

令和 2 年 6 月 29 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860233

氏 名

安原 崇哲

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：ハーバード大学医学大学院（国名：米国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

R-loop 構造を介した DNA 損傷シグナリングによるゲノム安定性維持機構の解明

3. 派遣期間：平成 30 年 6 月 3 日 ～ 令和 2 年 6 月 2 日

4. 受入機関名及び部局名

Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital

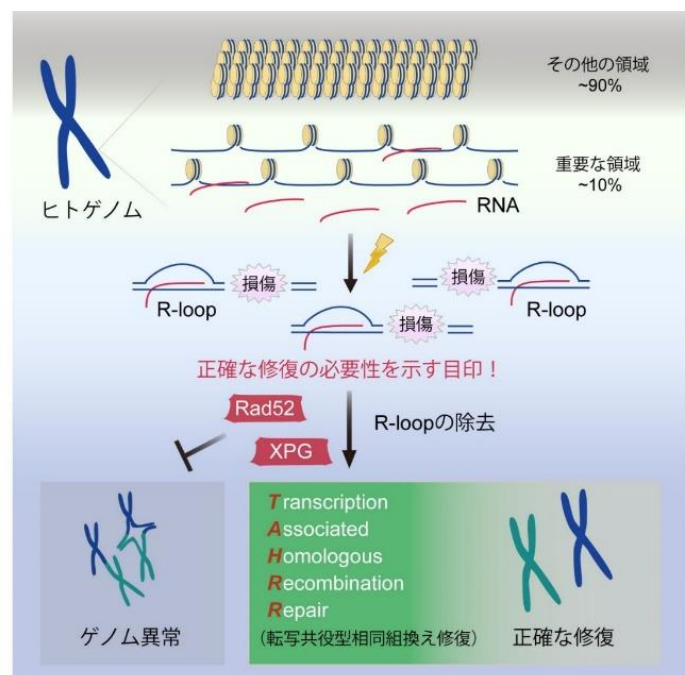
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

がんにおいて見られるゲノム異常は多岐にわたるが、我々の広大なゲノムの中でも遺伝子領域に欠損、挿入、染色体転座（すなわち遺伝子融合）が生じた場合には、遺伝子の機能異常をもたらし、最も顕著にがん化を促進する。つまり、転写が活性化している領域においては、その部位のゲノム機能の喪失を防ぐために DNA 損傷を正確に修復する必要性が高いと考えられる。最近、転写領域のゲノム安定性維持機構として、転写共役型相同組換え修復機構の存在が明らかとなった

(Yasuhara* et al. Cell 2018 *lead corresponding author、Kato et al* Mol. Cell. Oncol. 2019 *corresponding author)。転写領域を特徴づける性質として豊富な RNA の存在が挙げられるが、その領域に DNA 二重鎖切断 (DSB) が生じると、R-loop 構造

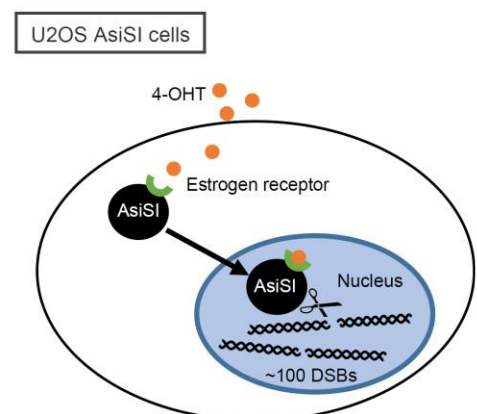
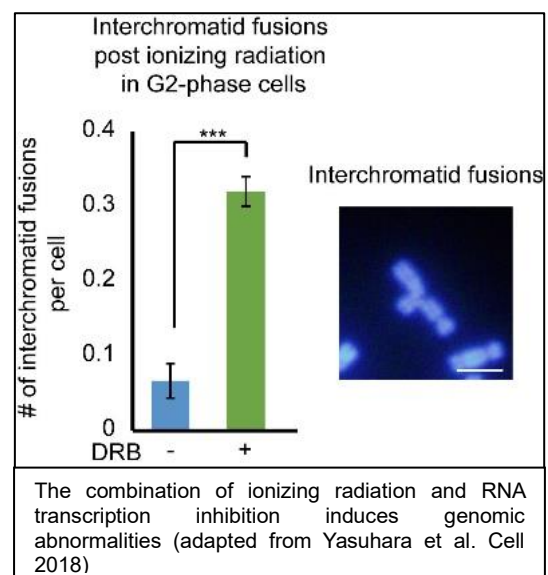


と呼ばれる、DNA/RNA ハイブリッド二重鎖と DNA 一重鎖からなる特殊な核酸構造体が形成されることを発見した。さらに、この R-loop 構造に応答し、解消するタンパク質群を同定し、その解消が起点となって、正確な修復機構である相同組換え修復が誘導されることを明らかにした（上図）。これらの成果は 2019 年 1 月に行われた **Keystone Symposia - Genomic Instability and DNA Repair** および 2019 年 12 月に行われた第 42 回日本分子生物学会年会にて発表した。

一般に相同組換え修復は姉妹染色体を鋳型として利用するため、転写共役型相同組換え修復も細胞周期の S/G2 期にしか起きない。次に G1 期における転写領域のゲノム安定性維持機構についても追究した。その結果、G1 期においても R-loop 構造は形成されたが、S/G2 期とは異なるタンパク質によって処理されることを同定した。そして、この R-loop 構造の処理を起点として、これまでに知られていなかった新たな DSB 修復経路で修復が行われ、染色体転座や欠失などのゲノム異常の発生が抑制されていることを明らかにした。これらのことから、細胞周期によって異なる機構で、しかし、いずれの場合においても転写領域を識別するマークとして R-loop 構造を利用することで、その部位の損傷を正確に修復するという、極めて精緻なメカニズムによって転写領域に異常が生じることを防いでいると考えられた。

転写共役型 DSB 修復機構を阻害した場合には、染色体転座などのゲノム異常が顕著に増加したことに着目し（右図、DRB：転写阻害剤、Interchromatid fusion：姉妹染色体間結合、染色体転座の指標の一つ）、転写とゲノム異常の発生の関係性をさらに追及したいと考えた。そこで「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」という問いを立て研究を進めた。

まず、転写活性化領域において染色体転座を検出できる系の開発を行った。タモキシフェン誘導性に制限酵素 AsiSI を核内に移行させ、ゲノム内に部位特異的な DNA 損傷を複数誘導できる細胞

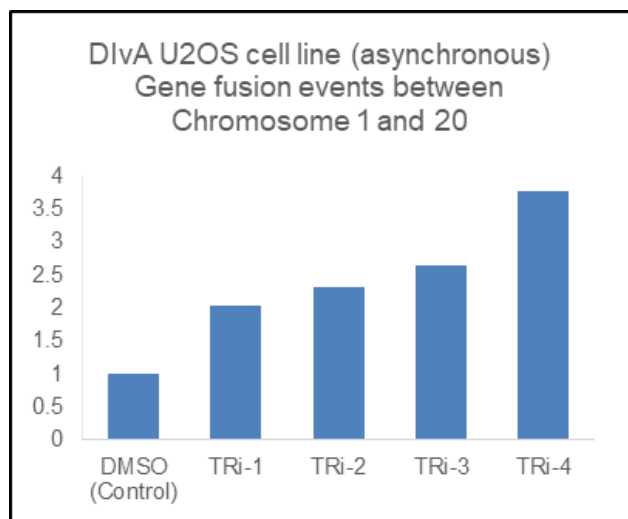
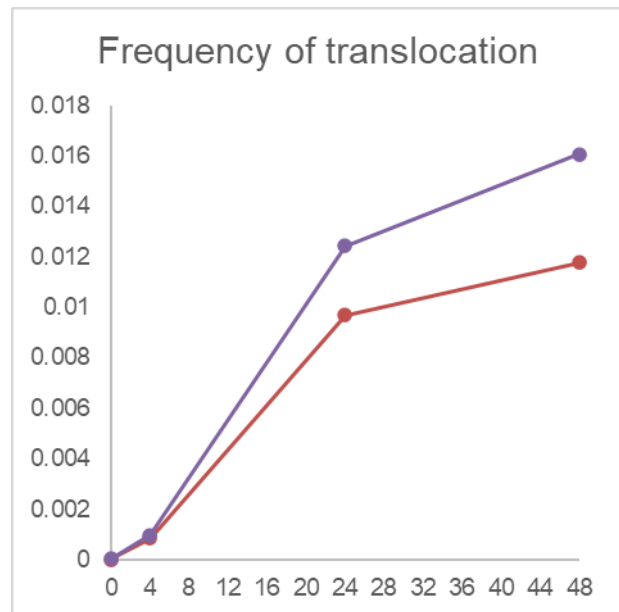
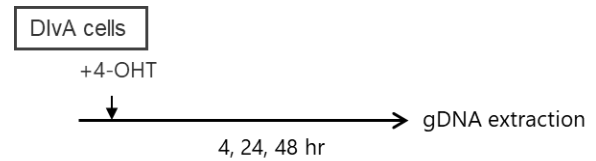


(Iacovoni et al. 2010、DlvA 細胞、右図参照) を用いて、誘導された DSB 間での染色体転座 (遺伝子融合を含む) の頻度を Quantitative PCR (qPCR) で検出する系を開発した。まず 4OHT を添加することでゲノム内に DSB を誘導し、4 時間、24 時間、48 時間のタイムポイントでゲノム DNA (gDNA) を回収し、染色体転座産物に特異的な PCR プライマーを用いて qPCR を行うこと

で特定の 2 つの DSB 間での染色体転座頻度を計測した。その結果、検出される染色体転座の頻度は、時間の経過とともに増加し

た (右図、異なる 2 つの染色体転座の結果を示す、X 軸: 時間、Y 軸: 染色体転座頻度)。制限酵素 AsiSI による DSB の誘導は時間の経過とともに切断効率が上昇することから、染色体転座の頻度も増加すると想定された。この系を用いて、まず転写阻害剤の影響を計測することにした。転写阻害剤

(TRi) として上記の DRB (CDK9 阻害剤) に加え、他の機序で転写阻害を行う阻害剤 3 つを用いた。4OHT による DSB 誘導の 30 分前にこれらの転写阻害剤を加え、4 時間のタイムポイントにおいて染色体転座 (遺伝子融合) の頻度を比較した。その結果、どの阻害剤を加えた場合にも、未処理に比べ、2~4 倍の染色体転座の頻度の増加が見られた (右図)。このことから、転写阻害剤によって転写を阻害した場合には染色体転座の頻度が増加することが確認された。



これらのことをさらに別の系においても確かめるために、染色体転座を計測する他の実験系を確立することにした。細胞周期の S 期にはゲノムの複製が行われるが、Topoisomerase I の阻害剤である camptothecin (CPT) を添加すると、ゲノムの複製が阻害され、その結果として DNA 損傷、特に DSB が生じることが知られている。こ

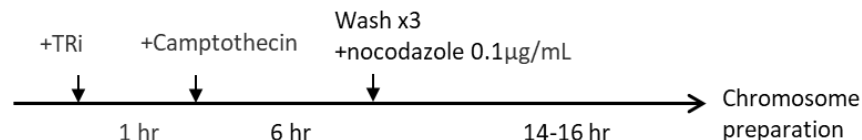
の薬剤を用いて S 期
の細胞をターゲット
に DSB を誘導した際
に生じる染色体転座

の頻度を、上で述べた姉妹染色体間結合を
指標に評価する系を用いて、転写を阻害し
た場合の影響を調べることにした。右図に
示したようなプロトコールにより転写を阻
害した場合に生じる CPT 誘導性の姉妹染色
体間結合を評価したところ、DRB の添加に
より、姉妹染色体間結合の頻度が増加する
ことが示された。

以上の結果から、転写の阻害によって染
色体転座の頻度が上昇する、つまり転写活
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考えられた。

このようなリスクが発生する原因となる因子を同定するために、データベースを用
いたスクリーニングを行ったところ、遺伝子融合の頻度を増加させる因子として
DNA/RNA 結合タンパク質である X を同定した（なお、現在までにこの因子 X が直
接的に DNA 修復に関与するという報告はない）。そこで、上記 AsiSI を用いて染色体
転座頻度を計測する系を用いて、因子 X をノックダウンした場合の染色体転座の頻
度を計測したところ、転写阻害剤によって見られた遺伝子融合頻度の増加は、因子 X
をノックダウンすることで消失することが判明した（下図）。つまり、この
DNA/RNA 結合タンパク質 X は、転写阻害によって生じた何らかの変化に関与してお
り、その結果として遺伝子融合の頻度が増加していることが示唆された。

今後はこの因子 X が関与する細胞機能
に注目して、転写阻害によって起こるど
のような変化が染色体転座の頻度を増加
させるのか、特に転写阻害を行った際の
因子 X の細胞内局在や、DNA/RNA 結合
状態の変化、R-loop 構造の関与の有無な
どを中心に解析し、因子 X が介在した染
色体転座発生メカニズムを解明してい
く予定である。



Radial, fusions

