

(様式6)

2025 年度 博士論文要旨

論文題目

染色体の異数性が細胞に及ぼす影響とその作用機序の研究

英文題目

Mechanistic study on the cellular effects of chromosomal aneuploidy

氏 名 久世陸
(ローマ字表記) Riku Kuse

(要旨)

第1章 緒言

DNA が遺伝情報の本質であることが明らかにされて以来、生命科学の進展は、遺伝情報が一次配列のみならず、染色体という高次構造やエピジェネティックな制御に深く依存していることを明らかにしてきた。真核生物において、ゲノム情報を複数の染色体に分割して保持する戦略は、複製および分配におけるコストやリスクの観点からは一見非合理的である。しかし、現存する真核生物の多様性は、染色体によるゲノムの分割こそが、遺伝情報の動的な再編成を許容し、進化や環境適応の源泉となってきたことを示唆している。すなわち、染色体には遺伝情報の正確な継承を担う「堅牢性」と、選択圧に応じて構造を変じうる「可塑性」という、相反する特性が共存していると言える。この可塑性の実体は、染色体の安定維持を担うセントロメアやテロメアといった機能ドメインが、ある種の構造的な柔軟性や曖昧さを内包していることに起因していると考えられる。

これら機能ドメインの機能不全は、大規模な染色体構造の変化 (**Gross Chromosomal Rearrangements; GCRs**) を誘発する主要因となる。例えば、テロメアの保護機能喪失は染色体末端融合を招き、二動原体染色体の形成を経て、**Breakage-Fusion-Bridge** サイクルと呼ばれるゲノム不安定化の連鎖を引き起こす。我々はこれまで、分裂酵母において部位特異的組換え酵素 **Cre** を用い、人為的にセントロメアを除去するセントロメア破壊アッセイを樹立してきた。この実験系を用いた解析により、セントロメアを失った染色体が、新規セントロメア形成による機能回復 (ネオセントロメア形成)、あるいは異なる染色体間の末端融合 (テロメア融合) といった **GCRs** を経て、致死性を回避したサバイバーが出現し得ることが明らかとなっている。

しかしながら、セントロメア喪失がいかなる細胞内プロセスを経て最終的な **GCRs** に至るのか、その詳細な分子機構、とりわけ再編成の直接的なトリガーや初期挙動については未だ不明な点が多い。加えて、従来の実験系には酵素過剰発現による細胞毒性や、サバイバー出現頻度の定量的解析が困難であるといった技術的課題が残されていた。

そこで本研究では、セントロメア喪失に伴う細胞応答と **GCRs** の分子基盤解明に向け、以下の二点を主要な目的とした。第一に、部位特異的組換え酵素 **Cre** の発現制御を最適化し、細胞毒性を低減させつつ、染色体再編成の頻度を正確に定量可能な改良型アッセイ系を確立することである。第二に、セントロメア破壊直後の染色体の挙動を詳細に追跡することである。セントロメアを失った染色体が細胞内で如何なる運命を辿り、それが細胞に対し如何なる影響を及ぼすことで劇的なゲノム再編成が誘導されるのか。その初期プロセスを解明することにより、**GCRs** に至る作用機序を明らかにすることを目指した。

第2章 5'UTR 変異を用いたセントロメア破壊アッセイの最適化

セントロメア破壊アッセイは、部位特異的組換え酵素 Cre の一過的な発現によりセントロメア領域を切除し、その致死性から生じる染色体再編成サバイバーを獲得する強力な手法である。しかしながら、分裂酵母における Cre 発現制御には困難が伴う。誘導性プロモーターである *nmt1* プロモーター系を用いた場合、抑制条件下（チアミン存在下）でも Cre のリーキーな発現が無視できない細胞毒性を引き起こし、プラスミド形質転換効率の著しい低下を招くという問題があった。このため、従来は最も弱いプロモーター (*nmt81*) を採用せざるを得ず、さらにスクリーニング前の煩雑な致死性同定ステップが必須となっていた。本研究は、この技術的制約を克服し、アッセイの堅牢性および操作性の向上を試みた。

異所性遺伝子の発現レベル調節において、転写制御に加えて翻訳効率の調節を試みた。具体的には、Cre mRNA の 5'非翻訳領域 (5'UTR) に変異を導入することにより、翻訳開始の冗長性を活用した Cre の発現抑制を企図した。作製したのは、上流に小規模なオープンリーディングフレーム (upstream Open Reading Frame; uORF) を組み込んだコンストラクトと、開始コドン AUG を非同義置換 (non-AUG; nAUG) したコンストラクトである。前者は、上流に配置した ORF がリボソームを捕捉することで下流にある Cre の翻訳開始を競合的に阻害し、後者は、開始コドンを翻訳開始能の低い AUA に置換することでリボソームによる認識効率を直接的に低下させるものである。ウエスタンブロッティングおよび RT-qPCR を用いた解析の結果、5'UTR 変異の導入は Cre mRNA の転写量には影響を及ぼすことなく、翻訳効率の低下を介して細胞内の Cre タンパク質量を顕著に減少させることを確認した。この発現レベルの低下は、nAUG 変異が uORF 変異よりも強力であった。この翻訳レベルでの抑制は、中程度および最弱のプロモーター (*nmt41*、*nmt81*) との組み合わせにおいても有効であった。さらに、この発現制御により、従来型アッセイで問題となっていた Cre のリーキーな発現による細胞毒性がほぼ抑制され、形質転換効率とコロニーサイズの均一性が大幅に改善された。改良されたコンストラクトをセントロメア破壊株に導入し誘導実験を行った結果、最も理想的な誘導プロファイルを示したのは *nmt41*-nAUG-Cre であった。この新規コンストラクトは、従来型 (*nmt81*-Cre) と比較してサバイバー出現頻度自体は低下したものの、独立した形質転換体間における染色体再編成頻度の均一性を向上させた。また、得られたサバイバーのネオセントロメア形成細胞とテロメア融合細胞の比率は従来型アッセイと同様の傾向を示した。

以上の結果より、翻訳効率の制御が、プロモーター選択と同様に異所性遺伝子の発現レベルを精緻に調節する上で有効な手段であることが実証された。本研究で確立された 5'UTR 変異を利用したアッセイ系は、セントロメア破壊実験における煩雑な選別ステップを排除し、様々な変異体間での染色体再編成頻度を均一なバックグラウンドで比較することを可能にした。この翻訳制御による遺伝子発現のコントロールはセントロメア破壊アッセイのみならず、異所性遺伝子発現を必要とする様々な実験系における発現レベルの精緻な調節を可能にする。

第3章 急性の染色体異数性に対するミトコンドリア応答が染色体再編成を駆動する

セントロメア破壊アッセイにより獲得されるネオセントロメア形成細胞やテロメア融合細胞は、固形がん細胞などに見られるような無秩序な崩壊とは異なり、秩序立った GCRs を経る。この特異的な再編成経路の起点となるイベントを解明するために、セントロメア喪失がもたらす細胞応答に着目した。セントロメア破壊を誘導した結果、セントロメアを喪失した染色体は細胞から脱落することなく、その後の細胞分裂において高頻度で染色体不分離を引き起こすことで、不安定な核型を持つ急性の染色体異数性細胞が生じた。予想に反し、この急性の染色体異数性細胞は直ちに致死には至らず、数回の細胞分裂を継続した。急性の染色体異数性細胞における転写応答解析の結果、遺伝子のコピー数増加に必ずしも対応しない、グローバルな転写応答が引き起こされていた。さらに、この応答の機能的特徴を抽出した結果、異数化する染色体の種類に依らず、ミトコンドリア呼吸鎖やエネルギー代謝経路に関連する遺伝子群が普遍的かつ有意に発現亢進していることが明らかとなった。

さらに詳細な解析により、急性の染色体異数性細胞において激しいミトコンドリア形態変化を観察した。この形態変化の定量解析により、ミトコンドリアネットワーク構造が断片化を引き起こしていることが明らかとなった。ミトコンドリア阻害剤を用いた実験結果との比較から、この断片化はミトコンドリア機能の低下を反映していると推察された。また、このミトコンドリアネットワークの断片化が活性

酸素種 (ROS) の蓄積を引き起こすことを確認し、ROS 抑制剤を用いた実験により、染色体異数性そのものが ROS 産生に先行してミトコンドリアの断片化を誘導するという因果関係を明らかにした。

最後に、ミトコンドリア変化に伴い産生された ROS が核内の染色体に及ぼす影響を検証した結果、急性の異数性細胞においては DNA 二本鎖切断マーカーの有意な増加が確認された。さらに、セントロメア破壊におけるサバイバーの出現頻度が ROS 抑制剤の添加により低下したことから、核内で生じた急性の染色体異数性がミトコンドリアの応答を引き起こし、その結果生じた ROS が核内の染色体に DNA ダメージを誘発することで、ネオセントロメア形成やテロメア融合といった GCRs が駆動されるという細胞応答経路が明らかとなった。本知見は、核内での染色体構造変化とオルガネラストレス応答が連動し、ゲノム安定維持機構を再構築するという、真核生物の染色体再編成メカニズムの一端を提案するものである。

第4章 総括

本研究では、セントロメア機能の喪失によって誘導される急性の染色体異数性が、どのように細胞応答を引き起こし染色体再編成へ至るのか、その一連の過程を明らかにした。セントロメア破壊により生じる染色体不分離は、遺伝子のコピー数変化に依存しない普遍的な転写応答を誘導し、この応答は核内にとどまらずミトコンドリアに波及した。急性の染色体異数性はミトコンドリアの断片化と ROS 増加を引き起こし、このミトコンドリア由来の酸化ストレスが染色体再編成の直接的な駆動力であると示された。分裂酵母を用いたセントロメア破壊アッセイは、個別染色体の急性の異数性を解析できる強力な手法であり、異なる染色体間に共通する普遍的応答の抽出を可能にした点で大きな意義がある。また、核とミトコンドリア間の染色体数の不均衡に基づくクロストークの存在を明らかにしたことは核-オルガネラ間ネットワークの新たな視点を提供した。一方で、染色体数変化をミトコンドリアがどのように感知するかなど未解明の課題も残されている。本研究が明らかにした、染色体異数性ストレスを起点とし、オルガネラ応答を経てゲノム再編成に至る一連の分子機構は、細胞が危機的状況下で遺伝的多様性を生み出す原始的な生存戦略の一端かもしれない。