

# 博士論文要約

論文題目（邦題）

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

論文題目（英題）

Mechanistic study on the cellular effects of chromosomal aneuploidy

氏名 久世 陸  
Riku Kuse

（要約）

## 第1章 緒言

真核生物のゲノムは染色体という DNA と多様なタンパク質が高次構造を形成した核内構造体によって分割して担われている。真核生物における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。しかしながら、現存する真核生物は多様性に富み、高次の細胞機能を備えている。このような真核生物の特長は、染色体の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生じる可塑性という、相反する特性が共存しているためと考えられる。

染色体にはゲノムの維持・継承のために必須である3つの要素が存在する。セントロメア、テロメア、複製起点は細胞核内においてそれぞれ独立して、染色体全体の正確な複製と分配を通してゲノムの忠実な継承に関与する多様なタンパク質を格納している。そして、これらの3つの必須要素は基本的にその機能の重複や冗長を許容できない。しかしながら、増殖を繰り返す細胞においては低頻度ながらこれらの要素の重複や喪失が生じる。これらの要素の変化は基本的に細胞に致命的な影響を及ぼすが、一部の細胞においては2次的な応答によって緩衝されることがある（図1）。このような一連の細胞応答を経ることにより、染色体構造には大規模な変化が引き起こされる。このような染色体構造の変化は GCRs（Gross Chromosomal Rearrangements; GCRs）として知られている（図1）。しかしながら GCRs に至る詳細な細胞応答経路は明らかになっていない。

そこで本研究は、分裂酵母における人為的な GCRs の誘導が可能な実験系であるセントロメア破壊アッセイを用いて GCRs に至る細胞応答経路を明らかにすることを目的とした。セントロメア破壊アッセイは分裂酵母のセントロメア領域を部位特異的組

換え酵素を用いて染色体上から切除する。セントロメアの喪失によってほとんどの細胞は致死となるが、一部の細胞はネオセントロメア形成やテロメア融合といった GCRs を経てその致死性を回避する。セントロメア破壊アッセイによって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 GCRs に至る作用機序を明らかにすることを旨とした。

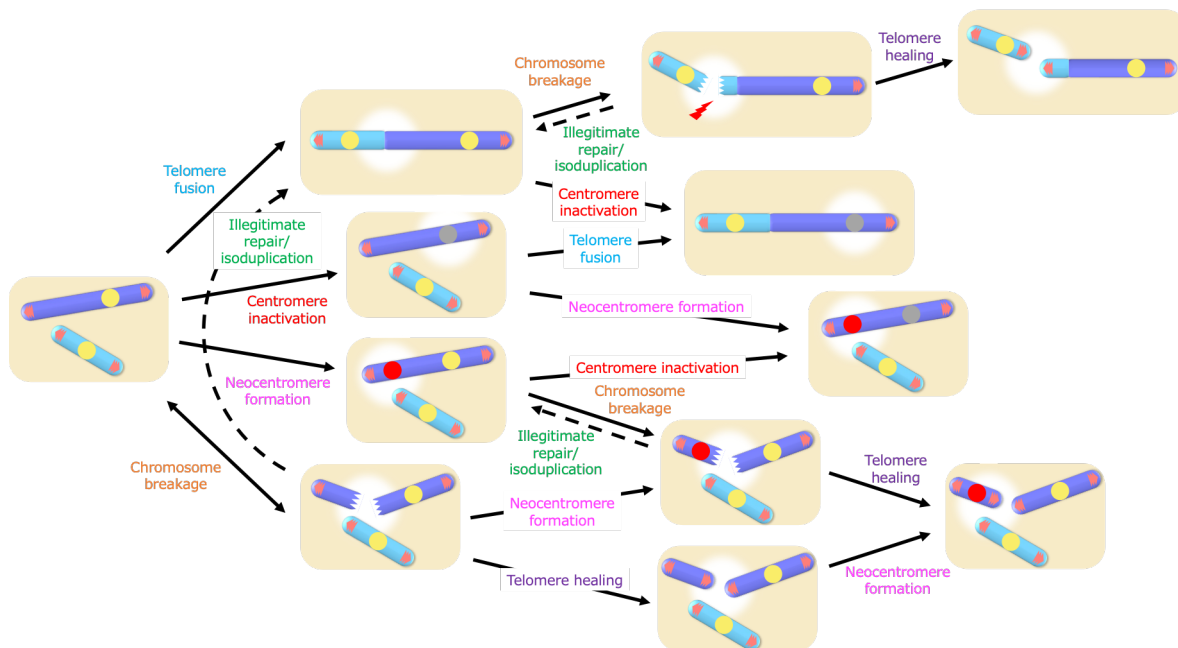


図1 テロメアやセントロメアの喪失や獲得に伴う染色体変化

## 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 を一過的に発現させることでセントロメア領域を切除し、その致死性を相補する GCRs サバイバーを単離する実験系である。一方で、分裂酵母において Cre 発現を厳密に制御することは容易ではない。誘導性プロモーターである *nmt1* プロモーター系を利用した場合、抑制条件下（チアミン存在下）であっても Cre のリーキー発現が完全には抑えられず、それが無視できない細胞毒性を引き起こす。この結果、プラスミド形質転換効率が著しく低下するという技術的課題が存在していた。そのため従来法では、最も弱いプロモーターである *nmt81* を使用せざるを得ず、さらにスクリーニングに先立って致死性を評価する煩雑な工程を経る必要があった。本研究では、こうした制約を解消し、アッセイ系の再現性および実験操作の効率を向上させることを目的とした。

異所性遺伝子の発現制御をより精緻に行うため、転写レベルの制御に加えて翻訳効率に着目した調節を試みた。具体的には、Cre mRNA の 5'非翻訳領域 (5'UTR) に改変を加えることで、翻訳開始段階における制御機構を利用し Cre 発現を抑制する設計とした。作製したコンストラクトは二種類であり、一つ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) を挿入したもの、もう一つは開始コドン AUG を非同義置換により non-AUG (nAUG) へ改変したものである (図 2)。前者では、上流 ORF がリボソームの結合を競合的に占有することで下流の Cre 翻訳開始を抑制することを想定した。後者では、翻訳開始効率の低い AUA へと開始コドンを置換することで、リボソームによる認識頻度そのものを低減させる設計とした。

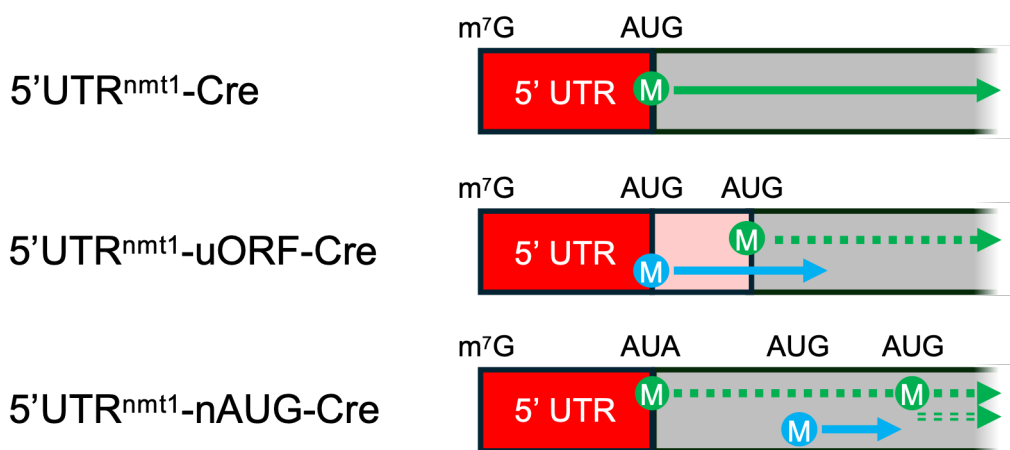


図 2 セントロメア破壊の最適化に向けた翻訳制御戦略

ウエスタンブロッティングおよび RT-qPCR 解析の結果、5'UTR 改変は Cre mRNA の転写量にはほとんど影響を及ぼさない一方で、翻訳効率の低下を通じて細胞内 Cre タンパク質量を明確に減少させることが示された。特に nAUG 変異は uORF 変異と比較してより強い抑制効果を示した。この翻訳段階での発現抑制は、中程度および最弱のプロモーター (*nmt41* および *nmt81*) と組み合わせた場合にも有効に機能した。さらに、この制御戦略の導入により、従来型アッセイで問題となっていたリーキー発現由来の細胞毒性が大幅に軽減され、形質転換効率の回復とコロニーサイズの均一化が達成された。

改良型コンストラクトをセントロメア破壊株へ導入し誘導実験を実施したところ、最も望ましい誘導特性を示したのは *nmt41*-nAUG-Cre であった。この新規コンストラクトでは、従来型 (*nmt81*-Cre) と比較してサバイバー出現頻度は低下したものの、独立した形質転換体間における染色体再編成頻度のばらつきが抑えられ、より均質な背景での解析が可能となった。また、得られたサバイバーにおけるネオセントロメア

形成細胞とテロメア融合細胞の比率は従来法と同様の傾向を示し、アッセイの本質的性質は保持されていることが確認された。

以上の結果から、翻訳効率の制御は、プロモーター強度の選択と同様に、異所性遺伝子発現を精密に調整するための有効なアプローチであることが明らかとなった。本研究で確立した5'UTR 改変型アッセイ系は、セントロメア破壊実験における事前選別工程を不要とし、異なる変異背景間での染色体再編成頻度を統一的な条件下で比較可能とする基盤を提供する。さらに、この翻訳段階での発現制御戦略は、セントロメア破壊アッセイに限らず、異所性遺伝子発現を必要とする多様な実験系において、発現レベルをより柔軟かつ精緻に制御するための汎用的手法として応用可能である。

### 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って得られるネオセントロメア形成細胞やテロメア融合細胞は、大規模染色体再編成（GCRs）を経て生存する。この再編成経路がいかなる細胞応答イベントによって駆動されるのかを明らかにするため、本研究ではセントロメア喪失に対する細胞応答に着目した。

セントロメア破壊を誘導したところ、セントロメアを失った染色体は直ちに細胞核から脱落するのではなく、その後の細胞分裂過程において高頻度の染色体不分離を引き起こした。その結果として、不安定な核型を有する急性の染色体異数性細胞が出現した。興味深いことに、この急性異数性状態は即時の致死をもたらすものではなく、細胞は数世代にわたり分裂を継続した。急性の染色体異数性細胞における転写プロファイルを解析した結果、単純な遺伝子コピー数増加に比例した発現変化だけでは説明できない、全ゲノム規模の転写応答が誘導されていることが明らかとなった。さらに普遍的な転写応答が見られた遺伝子群において、GO エンリッチメント解析を行ったところ、異数化した染色体の種類にかかわらず、ミトコンドリア呼吸鎖およびエネルギー代謝関連遺伝子群が共通して有意に発現上昇していることが判明した。

この転写応答の背景にある細胞内変化を検証するため、ミトコンドリアの形態に着目した詳細な観察を行った。その結果、急性の染色体異数性細胞では顕著なミトコンドリア形態の変化が生じており、定量解析からミトコンドリアネットワークが高度に断片化していることが示された。ミトコンドリア阻害剤処理時の表現型との比較により、この断片化は単なる形態変化ではなく、ミトコンドリア機能低下を反映する現象であると考えられた。さらに、このネットワーク断片化が活性酸素種（ROS）の蓄積を伴うことを確認した。ROS 抑制剤を用いた実験により、染色体異数性の成立が

ROS 産生に先行し、まずミトコンドリアの断片化を誘導するという因果関係が支持された。

続いて、ミトコンドリア機能変化に伴い増加した ROS が核内ゲノムに及ぼす影響を検証した。その結果、急性の染色体異数性細胞において DNA 二本鎖切断マーカーが有意に増加していることが示された。加えて、セントロメア破壊アッセイにおけるサバイバー出現頻度は ROS 抑制剤の添加によって低下した。これらの結果は、核内で生じた急性の染色体異数性がミトコンドリア応答を誘導し、その過程で産生された ROS が核内染色体に DNA 損傷をもたらすことで、ネオセントロメア形成やテロメア融合といった GCRs を駆動するという一連の細胞応答経路の存在を示している。

以上より、本研究は、核内での染色体構造変化がオルガネラレベルのストレス応答を誘発し、そのフィードバックとして再び核ゲノムへ作用するという連関機構を提示するものである (図 3)。この知見は、真核生物における染色体再編成が単なる局所的 DNA イベントではなく、核-オルガネラ間の動的相互作用の中で組織化される現象であることを示唆し、ゲノム安定性維持機構の再構築過程に新たな視座を与えるものである。

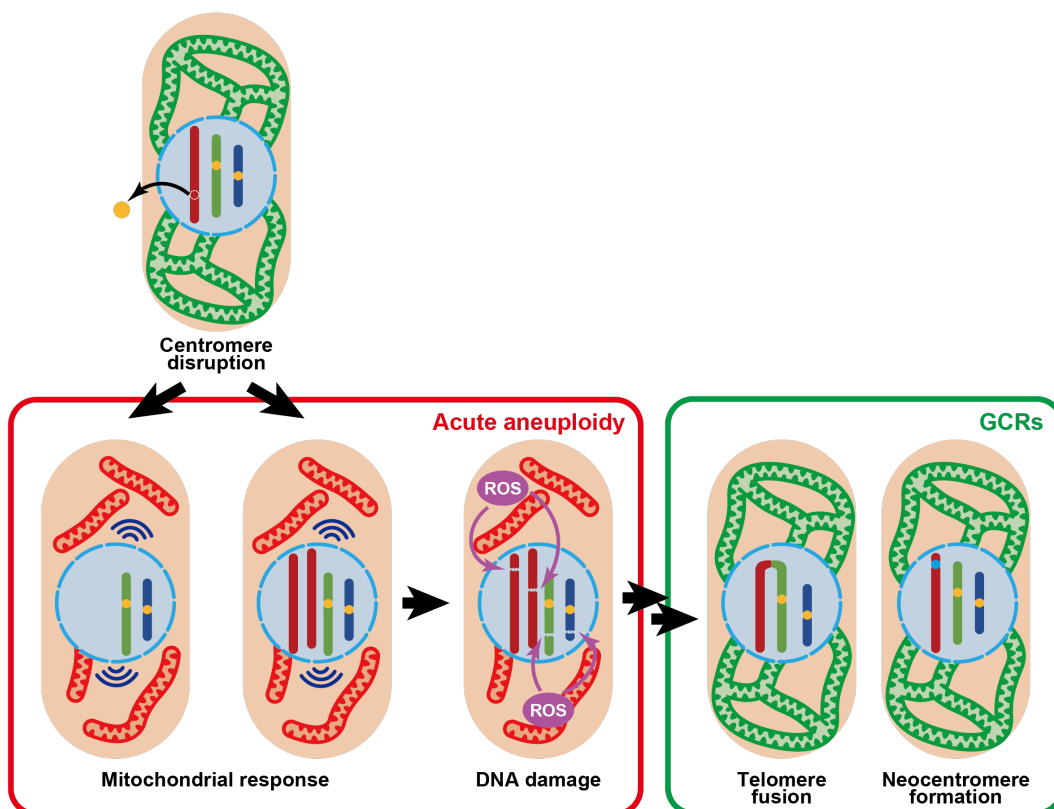


図 3 核-ミトコンドリア間クロストークによる染色体再編成モデル

## 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、いかなる細胞応答を惹起し、最終的に染色体再編成へと接続されるのかという一連の過程を体系的に解明した。セントロメア破壊に起因する染色体不分離は、単なる遺伝子コピー数変動の帰結にとどまらず、それに依存しない普遍的な転写応答を引き起こすことが明らかとなった。この応答は核内で完結するものではなく、ミトコンドリア機能へと波及することが示された。

急性の染色体異数性は、ミトコンドリアネットワークの顕著な断片化と活性酸素種（ROS）の増加を誘導した。さらに、このミトコンドリア由来の酸化ストレスが核内DNAへ作用し、染色体再編成を直接的に促進する駆動因子となることを実験的に示した。すなわち、核内で生じた染色体数の不均衡が、オルガネラ応答を介して再び核ゲノムへ影響を及ぼすという、双方向的なストレス伝達経路の存在が明確となった。

分裂酵母を用いたセントロメア破壊アッセイは、個々の染色体に対する急性異数性の影響を分離して解析できる点で有用であり、異なる染色体に共通する普遍的応答を抽出することを可能にした。この実験系を通じて、核とミトコンドリア間の染色体数不均衡に基づくクロストークの存在が示されたことは、核-オルガネラ間ネットワークの理解に新たな視点を与えるものである。

一方で、染色体数の変化という核内イベントをミトコンドリアがどのような分子機構で感知しているのか、その初期センシング機構については未解明の課題が残されている。今後、この点を明らかにすることにより、染色体異数性ストレス応答の全体像がより明確に描き出されると期待される。

本研究が提示した、染色体異数性ストレスを起点とし、オルガネラ応答を経由して最終的にゲノム再編成へ至る一連の分子機構は、真核生物が危機的状況下において遺伝的多様性を創出し、生存可能性を拡張するための戦略の一端を示している可能性がある。