RBC 放生研ニュース
RBC NEWSLETTER
No.158
SEP 09,2017

Contents

ミニレビュー 1 ・・・・・・・・・・・・ 1
ヒトの染色体DNAは、
放射線被曝しなくてもふだんから
頻回に2重鎖切断される

ミニレビュー 2 ・・・・・・・・・・・・ 4
Fanconi貧血の新規の原因タンパク質
RFWD3による相同組換えの制御

学会参加記 1 ・・・・・・・・・・・・ 8
Keystone Symposia on Molecular and
Cellular Biology report

学会参加記 2 ・・・・・・・・・・・・ 10
US-Japan DNA Repair Meeting

第33回 京都大学放射線生物研究センター ・ 12
国際シンポジウム開催のお知らせ

編集後記 ・・・・・・・・・・・・ 12

ミニレビュー 1

ヒトの染色体DNAは、放射線被曝しなくても ふだんから頻回に2重鎖切断される

はじめに

トポイソメラーゼ酵素（Topoisomerase 2, 以下Top2と略す）は、DNA複製、転写、染色体分配に必須であり、各細胞で毎日数十万回以上の触媒反応をする。この触媒反応は、２本のDNA間のからみを解消する（図１）。Top2は、触媒反応中に一過的にDNA二重鎖切断（以下DSBと略す）を作り、自らその切断を再結合する。筆者は、Top2がしばしば再結合に失敗することを見出した[1]。すなわち染色体DNAは、放射線被曝しなくてもふだんから頻回に２重鎖切断されているのである。

Top2の触媒反応の失敗は、難治性のDNA２重鎖切断を作る

Top2は、２量体で働き、一過性にDSBを作るときに各

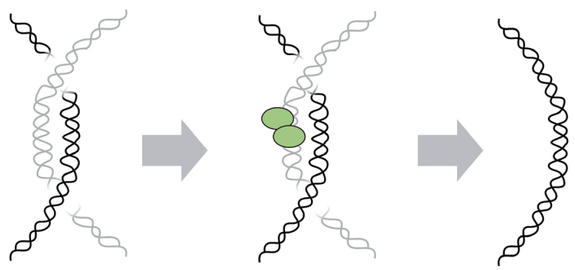


図1　トポイソメラーゼ２の触媒反応
トポイソメラーゼ２(Top2) は、２本の DNA 間のからみを解消する。
この触媒反応のときに一過性に DSB が生成される。

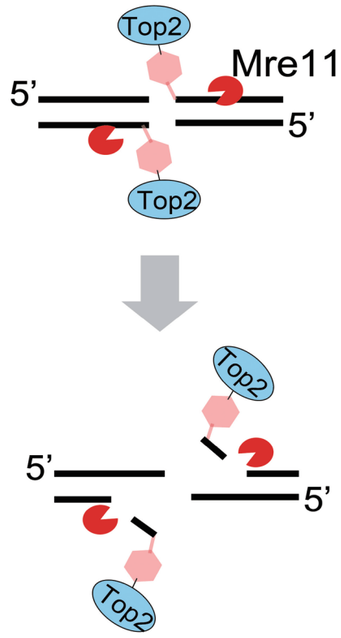


図2　Mre11のDNA切断活性を消失させると、病的Top2ccが大量に蓄積する
Top2 は、図１で示した触媒反応の時に DSB 切断端の 5' 末端に共有結合する。下段は、Mre11 が Top2 の結合した DNA 鎖の近傍を切断することを示す。

Top2が１つのDSBの２つの切断端に共有結合する（図2)。この一過性の状態をTop2 cleavage complex（Top2cc）形成と呼ぶ。抗がん剤、エトポシド(etoposide)は、このDSBが再結合されるのを防ぐ。エトポシド処理を１時間以上続けると、ほとんどのTop2は自身が作ったDSB（Top2ccのこと）を修復できなくなる。この状態を病的Top2ccの形成と呼ぶ。エトポシドのみならず、熱やヒートショックタンパク阻害剤の影響によってTop2は自らが創った切断を自分で再連結できなくなる(つまり病的Top2ccが蓄積する)[2]。

病的Top2ccは、難治性のDSBである。その理由は、5'切断端に共有結合したTop2を除去しない限り、相同組換えや非相同末端結合がDSBを連結できないからである。同様に、電離放射線が作るDSBでも切断端に異常な化学修飾が生じているはずであり、その化学修飾を除去しない限りDSBを連結できない。5'切断端に存在する異常な化学修飾を5' adductsと呼ぶ。5'切断端に共有結合したTop2も5' adductsの１つの例である。筆者は、Mre11 DNA切断酵素が5' adductsの除去（図２の下段）に重要な機能をもつことを発見した[1]。この除去反応のあとに主に非相同末端結合が病的Top2ccを再結合する。

Mre11のDNA切断活性を消失させると、病的Top2ccが大量に蓄積する

Mre11のDNA切断酵素活性を抑制すると、大量の染色体断裂が自然発生して細胞は死ぬ。致死であるということは、Mre11がゲノムの恒常性維持に非常に重要な働きをしているということを意味する。しかしながら、致死性ゆえにヒトMre11の機能解析があまり進んでいなかった。ヒト細胞を使った逆遺伝学的解析では、一般に、出芽酵母ほどには相同組換え変異細胞の表現型解析（とくに組換え中間体の定量解析）が正確にできないが故に、酵母の知見をヒトに外挿して実験結果を解釈することが多い。例えば、ヒトMre11変異細胞の致死性は、酵母Mre11の機能、すなわち相同組換えの最初のステップ（DSB resection）の機能がヒト変異細胞でも低下するからであると説明・解釈されてきた。たしかに、ヒト細胞でMRE*11*を欠損させるとDSB resectionが３倍程度に低下する[3]。しかし３倍程度の低下がMRE*11*欠損による致死性をほんとうに説明できるだろうか？以前の研究で、我々はヒト細胞において人工的にDSB resectionを３倍程度に低下させたが、相同組換え効率には全く影響が無いことを示した[4]。すなわち相同組換えでは、各ステップの効率が少々低下してもDSB修復全体の効率には影響しないという"Robustness"が存在するのである。この知見は、Mre11が相同組換え以外にDSB修復において増殖細胞の生存に重要な働きを持つことを示唆する。

我々は、Mre11ヌクレアーゼ機能に必須なNBS*1*が中枢神経だけで機能しないマウスでは神経組織で病的Top2ccが大量に蓄積することも証明した[1, 5]。同様に、ヒト培養細胞においてMre11のDNA切断酵素活性を抑制すると、病的Top2ccが大量に蓄積することを発見した[1]。このMre11欠損培養細胞においてTdp2と呼ばれる5' adductsをDSBから除去できる酵素を強制発現させると、MRE*11*欠損細胞で大量に自然発生した染色体断裂が半分程度に減少しそして細胞の生存率が改善した[6]。我々の論文発表とバックツーバックでなされた生化学解析の論文発表により、Mre11は5' adductsを除去する活性（図2の下段）を持ち、その活性は相同組換えとは独立して機能することが解明された[6]。以上の知見から、Mre11は、相同組み換えによるDSB修復とは別に、２つめの機能、5'adductsをDSBから除去する活性があることが証明された。Top2の触媒反応の失敗によって大量の致死的DSBが自然発生していることがこれまで未解明だったのは、そのDSBが、Mre11によって迅速に修復されていたからである。

将来の研究課題

Mre11の機能解析について将来の研究課題を２点述べたい。出芽酵母において制限酵素で作られたDSB（5'末端にリン酸基、3'にOH基がある"きれいな"DSB）が相同組換えで修復される場合には、Mre11はあまり重要ではない。一方、出芽酵母のMRE*11*欠損株は非常に強い放射線感受性を示す。強い放射線感受性の原因は、放射線が"汚い" DSB、すなわち切断端が異常な化学修飾されているDSBを作るからだと推定されてきた。ヒトMre11が"汚い" DSBの切断端を"きれいにする"ことにどれだけ貢献しているかが今後の研究課題の１つである。２つめの研究課題は、DSBの切断端を"きれいにする"ことに関してMre11とATMが共同しているか否かである。ヒトのある種のMre11変異はATM欠損と似た症状をおこす[7]。そしてATM欠損も非常に強い放射線感受性の原因になるが、その分子機構は十分解明されていない。ATMはp53が正常に機能するのに必須の働きをするが、p53欠損は必ずしも放射線感受性の原因にならない（アポトーシスが起こりにくくなる)。我々の作業仮説は「ATMがMre11を活性化して"汚い" DSBの切断端を"きれいにする"」である。エトポシドが作る難治性DSB（病的Top2ccのこと）の修復をモデル実験系にして、この作業仮説を解析していきたい。

終わりに

DSBは、染色体転座や大きな領域の塩基欠失の原因になる発がん性の強いDNA損傷である。我々の解析によりDSBの自然発生には２つの大きな原因があることが解った。１つめは、損傷鋳型鎖でおこるDNA複製ブロックが原因の複製フォーク崩壊である。もう１つはTop2の触媒反応の失敗である。放射線被曝が無くても、生命体では発がん性の強いDNA損傷が恒常的発生しているのである。

● 引用文献

1　Hoa, N. N. et al. Mre11 Is Essential for the Removal of Lethal Topoisomerase 2 Covalent Cleavage Complexes. *Molecular cell* 64, 580-592, doi:10.1016/j.molcel.2016.10.011 (2016).
2　Karras, G. I. et al. HSP90 Shapes the Consequences of Human Genetic Variation. *Cell* 168, 856-866 e812, doi:10.1016/j.cell.2017.01.023 (2017).
3　Zhou, Y., Caron, P., Legube, G. & Paull, T. T. Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells. *Nucleic acids research* 42, e19, doi:10.1093/nar/gkt1309 (2014).
4　Hoa, N. N. et al. Relative contribution of four nucleases, CtIP, Dna2, Exo1 and Mre11, to the initial step of DNA double-strand break repair by homologous recombination in both the chicken DT40 and human TK6 cell lines. *Genes to cells :* devoted to molecular & cellular mechanisms 20, 1059-1076, doi:10.1111/gtc.12310 (2015).
5　Deshpande, R. A., Lee, J. H., Arora, S. & Paull, T. T. Nbs1 Converts the Human Mre11/Rad50 Nuclease Complex into an Endo/Exonuclease Machine Specific for Protein-DNA Adducts. *Molecular cell* 64, 593-606, doi:10.1016/j.molcel.2016.10.010 (2016).
6　Cortes Ledesma, F., El Khamisy, S. F., Zuma, M. C., Osborn, K. & Caldecott, K. W. A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature* 461, 674-678, doi:10.1038/nature08444 (2009).

笹沼　博之
京大医学研究科放射線遺伝学

ミニレビュー　2

Fanconi貧血の新規の原因タンパク質 RFWD3による相同組換えの制御

稲野将二郎[1]、佐藤　浩一[2]、胡桃坂仁志[2]、高田　穣[1]
[1] 京都大学放射線生物研究センター 晩発効果研究部門、
[2] 早稲田大学大学院先進理工学研究科 電気・情報生命専攻構造生物学研究室

要 約

Fanconi貧血はDNA鎖間架橋の修復の障害による症患で、その原因遺伝子の解析はDNA鎖間架橋の修復経路の解明に大きく寄与してきた。RFWD3はFanconi貧血の患者におけるエキソーム解析により同定された新規のユビキチンリガーゼである。DNA鎖間架橋の修復経路においては複数のDNA修復機構が協調して機能するが、RFWD3はそのうち相同組換えにはたらき、相同組換えの主要な制御タンパク質であるRPAおよびRAD51をユビキチン化することによりDNAの損傷部位からの解離および分解を促進した。RFWD3を欠損した細胞においては、RPAおよびRAD51が損傷をもつクロマチンに残存していた一方、RAD54やMCM8といった相同組換えの後期においてはたらくタンパク質はリクルートされず、相同組換えにおいて機能するタンパク質の入れ替わりが阻害されているものと考えられた。

はじめに

DNA鎖間架橋の修復経路においては複数のDNA修復機構が協調して機能することによりDNA鎖間架橋の除去および正確な複製が実現される。これを単純化すると、DNA鎖間架橋の両側へのDNA 2本鎖切断の導入、DNA損傷乗り換え、相同組換え、となる（図1）。相同組換えにおいては、DNA 2本鎖切断の平滑末端が1本鎖となり、そこにRPAがリクルートされる。そこにBRCA2に依存してRAD51が結合し、鋳型となる相同なDNA配列へと侵入し相補鎖を形成する。侵入した1本鎖DNAの末端はDNAポリメラーゼにより伸長し、ふたたび相補鎖が解離することにより修復は完了する。しかしながら、相同組換えの詳細な分子機構については未解明な点が多い。

1. RFWD3は鎖間架橋の修復経路において相同組換えにはたらく

RFWD3はFanconi貧血の患者のエキソーム解析により同定された新規のユビキチンリガーゼである。すでに、RPAと結合すること、および、チェックポイントの活性化に必要であることが報告されていたが[1, 2]、本質的な分子機能は未解明であった。RFWD3の機能を解明するため、ヒトのハプロイド細胞株HAP1細胞においてRFWD3を欠損した細胞を作製した。RFWD3欠損細胞はDNA鎖間架橋の誘導剤に対しきわめて強い感受性を示し、DNA鎖間架橋の修復経路が障害されていることが示唆された。また、RFWD3欠損細胞にレンチウイルスを用いて野生型のRFWD3あるいはユビキチンリガーゼ活性をもたないRFWD3変異体を発現させたところ、野生型のRFWD3を発現させた場合のみDNA鎖間架橋に対する耐性が回復し、DNA鎖間架橋の修復にはRFWD3のユビキチンリガーゼ活性が必要であることが確認された。

RFWD3のDNA鎖間架橋の修復経路における作用点を明確にするため、RFWD3欠損細胞においてその上流のイベントであるFANCD2のモノユビキチン化について調べたが影響はみられなかった。一方で、DNAの損傷のち16〜24時間において、相同組換えにはたらく主要なタンパク質であるRPAおよびRAD51のクロマチンへの集積が増強していた。これらのことから、RFWD3の鎖間架橋の修復経路における作用点は相同組換えにあると推察された。

2. RFWD3はRPAおよびRAD51をDNAの損傷に依存してユビキチン化する

ユビキチンリガーゼRFWDの基質はRPAおよびRAD51であると仮説をたてた。in vivoにおいて、DNAの損傷のちRFWD3に依存したRPAおよびRAD51のユビキチン化が確認された。さらに、精製したタンパク質を用いたin vitroの系においても同様の結果が得られた。ユビキチン化されたRPAおよびRAD51はプロテアソームの阻害薬を処理することにより細胞に蓄積したことから、RPAおよびRAD51はユビキチン化ののちプロテアソームにおいて分解されることが示唆された。

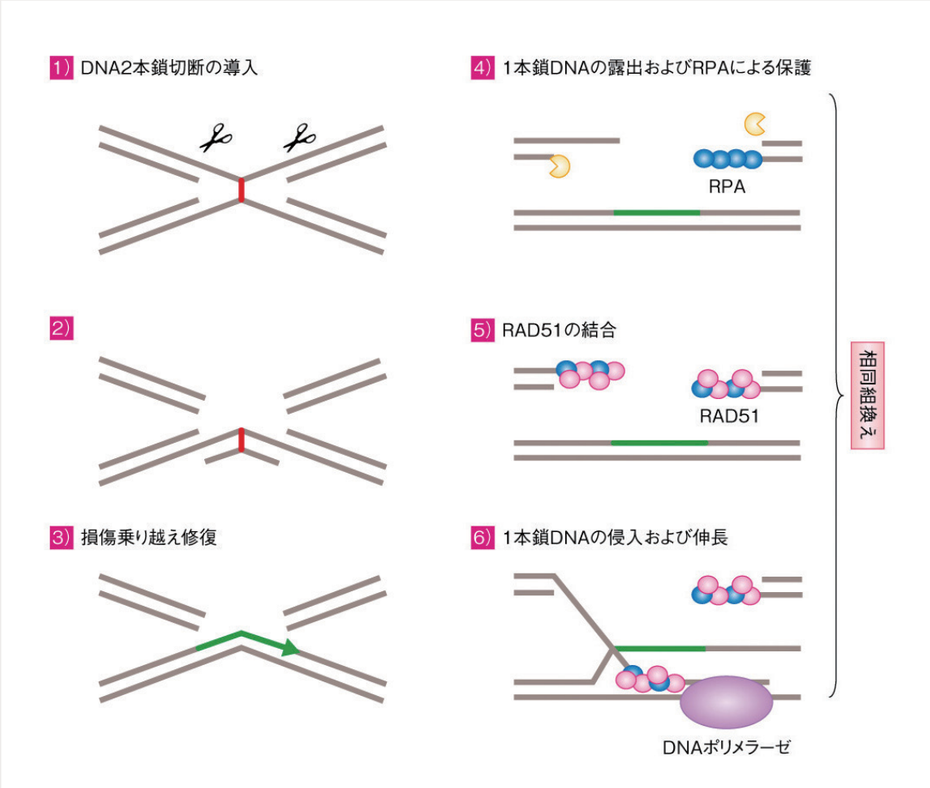


図1　DNA鎖間架橋の修復の全体像

RPAおよびRAD51はともに相同組換えにおいてきわめて重要なタンパク質であるため、RFWD3の活性は厳密に制御される必要がある。RFWD3はATR/ATMによりSer46およびSer63がリン酸化されると報告されているが[3]、この2箇所のリン酸化部位の変異体を作製したところ、野生型のRFWD3と比べ、RPA2のユビキチン化能は低く、RFWD3欠損細胞に発現させた際にはDNA鎖間架橋に対し低い耐性しか賦与しなかった。したがって、RFWDのSer46およびSer63のリン酸化が重要な引き金となりユビキチン化が起こると考えられた。ただし、RFWD3にはほかにも多くのリン酸化のコンセンサス配列が存在することから、Ser46およびSer63のリン酸化はあくまで必要条件であり、そのほかの部位のリン酸化が関与する可能性もある。

3. ユビキチン化されたRPAおよびRAD51はクロマチンから除去される

RPAおよびRAD51のユビキチン化がクロマチンからの除去にどう関与するかについて検証したところ、in vitroにおいて、ユビキチン化されたRPAおよびRAD51はユビキチン化されていないものと比べ1本鎖DNAへの結合能の低いことが見い出された。また、ユビキチン化タンパク質の輸送を介し細胞におけるさまざまな過程に関与するVCP/p97に注

目したところ[4]、RPAおよびRAD51はDNAの損傷に依存してVCPと結合し、また、VCPのノックダウンによりRPAのターンオーバーは低下しクロマチンに集積したユビキチン化RPAが増加することわかった。これらの結果より、ユビキチン化されたRPAおよびRAD51は構造的にクロマチンから解離しやすくなり、少なくとも部分的には、VCPに依存してプロテアソームにおいて分解されることが示唆された（図2）。

一般にユビキチン化は基質タンパク質のLysにユビキチンが付加される反応である。そこで、RPA2およびRAD51においてユビキチン化の標的となる部位を既知のプロテオクミクスのデータなどから推定し、複数の変異体において試験したうえ、最終的には、5箇所のLysをArgに置換したRPA2およびRAD51の変異体を作製したところ、ユビキチン化は有意に低下した。レンチウイルスを用いてこれらの変異体をドキシサイクリンに依存的に発現させ、さらに内在する野生型のタンパク質をノックダウンして入れ替えた細胞においては、野生型を発現させた場合と比べ相同組換えの活性が低下し、クロマチンへの集積がみられた。これらの結果より、RPAおよびRAD51のユビキチン化はクロマチンからの除去を介して相同組換えに寄与することが支持された。

4. RPAおよびRAD51のクロマチンからの除去は後続するタンパク質のアクセスに必要である

相同組換えにおいてクロマチンに集積したRPAおよびRAD51は後続のタンパク質のクロマチンへのアクセスを阻害することから除去される必要があるという仮説をたてた。相同組換えの後期の過程の制御については未解明な部分が多いが、主要なタンパク質としてRAD54およびMCM8に注目した。RAD54はSWI2/SNF2ファミリーに属する2本鎖DNAに依存性のATPaseであり相同組換えにおいて多彩な機能が報告されている[5]。MCM8はAAA+スーパーファミリーに属し相同組換えにおいてRAD51の下流にて機能すると考えられている[6, 7]。解析の結果、対照となる細胞においてはRAD54およびMCM8はDNA鎖間架橋に依存してリクルートされDNAの損傷部位に集積したのに対し、RFWD3欠損細胞においてはその蓄積は顕著に低下していた。さらに、5箇所のLysの置換によりユビキチン化をさまたげたRAD51の変異体を発現させた細胞において、野生型の細胞と比べクロマチンへのMCM8のリクルートが低下しており、この仮説が支持された。

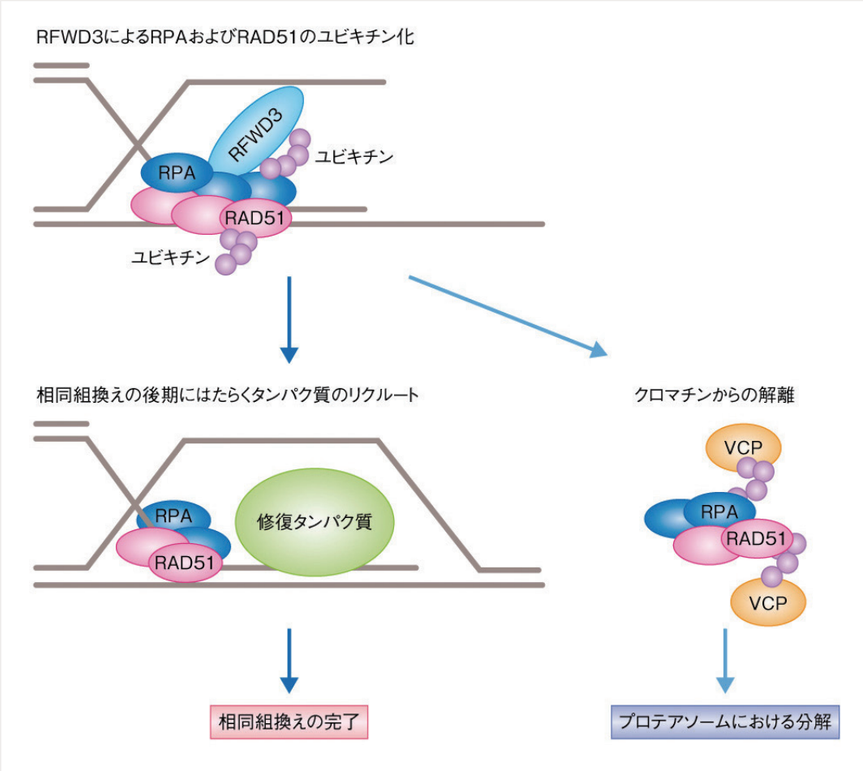


図2　RFWD3はRPAおよびRAD51をユビキチン化しVCPの介在によりクロマチンからの解離を促進する

おわりに

この研究は、ドイツにおけるFanconi貧血の新規の原因遺伝子の同定から共同研究としてスタートした。RFWD3がRPAをユビキチン化することにより相同組換えに寄与する点については、2015年にほかの研究グループにより報告されたが8)、この論文においては機序についての言及がなく、また、RPAの分解も起こらないとしている。おそらく、異なるDNAの損傷を用い早期における観察にしぼられていたため、筆者らとは異なる結論にいたったのではないかと推察される。

相同組換えをはじめとするDNAの損傷の修復への注目は飛躍的に高まってきたが、いまだに不明な部分が多い。この研究からの直接的な臨床応用への距離はまだまだ遠いが、非常に複雑なDNAの損傷の修復経路において、そのパズルの1ピースを埋めることができたと感じている。それがFanconi貧血に苦しむ患者の治療につながること、および、将来のより洗練されたがんの治療法の開発にわずかながらでも貢献することを切に願う。

あとがき

原著論文（Inano S et al. Molecular Cell. 66:622-634. 2017.）の内容を、ライフサイエンス 新着論文レビュー <http://first.lifesciencedb.jp/archives/16605>より許可を得て転載した。

本研究は、京都大学放射線生物研究センター全国共同利用・共同研究拠点活動による成果である。

引用文献

1. Gong Z & Chen J. *J Biol Chem.* 286:22308-22313. 2011
2. Liu SJ et al. *J Biol Chem.* 286:22314-22322. 2011.
3. Fu X et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:4579-4584. 2010.
4. Meyer H et al. *Nat Cell Biol.* 14:117-123. 2012.
5. Solinger JA et al. *Mol. Cell.* 10:1175-1188. 2002.
6. Natsume T et al. *Genes Dev.* 31:816-829. 2017.
7. Nishimura K et al. *Mol. Cell.* 47:511-522. 2012.
8. Elia A et al. *Mol. Cell.* 60:280-293. 2015.

稲野　将二郎
京都大学放射線生物研究センター
晩発効果研究部門

学会参加記　1

Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology report

今回私は、カナダのウィスラーにあるWhistler Conference Centreにて、2017年3月5日〜9日で5日間に渡り開催されたKeystone symposia のAdaptations to Hypoxia in Physiology and Disease (X4)というセッションに参加させていただきました。

Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biologyは元々1972にロサンゼルスで開催されたICN-UCLA Symposium on Molecular Biologyを前身とした国際会議であり、1990年にコロラドのkeystone centerで開催された際に現在の名称に変更され今に至っています。

Keystone symposiaは一年を通していろいろな場所で、それぞれ特定のトピックスについてのセッションが数日間に渡り開催されています。それぞれのセッションは、参加人数が数百人程度の規模の小さいものでありながら、その道のトップクラスの研究者が集まり、未発表の研究データを多数含む最新の研究内容が発表されるという、とてもエキサイティングな場となっています。今回私が参加させていただいたのは、Adaptations to Hypoxia in Physiology and Disease (X4)という低酸素研究に関するセッションでしたが、本会においても、低酸素研究における非常に著名な研究者の方々が名を連ねていました。

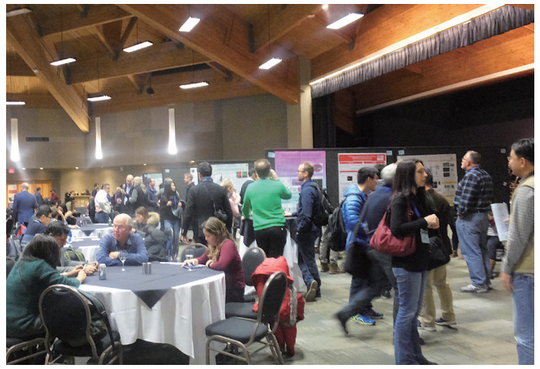
今回私が参加させていただいたAdaptations to Hypoxia in Physiology and Disease (X4)は、Tumor Metabolism: Mechanisms and Targets (X3)というセッションと合同開催でした。二つのセッションはそれぞれ低酸素とがんの代謝というトピックスではありますが、腫瘍はその異常な増殖能から、血管による酸素の供給が追い付かずに、血管から離れた部分は低酸素になることが知られており、また一方で腫瘍の代謝変化に関しては、腫瘍内低酸素による低酸素応答因子(HIF)-1の活性化が重要な役割を担う因子の一つであることが報告されているなど、この二つのトピックス間には密接な関係があることが知られています。実際に、いくつかの発表については、双方のセッション合同でとり行われました。また、合同で行われた発表以外にも、低酸素と代謝、双方に関わる内容を取り上げている発表も多数行われました。ポスターセッションも同じ部屋に両方のセッションのポスターが掲載されていましたが、両セッションのポスターを見て回っている研究者も多数見られました。

がんの代謝というと、古くからWarburg effectと呼ばれる解糖系優位な糖代謝のリプログラミングが知られていましたが、現在、代謝に関しては様々なバイパス経路が報告されており、糖代謝、アミノ酸代謝、脂質代謝のすべてが相互につながっていることが明らかになってきています。未発表の内容を多数含むことから、本シンポジウム内で発表された内容について、ここに詳細を書くことは出来ませんが、本会では古くから知られている糖代謝のリプログラミングはすでに中心的なトピックスではなく、脂質代謝と脂質代謝産物による細胞内シグナル伝達への影響や、アミノ酸代謝経路を介した細胞内レドックス制御などを中心とした最先端の研究がシンポジウムの発表で多数取り上げられていました。また、これらの経路には低酸素やHIF-1も密接に関係しており、低酸素やHIF-1がそれらの経路にどのような影響を及ぼすのかについても発表がありました。他にも、腫瘍の代謝産物が低酸素やHIF-1に及ぼす影響、その代謝産物の産生経路などについての発表をはじめとする多岐に渡る研究成果の発表がありました。

会はシンポジウムセッションとポスターセッションがあり、シンポジウムセッションではほぼ全ての発表で活発な質疑応答が行われ、時間をオーバーしてなお議論が終わらないことも何回もありました。また、ポスターセッションでも常に会場内は多くの人であふれており、ここでも多くの参加者による活発な議論が行われていました。

ウィスラーはリゾート地として有名な場所で、特に冬季はスキーやスノーボード、クロスカントリーなどで有名です。実際に会場から歩いていける距離にリフト乗り場があり、シンポジウム開催期間中も、ホテルや街中でスキー板を持った観光客の方と多くすれ違いました。また、お土産屋や料理店などでも日本人が経営するお店や日本人店員のいる店が複数あるらしく、何気なく入ったお店で「日本人の方ですよね？観光ですか？」と日本語で尋ねられることも何回かあり、驚くこともありました。本シンポジウムはスキーシーズン中の開催でしたが、今回のシンポジウムはAdaptations to Hypoxia in Physiology and Disease (X4)、Tumor Metabolism: Mechanisms and Targets (X3)の2つのシンポジウムが合同で開催されたこともあったため、開催期間中は毎日、午前も午後ともに必ずいずれかのセッションが行われており、双方のセッション共に興味深い内容が多かったので、両方のセッションに参加させていただいていたことや、本シンポジウムの参加にあたり、観光やスキーのことを考えておらず全く準備などをしていなかったこともあり、残念ながらスキーなどをする時間は取れませんでした。

また、朝と夕方には食事も準備されていました。ビュッフェ形式で種類はそこまで多くないですが、ケーキなども用意されており、十分に満足する量を食べることも可能でした。昼は用意されていなかったので、会場周辺にあるレストランや



カフェなどに食べに行ってみたり、近くにスーパーマーケットもあったので、そこでサンドイッチなどを購入して食べていました。夕方の食事の時間は午後のセッションの後、そのままポスターセッションの時間とつながっていたこともあり、多くの方が食事を食べながら活発に議論をしていました。私も、この食事のタイミングで海外の方から声をかけていただいたり、他のグループの日本人の方から声をかけていただいたりと、短い時間でしたがお話や議論をさせていただきました。

本会では私も2日目にポスター発表をさせていただきましたが、何人かの方から内容の質問をいただき、いくつかの議論をさせていただきました。議論の中には現在執筆中の論文のreviseに関わる内容のものもあり、本会で行った議論が役に立っています。

私は今回、本会議に参加させていただいたことで、低酸素研究における現在の最新研究トピックスや、細胞の周囲の環境、栄養、代謝といった要素が、様々な経路と密接に関わり、細胞の機能に大きな影響を及ぼしていることなど、新しい知見などを得られるとともに、他の研究者の方たちとも交流があり、今後の研究につながる多くの刺激を貰うことが出来ました。

小林　稔
京都大学 放射線生物研究センター

学会参加記　2

US-Japan DNA Repair Meeting

3、4年に一度開催されるUS-Japan DNA Repair Meetingの第6回会議がThomas Kunkel先生、Orlando Scharer先生、Kaoru Sugasawa先生、Doger Woodgate先生、Wei Yang先生のオーガナイズにより2017年5月17日から21日の会期で開催された。会議はサンフランシスコ国際空港からBART列車で1時間、カリフォルニア大学バークレー校のClark-Kerrキャンパスで行われた。日米でラボを運営する約50名のPIの研究者が参加し、同キャンパス内の寄宿舎、食堂を利用することで5日間の期間中のほとんどを全員で過ごした。

本会議では参加者全員が口頭発表を行った。1) Translesion DNA synthesis/DNA複製ストレス、2) 塩基除去修復、3) クロマチン、4) DNA二重鎖切断修復、5) 酸化損傷、6) 突然変異の6つのセッションで、進行中のものを含む最新の研究内容が発表され、活発な議論が行われた。それらのうち、筆者が特に興味を惹かれた発表のいくつかを紹介させて頂きたい（筆者はDNA二重鎖切断修復が専門であり、他分野の発表について理解が足りていない点はご了承頂きたい）。

初日の夕方、Fumio HANAOKA先生（University of Tsukuba & Gakushuin University）のご講演から会議が始まった。講演（“My CV: From our studies on XP-C to XP-V”）では、損傷DNA複製の研究を牽引してこられたご自身の研究内容を時系列に沿って発表された。世界に先駆け、色素性乾皮症原因遺伝子XPCのクローニングとその損傷認識機能の解明を行い、さらにXPV（pol eta）の同定、pol etaが損傷乗り越え複製ポリメラーゼとして機能することなどを明らかにされてきた。また、研究室メンバーの集合写真や旅行先での写真を織り交ぜながら、菅澤薫先生、益谷央豪先生をはじめ、多くの協力により研究を発展してこられた点を強調され、これまでの協力者への感謝を述べられた際に言葉を詰まらせていた先生のお姿がとても印象的だった。

Orlando SCHARER先生（IBS/UNIST & Stony Brook University）は、DNA鎖間架橋（ICL）近傍のDNA構造が及ぼすICL修復効率への影響について発表された（“Replicative and translesion synthesis DNA polymerases in ICL repair”）。ICL修復では1）架橋部位まで複製フォークが進行し、一方の鎖からICL部位が切り離され（Approach）、2）unhooked-ICLが存在する鎖を鋳型にしたTLSが起こり（Insertion）、3）損傷領域の複製が完了する（Extension）。切り込みの位置やunhooked-ICL領域の合成過程はTLSの効率や正確性に重要だと考えられるが、unhooked-ICLの正確な構造は不明な点が多い。そこで複数種のunhooked-ICLの基質をin vitroで合成し、基質の種類によりICL効率がどのように変化するかを検討された。その結果、unhooked-ICL周辺のDNA二重鎖が長いほどApproachの過程が阻害されることを発見され、ICL修復中間体の構造と修復効率の関係性を示された。

Kaoru SUGASAWA先生（Kobe University）は、XPCによる損傷部位の認識メカニズムについて発表された（"Interaction of DNA damage recognition factors with chromatin"）。グローバルヌクレオチド除去修復（NER）においてXPCは修復の開始に機能することが知られるが、実際に高次なクロマチン構造の中で、どのようにして損傷部位を認識するのかは明らかでなかった。XPCが結合するヒストンの修飾を調べた結果、特にアセチル化ヒストンとの結合が弱かったことから、XPCとヒストンとの結合をアセチル化に着目して解析された。その結果、XPCは特にヒストンH3と直接結合しており、H3のアセチル化はXPCとの結合を阻害し、さらにNERの効率を減弱させることを示された。また、紫外線を照射した細胞で、照射領域のH3アセチル化レベルが他の領域よりも減少していたことから、NERにおけるヒストンアセチル化の積極的な役割が示された。

Atsushi SHIBATA先生（Gunma University）は、G2期におけるDNA二重鎖切断（DSB）修復経路の選択機構について発表された（“Spatiotemporal regulation of DNA double strand break repair pathway choice in G2-phase”）。放射線誘発DSBの70%程度が早期に非相同末端結合（NHEJ）で修復され、残りが相同組換え（HR）で修復されることを報告されてきたが、これまで時間経過による修復経路選択のメカニズムは明らかでなかった。そこで近年報告されたBRCA1と53BP1による経路選択に着目し、G2期ではATMによる53BP1のリン酸化、および下流のRIF1の集積が一過的であることを見出した。さらにBRCA1はおそらくPP4Cと協調的に機能することで53BP1の脱リン酸化を促進し、それがRIF1の集積を阻害することで53BP1がDSB末端から解離することを示された。この反応は照射後2時間程度から見られ、53BP1の解離が時間経過による修復経路選択の実態である可能性が示唆された。

Polina SHCHERBAKOVA先生（University of Nebraska）は、複製DNAポリメラーゼεによる変異誘発と発がんとの関連について発表された（“Replicative DNA polymerase defects in human cancers: consequences and mechanisms”）。DNA複製は校正とミスマッチ修復（MMR）により正確性が担保されており、MMR遺伝子の変異はいくつかのがんにおける発がん頻度を上昇させることが知られている。一方でMMRに変異がない大腸がん、子宮内膜がんにおいてDNAポリメラーゼεにアミノ酸置換を伴う変異が報告されてきた。そこで、出芽酵母をモデルとして用い、この変異と発がんとの関連を解析された。実際に報告された変異に対応するP301R変異をもつDNAポリメラーゼεを発現する酵母の突然変異頻度を薬剤感受性により検出した結果、野生型の150倍という非常に高い変異頻度を呈した。このことから、複製DNAポリメラーゼに生じた突然変異がさらなる変異を誘発し、発がんを促進するモデルが示唆された。

カリフォルニア大学バークレー校は100年を越す歴史があり、森林や川などの自然、年代の異なる建物が調和した美しいキャンパスを有していた。自由時間にキャンパスを散策する中、学生たちが活発に議論する姿をいたるところで見かけた。研究、教育レベルの高いカリフォルニア大学バークレー校のすごさを垣間見ることができた気がする。また、3日目の夜にはCynthia McMurray先生のご自宅で夕食会が催された。一生縁がなさそうな豪邸で、サンフランシスコの夕日や夜景を眺めながら豪華なディナーとワインを頂いた。筆者にはレベルが高すぎた感じもするが、世界で活躍する日米の研究者らと過ごした5日間は非常に刺激的だった。このような機会を与えて下さった先生方に深く感謝したい。

斎藤　裕一朗
京都大学放射線生物研究センター
ゲノム動態研究部門

第33回 京都大学放射線生物研究センター国際シンポジウム開催のお知らせ

共同利用・共同研究拠点の活動の一環として、2017年12月4日(月)～5日(火)に、コープイン京都（http://www.coopinn.jp/）で、第33回国際シンポジウムを開催します。メインテーマは、Cutting Edge of Radiation and Cancer Biology です。10月に入りましたらシンポジウムホームページを公開し、事前参加登録と一般演題の登録を開始する予定です。詳細につきましては、右のシンポジウムポスター（暫定版）をご覧ください。

編 集 後 記

放生研ニュース158号（2017年9月号）をお届けします。今号は、outstandingな研究成果がまとめられたミニレビューや、国際学会に参加した2名の若手研究者による学会参加記などで構成されています。お楽しみ頂けましたでしょうか？放生研を中心とした研究コミュニティーの中で、関心が高いと思われるトピックスや共有すべき情報など、皆様からの記事や企画をお待ちしております。どうぞお気軽にご寄稿下さい。

毎年7～8月の夏休みに合わせて、放生研では中学生や高校生を対象にした夏の学校を開催しています。サイエンスの楽しさと放射線生物学の重要性が子供たちに伝わり、いつか私達の研究フィールドに戻って来てくれたら素晴らしいですね。表紙の写真は今年の夏の学校の一コマです。

第33回京都大学放射線生物研究センター国際シンポジウムの開催準備を順次進めております。開催概要はページ上部に記載の通りです。10月に入りましたらシンポジウムのホームページを公開し、一般演題の募集と事前参加登録を開始する予定です。当センターのホームページを是非ご確認下さい。

（原田 浩）

RBC Radiation Biology Center Kyoto University
京都大学放射線生物研究センター　〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町
編 集 委 員　原田 浩、小林 稔、子安 翔、和田 佳子
お問い合わせ　Tel: (075)753-7551　E-mail: 060jimuhosei@mail2.adm.kyoto-u.ac.jp