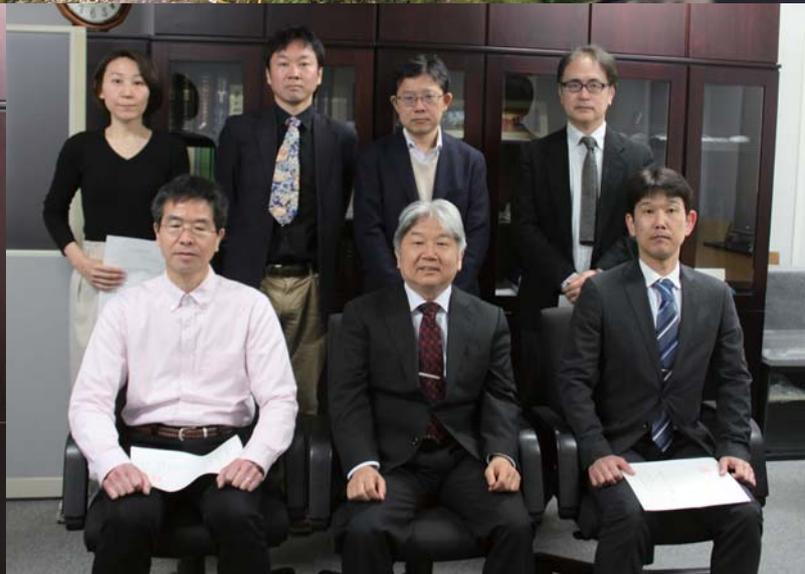


# RBC 放生研ニュース NEWSLETTER

No. **161**  
JUL  
6, 2018



## Contents

着任のご挨拶	2
ミニレビュー	6
DNA 損傷シグナルによって制御される がん免疫治療標的分子PD-L1の発現調節機構	
ミニレビュー	10
The CDK-PLK1 axis targets the DNA damage checkpoint sensor protein RAD9 to promote cell proliferation and tolerance to genotoxic stress.	

転出された方	13
平成30年度 新人紹介	14
放射線生物研究センター国際シンポジウムのお知らせ	15
編集後記	16

## 着任のご挨拶

京都大学内の改組により、平成30年4月1日をもって京都大学放射線生物研究センターは、京都大学大学院生命科学研究科附属放射線生物研究センターに生まれ変わりました。この改組などを機に、新たな先生方をお迎えしました。

## 放射線ストレス耐性研究部門 教授 石川 冬木

4月1日に京都大学放射線生物研究センターが生命科学研究科と統合され、このたび本センターの放射線ストレス耐性研究部門を担当させていただくことになりました。どうぞよろしくお願いいたします。

私は2002年に生命科学研究科に加えていただき、これまでに遺伝機構学講座細胞周期学分野におきまして、染色体テロメアと弱いストレスに対する生体応答に関する研究を続けてまいりました。今回、伝統ある放射線生物研究センターの一員として低線量放射線に対する生体応答の研究に携わらせていただくことは大変光栄であり、研究者としての喜びであります。

今日ある生物は、刻々と変動する地球環境に適応し今日まで生き延びてきました。環境の変化には、地球の寒冷化や温暖化のような長期間にわたる大規模変動もあれば、サバンナに生きるシマウマが草食しながら鋭く感じ取るライオンが忍び寄る足音のような短期間・局所的なものが含まれます。これらの環境変化は、それが直ちに生物の生命を危うくするものではなくても、それらに対する適切な生体応答（温暖化の原因となる大気中二酸化炭素レベルをさげる、食事を中断してその場から逃げる）をしないと、近未来において大変な災厄を招くことになります。今日地球上にある生物は、このような困難を克服して生き延びてきた強者揃いであり、必ず来たるべき災厄を免れる知恵と生体機能を有するものと考え、今日まで研究を続けてまいりました。

5月25日に行われました放射線生物研究センターと生命科学研究科の統合シンポジウムおよび祝賀会では、両部局の大先輩をお迎えし、山極寿一総長、湊 長博研究・企画担当理事兼プロボストのご臨席のもと盛大に行われました。統合を契機に、放射線生物研究センターがなお一層の発展をいたしますようみなさまのご支援をどうぞよろしくお願い申し上げます。



放射線生物研究センター・生命科学研究科統合記念シンポジウムにおける山極寿一総長のご挨拶



放射線ストレス耐性研究部門のメンバー  
(左から三好知一郎准教授、筆者、林眞理白眉助教、石川正真研究員)

染色体継承機能研究部門 准教授

## Peter Carlton

Our lab studies chromosome dynamics during meiosis, the essential pair of cell divisions that create haploid cells (e.g., sperm and eggs) from diploid precursors. Errors in meiosis are responsible for many human reproductive problems, from infertility to birth defects. Using the nematode worm *Caenorhabditis elegans* as a model system, we aim to reveal the mechanisms underlying pairing and synapsis of homologous chromosomes, control of genetic recombination, and accurate chromosome segregation.



Although cells normally protect their genomes from DNA damages at all costs, during meiotic prophase many double-strand breaks (DSBs) are intentionally created by the endonuclease SPO-11 to ensure that some can be repaired as crossovers. This is because crossovers are absolutely required to connect homologous chromosomes together, enabling them to be segregated in opposite directions, at meiosis I division. Since crossovers provide the only physical linkage connecting and orienting homologous chromosomes prior to the meiosis I division, failure to establish crossovers leads to random, missegregation of chromosomes. The DNA repair mechanisms operating during meiosis are similar to those in mitosis, with some important differences. Repair outcomes are biased toward crossovers instead of noncrossovers, and homologous chromosomes, rather than sister chromatids, are preferentially used as repair templates. Interestingly, recent work has shown that correct meiotic outcomes depend on how DNA breaks are made: the endonuclease SPO11 or  $\gamma$ -rays are competent to make crossovers, while other types of DNA damage, such as damage from incomplete replication, are not. Meiosis has thus taken the ancient, conserved DNA repair

pathways common to all organisms and adapted them to carry out the particular steps needed to ensure creation of haploid cells.

We have recently identified protein phosphatase 4 (PP4) as an infertility gene and have shown that PP4 is required for DSB generation and crossover formation in *C. elegans*. Previous studies in other organisms have shown that PP4 antagonizes the DNA damage kinases ATM and ATR, and functions to dismantle the DNA damage checkpoint by dephosphorylating repair proteins such as  $\gamma$  H2AX, RPA, and 53BP1 in somatic cells. Our work suggests that the antagonizing relationship between PP4 phosphatase and ATR kinase is required to generate the “not too many but not too few” DSBs necessary to ensure a crossover for each pair of chromosomes in meiotic prophase. The balance of phosphatase and kinase activities must be finely tuned by feedback systems since creating too many DSBs could result in unrepaired DNA breaks, whereas too few DSBs could lead to lack of crossovers. We would like to understand the molecular mechanisms of this intricate regulation that creates and repairs DSBs



Laser light source, control, and processing unit for the OMX 3D-SIM superresolution microscope.



**Widefield deconvolution microscopes with high-precision motorized XYZ stages and home-built adaptation to create limited-area high-intensity laser light for DNA damage or FRAP studies.**

via homologous recombination in meiotic prophase. We aim to work closely with members of the RBC studying DNA damage and repair, and use the similarities and differences in these processes between meiotic and somatic cells to increase our understanding in both systems.

Another branch of our work is dedicated to understanding how functional domains are established to separate chromosomes in two steps during the first and second meiotic divisions. Meiotic chromosome segregation requires the removal of chromosome cohesion in two discrete steps, so that chromatids can stay connected between the first and second division. To retain cohesion between these steps, all organisms define an "early removal" zone and a "late removal" zone along each chromosome. While many organisms use their centromeres as "late removal" zones, *C. elegans* (which lacks discrete centromeres) instead uses the single crossover on each chromosome as the dividing point between the early and late removal zones. Remarkably, these two regions are always regulated to be dissimilar in size, and the smaller of the two regions becomes designated as the "early removal" zone, leaving the larger region as the "late removal" zone. The mechanisms that ensure unequal zone size, and designate functions in response to zone size, are not understood. Recently, we have found that a key upstream element in this process is the phosphorylation of a chromosome structural protein, SYP-1. SYP-1 is a member of the synaptonemal complex, a polymer

that holds paired chromosomes together. We showed that phosphorylation of SYP-1 creates a binding motif for the Polo-like kinase PLK-2, and PLK-2 and phosphorylated SYP-1 mutually promote their own restriction to the shorter "early removal" zone. When we mutated SYP-1 to a non-phosphorylatable form, we found that the two zones were no longer formed properly and chromosome segregation was impaired. Thus, we have found a key step in an informational cascade that propagates a single molecular-scale event (repair of a double-strand break as a crossover) into a chromosome-wide differentiation of function in an asymmetric manner dependent on the crossover position. Our ongoing research is focused on elucidating the molecular mechanisms of this functional differentiation, as well as other aspects of phosphoregulation in meiotic prophase.

Our research techniques include genetics, high-resolution microscopy and quantitative image analysis, biochemistry and molecular biology. In particular, we use super-resolution 3D-SIM microscopy to probe the structure of chromosomes below the optical diffraction limit of 250nm. We use quantitative image analysis to turn our raw microscopy images into the basis of biological understanding. We often create our own image analysis algorithms to automate quantitation and to ask questions not possible with commercial software.

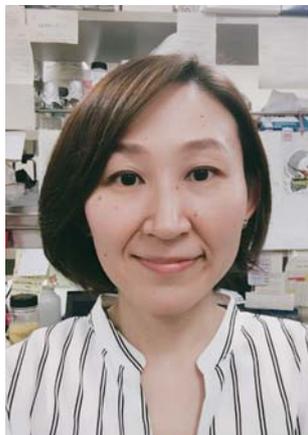


***C. elegans* nematode worms, our model system. Their transparent body and abundant germline cells make them an ideal system to study meiosis.**

晩発効果研究部門 特定助教

## 勝木 陽子

平成30年2月1日付けで、京都大学放射線生物研究センター晩発効果研究部門の特定助教を拝命いたしました、勝木陽子と申します。今年度より放生研は、大学院生命科学研究所と統合しましたので、大学院生命科学研究所附属放生研のゲノム損傷応答学分野に名称のみ変更となりました。今号の放生研ニュースの誌面上をお借りして、着任のご挨拶をさせていただきます。



もともと放射線によるゲノム損傷の修復機構に興味があり、2010年から2年間、英国サセックス大学 Genome Damage and Stability Centre の Penny Jeggo 博士の研究室にポスドクとして参加しました。帰国後は、長崎大学原爆後障害医療研究所の荻朋男博士（現・名古屋大学環境医学研究所教授）の研究室に研究員として勤めたのち、2014年から放生研の高田穰教授のもとで新たな研究をスタートし、現在に至ります。

高田研究室は、ファンコニ貧血 (FA) の原因遺伝子と、DNA クロスリンク修復をはじめとする、相同組換えやゲノム損傷応答に着目して研究を行っています。ファンコニ貧血は骨髄不全や奇形、高発がん性を特徴とする小児の先天性疾患で、二本鎖DNAの間に生じたクロスリンク損傷が、正確に修復さ

れないことが発症要因と考えられています。現在までに22の原因遺伝子が同定されており、いずれの機能不全も同様の病態を示すことから、クロスリンク修復は複合的因子の巧妙なネットワークで制御されていると考えられますが、未解明の部分が多く残されています。私が現在興味を持っているのは、クロスリンク損傷の除去機構です。特に、この修復の中核を担うユビキチン化を介した複数の経路が、どのようにクロストークするのかに注目しています。

もうひとつは、DNA二本鎖損傷の修復経路の選択です。Jeggo研究室で、放射線による損傷の修復経路の選択にクロマチンの状態や細胞周期が大きく影響することを学んで以来、その制御機構に興味を持っています。複製期におけるクロスリンク修復では、損傷の除去によってDNA二本鎖末端が生じ、相同組換えによって修復されると考えられています。なぜ放射線によるDNA二本鎖損傷よりも、クロスリンク損傷の除去過程で生じる二本鎖末端のほうが積極的に相同組換えを使うのか、この制御にどのような因子が関与しているのかなど、興味は尽きません。

大学院生時代にゲノム損傷応答研究に出会ってから16年になります。生命現象の不思議さと奥深さに没頭しつつ、目の前の課題に対する自身の力不足を感じ、葛藤する日々です。浅学ではありますが、初心とチャレンジ精神を忘れず、何事も勉強させていただきたいと思っています。どうかご指導ご鞭撻を賜りますよう宜しくお願い申し上げます。

## DNA損傷シグナルによって制御される がん免疫治療標的分子PD-L1の発現調節機構

### 1. はじめに

近年のがん治療において、抗PD-1抗体を用いた免疫治療は革新的がん治療法として世界的に大きな注目を集めている(1)。PD-1は細胞傷害性T細胞に発現する受容体であり、PD-L1は標的細胞の膜表面上に提示されるPD-1のリガンドである。PD-1とPD-L1は相互作用することで免疫抑制効果を引き起こすため、免疫チェックポイントと呼ばれている。抗PD-1抗体はこの相互作用を遮断する免疫チェックポイント阻害剤として機能する。抗PD-1抗体を用いたがん治療では、がん細胞周囲の免疫抑制状態を解除することで自己の免疫機能を再活性化し、抗腫瘍効果を発揮する。抗PD-1抗体治療では高反応性群の患者が存在し、それらの患者に対しては非常に高い治療効果を示すが、単剤では治療効果が十分ではないケースが少なからず存在する。そのため、既存の治療法である放射線治療や化学療法剤等との併用による有効性が世界各国で検証されている。近年のマウス腫瘍移植モデルを用いた基礎研究により、放射線と抗PD-1抗体治療の併用はその有効性が報告されつつある(2-4)。放射線照射は炎症性サイトカイン等を介し免疫活性化を促す可能性が示唆されているが、一方でがん細胞膜表面上のPD-L1発現上昇を引き起こすことから、免疫抑制効果も生じると考えられている(4,5)。そのため、抗PD-1抗体投与による免疫抑制解除は、放射線治療後の免疫効果を最大限に引き出すことに繋がる可能性がある。このように、放射線治療は抗PD-1抗体治療の最適なパートナーの一つであると考えられる。実際、放射線照射と抗PD-1抗体の併用により、放射線照射によって増大したPD-L1依存的な免疫抑制効果が遮断され、抗腫瘍効果が高まることが報告されている(4)。しかしながら、放射線照射がどのようにしてPD-L1発現上昇を引き起こすか、その分子機構は未だ多くが明らかになっていない。そこで我々は、放射線照射が誘発するDNA修復および損傷シグナルに着目し、DNA損傷発生からPD-L1発現上昇に至るまでの詳細な分子機構の解明を目指し研究を行っている。

### 2. がん細胞内のPD-L1発現誘導に影響を及ぼす因子

がん細胞は免疫システムから免れることで増殖する。すなわち、腫瘍組織の中では、がん細胞は何らかの方法で免疫から回避するシステムを構築している。その一つの要因として、がん細胞及び周辺免疫細胞におけるPD-L1発現上昇が考えられている。PD-L1の発現調節には、インターフェロングamma (IFN  $\gamma$ ) からの外部刺激が大きく寄与する。腫瘍環境内で活性化されたT細胞は、IFN  $\gamma$ を放出し、がん細胞膜表面上にあるIFN  $\gamma$ レセプター1/2 (IFNGR1/2)を介して、JAK1/2-STAT1/3経路を活性化する(6)。STAT1/3はPD-L1のプロモーター領域に結合する転写因子であるIRF1を発現誘導し、最終的にPD-L1の発現を高める(6)。2015年、Le DTらによって、ミスマッチ修復欠損を有する大腸がん患者に対し、抗PD-1抗体治療が有効であることが報告された(7)。ミスマッチ修復遺伝子の欠損は大腸がんにおいて多く認められ、それらのがん細胞では遺伝子不安定化の特徴であるマイクロサテライト不安定性 (MSI) が認められる。がん細胞におけるミスマッチ修復欠損は、MSI以外にもゲノム内の遺伝子領域に大量の突然変異を生み出し、変異タンパク質由来のペプチド断片としてネオアンチゲン (neoantigen) を産生する。ネオアンチゲンの産生は、T細胞の活性化を促し、その後は上記したIFN  $\gamma$ -STAT/IRF1経路を介したPD-L1発現上昇を引き起こすと考えられている(6)。結果として、ミスマッチ修復欠損を有するがん細胞では、PD-L1の発現が高まり免疫抑制効果が生じるため、抗PD-1抗体治療が有効になると考えられている。一方、上記のように、放射線照射によってもPD-L1は発現上昇するが、数Gy程度の放射線照射では発生するDNA二本鎖切断 (DSB: DNA double strand break) 数は数百程度であり、放射線誘発の突然変異数はミスマッチ修復欠損がん細胞における突然変異数には大きく及ばないと考えられる。以上のことから、放射線照射によって引き起こされるPD-L1発現上昇は、従来のネオアンチゲンを介したモデルだけではなく、その他の制御機構が存在すると考えられていた(図1)。

### 3. 放射線照射を含めた様々なDNA損傷によりがん細胞内のPD-L1は発現上昇する

放射線治療のみならず、化学療法剤の多くはがん細胞にDNA損傷を誘発し、細胞死を引き起こす。我々は、放射線照射だけではなく、エトポシド、カンプトテシン、シスプラチン、マイトマイシンC、アルキル化等のDNA損傷系抗がん剤処理により、がん細胞のPD-L1発現上昇を引き起こされることを見出した(8)。これらの結果は、PD-L1の発現上昇はDNA損傷シグナルを介した生物応答であることを強く示唆していた。さらに我々は、放射線照射後のPD-L1発現上昇は、DNA損傷シグナルであるATM/ATR/Chk1キナーゼ依存的に引き起こされることを見出した。次に、放射線照射後のPD-L1発現上昇に大きな影響を及ぼすDNA修復因子を同定するため、DSB修復関連因子のsiRNAスクリーニングを行った。その結果、Ku70/80またはBRCA2をノックダウンした細胞では、放射線照射後のPD-L1発現誘導が増強することを見出した。

近年の研究から、放射線照射直後のDSB末端には、相同組換えが行われるDSB末端であっても非相同末端連結因子であるKu70/80およびDNA-PKcsが結合することが示唆されている(9,10)。その理由として、Ku70/80は相同組換え開始前のDNA末端配列を保護する役割があるのではないかと考えられている。すなわち、Ku70/80欠損下ではDSB末端保護が出来ず、DNA末端からの削り込みが行われ、ATR/Chk1の活性化が過剰になることが予測される。そこで我々は、Ku80ノックダウン細胞におけるChk1活性化レベルを検討した結果、Ku80ノックダウン細胞では放射線照射後のChk1のリン酸化(Chk1活性化の指標)が顕著に増加していることを見出した。またKu80ノックダウン細胞におけるPD-L1発現増強は、DNAヌクレアーゼであるEXO1/BLMノックダウンにより減弱した。ATR/Chk1は、DNAヌクレアーゼにより生じた一本鎖DNA上に集積するRPAを介して活性化されるため、Ku80ノックダウン細胞におけるPD-L1発現上昇はATR/

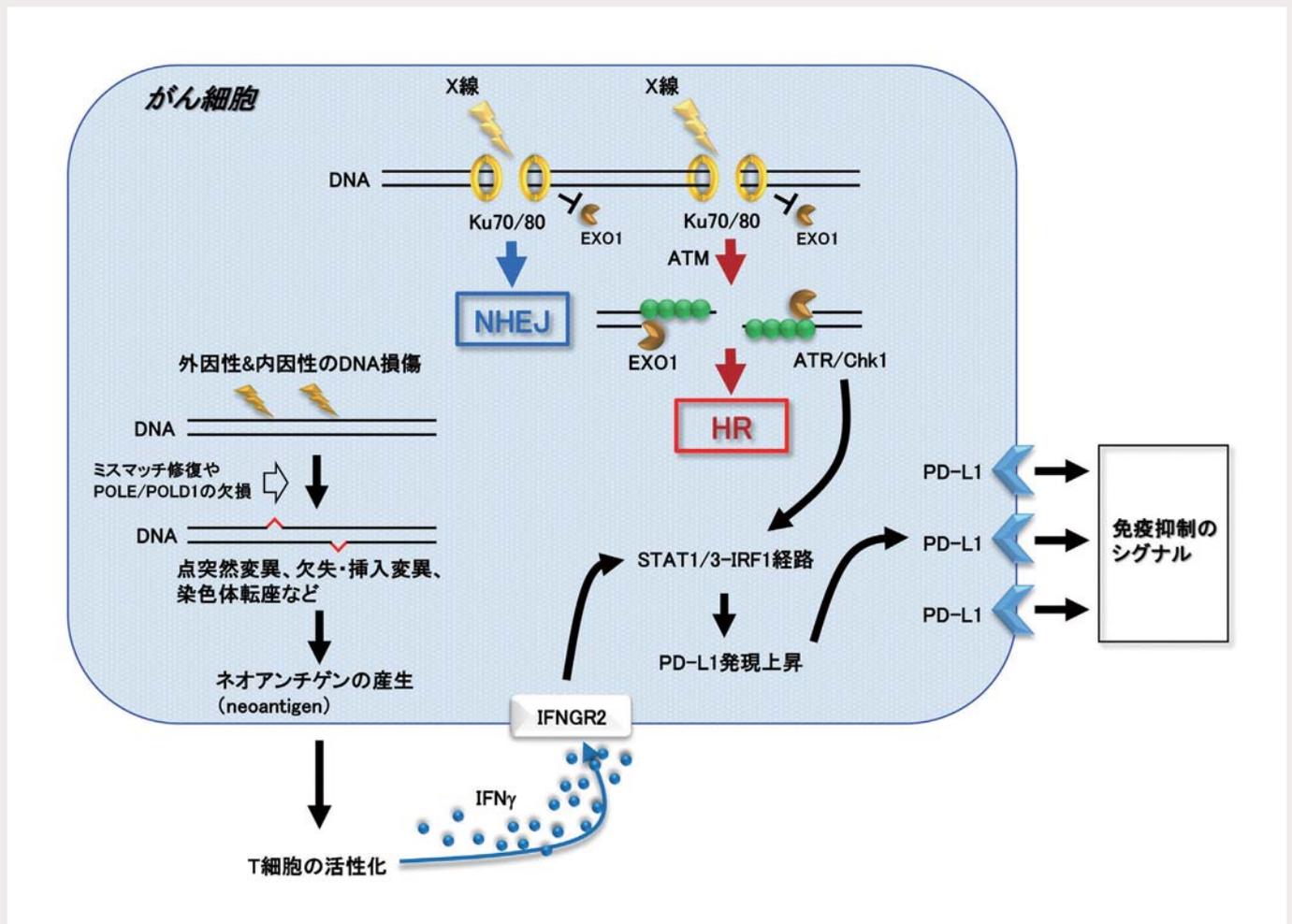


図1 DNA損傷応答を介したがん細胞内PD-L1発現調節機構

Chk1経路に依存していることが示唆された。一方、BRCA2はDNA末端の削り込み後に、一本鎖DNA上でのRPAからRAD51への分子変換の役割を担っている。BRCA2欠損細胞では、RAD51への移行が出来ずに、DSB部位にRPAが蓄積することからATR/Chk1経路が継続的に活性化される。このように、Ku80またはBRCA2のいずれの場合も、ATR/Chk1を介したDNA損傷応答が中心となり、DSB発生後のPD-L1発現上昇を引き起こしていることを我々は報告している(図1)(8)。

さらに我々は、DSB発生後に引き起こされるATR/Chk1以降のシグナル伝達において、PD-L1活性化の主経路であるSTAT1/3-IRF1が、放射線照射後に活性化することを見出した(8)。ATR/Chk1からSTAT1/3-IRF1活性化に至る経路が、Chk1によるSTAT1/3に対しての直接的なリン酸化によるものか、他因子を介した間接的なシグナル伝達が必要であるかは明らかになっていないが、DNA損傷シグナルがSTAT1/3-IRF1経路を通じてPD-L1発現調節を明らかにしたことはDNA損傷依存的PD-L1発現調節機構の全容解明に向けた一つの大きな前進と言える。以上の結果から、放射線照射や化学療法剤処理後に引き起こされるDNA損傷シグナルが、腫瘍環境内の免疫反応制御に関わることを示唆された。今後の抗PD-1抗体治療効果向上を目指すためには、がん細胞内のDNA損傷応答性は考慮すべき重要な因子となると考えている(図2)。

#### 4. 今後の課題

DNA損傷応答によって生じるPD-L1発現上昇は、がん細胞株で認められたが、ヒト正常皮膚繊維芽細胞では発現上昇は認められなかった(8)。またDNA損傷によるPD-L1発現上

昇の度合いは、細胞株によってバラつきがあることが明らかになっている(未発表)。DNA損傷依存的なPD-L1発現誘導が引き起こされにくい細胞では、がん細胞の特徴でもある多種多様なゲノム変異により一連のシグナル伝達系に異常が生じているのかもしれない。また、PD-L1遺伝子のプロモーター領域でのメチル化やヘテロクロマチン化など、遺伝子発現抑制機構が働いている可能性も考えられる。この場合、抗PD-1抗体単剤での治療のみならず、放射線治療と併用した場合においても抗PD-1抗体治療は有効でないかもしれない。一方で、Ku80やBRCA2遺伝子に異常があり、がん細胞内でATR/Chk1シグナルが過剰に活性化される場合には、PD-L1発現誘導により免疫抑制がより強く誘起され、抗PD-1抗体治療併用の必要性が高まると考えられる。今回の我々の研究成果は、放射線治療や化学療法といった従来のDNA損傷誘導型のがん治療と、免疫治療併用の有効性・科学的妥当性を支持するだけでなく、効果的な併用治療のための情報基盤作成の必要性を提示していると考えている。DNA損傷シグナルは、放射線照射によって誘発されるDSBだけではなく、酸化ストレス、アルキル化剤、架橋剤、DNA複製阻害剤等、様々な場面で引き起こされる。DNA損傷の形状は多種多様であり、それぞれに対応した最適なDNA修復経路が存在する。DNA損傷の種類によってPD-L1発現への影響が異なるのかどうか、それぞれの損傷に対応したDNA修復経路が欠損した場合には、PD-L1発現はどのように変動するのか、これらの分子間ネットワークを詳細に解明することで、がん治療の発展に貢献できればと考えている。

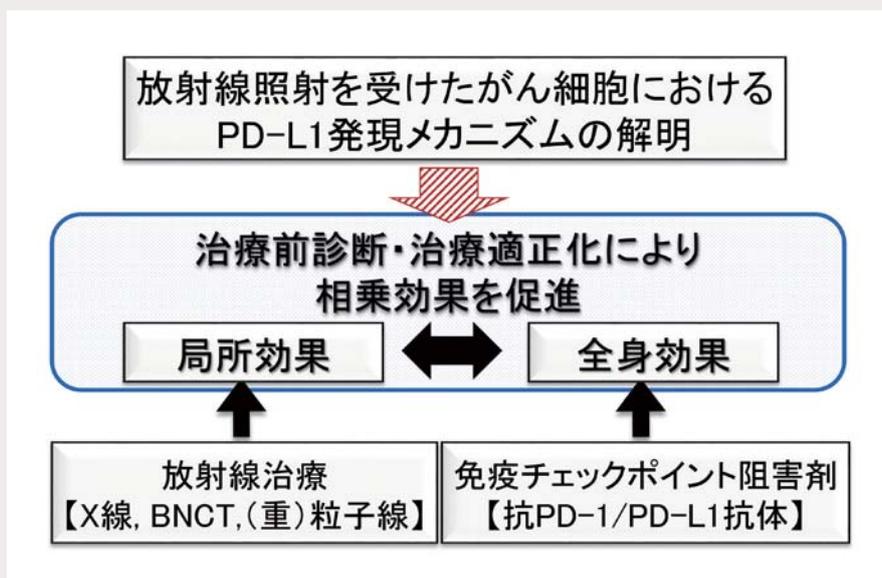


図2 がん治療への貢献をに向けたPD-L1発現調節機構の解明

## ● 引用文献

1. Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci* 2017;24(1):26.
2. Deng L, Liang H, Burnette B, Beckett M, Darga T, Weichselbaum RR, et al. Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *J Clin Invest* 2014;124(2):687-95.
3. Dovedi SJ, Adlard AL, Lipowska-Bhalla G, McKenna C, Jones S, Cheadle EJ, et al. Acquired resistance to fractionated radiotherapy can be overcome by concurrent PD-L1 blockade. *Cancer Res* 2014;74(19):5458-68.
4. Wu CT, Chen WC, Chang YH, Lin WY, Chen MF. The role of PD-L1 in the radiation response and clinical outcome for bladder cancer. *Sci Rep* 2016;6:19740.
5. Chen MF, Chen PT, Chen WC, Lu MS, Lin PY, Lee KD. The role of PD-L1 in the radiation response and prognosis for esophageal squamous cell carcinoma related to IL-6 and T-cell immunosuppression. *Oncotarget* 2016;7(7):7913-24.
6. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA, et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep* 2017;19(6):1189-201.
7. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 2015;372(26):2509-20.
8. Sato H, Niimi A, Yasuhara T, Permata TBM, Hagiwara Y, Isono M, et al. DNA double-strand break repair pathway regulates PD-L1 expression in cancer cells. *Nature communications* 2017;8(1):1751.
9. Chanut P, Britton S, Coates J, Jackson SP, Calsou P. Coordinated nuclease activities counteract Ku at single-ended DNA double-strand breaks. *Nature communications* 2016;7:12889.
10. Biehs R, Steinlage M, Barton O, Juhasz S, Kunzel J, Spies J, et al. DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Non-homologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination. *Molecular cell* 2017;65(4):671-84 e5.



柴田 淳史

群馬大学大学院医学系研究科  
研究講師  
京都大学大学院生命科学研究科  
附属放射線生物研究センター  
客員准教授

ミニレビュー

Elife. 2017 Dec 19;6. pii: e29953. doi: 10.7554/eLife.29953.

## The CDK-PLK1 axis targets the DNA damage checkpoint sensor protein RAD9 to promote cell proliferation and tolerance to genotoxic stress.

Wakida T, Ikura M, Kuriya K, Ito S, Shirowa Y, Habu T, Kawamoto T, Okumura K, Ikura T, Furuya K.

### 概要

本研究では、細胞がゲノムDNA損傷を乗り越えながらも増殖を推し進めるための新たなリン酸化シグナル伝達経路を同定しました。この仕組みはがん細胞の異常な増殖も説明できると私たちは考えています。がん細胞は不死化した細胞であり、強い増殖能力をもつことはよく知られています。一方で正常細胞には異常な増殖を防ぐ様々な防御ネットワークが様々な形で備わっていることがわかっています。その一つがDNAチェックポイントと呼ばれる機構です。一般に細胞が放射線・紫外線、DNA複製阻害剤等に曝され、遺伝情報であるDNAに傷が生じると、DNA上の損傷を感知し、細胞増殖の速度が遅くなります。しかし、我々の同定した新規のリン酸化シグナル経路は、DNAチェックポイント機構のうち、DNA上の損傷を感知する役割を担うRAD9タンパク質を損傷DNAから解離させ、DNAチェックポイント機構の発動を抑えていました。また、このリン酸化シグナル経路を担う酵素はPLK1と呼ばれるリン酸化酵素であり、がん細胞において頻繁に高発現し、予後不良とも高い関連があることが報告

されています。がん細胞ではこのPLK1に依存したリン酸化シグナル経路を働かせることでDNAに傷を負いながらも、増殖速度を維持し続けることができると予想できます。

### 細胞増殖とDNA損傷ストレス応答のせめぎ合い

私たちの身体の細胞は、ゲノムDNA損傷ストレスの危険性に常に曝されています。ゲノムDNAに損傷を受けた細胞はDNAチェックポイント機構をはじめとするDNA損傷ストレス応答を発動させ、これらのストレス応答は細胞増殖を止めにかかります。ただ、そういった中でも増殖をすすめなければならない状況に遭遇することもあり、細胞の中では常に増殖の推進シグナルと抑止シグナルがせめぎあっていると思われれます。

細胞の増殖シグナルの中でも有名なものはCDK（サイクリン依存性キナーゼ）です。CDKは細胞分裂のM期の開始をトリガーし、染色体分配を推し進めるリン酸化酵素として知られています。また、CDKのリン酸化標的基質としては分裂期進行や染色体分配に関わるタンパク質だけでなく、DNA複

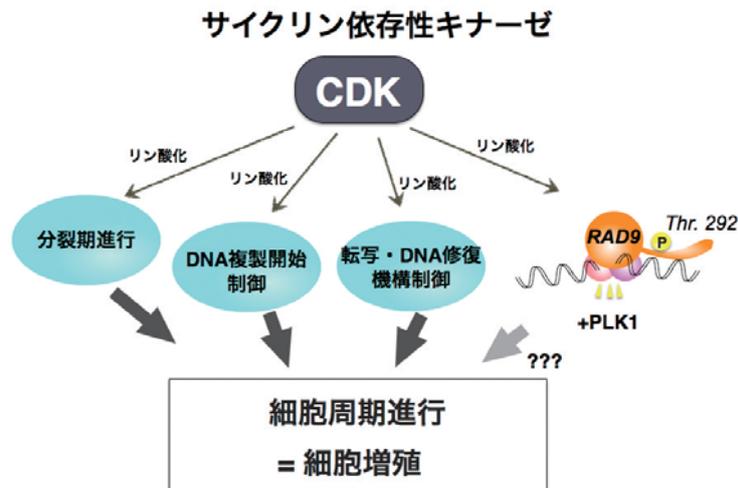


図1 細胞増殖促進キナーゼCDKはDNAチェックポイント因子RAD9を標的とし、リン酸化する。

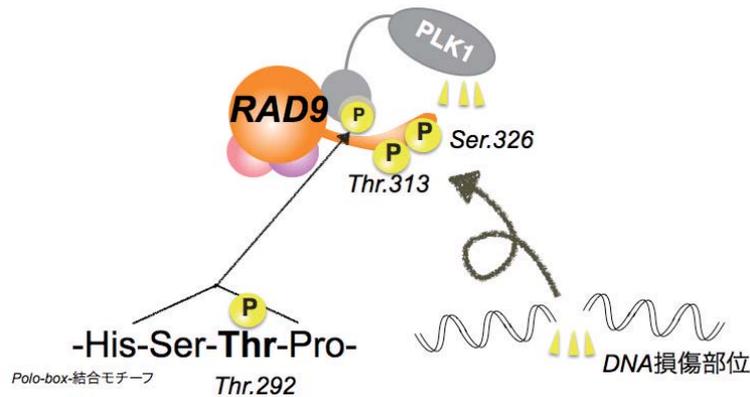


図2 Polo様キナーゼ1はCDKによりリン酸化を受けたRAD9(スレオニン292)を標的とし、結合、リン酸化する(スレオニン313及びセリン326)。リン酸化を受けたRAD9は損傷部位から解離し、DNAチェックポイント機構の発動が抑制される予想される。

製の開始やDNA修復経路に関わるものも同定されており、細胞周期の各ステップの円滑な進行を保障する役割が示されてきました。そういった中で我々はDNAチェックポイント機構の活性化を担うRAD9タンパク質もまた、CDKによりリン酸化を受けることを見出しました。RAD9タンパク質はゲノム上のDNA損傷に直接結合し、DNAチェックポイント機構を発動させる、DNA損傷の検出役を担う重要なタンパク質です(図1)。このように細胞増殖を停止させるDNAチェックポイント因子が細胞増殖推進に関わるCDKによりリン酸化を受け、標的となるのは意外でした。RAD9のリン酸化を認識する抗体や、CDKによるリン酸化を受けないRAD9変異体タンパク質の解析を行うことで、CDKがリン酸化することでRAD9タンパク質をDNA損傷部位から解離させ、DNAチェックポイント機構を抑制し、細胞増殖の進行が遅くならないようにしていることを見出しました(図1)。

### CDKによる「二刀流」の細胞増殖調節

CDKはどのような仕組みでRAD9に働きかけるのでしょうか。そのヒントはRAD9のリン酸化部位自体にありました。リン酸化部位はちょうどPLK(ポロ様キナーゼ: Polo-Like Kinase)と呼ばれるリン酸化酵素が結合する配列と酷似していました。PLKはリン酸化されたペプチドに結合するPolo-Box domainを有するリン酸化酵素です(図2、文献1)。実際に我々は、5種類あるPLKタンパク質群のなかでもPLK1が、リン酸化を受けたRAD9に直接結合することを試験管内の再構成実験系により示しました。PLK1は細胞分裂期の推進にリン酸化を通じて関わるということが知られているほか、多くのがん組織において高発現することも知られています。正常細胞ではPLK1の発現量は低くても細胞の増殖にはあまり影

響を与えませんが、p53を欠失したり、Ras変異を伴うがん細胞の増殖においてはPLKの発現量の亢進が必須となっていることも報告されています。これらを「PLK1-addiction」と称するモデルが立てられています(文献2,3)。さらには、PLK1の高発現はがん細胞がDNA損傷を誘導する抗がん剤(Gemcitabineなど)に対する耐性を獲得する際の鍵となる因子であることも明らかになっています。我々はPLK1がCDKによりリン酸化を受けたRAD9に結合するだけでなく、リン酸化されたRAD9がPLK1のキナーゼ活性を亢進させ、RAD9をリン酸化することも示し、このRAD9上のリン酸化部位も質量分析解析により同定しました。

RAD9が受けるPLK1依存的なリン酸化こそがRAD9をDNA損傷部位から解離させるものでした。PLK1によるリン酸化を受けないRAD9は損傷クロマチンから解離しにくくなっていることをクロマチン分画実験により示しました。また、リン酸化を受けないRAD9を発現するがん細胞ではDNAチェックポイントの発動が強くなっており、本来顕著な影響が見られないDNA損傷ストレス下でもDNA複製期の進行の遅延が起り、増殖が極端に遅くなることを、DNAコーミングアッセイなどを用いることで実際に複製速度を巨視的、微視的観点から測定することで示しました。これらの結果は、PLK1によるRAD9のリン酸化がゲノムDNA損傷ストレスを乗り越えて細胞増殖をすすめるために重要な役割を果たすことを示しています。

このように、本研究では、あらたな細胞増殖制御の仕組みを明らかにしました。CDKが本来の役割である細胞増殖推進機構の活性化だけでなく、細胞増殖を止めにかかるDNAチェックポイント機構を抑え込むという、「二刀流」の手法をもって細胞増殖を後押しすることを見出しました。このこと

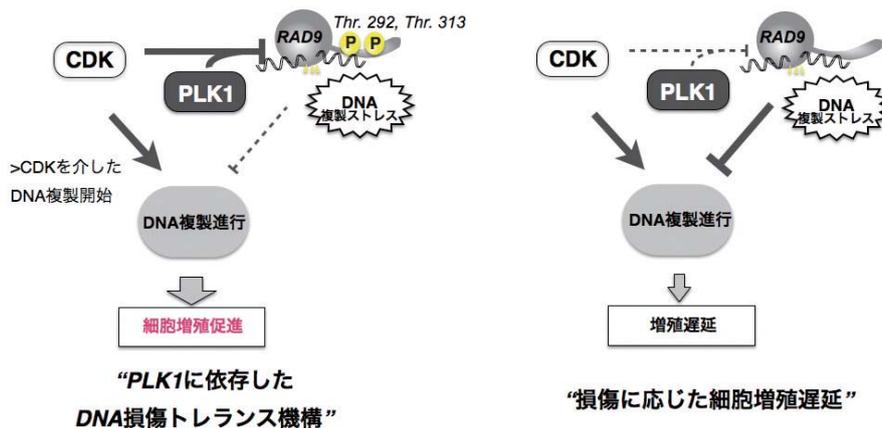


図3 PLK1に依存したDNA損傷トレランス機構。(左) PLK1を高発現するがん細胞などでは、DNAチェックポイント機構の働きが抑制され、損傷が無視され細胞増殖が促進される。(右) PLK1の発現が低い細胞ではDNA損傷に応じた増殖遅延が見られる。

は細胞を増殖させる、という作業がDNA損傷ストレスに対して鈍感になることと同義であることを示していると思われ、一種のDNA損傷トレランス機構であるとも予想できます。また、このCDKの新機能にはPLK1というリン酸化酵素が大きな役割を果たしていました。前述のようにPLK1はがん化との関連性が非常に高いことがわかっています。我々の知見は、PLK1の機能が亢進したがん細胞での放射線・化学療法に対する耐性をも説明できる、非常に重要なものと思われれます。がん細胞ではDNA修復機構がうまく働かなくなり、それゆえにDNA損傷を蓄積し、異常な遺伝子変化を引き起こすことも知られています。また、がん化した細胞は本来増殖すべきでないタイミングで細胞周期を回すため、DNA複製に伴い過大な損傷ストレスに曝されると考えられています(文献4)。こういったがん細胞が、増殖をし続けるためには我々の同定したCDK-PLK1によるシグナル伝達経路が発動する必要がある可能性があります(図3)。すなわち我々の同定したリン酸化シグナル経路は、傷つきながらも増殖するがん細胞特有の性質を説明するとともに、がん細胞特異的な分子標的を提示するものとも期待できます。

### 補足

本研究成果はヒト細胞の系で明らかにしたものです。しかし、元となる成果は分裂酵母を用いた遺伝学的な実験系から得たものでした。分裂酵母ではDNAチェックポイント機構の発動から解除までが、RAD9が二つの異なるリン酸化酵素により段階的なリン酸化を受けることで非常にタイトなフィードバック制御を構築していることを示してきました(文献5、6)。一方ヒト細胞においてはPLK1というあらたな

役者が関わっており、より密接に細胞増殖とDNA損傷応答がカップルしていることが明らかとなりました。また、このDNAチェックポイント機構の抑制の意味づけが正常細胞とがん細胞で異なることも興味深く、今後はこういった違いを見定めながら、がん研究へと展開できればと考えています。

### ● 引用文献

1. Zitouni S et al., *Nature Reviews; Mol. Cel. Biol.* Vol. 15, 2014.
2. Lee KS et al., *Trends Pharmacol Sci.*, Vol. 36, 858-877, 2015.
3. Gutteridge REA et al., *Mol. Cancer Ther.* Vol. 15, 1427-1435, 2016.
4. Furuya et al., *Genes & Dev.* Vol. 18, 1154-1164, 2004.
5. Furuya et al., *Mol. Cell.*, Vol. 40, 606-618, 2010.

古谷 寛治  
京都大学大学院生命科学研究科  
附属放射線生物研究センター  
講師



## 転出された方

## H30年3月 転出

**吉井(羽床) 友紀子さん**

ゲノム動態研究部門  
研究支援推進員

ゲノム動態研究部門で15年くらいお世話になりました、羽床です。放生研ニュースに初めて載ったのはNo.99。まだ緑色で写真も表紙にちよっとだけの頃でした。放生研の方々とは実験以外のことも色々しました。花見、鴨川バーベキュー、セミナー室で浴衣に着替え祇園祭へ。屋上に上って送り火を見たり（注：今はダメですが...）。ハロウィンではかぼちゃのランタンを作り、クリスマスには玄関に生木を飾りました（皆様の寄付で年々飾りが増えました）。バス1台貸し切ってスキーや、富士登山に行ったり。学生の卒業旅行に便乗してエジプトに行ったり、海外に留学する人の「遊びに来てね」に本気で押しかけたり、、、遊んでばかりでした。

4月からは京大のメディカルイノベーションセンターで働くことになりました。私と入れ違いで、20年来の友人が高田先生のところで働くそうです。なので、ちょいちょい遊びに来るかもしれませんが、その時はよろしくお願い致します。長い間、本当にありがとうございました。

平成30年度 新人紹介



**城地 久美さん**

生命科学研究科  
ゲノム損傷応答学分野  
(晩発効果研究部門)  
技術補佐員

4月から晩発効果研究部門で技術補佐員として就業しております、城地久美と申します。放生研から大阪大学に研究室移転なさった藤堂剛教授に阪大に連れて行っていただいて以来の放生研となります。11年ぶりの京都と放生研の変わったところ変わらないところを発見し、11年たってもあまり成長の見られない自分を再確認し反省しながら過ごす一ヶ月になりました。

高田先生はじめ晩発のみなさま、放生研のみなさまにはご迷惑をおかけすることもあるかと思いますが、がんばりますのでどうぞよろしくお願いいたします。



**長尾 綾子さん**

生命科学研究科  
がん細胞生物学分野  
(ゲノム動態研究部門)  
修士課程1回生

今年度4月から京都産業大学から生命科学研究科 修士課程に進学しました、長尾綾子です。出身は山口県です。趣味は音楽や映画鑑賞、最近は麻雀がブームです。学部時代は免疫分野の研究をしておりました。未熟で至らぬ点が多いかと思いますが、どうぞご指導の程、よろしくお願いいたします。



**Christalle CHOW さん**

生命科学研究科  
がん細胞生物学分野  
(ゲノム動態研究部門)  
研究生  
(平成30年10月より修士課程入学)

I am a student from Vancouver, Canada and am excited to join the Harada Lab (Laboratory of Cancer Cell Biology). Holding a strong interest in drug and disease research, I graduated from the University of British Columbia (UBC) with a Bachelor's degree in Biochemistry and Chemistry. Much of my previous laboratory experience involved investigating various aspects of cancer: with the Morin Lab at Canada's Michael Smith Genome Sciences Centre, I conducted research on the mechanisms of CDK12, a protein implicated in cancer pathology. With the Roberge Lab at UBC, I investigated the potential of using drug-induced premature stop codon readthrough to treat cancer cells with p53 nonsense mutations. I will spend my first term at Kyoto University in an intensive Japanese language program, and will be entering the Master's program at the Graduate School of Biostudies in October 2018.

## 今年度の放射線生物研究センター国際シンポジウムのお知らせ

今年度の放生研シンポを以下の要領で開催しますので、ご予約をよろしくお願いいたします。

### The 34th Radiation Biology Center International Symposium / The 2nd International Symposium on Radiation Therapeutics and Biology "Molecular Targets and Precision Cancer Medicine: From basic research toward translation"

日程：11月10日(土) 午後1時ごろ～12日(月) 午後12時半ごろ(正確な時間は未定)

場所：京都大学 吉田キャンパス 国際イノベーション棟 5階 シンポジウムホール+ホワイエ

<http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/innovation>

昨年から、中国深セン大学と共催で、International Symposium on Radiation Therapeutics and Biologyを日中で交互に行うことを計画しており、今回、二回目を京都で行います。中国側からはすでに7名の講演者が選抜されています。例年の基礎研究に加え、がん治療への応用の視点を入れたシンポジウムとなる予定です。この日程は、長崎の放射線影響学会の直後で、翌週は金沢での3Rシンポジウムとなります。11月の京都は極端に混み合う時期でもあり、ホテルの予約などが困難であることが予想されます。

日本側は、現在依頼を進めており、近日中に講演者リストをオープンにする予定です。どうぞ奮ってご参加くださいませよう、お願い申し上げます。

オーガナイザー Dr Xinzhi Xu (深セン大学)、高田 穰 (放生研)

## 編集後記

放生研ニュース161号(2018年6月号)をお届けします。

新年度を迎え、京都大学大学院生命科学研究科附属放射線生物研究センターとしての活動が始まりました。表紙の写真は、平成30年4月に開催された放生研スタッフの辞令交付式の様子などです。改組に伴い、石川冬木教授による放射線ストレス耐性部門と、Peter Carlton 准教授による染色体継承機能研究部門が加わって、計6部門(客員部門を合わせると計8部門)の体制となりました。カバーできる研究領域も広がり、よりパワーアップした新生・放生研を宜しくお願い致します。

年度の変わり目、放生研メンバーにも動きがありました。放生研を巣立って行かれた方々、放生研で研究活動をスタートされた方々、皆さん新天地で(大谷翔平選手のように)ご活躍下さい。

今号がお手元に届く頃は、FIFAワールドカップサッカー(ロシア大会)の真っ只中だと思います。大会直前に監督が電撃交代し、日本代表チームもある種の改組…となった訳ですが、寝不足覚悟で応援したいと思います。(原田 浩)



京都大学大学院生命科学研究科附属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

