授との共同研究を行っていた。

国際共同研究を進める中で、次のような予備実験結果を得た。まず、部位特異的な DNA 損傷を複数誘導し、それらの間での遺伝子融合を qPCR で検出する系を開発して検証したところ、遺伝子融合が転写阻害によって増加することが判明した (図 1 : DRB, THZ1 FLV, Triptolide=転写阻害剤)。これらのことから、

「転写活性化領域には染色体転座が発生する潜在的なリスクがある」という仮説を立てた。一方、転写阻害剤処理後の細胞を観察するうちに、パラスペックル因子 SFPQ と NONO が巨大な凝集体を形成することを発見した (図 2)。パラスペックルは、膜を持たない核内構造体の一つで、最近、パラスペックル構造は液-液相分離を介して形成することが示された (Yamazaki et al. 2018)。そこで、図 1 と同様の系で遺伝子融合の頻度を検証したところ、転写阻害剤によって見られた遺伝子融合頻度の増加は、SFPQ をノックダウンすることで消失することが判明した (図 3)。

2. 研究の目的

当研究では、転写活性化領域にはがんゲノム異常、特にここでは、染色体転座が発生する潜在的なリスクがあること、さらに、遺伝子融合の発生メカニズムが液-液相分離を介した凝集体によって制御されるという仮説を検証することを目的とした。特に、マサチューセッツ総合病院がんセンターLee Zou 教授の下に研究代表者が出向いて実験を行うことで、国際共同研究を進展させる計画で研究を開始した。

3. 研究の方法

- (1) 凝集の誘導と転写伸長反応阻害の関連性
 - (1-A) 様々な RNAPII 阻害剤による凝集体形成の検討
 - (1-B) オーキシングロン法による RNAPII の分解を介した転写阻害の検討
- (2) 凝集に関与する RNA の同定とデータベースでの凝集体-染色体転座の関係性の検証
 - (2-A) ノンコーディング RNA NEAT1、ribosomal RNA (rRNA) の関与を検討する。
 - (2-B) 独自のデータベースを用いて検証する。
- (3) SFPQ/NONO のクロマチン・RNA 結合状態

転写阻害剤による SFPQ/NONO のクロマチンあるいは RNA への結合状態の変化を検証する。
- (4) SFPQ/NONO を介したクロマチン高次構造変化

凝集体の形成によるクロマチン高次構造の変化、特に遺伝子領域における変化を検証する。
- (5) 超高解像度顕微鏡 STORM 法による分子配向の解析

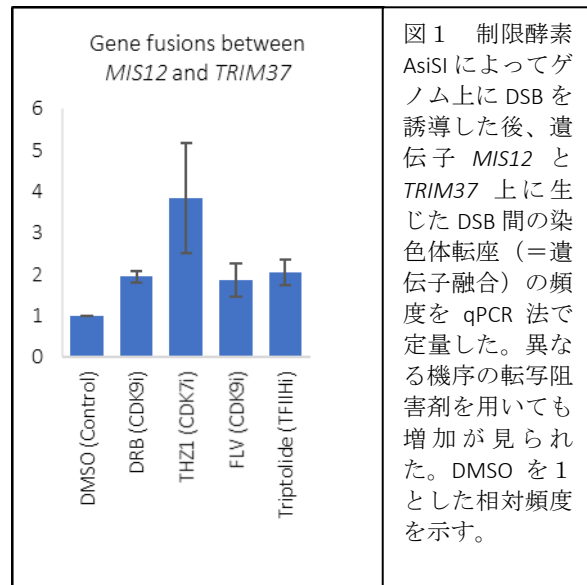


図 1 制限酵素 AsiSI によってゲノム上に DSB を誘導した後、遺伝子 MIS12 と TRIM37 上に生じた DSB 間の染色体転座 (=遺伝子融合) の頻度を qPCR 法で定量した。異なる機序の転写阻害剤を用いても増加が見られた。DMSO を 1 とした相対頻度を示す。

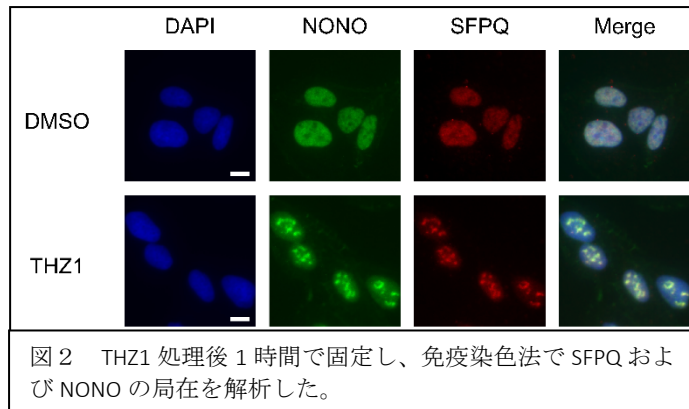


図 2 THZ1 処理後 1 時間で固定し、免疫染色法で SFPQ および NONO の局在を解析した。

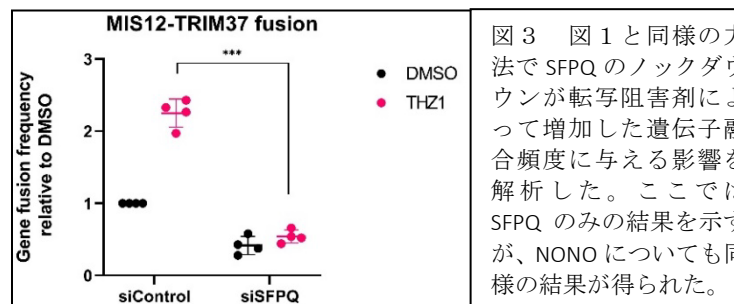


図 3 図 1 と同様の方法で SFPQ のノックダウンが転写阻害剤によって増加した遺伝子融合頻度に与える影響を解析した。ここでは SFPQ のみの結果を示すが、NONO についても同様の結果が得られた。

ライブセルイメージングによる凝集の形成過程と性質の解明

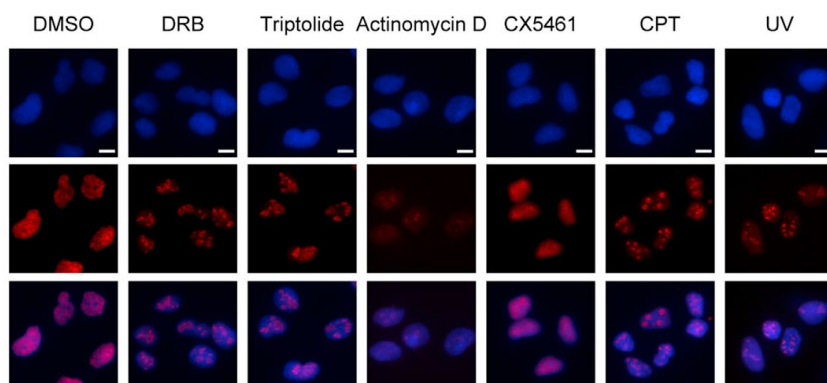
(5-A) SFPQ/NONO 凝集体形成過程を明らかにする。

(5-B) 液-液相分離の性質を Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 法を用いて解析し、SFPQ/NONO 凝集の性質を明らかにする。

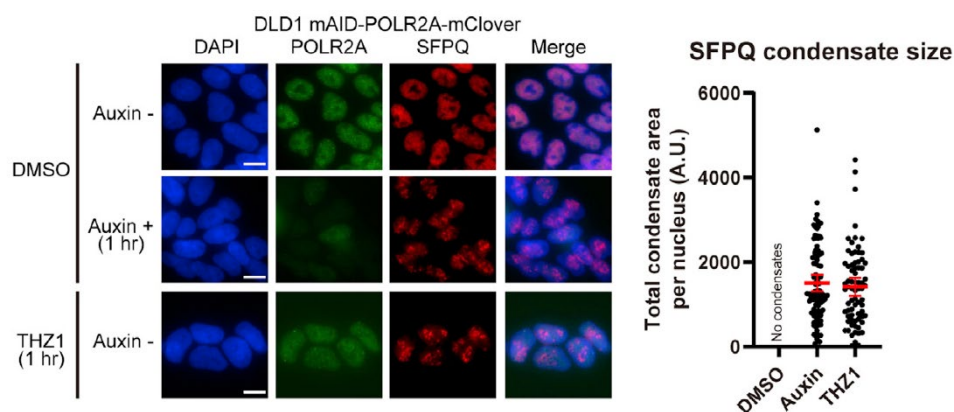
4. 研究成果 (※詳しい図の説明は Yasuhara et al. *Mol Cell* 2022 を参照)

(1) 凝集の誘導と転写伸長反応阻害の関連性

(1-A) 様々な RNAPII 阻害剤処理後の凝集体形成を評価したところ、RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) を直接的あるいは間接的に阻害する薬剤では、機序にかかわらず SFPQ による凝集体が形成された。一方、Actinomycin D や CX5461 など、主に RNA ポリメラーゼ I (RNAPI) を阻害する薬剤によってはこの凝集体は形成されることが判明した (右図)。



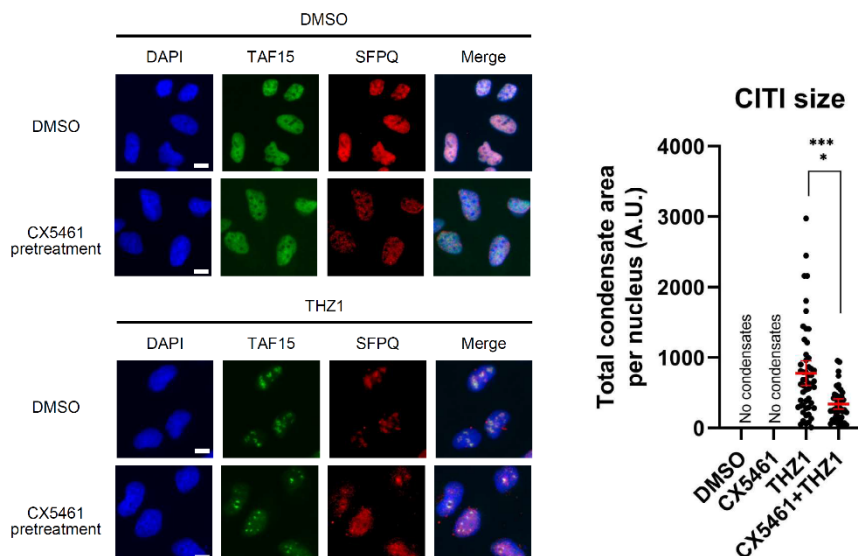
(1-B) 直接的な RNAPII の関与を検討するため、オーキシシンドロン法による RNAPII の分解が可能な細胞株を用いて、RNAPII 分解後の SFPQ の動態を検証した。その結果、オーキシシン添加後では、RNAPII 阻害剤 (THZ1) と同等のサイズの SFPQ 凝集体が形成された (右図)。以上より、RNAPII の阻害に特異的に SFPQ や NONO



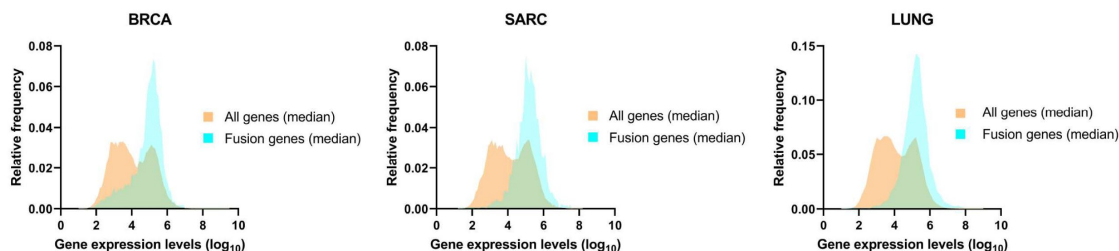
が凝集体を形成することが示された。この凝集体を Condensate Induced by Transcription Inhibition (CITI) と名付けた。

(2) 凝集に関与する RNA の同定とデータベースでの凝集体-染色体転座の関係性の検証

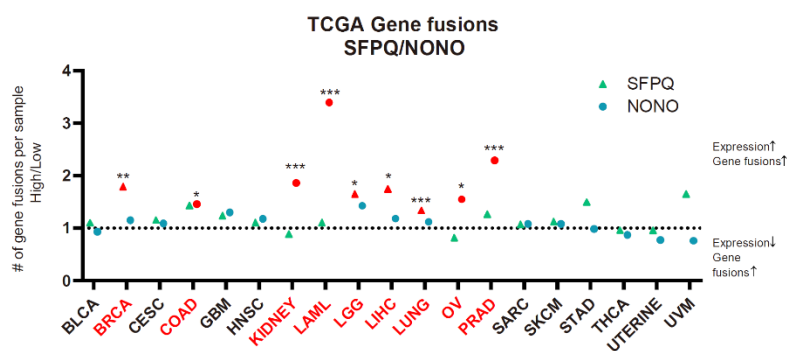
(2-A) パラスペックルはノンコーディング RNA NEAT1 を足場として形成されるため、次に NEAT1 の関与を検証したが、NEAT1 の非存在下でもこの凝集体は形成されることが判明した。さらに検討を進めたところ、CX5461 の前処理によって rRNA を減少させると、凝集体の形成が不全になることが判明した (下図)。その後の他の検証からも、SFPQ 凝集体の形成への rRNA の関与が示唆された。



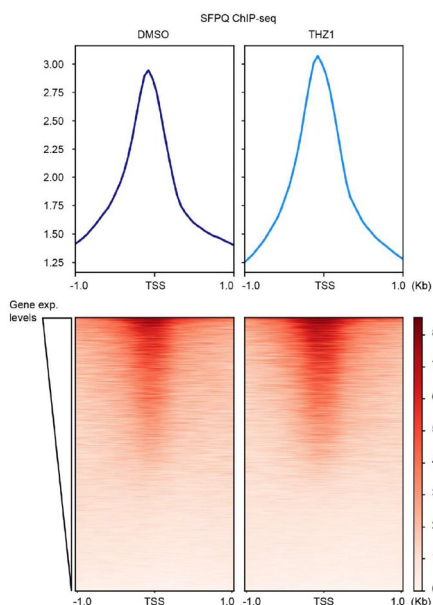
(2-B) 独自のがんデータベース解析系を用いて、転写活性化遺伝子・不活性化遺伝子における遺伝子融合の頻度、さらに凝集体形成因子 (SFPQ, NONO) と染色体転座頻度の関係性を検証した。まず、遺伝子融合が観察された遺伝子の発現量をプロットしたところ、全ての遺伝子の発現量の分布が bimodal な分布を示すのに対して、遺伝子融合が起こった遺伝子は高発現遺伝子に偏って分布していた。また複数のがん種において同様の傾向が見られた (下図)。



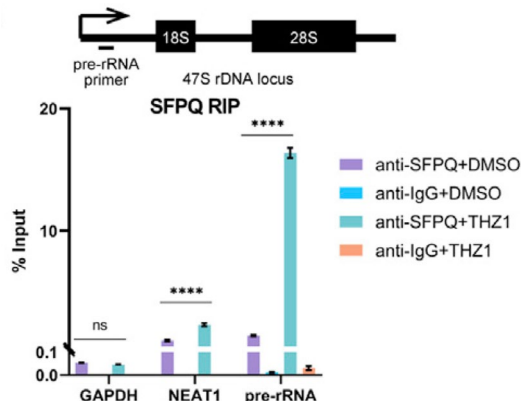
次に、SFPQ あるいは NONO の発現が高いサンプル群と、低いサンプル群の間で遺伝子融合の数を比較したところ、SFPQ あるいは NONO のいずれかの高発現と、遺伝子融合発生数に相関があるがん種が複数見つかった (下図、赤字)。このことは、SFPQ あるいは NONO による凝集体形成が遺伝子融合、染色体転座と関連することを裏付けた。



(3) SFPQ/NONO のクロマチン・RNA 結合状態

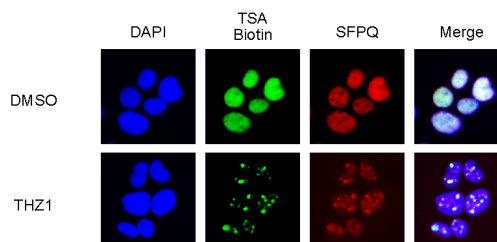


次に、SFPQ/NONO のクロマチンおよび rRNA への結合状態を検証した。その結果、SFPQ は遺伝子領域の転写開始点に主に結合しており、驚くべきことにその結合は凝集体形成状態でも変化しなかった (左図)。一方で、SFPQ の RNA 免疫沈降を行ったところ、凝集体形成下において未プロセシング状態の rRNA への結合が大幅に増加することが判明した (下右図)。

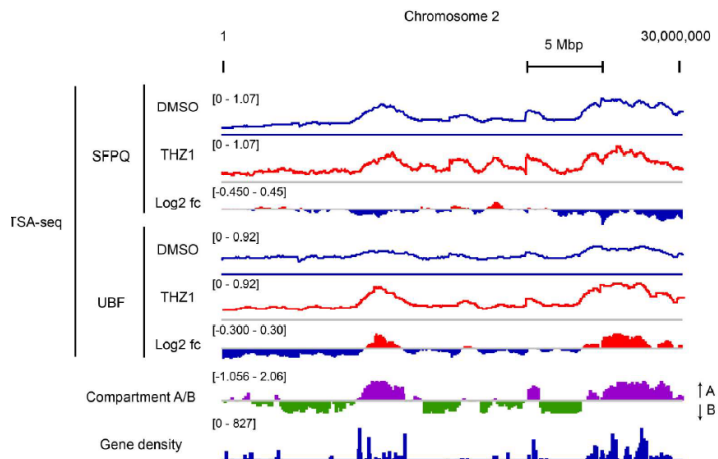


(4) SFPQ/NONO を介したクロマチン高次構造変化

凝集体形成によるクロマチン高次構造の変化、特に遺伝子領域における変化を検証することにした。当初は Hi-ChIP 法による検証を予定していたが、実際に実験を行ってみると検出感度が不足していることが判明した。そこで他の方法を検討し、TSA-seq (Chen et al. 2018) を用いることとした。SFPQ 凝集体をラベルし、その周辺だけにビオチン化を起こすことでその周囲にあった DNA を検出する方法である (右図)。

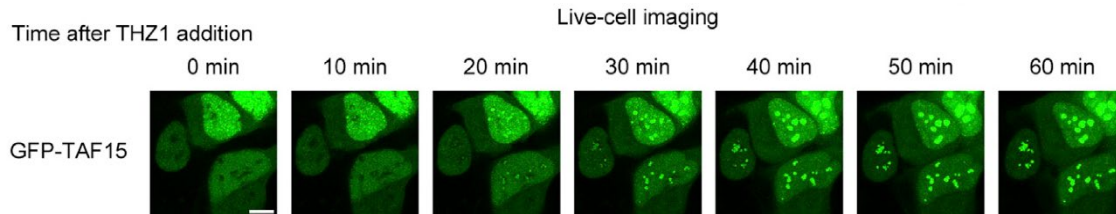


その結果、遺伝子が高密度に存在するコンパートメント A への SFPQ の結合は凝集体形成 (THZ1 処理) によって変化しない一方で、核小体 (UBF をマーカーとする) とコンパートメント A の相互作用は凝集体の形成によって増加することが判明した。このことは、高発現遺伝子領域が凝集体の形成に伴って核小体に巻き込まれているということを示唆した。



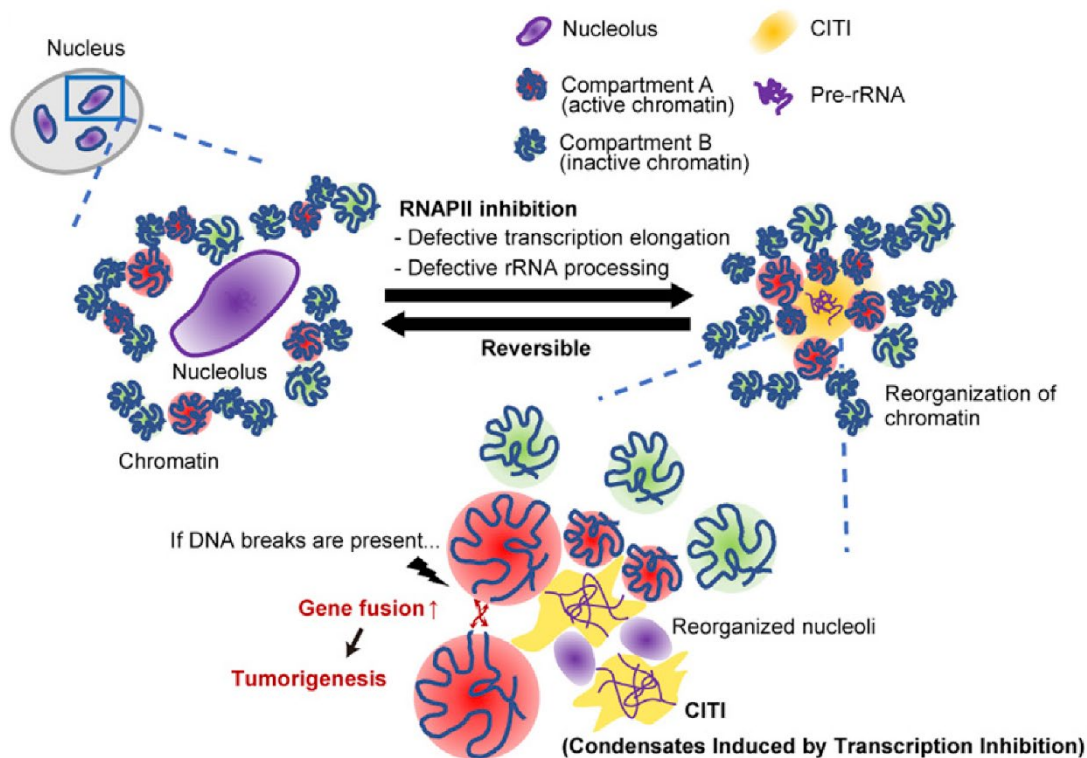
(5) ライブセルイメージングによる凝集の形成過程と性質の解明

凝集体形成過程を明らかにするため、凝集体形成因子である TAF15 のライブセルイメージングと、FRAP アッセイを行った。凝集体は転写阻害剤添加後 20 分程度から形成が始まり、60 分程度でプラトーに達すること、また FRAP アッセイの結果、過去に報告された液-液相分離因子と同様の非常に流動的な挙動を示すことがわかった。



(考察・結論)

以上のことより、転写活性化領域において遺伝子融合頻度が高いこと、RNAPII 阻害のようなストレス下においては、SFPQ/NONO/TAF15 などの RNA 結合因子が液-液相分離を介して核小体に rRNA を足場とした凝集体 CITI を形成すること、さらに、この CITI は領域遺伝子領域の中でも特に高発現遺伝子領域を核小体領域に巻き込み、その結果として染色体同士の近接性が達成されることが示された。これらのことから、CITI が介在する染色体の近接性によって遺伝子融合が転写活性化領域に好発するというモデルを提唱した (下図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Igarashi Taichi, Mazevet Marianne, Yasuhara Takaaki, Yano Kimiyoshi, Mochizuki Akifumi, Nishino Makoto, Yoshida Tatsuya, Yoshida Yukihiro, Takamatsu Nobuhiko, Yoshimi Akihide, Shiraiishi Kouya, Horinouchi Hidehito, Kohno Takashi, Hamamoto Ryuji, Adachi Jun, Zou Lee, Shiotani Bunsyo	4. 巻 14
2. 論文標題 An ATR-PrimPol pathway confers tolerance to oncogenic KRAS-induced and heterochromatin-associated replication stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-40578-2	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 Yasuhara Takaaki, Xing Yu-Hang, Bauer Nicholas C., Lee Lukuo, Dong Rui, Yadav Tribhuwan, Soberman Roy J., Rivera Miguel N., Zou Lee	4. 巻 82
2. 論文標題 Condensates induced by transcription inhibition localize active chromatin to nucleoli	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 2738 ~ 2753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2022.05.010	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 安原 崇哲	4. 巻 54
2. 論文標題 ゲノム安定性維持機構におけるarcRNA の役割	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 30-33
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 安原 崇哲	4. 巻 6
2. 論文標題 RNA を介したゲノム安定性の維持機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊「アグリバイオ」	6. 最初と最後の頁 77-81
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 Yasuhara Takaaki, Zou Lee	4. 巻 105
2. 論文標題 Impacts of chromatin dynamics and compartmentalization on DNA repair	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103162 ~ 103162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2021.103162	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Krishnan Badri, Yasuhara Takaaki, Rumde Purva, Stanzione Marcello, Lu Chenyue, Lee Hanjun, Lawrence Michael S., Zou Lee, Nieman Linda T., Sanidas Ioannis, Dyson Nicholas J.	4. 巻 221
2. 論文標題 Active RB causes visible changes in nuclear organization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202102144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202102144	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 Yasuhara Takaaki, Kato Reona, Yamauchi Motohiro, Uchihara Yuki, Zou Lee, Miyagawa Kiyoshi, Shibata Atsushi	4. 巻 38
2. 論文標題 RAP80 suppresses the vulnerability of R-loops during DNA double-strand break repair	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110335 ~ 110335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110335	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

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Takaaki Yasuhara
2. 発表標題 How Our Genome Is Protected From Mutagenesis
3. 学会等名 Asian Young Scientist Fellowship Annual Conference 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安原 崇哲
2. 発表標題 RNAを介したゲノム安定性維持機構
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takaaki Yasuhara
2. 発表標題 Genome maintenance by transcription-associated DNA double-strand break repair
3. 学会等名 2nd Fukuoka RNA commons (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takaaki Yasuhara
2. 発表標題 Toward an understanding of how chromosome translocations occur
3. 学会等名 Radiation Biology Center Mini-symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安原 崇哲
2. 発表標題 染色体転座の発生メカニズムに迫る
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安原 崇哲
2. 発表標題 リボソームRNAを足場とした液 液相分離によるゲノム制御機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takaaki Yasuhara
2. 発表標題 Condensates induced by nucleolar stresses mediate gene fusion
3. 学会等名 The 19th Ataxia-Telangiectasia workshop (ATW2023Kyoto) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安原 崇哲
2. 発表標題 RNAを介したゲノム安定性維持機構
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安原 崇哲
2. 発表標題 核内凝集体を介したがんゲノム不安定性誘導機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takaaki Yasuhara
2. 発表標題 Genome maintenance by RNA-mediated stress responses
3. 学会等名 The 12th International Symposium Gunma University Initiative for Advanced Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ゾウ リ (Zou Lee)	マサチューセッツ総合病院・がんセンター・教授	

	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
その他の研究協力者	リベラ ミゲル (Rivera Miguel)	マサチューセッツ総合病院	
その他の研究協力者	ソバ マン ロイ (Soberman Roy)	マサチューセッツ総合病院	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	マサチューセッツ総合病院			