

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03183

研究課題名（和文）染色体融合運命の多角的解析

研究課題名（英文）Multilateral analysis of the fate of chromosome fusions

研究代表者

林 眞理（Hayashi, Makoto）

京都大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：90761099

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、染色体融合が細胞に与える影響について解析した。課題1では、融合の結果として生じる細胞周期M期停止とM期テロメア脱保護現象について解析し、RECQヘリケースファミリー因子のWRN、及びBLMが関与する分子機構の一端を明らかにした。課題2では、染色体融合の運命について詳細に解析するためのレポーター細胞を開発し、姉妹染色分体融合の運命を解析した。その結果、融合から微小核が生じることが判明した。また、定説となっていた微小核による自然免疫応答についてもレポーターを用いて詳細に解析し、微小核はcGAS-STINGを介した自然免疫応答を活性化しないという新たな発見に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、染色体融合が細胞に与える様々な影響の一端についての分子レベルでのメカニズムを明らかにした。これらの知見は、細胞ががん化する過程の理解や、正常な細胞とがん細胞の差異の理解に繋がり、がん治療や遺伝病の新しい治療法開発に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the effects of chromosome fusion on cells. In Project 1, we examined the mitotic telomere deprotection phenomenon during the cell cycle arrest in M phase resulting from fusion, elucidating part of the molecular mechanisms involving the RECQ helicase family factors WRN and BLM. In Project 2, we developed reporter cells to analyze in detail the fate of chromosome fusion and investigated the fate of sister chromatid fusion. As a result, we discovered that micronuclei are generated from fusion. Furthermore, using the reporter cells, we conducted a detailed analysis of the innate immune response due to micronuclei, which had been a widely accepted theory. We made a novel finding that micronuclei are not potent inducer of the cGAS-STING-dependent innate immune response pathway.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：テロメア 染色体融合 細胞周期 RECQヘリケース 自然免疫 cGAS STING

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

染色体末端を保護するテロメアは、単純なリピート配列（脊椎動物では TTAGGG）と、その配列に特異的に結合する一連のタンパク質群から構成され、染色体末端が DNA 傷害として認識されることを防いでいる。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。これを細胞老化というが、細胞周期停止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。この時期には、テロメア配列を失った染色体末端同士が融合し、細胞集団のほとんどが最終的に死滅する。しかし、まれに生存した細胞が現れ、腫瘍化すると考えられている。よってテロメアクライシス期は、がん化の非常に初期の段階と捉えることができる。この時期の細胞の挙動は、染色体融合によって左右されるため、染色体融合がどのように細胞に影響を与えるかは、細胞のがん化を理解する上で非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究では、テロメアクライシス期の染色体融合が細胞にどのような影響を与えるのかを、(1)特定の種類の染色体融合が引き起こす表現型、及び(2)染色体融合の表現型の1つとしてのM期テロメア脱保護のメカニズム、という2つの側面から理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 特定の種類の染色体融合が引き起こす表現型解析

現時点で染色体融合の運命を説明する仮説は複数提唱されており、互いに相反する仮説も存在する。我々は、この相反の原因の一つとして、染色体融合の種類と数に着目した。がん細胞で検出される染色体融合には、姉妹染色分体融合（以下・姉妹融合）、異なる2本の染色体間の融合、同じ染色体内の両腕間の融合（染色体環状化）など、複数の種類が存在する。例えば、テロメアクライシスからがん細胞が生じる際には、姉妹融合の寄与が重要であることが報告されるなど、それぞれの融合が細胞に異なる影響を与える可能性があるが、その詳細は全く不明であった。

これまでの染色体融合に関する研究では、テロメア配列を失わせるか、テロメア結合タンパク質の機能を阻害することで、ランダムに染色体融合を誘導していた。しかしこの手法では、1細胞あたりの染色体融合の種類も数も制御できない。また、生きている細胞集団内でどの細胞が染色体融合をもつかを識別することもできず、特定の染色体融合の影響を生細胞において解析することは不可能であった。

我々は、神経細胞を様々な蛍光タンパク質で識別する Brainbow というシステムから着想を得て、創造的に発展させ、FuVis-XpSIS(FuVis for Xp SISter chromatid fusion)系の開発に至った。FuVis-XpSIS系は、X染色体短腕の姉妹融合を1つだけ保持する細胞を蛍光タンパク質でラベルすることができ、上記の制約を解消できる当該分野で他に類を見ないシステムである。本研究では、FuVis-XpSISを用いて、X染色体がどのような影響を受けるかを詳細に解析した。また、FuVis-XpSISを改変し、さらに厳密な解析を可能とするレポーター系を用いて、姉妹融合によって生じる微小核が細胞の自然免疫応答に与える影響を、主に生細胞解析によって追跡した。

(2) M 期テロメア脱保護のメカニズム解析

我々は、染色体融合の結果として、細胞周期 M 期停止が誘導されること、さらに M 期停止の結果として、M 期中に Aurora B キナーゼ(AURKB)依存的に、テロメアの脱保護が引き起こされる現象を発見・報告した。この我々が独自に発見した「M 期テロメア脱保護」について、染色体融合の引き起こす重要な表現型の一つと捉え、その分子メカニズムの解明に挑んだ。具体的には、ヒト繊維芽細胞 IMR-90 を不死化した IMR-90 hTERT E6E7 細胞を用い、微小管重合阻害剤によって細胞周期を M 期に停止させ、テロメアの保護状態に与える影響を様々な条件で観察した。

4 . 研究成果

(1) 特定の種類の染色体融合が引き起こす表現型解析

我々は、FuVis-XpSIS レポーター細胞を用いた生細胞解析、並びに数理解析により、姉妹融合が生じる最も顕著な異常が微小核形成であることを明らかにした。一方この解析から、FuVis-XpSIS レポーター細胞の課題が明らかとなったため、この課題点を改善した FuVis2-XpSC レポーターを開発した。この FuVis2 レポーターでは、X 染色体の短腕テロメア近傍領域に、改変した人工のレポーター配列を導入した。このレポーター配列を CRISPR/Cas9 によって切断することで、切断後にレポーター配列の一部を消失した細胞では mCerulean3 が発現し、複製後の姉妹間で融合が生じた細胞では mCitrine が発現する、というレポーター系であり、実際に mCitrine 発現細胞でのみ X 染色体の姉妹融合が見られることを確認した。FuVis2 を用いた生細胞解析から、初代 FuVis レポーターと同様に最も顕著な表現型が微小核形成であることを確認した。また、当初計画していた染色体環状化のレポーター作成にも挑んだが、効率が非常に低く解析に適さないことが分かった。

これらの結果を受け、当初予期していなかった進路へと研究内容を展開し、FuVis2 において生じる微小核が細胞に与える影響として自然免疫応答に着目した。細菌やウイルスの感染によって細胞質に生じる二本鎖 DNA に応答して自然免疫を活性化する因子として cGAS-STING 経路が近年報告された。さらに、微小核が生じた際には、核膜の不安定化と破裂を介して、自己 DNA を cGAS が認識して自然免疫応答が活性化されるとして非常に大きな注目を集めており、すでに定説のような扱いとなっていた。しかしながら、これらの報告は相関関係を因果関係と推論したものがほとんどであり、微小核が実際に cGAS-STING 経路を活性化するかは良くわかっていなかった。そこで我々は、FuVis2 に cGAS と STING のレポーターを追加で搭載し、微小核が生じた後の cGAS-STING 経路の活性化について生細胞を用いて厳密に解析した。その結果、定説に反して、微小核由来の DNA が最初に cGAS に捕捉されるのはほとんどの場合 M 期に入った直後であること、そしてその後の間期においても STING の活性化は見られないことを明らかにした。過去の報告では、微小核を生じる手段として放射線が良く用いられていたが、我々のレポーターを用いた解析から、放射線によって生じる STING の活性化は微小核とは無関係であり、ミトコンドリアの DNA が細胞質に漏出することが原因であることが明らかとなった。

cGAS-STING 経路を介しての自然免疫応答の活性化は、細胞の置かれた状況に応じて細胞の生育を阻害してがん化を抑制することなどが報告されていた。本成果によって、微小核はこれらの応答を引き起こしにくいことがわかり、微小核が従来考えられていたよりもより危険な染色体異常であることが示唆された。

(2) M 期テロメア脱保護のメカニズム解析

テロメアの保護構造である T ループに影響を与えうる酵素群として RECQ ファミリーヘリケースに着目し、小規模なスクリーニングを行った。その結果、WRN ヘリケースが M 期テロメア脱保

護の抑制に、BLM ヘリケースが促進に、それぞれ寄与することを明らかにした。これを受けてさらなる詳細な解析を行い、WRN ヘリケースは、酵素活性に非依存的に M 期テロメア脱保護を抑制していることを突き止めた。この抑制活性は、AURKB によるリン酸化によって減弱することが示唆された。一方 BLM ヘリケースの解析では、オーストラリアの研究チームとの国際共同研究を展開し、BLM 及び BLM と複合体を形成する TOP3A の酵素活性によって M 期テロメアの保護構造が解消され、テロメアが脱保護されることを明らかにした。さらに、この脱保護活性はテロメア結合因子 TRF2 によって抑制されること、TRF2 の抑制活性は AURKB による TRF2 の N 末リン酸化によって減弱することを明らかにした。また非常に興味深いことに、もう一つのテロメア結合因子である TRF1 は、M 期テロメア脱保護の促進に関わることも明らかにした。この TRF1 による促進機構には、同じく AURKB による TRF1 のリン酸化が関与することを発見した。

本成果から、M 期テロメア脱保護において少なくとも 3 つの因子が AURKB リン酸化のターゲットとなる制御機構の存在が明らかになった。M 期テロメア脱保護は我々が発見した現象であり、世界にさきがけてその分子機構の解明に貢献することができた。タキサン系やビンサルカロイド系など抗がん剤の一部では M 期停止と M 期テロメア脱保護を引き起こすことが分かっており、本成果はこれら抗がん剤の薬理効果に対して人為的な操作を可能にすることも期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Romero-Zamora Diana, Rogers Samuel, Low Ronnie Ren Jie, Robinson Andrew B., Page Scott G., Lane Blake J. E., Lamm Noa, Ishikawa Fuyuki, Hayashi Makoto T., Cesare Anthony J.	4. 巻 -
2. 論文標題 A CPC-shelterin-BTR axis regulates mitotic telomere deprotection	5. 発行年 2024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） 10.1101/2024.01.09.574754	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 該当する
1. 著者名 Sato Yuki, Hayashi Makoto T	4. 巻 7
2. 論文標題 Micronucleus is not a potent inducer of the cGAS/STING pathway	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	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） 10.26508/lsa.202302424	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 Romero-Zamora Diana, Hayashi Makoto T	4. 巻 13:645
2. 論文標題 A non-catalytic N-terminus domain of WRN prevents mitotic telomere deprotection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-27598-0	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 林真理	4. 巻 56
2. 論文標題 RECQファミリーヘリカーゼとテロメア制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本応用酵素協会誌	6. 最初と最後の頁 11-20
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kagaya Katsushi、Noma-Takayasu Naoto、Yamamoto Io、Tashiro Sanki、Ishikawa Fuyuki、Hayashi Makoto T	4. 巻 3
2. 論文標題 Chromosome instability induced by a single defined sister chromatid fusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	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) 10.26508/lisa.202000911	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yuki Sato, Hayashi MT
2. 発表標題 Micronucleus Derived from Chromosome Fusion Is Not a Potent Inducer of cGAS-STING Pathway
3. 学会等名 EMBO Workshop Telomere function and evolution in health and disease (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Diana Romero, Sam Rogers, Ronnie Ren Jie Low, Alexander Sobinoff, Scott G. Page, 石川冬木, Hilda Pickett, Anthony J. Cesare, 林眞理
2. 発表標題 M期テロメア脱保護の分子機構の解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林眞理
2. 発表標題 微小核は自然免疫を活性化するのか?
3. 学会等名 第2回細胞分裂研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤祐樹, 林眞理
2. 発表標題 染色体融合に起因する微小核はcGAS/STING経路を活性化しない
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Diana Romero Zamora*, Samuel Rogers*, Ronnie Ren Jie Low, Alexander Sobinoff, Scott G. Page, 石川 冬木, Hilda Pickett, Anthony J. Cesare**, 林 眞理**
2. 発表標題 M期テロメア脱保護の分子機構の解明
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Diana Romero-Zamora*, Samuel Rogers*, Ronnie Ren Jie Low, Alexander Sobinoff, Scott G. Page, Fuyuki Ishikawa, Hilda Pickett, Anthony J. Cesare**, and Makoto T. Hayashi**
2. 発表標題 AURKB-TRF1-BTR Axis Promotes Mitotic Telomere Deprotection by Counteracting the TRF2 Basic Domain
3. 学会等名 CSHL Meeting Telomere & Telomerase 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Zamora DR, Hayashi MT
2. 発表標題 A non-catalytic N-terminus domain of WRN prevents mitotic telomere deprotection
3. 学会等名 The 74th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	Diana Romero-Zamora, Samuel Rogers, Ronnie Ren Jie Low, Lara Abbouche, Vince Murphy, Alexander Sobinoff, Scott G. Page, Fuyuki Ishikawa, Hilda Pickett, Andrew Deans, Anthony J. Cesare, and Makoto T. Hayashi
2. 発表標題	TRF1-BTR-AURKB Axis Promotes Mitotic Telomere Deprotection by Counteracting TRF2
3. 学会等名	The International Ataxia-Telangiectasia Workshop 2023 (国際学会)
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	Diana Romero Zamora, Sam Rogers, 石川 冬木, Anthony J. Cesare, 林 眞理
2. 発表標題	TRF1-BTR-AURKB経路はTRF2と競合しM期テロメア脱保護を促進する
3. 学会等名	第40回染色体ワークショップ・第21回核ダイナミクス研究会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	林 眞理, 加賀谷 勝史
2. 発表標題	染色体融合可視化システムによる単一姉妹染色分体融合の運命解析
3. 学会等名	日本遺伝学会93回大会(招待講演)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	林眞理, Diana Romero, 石川冬木
2. 発表標題	M期テロメア脱保護の分子機構解析
3. 学会等名	第80回日本癌学会学術総会(国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 Diana Romero, Sam Rogers, 石川冬木, Anthony J. Cesare, 林真理
2. 発表標題 M期テロメア脱保護の分子機構解析
3. 学会等名 第9回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 真理, 加賀谷 勝史
2. 発表標題 染色体融合可視化システムによる単一姉妹染色分体融合の運命解析
3. 学会等名 日本人類遺伝学回第65回大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室紹介ページ(京都大学) https://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral_course/r-192/ 研究室紹介ページ(IFOM ETS) https://www.ifom.eu/en/cancer-research/researchers/makoto-hayashi.php 研究室ホームページ https://www.mthayashilab.com/ 研究室ホームページ https://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral_course/r-192/ 研究室ホームページ https://www.ifom.eu/en/cancer-research/researchers/makoto-hayashi.php 研究室ホームページ https://www.mthayashilab.com/ 研究室ホームページ https://www.mthayashilab.com/
--

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
研究分担者	加賀谷 勝史 (Kagaya Katsushi) (00580177)	東京大学・大学院情報理工学系研究科・特任研究員 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	ロメロザモラ ディアナ (Romero Zamora Diana)		
研究協力者	佐藤 裕樹 (Sato Yuki)		
研究協力者	シーザー アンソニー (Cesare J Anthony)		
研究協力者	山本 唯央 (Yamamoto Io)		
研究協力者	石川 正真 (Ishikawa Shoma)		

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			
イタリア	IFOM ETS			
オーストラリア	Children's Medical Research Institute			