

# RBC 放生研ニュース NEWSLETTER

No. **169**  
JULY  
7, 2021

第36回

# 放生研シンポジウム

2021年9月23日 Thu

ザ・ヒロサワ・シティ会館 (茨城県民文化センター)

C会場 (本館2F 県民ギャラリー)

## Contents

着任のご挨拶	2
離職のご挨拶	3
ミニレビュー 1 「線量率効果」のメカニズムに迫る: Ku欠損細胞における線量率効果の消失・逆転	4
ミニレビュー 2 DNA修復タンパク質XRCC4によるスクランブラーゼ制御	7

第36回放生研シンポジウムについて	11
第45回放射線生物研究連絡会議について	12
編集後記	12

着任のご挨拶

令和3年4月1日付けで、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（放生研）の特定講師を拝命しました、勝木陽子と申します。今号の放生研ニュースの誌面上をお借りし、着任のご挨拶をさせていただきます。

生命科学研究との出会いは、母校の創価大学工学部、安藤俊夫先生の研究室での卒業研究にさかのぼります。安藤研では抗がん剤候補の探索を目的とした、新規トポイソメラーゼ阻害剤の解析を行い、がん化学療法の基礎知識に加え、研究を志す者の姿勢や心構えを教えてくださいました。安藤先生、実験をご指導いただいた助教の柳瀬香恵先生のご厚意により、札幌で行われた学会ではじめてポスター発表を経験した思い出は、今も印象深く残っています。

卒業後、小児の遺伝性疾患の分子メカニズムや治療法の開発について勉強したいと思い、東京医科歯科大学大学院の門をたたきました。難治疾患研究所の寺岡弘文先生の研究室（病態生化学）に、専攻生として2年間在籍し、その間と大学院博士課程の4年間、小児科学教室（発生発達病態学）前教授の水谷修紀先生にご指導いただきました。水谷研究室では、乳児白血病の遺伝子解析をとおり、小児のまれな先天性疾患である「毛細血管拡張性運動失調症」の原因遺伝子ATMとの関連性が研究されており、はじめて触れた疾患生物学の世界に魅了されました。ATMはDNA修復や細胞周期チェックポイントをはじめとする、DNA損傷応答の重要な分子として知られており、この出会いが小児遺伝性疾患とゲノム安定性機構への興味の原点となりました。

院生時代は細胞生物学、分子生物学をとおして、先輩研究者であった中田慎一郎先生に医学研究を学び、トポイソメラーゼII阻害剤による治療関連二次性白血病、乳児白血病に特徴的な染色体転座（MLL rearrangement）の抑制メカニズムを、ゲノム損傷応答を切り口として解明する研究などに携わりました。2008年に学位を取得し、国立がん研究センター研究所でポスドクとして研究者の道をスタートしました。

がんセンターでは前任者の仕事を引き継ぎ、肺がん抑制遺伝子として同定された、細胞分裂装置にかかわるタンパク質の機能を明らかにするプロジェクトにチャレンジしましたが、思うような結果を出せず、研究の世界の厳しさを味わいました。ゲノム損傷応答のフィールドで研究したいという思いと、学生時代から希望していた海外留学への気持ちが再び高まっていたところ、幸運にも先輩方の後押しのおかげで、英国サセックス大学Genome Damage and Stability CentreのDr. Penny Jeggoのラボで、2年間ポスドクとして働くチャンスに恵まれました。Jeggoラボでは、放射線によるDNA二本鎖損傷の修復において、細胞周期、クロマチン構造などのファクターによる修復経路の選択メカニズムに注目しており、高解像度顕微鏡等を駆使した研究が行われていました。センター全体

にも、質の高い研究・教育環境が整っており、複数の関連グループが集まって行われるジャーナルクラブや、国内外からスピーカーを招いて行われるセミナーには毎回会場いっぱいの参加者が集まり、活発な議論が展開される様子を目の当たりにするなど、毎日が刺激の連続でした。日々の研究に没頭しつつ、イギリスのゆたかな自然や、同僚との交流を楽しみ日常生活も満喫することができました。

帰国後、長崎大学原爆後障害医療研究所の荻朋男先生の研究室で研究員を経て、2014年から放生研晩発効果研究部門に参加し、今年で8年目になります。現在、ファンconi貧血の原因遺伝子産物を制御するDNAクロスリンク修復の分子経路を探索しています。特定教員として授業や大学院生の実験指導の機会もいただき、研究以上に、教育の難しさを痛感していますが、研究の面白さを常に再発見させてくださるメンターの高田穰先生、アットホームなラボメンバー、放生研のおかげで、充実した時間を送らせていただいています。今日の自分があるのは多くの方々のサポートのおかげであり、京都大学生命科学研究科という恵まれた環境で研究ができることに、日夜感謝の思いを深くしています。

未熟で至らぬ点も多くありますが、一層精進してまいりますので、今後ともご指導、ご鞭撻いただきますようにとぞよろしくお願い申し上げます。



勝木 陽子

晩発効果研究部門  
ゲノム損傷応答学分野  
特定講師

## 離職のご挨拶

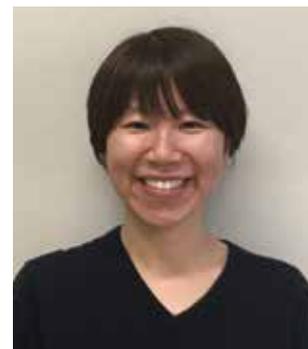
私は、2004年4月から京大放生研の松本智裕教授の下でポスドク生活をスタートさせました。私は学生時代から今でも変わらず分裂酵母をモデル生物として研究を続けています。学生時代は、減数分裂・配偶子形成の研究をしており、放生研に移ってきてから初めて放射線生物学の勉強を始めました。その当時、晩発効果研究部門の教授であった丹羽大貫先生が放射線生物学の勉強会を毎週催してくださっていました。ホルミシス効果やバイスタンダー効果など聞き慣れない用語ばかりで、毎回必死に付いていっていました。初めて参加したRBCシンポジウムの印象記では、私の拙い文章を丹羽先生が褒めてくださったことが今でも温かな思い出として残っています。それまでは新しい環境での不安感や焦燥感に包まれていましたが、その言葉で“自分も放射線生物学の分野に受け入れてもらえた”ような気がして、気持ちが少し楽になりました。

松本先生の下では、分裂酵母を用いてヒト結節性硬化症の原因遺伝子TSC1/2の機能解析を進めていました。結節性硬化症（Tuberous Sclerosis Complex ; TSC: 多臓器に腫瘍が形成される）は発症率が6,000人に一人程度と比較的頻度が高く、精神発達遅延やてんかん、顔面血管繊維種などの症状を呈します。また、TSC1/2は、栄養応答シグナルに関与するTSC-mTORシグナル伝達経路に機能することがわかっていたことから、培養が低コストであることや培養時間の短さなど分裂酵母の利点を生かし、この経路に関わる新規因子のスクリーニングを開始しました。その結果、低分子量Gタンパク質のファルネシル基転移酵素やアミノ酸トランスポーターの制御因子、レトロトランスポゾン発現制御因子など興味深い因子の単離に成功しました。

この仕事を進めていく中で、私は結婚と出産を経験し、毎日目が回る思いでしたが、振り返ってみるととても充実した日々だったように思います。一人目の出産後に、育児と仕事のプレッシャーから、松本先生に「ポスドクではなく技術補佐員として雇って欲しい」と申し出たときに、今の立場で続けることを後押ししてくださったことが今に繋がっています。これまで好きだけ研究に打ち込めていた時間が、子供がいることで制限ができ、周りより少ない時間で勤務することをとても後ろめたく感じていました。また、要領が悪かった私は、子供のお迎えの時間までに実験が終わらず、度々保育園に遅れて迎えに行くという日々でした。そんな中で、放生研の事務室の方々には仕事だけでなく育児の悩みなども聞いていただいたり癒しの時間をいただきました。それまでは人に頼ることに躊躇や罪悪感さえありましたが、子供ができてからは「周りに助けをもらいながら進もう」という新たな境地に至り、心が少し楽になりました。時代の波もあり、男女共同参画の女性研究者支援などの後押しも大きかったと思います。

2021年2月から奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエ

ンス領域の助教として着任しました。現在も引き続き分裂酵母を用いて『細胞が高温環境に適応する分子メカニズムの解明』に取り組んでいます。長い放生研生活の中で学んだことや知り合った方々との思い出を胸に、新天地でも邁進していく所存です。今後とも引き続き放生研の皆様にはご指導ご鞭撻を賜りますよう、よろしくお願い申し上げます。



中瀬 由起子

放射線システム生物学研究部門  
特任助教

ミニレビュー 1

## 「線量率効果」のメカニズムに迫る： Ku欠損細胞における線量率効果の消失・逆転

### はじめに

放射線の生物影響、特にX線やγ線のような低LET放射線の生物影響は、一般に、線量率が小さくなるにつれて低下する傾向があります。これは「線量率効果」と呼ばれ、培養細胞、モデル動物、ヒト疫学などを含むさまざまな生物学的システムで認められ、がんの放射線治療や放射線防護の重要な基礎の一つとなっています。低線量率照射は分割照射の1回あたりの線量と照射間隔を小さくした極限で、線量率効果は照射中に亜致死損傷 (SLD) が修復されることによるものと考えられています。しかしながら、その分子メカニズムには不明の部分が多く残されており、線量率効果がどのDNA修復経路に関係しているのかが明らかにされていません。

放射線によって生じるさまざまなDNA損傷の中で、最も重篤と考えられるDNA二本鎖切断 (DSB) は、相同組換え (HR) と非相同末端結合 (NHEJ) によって修復されます。HRはNHEJに比べて精度が高いと考えられますが、脊椎動物細胞においては姉妹染色分体を必要とするため、S期の後半からG2期に限定されると考えられています。一方で、NHEJは細胞周期を通じて機能し、G1期ではほぼ全てのDSB、G2期でも70~80%のDSBの修復に関わると考えられています。NHEJにおいては、Ku70、Ku86 (あるいはKu80)、DNA依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット (以下、DNA-PKcs)、XRCC4、DNA ligase IVなどが重要な役割を担います。Ku70とKu86はリング状構造のヘテロダイマー (以下、Ku) を形成し、その穴の部分でDNA末端、すなわちDSBに結合します。次にKuはDNA-PKcsをDSBにリクルートして活性化し、DNA-PKcsはタンパク質リン酸化を通じて、続くNHEJの過程を制御すると

考えられています。

今回、私たちは線量率効果とNHEJによるDSB修復との関係を明らかにすることを目的として、京都大学大学院生命科学研究所附属放射線生物研究センター (以下、センター) を利用させて頂き、KuおよびDNA-PKcs欠損細胞における線量率効果を調べました。その成果を本年3月のJournal of Radiation Research誌にて発表させて頂きましたので、その概要と今後の展望について述べさせて頂きたいと思っております<sup>(1)</sup>。

### DNA-PKcs、Ku欠損細胞における線量率効果

本研究では、DNA-PKcs、Ku70あるいはKu86を欠損する4種類のげっ歯類細胞とその対照となる4種類の細胞を用いました。東京工業大学のコバルト照射施設を用いた高線量率照射実験も行っていますが、ここではセンターの設備を用いた実験の結果をご紹介します。高線量率 (HDR) 照射は、コロニー形成のために低密度で細胞をディッシュに播種した後、Gammacell 40 Exactor (<sup>137</sup>Cs) を用いて、0.855~0.911 Gy/minの線量率で、室温で行いました。また、低線量率 (LDR) 照射では、低密度で細胞をディッシュに播種した後、低線量率長期照射設備 (<sup>137</sup>Cs) 内に設置されたインキュベータ (設定温度37.0°C、CO<sub>2</sub>濃度5.0%) 中に置いて、1.0または1.1 mGy/minで照射しながら1~2日の培養を行いました。いずれも照射終了後、8-15日の培養を行い、形成されたコロニーを計数し、コロニー形成効率と生存率を求めました。

図1は、DNA-PKcsに変異を持つ重症複合免疫不全 (SCID) マウス由来の胎仔線維芽細胞 (以下、MEF)、その対照として親系統 (CB17) マウス由来のMEF、Ku70遺伝子ノックアウト

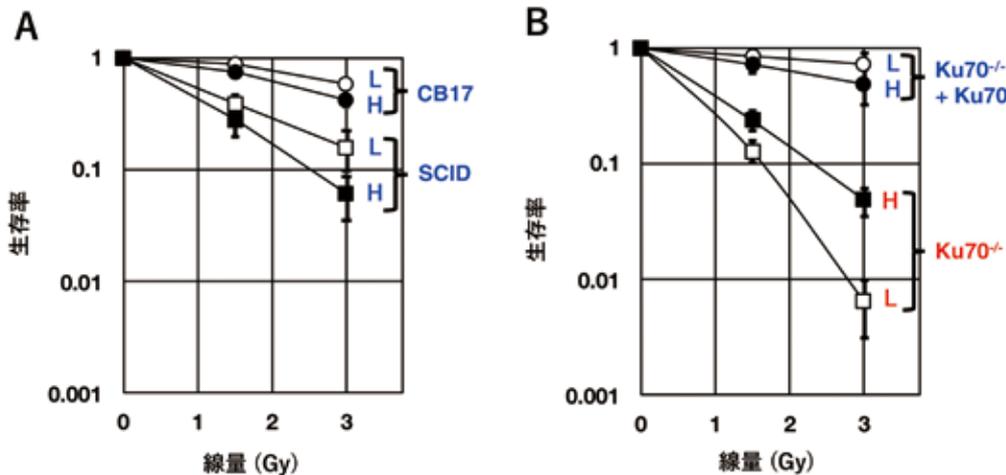


図1 DNA-PKcs欠損細胞 (SCID)、Ku70欠損細胞 (Ku70<sup>-/-</sup>) およびこれらの対照細胞 (CB17、Ku70<sup>-/-</sup>+Ku70) の高線量率 (HDR)、低線量率 (LDR) γ線照射後の生存率曲線

ト (Ku70<sup>-/-</sup>) マウス由来のMEF、その対照としてマウスKu70 cDNAを導入した細胞 (Ku70<sup>-/-</sup>+Ku70) の4種類の細胞のHDR、LDR照射後の細胞生存率を示しています。○□はLDR (L) を、●■はHDR (H) を表しています。A、Bともグラフ上方の2曲線は対照細胞で、いずれもLDR照射の方がHDR照射より生存率が高く、一般的な線量率効果を示しました。下方の2曲線は欠損細胞の生存率です。AのSCIDでは対照細胞と同様、一般的な線量率効果が見られました。しかし、BのKu70<sup>-/-</sup>では、LDR照射の方がHDR照射より生存率が大きく下がり、線量率効果の逆転が見られました。また、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞V79B、卵巣細胞CHO-K1由来でKu86遺伝子に変異を持つXR-V15Bとxrs-5は、LDR照射とHDR照射でほぼ同じ生存率を示し、線量率効果の消失が見られました。これらの結果から、線量率効果にKuが関与していることが示されました。

なお、Mitchellらは、ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞を用いて、0.37~1.54 Gy/hの範囲で線量率の低下に伴い細胞生存率が低下すること、つまり線量率効果が逆転することを報告していますが、いずれもHDR照射 (1.43 Gy/min) 時よりは高い細胞生存率を示しています<sup>(2)</sup>。また、Tomitaらは、KuあるいはDNA-PKcsを欠損するトリ、ヒト細胞を1mGy/hrの条件で照射しながら培養した場合、対照細胞やHR欠損細胞よりも非照射に対する増殖遅延が大きいことを示しています<sup>(3)</sup>。また、Krederらはパルス状の照射によって平均1Gy/hrでの照射を行い、対照細胞ではHDR連続照射より生存率が上がるが、NHEJあるいはHR遺伝子に異常を持つ細胞では変わらないことを示しています<sup>(4)</sup>。Tomitaら、Krederらの結果はいずれもLDR照射時の細胞生存・増殖におけるNHEJの重要性を示す

ものですが、線量率がTomitaらの研究では今回の研究に比べて60分の1程度と低く、一方、Krederらの研究では15倍程度高い点に違いがあります。

## LDR照射に伴う細胞周期分布の変化

次に、LDR照射によって細胞周期分布にどのような変化が見られるか調べました。LDR照射した細胞をEdU存在下で30分培養した後、クリック反応によってEdUをAlexa Fluor 488で標識するとともに、PIによるDNAの染色を行い、フローサイトメトリーで解析しました。その結果、Ku70<sup>-/-</sup>ではLDR照射後にS期細胞の割合の減少とG2/M期細胞の割合の増加が顕著に見られました。一方、Ku70<sup>-/-</sup>+Ku70、SCIDでは、S期細胞の割合の減少、G2/M期細胞の割合の増加ともにわずかで、CB17ではいずれも見られませんでした。XR-V15BはKu70<sup>-/-</sup>とSCIDの中間程度の変化を示しました。以上のことから、G2/M期への蓄積が線量率効果の消失・逆転と関係があることが示唆されました。

## Ku欠損細胞における線量率効果の消失・逆転のメカニズム

線量率効果の要因として、照射中の①DNA損傷の修復、②細胞の増殖、③(その時点で生き残っている細胞の)細胞周期の分布の変化が考えられます。①、②については一般的に生存率を増加させる方向に働きますが、③については生存率を減少させる方向に働く場合があります。これらを踏まえて、Ku欠損細胞が線量率効果の消失や逆転が見られるほど、低線量率放射線に高い感受性を示す理由について考察してみます (図2)。まず、①のDNA修復については、HRはS期後半とG2期でし

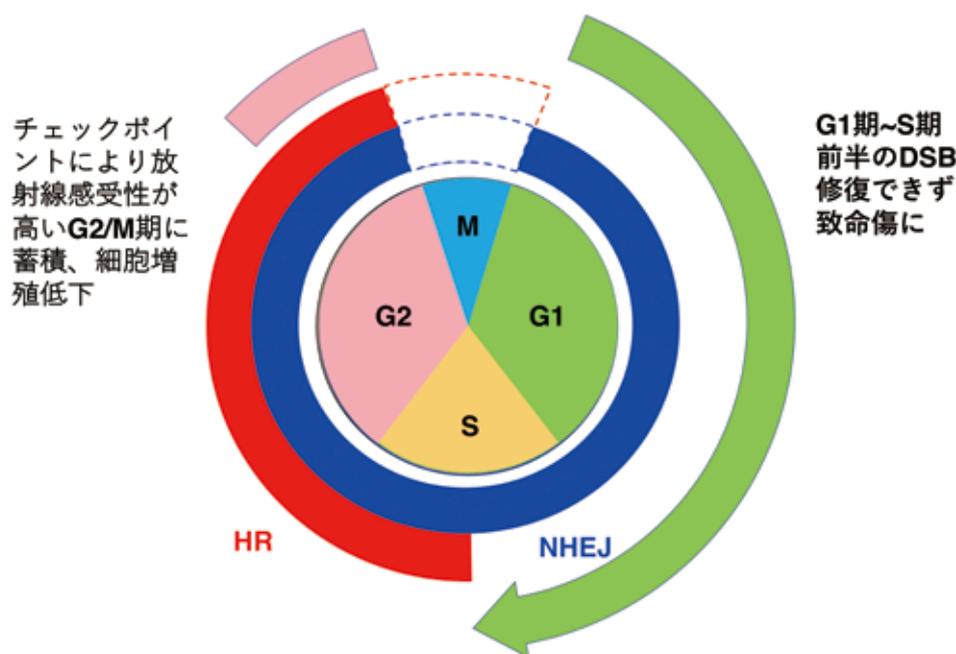


図2 DNA二重鎖切断修復機構と細胞周期から見たKu欠損細胞に対する低線量率放射線の影響

か機能しないため、Ku欠損細胞にとってG1期でのDNA損傷は致命傷になりやすいと考えられます。また、今回のLDR照射の線量率では照射時間が細胞周期と同等かそれより長くなるため、照射開始時にどの時期にあった細胞も必ずG1期を通過すると考えられます。Krederらの研究では照射時間が最大10時間程度で、細胞周期と同等かそれより短くなるため、今回の研究ではこの影響がより顕著に現れたことが考えられます。②の細胞増殖と③の細胞周期分布の変化については、細胞周期解析の結果から、Ku欠損細胞はG2/Mチェックポイントの働きにより、放射線感受性が高いG2/M期に蓄積するとともに、細胞増殖が抑えられていると考えられました。なお、上記のMitchellの研究では、HeLa細胞の場合0.37 Gy/h以上でG2/M期での細胞周期停止が起こることを示しています<sup>(2)</sup>。Ku欠損細胞はDSB修復能が低いため、より低い線量率でG2/M期への蓄積が起こったと考えられます。

LDRでも線量率に数桁の幅があり、DNA修復、細胞増殖、細胞周期に与える影響が大きく異なると考えられますので、今後、線量率を変えて実験してみたいと考えております。また、同じNHEJに関連する遺伝子でも、Ku欠損細胞では線量率効果が消失あるいは逆転する一方、DNA-PKcs欠損細胞では線量率効果が正常に見られるのも興味深い点です。これについては、NHEJにおけるDNA-PKcsの機能がKuより部分的であることなどが考えられます。今後、他のNHEJ欠損細胞やHR欠損細胞、さらには多重遺伝子欠損細胞を用いた検討を行うことで、線量率効果のメカニズムをより明らかにしたいと思っております。

## おわりに

今回の研究で、わたしたちは、コロニー形成能を指標とした線量率効果がKu欠損細胞では消失、さらには逆転させることを示しました。この結果は、線量率効果へのKuの関与を示すとともに、がん放射線治療への応用可能性も考えられます。たとえば、低線量率放射線源を用いた密封小線源治療において、Kuの発現をsiRNAやshRNAを用いたRNA干渉で抑制したり、昨年報告されたKu-DNA結合阻害剤<sup>(5)</sup>などで阻害したりすることにより、治療効果を向上させられる可能性が考えられます。このような可能性についても、今後検討したいと考えております。

## 謝辞

この研究はセンターの低線量率長期照射設備があっただけでできたものであり、また、実施にあたってセンターからさまざまなご支援を頂きました。わたしたちの研究紹介を通じて共同利用・共同研究拠点としてのセンターの学術的重要性をお伝えできれば幸いです。本研究の開始以来、現在国際医療福祉大学の小林純也先生に所内連絡者として、ご指導、ご協力頂きました。小林先生が異動されてからは、センター長の原田浩先生

のご高配、研究室の方々のご好意により、新型コロナウイルスによる難しい状況の中、論文発表にこぎ着けることができました。京都大学大学院理学研究科の孟慶梅さんには低線量率長期照射設備の利用に当たって大変お世話になりました。東工大での実験では、研究室のメンバー、特に島田幹男先生、塚田海馬さん、コバルト照射施設の依田功さんにご指導、ご協力頂きました。また、この研究は一部、日本学術振興会科学研究費補助金(15H02817、20H04334)、環境省放射線の健康影響に係る研究調査事業の支援を頂きました。ここに心より御礼申し上げます。

## ● 引用文献

1. Tsuchiya H, et al. Diminished or inversed dose-rate effect on clonogenic ability in Ku-deficient rodent cells. *J Radiat Res* 2021; 62: 198-205.
2. Mitchell JB, et al. Dose-rate effects in mammalian cells in culture: III. Comparison of cell killing and cell proliferation during continuous irradiation for six different cell lines. *Radiat Res* 1979; 79: 537-551.
3. Tomita M, et al. Role of DNA double strand break repair genes in cell proliferation under low dose-rate irradiation conditions. *J Radiat Res* 2008; 49: 557-564.
4. Kreder NC, et al. Cellular response to pulsed low-dose rate irradiation in X-ray sensitive hamster mutant cell lines. *J Radiat Res* 2004; 45: 385-391.
5. Gavande NS, et al. Discovery and development of novel DNA-PK inhibitors by targeting the unique Ku-DNA interaction. *Nucleic Acids Res* 2020; 48: 11536-11550.



土屋 尚代

東京工業大学環境・社会理工学院  
融合理工学系原子核工学コース  
博士課程大学院生



松本 義久

東京工業大学科学技術創成研究院  
ゼロカーボンエネルギー研究所  
准教授

## ミニレビュー 2

## DNA修復タンパク質XRCC4によるスクランブラーゼ制御

## はじめに

細胞膜を構成するリン脂質は非対称性を有しており、ホスファチジルセリン (PS) は細胞膜の内側に存在している。しかしながら、様々な生理的条件下においてこの非対称性は崩壊する。例えば、アポトーシス時に細胞表面に露出したPSは、マクロファージ等の貪食細胞に認識・貪食されるための“Eat-me”シグナルとして機能する (Beverly and Williamson, 2016; Nagata, 2018)。この過程には、リン脂質を区別なく双方向に輸送するスクランブラーゼが関わりとされていたが、その分子の実体は長らく不明であった。我々はスクランブラーゼを同定することを目的として研究を進め、カルシウム依存的スクランブラーゼTMEM16F (Suzuki et al., 2010)、カスパーゼ依存的スクランブラーゼXkr8 (Suzuki et al., 2013a) を同定し、そのファミリーメンバーにもスクランブラーゼがあることを示してきた (Suzuki et al., 2013b; Suzuki et al., 2014; Gyobu et al., 2016; Gyobu et al., 2017)。また、Xkr8には細胞膜に局在するためのサブユニットBasiginが必要なことも示している (Suzuki et al., 2016)。Xkrファミリーが活性化するためには、C末端の細胞内領域がカスパーゼにより切断される必要があるが、神経細胞に特異的に発現するXkr4のC末端が欠損させたもの (Xkr4 $\Delta$ C) を細胞に発現させても活性は示さなかった。この結果より、Xkr4の活性化には未知の活性化因子が必要であることが示唆されたが、その分子の実体は不明であった。

## 1. Xkr4活性化細胞の樹立

Xkr4 $\Delta$ Cを活性化するためにはアポトーシス刺激を必要とする。細胞死に関わる分子の同定に関しては、遺伝学的スクリーニングの後、増殖してくる細胞を解析すればよい。しかし、細胞死に必須でないリン脂質スクランブルに関わる分子を同定する場合、それらの欠損下でも細胞は死に至るため分子同定は困難である。そこで、Xkr4が生き残った細胞で恒常的に活性化した変異細胞を樹立し、その細胞で起こっている変化を解析しようと考えた。活性化因子に変異が入ることを期待したのである。Xkr4 $\Delta$ C発現細胞と蛍光標識したホスファチジルコリン (NBD-PC) を反応させ、自発的なスクランブル活性により細胞内に取り込んだ細胞 (1%以下) をFACSによりソーティングした。細胞を増殖させた後、再びNBD-PCを取り込ませると前回と変わらない。しかし、ソーティングを繰り返すことで恒常的に活性化した細胞を濃縮できると信じて解析を進めたところ、6回のソーティングの後に、生き残った細胞において恒常的にリン脂質スクランブル活性を示す細胞 (PC6) が樹立できた。Xkr4をノックアウトさせるとスクランブル活性が消失したこ

とより、この活性にはXkr4が必要であることが確認できた。

## 2. cDNAライブラリースクリーニング

PC6細胞には何らかの遺伝子に変異が入っている可能性が考えられた。そこで、PC6細胞よりcDNAライブラリー (2000万クローン) を作製し、レトロウイルスベクターに組み込んだ。それを用いてレトロウイルスを作製しXkd4 $\Delta$ C発現細胞に感染させ発現クローニングを行ったところ、3回のソーティングの後、何も刺激をしなくてもリン脂質スクランブル活性を示す細胞が取得できた。その細胞よりゲノムDNAを作製し、組み込まれたcDNAをPCRにより増幅したところ、複数のバンドが検出された。そこで、それらのPCR産物を再度ウイルスベクターに組み込み発現クローニングを行ったところ、1回のソーティングでスクランブル活性を示す細胞が取得できた。組み込まれたcDNAを増幅したところ単一バンドで同定され、シーケンスにより解析したところ、期待に反してXkr4 $\Delta$ Cそのものであることが分かった。調べると、クローニングされたXkr4 $\Delta$ Cには変異が挿入されており、I322S, L331F, Q332Eの3種類の独立した変異が同定されたことが分かった。それらを細胞に発現させると、アポトーシス刺激が無くともリン脂質スクランブル活性が誘導されたことから恒常的活性化型であることが分かった。Blue-Native PAGEで解析したところ、Xkr4 $\Delta$ Cはダイマーを形成しており、Xkr4 $\Delta$ C恒常活性化変異体もダイマーであることが分かった。以上より、Xkr4 $\Delta$ C恒常活性化変異体はダイマーを形成した後、構造的変化により活性化していると考えられた。ではアポトーシス刺激時にXkr4 $\Delta$ Cに構造変化を起こさせる活性化因子は何なのだろうか？

## 3. リバイバルスクリーニング

前述のアプローチでは、Xkr4に変異が挿入された細胞が優先的に濃縮されてくるため、Xkr4の活性化因子を同定するためには死にゆく細胞を用いるしかないと考えた。そこでCRISPR sgRNAライブラリー (Sanjana et al., 2014) を用いたスクリーニング法を樹立することにした。まず、Xkrファミリーを欠損したPLB細胞にCRISPR/Cas9を発現させ、アポトーシス時に機能するDNaseであるCADをノックアウトした。この細胞にレンチウイルスを用いてsgRNAライブラリーを導入後、スタウロスポリンによりアポトーシス刺激を行い、スクランブル活性が消失した細胞をFACSによりソーティングした。次に、ソーティングにより集められた細胞よりゲノムDNAを調製し、組み込まれたsgRNA領域をPCRにより増幅、PCR産物をレンチウイルスベクターに組み込み、それよりレンチウ

ウイルスを作製し細胞に発現させスクリーニングを行った。一度使用したsgRNAを再度、スクリーニングに利用することからこの手法をリバイバルスクリーニングと名付けた(図1)。すると、ライブラリーの作製とソーティングを3回繰り返すことでスクランブル活性を失った細胞が濃縮されることが分かった。候補因子が濃縮されたライブラリー中に存在するsgRNAを次世代シーケンサーにより調べ、マッピングを行ったところ(京大iCeMS、Daniel Packwood博士との共同研究)、Cytochrome C, Apaf1といったアポトーシス時にCaspase3経路を活性化させるために重要な因子に加え、たくさんの遺伝子が濃縮されてきた。Xkr4活性化因子はアポトーシス刺激で活性化されるため、Caspase3の下流に位置するはずである。そこで、濃縮のかかったライブラリーの中からXkr4の活性化因子を同定するために、ライブラリーを再度細胞に発現させ、スクランブル活性を消失した細胞をFACSにより集めた。次に、ソーティングされた細胞をホルマリンで固定、界面活性剤で膜の透過処理をした後、活性化型Caspase3を認識する抗体と反応させた。この抗体によって認識された細胞をFACSによりソーティングし、ゲノムDNAを調製後、組み込まれたsgRNAを次世代シーケンサーにより解析したところ、XRCC4が最上位で同定された。実際に、「Caspase3が活性化しているがスクランブル活性は喪失している」という条件でソーティングした時に、濃縮されたのはXRCC4だけであった。

#### 4. XRCC4

XRCC4はDNA修復に関わる核内タンパク質である(Grawunder et al., 1997)。XRCC4を欠損させた時のCaspase3の活性化に変化がないことよりCaspase3の下流に位置することが示された。一方で、Xkr4によるスクランブル活性に関してはXRCC4の欠損により完全に抑制された。次に、

XRCC4がCaspase3の下流に位置するならCaspase3によって切断されるのではないかと考え配列を調べるとCaspase3切断サイトを有していた。実際に文献でも切断されることが示されていた(Matsumoto et al., 2000)。そこで、XRCC4欠損細胞に野生型のXRCC4に戻すと活性が回復したが、Caspase切断変異体(2DA)においてはその効果は無かった。では、核内のXRCC4はどのように細胞膜のXkr4を活性化するのだろうか?調べると、Caspase3により切断後、DNAリガーゼ4と複合体を形成するN末側は核内に留まるが、驚くことに、天然変性領域から成るC末端側は細胞質内に放出されることが分かった。ではC末端だけでXkr4の活性化に十分なのだろうか?XRCC4のC末端のみを細胞に発現させたところアポトーシス刺激を加えてもその活性は非常に弱かった。XRCC4が切断されると通常、切断部位においてイソロイシンが露出するが、C末端のみを発現させる時にはイソロイシンの前にメチオニンを付加する必要がある。このメチオニンが活性を阻害しているのではないかと考えた。そこで、切断サイトよりN末側に10アミノ酸を付加したものを発現させアポトーシス刺激を加えるとXkr4が効率よく活性化された。このN末側の10アミノ酸が付加された状態でC末端を端から欠損させると、Caspase切断サイトよりC末側に20アミノ酸(全体で30アミノ酸)を含む領域が十分であることが分かった。そこで、この20アミノ酸をペプチド合成し、エレクトロポレーションにより細胞に導入すると、Xkr4の野生型ではなくXkr4 $\Delta$ Cを活性化させることができた。以上より、Caspase3によって切断されたXRCC4のC末端は、Xkr4のダイマーを活性化させると結論付けた。

#### 5. アポトーシス刺激

これまでの研究において、アポトーシス刺激にはキナーゼ

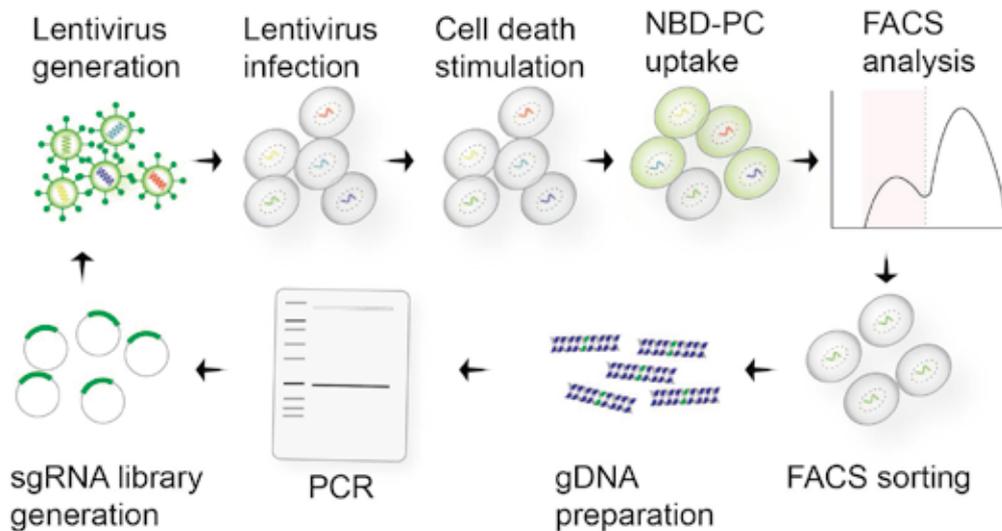


図1 リバイバルスクリーニング

阻害剤のスタウロスポリンを用いていた。しかしXRCC4は放射線によるDNAの二重鎖切断時に活性化されるタンパク質である。そこで、京大放射研の原田浩教授との共同研究により、放射線刺激時のXRCC4のXkr4活性化能を調べた。すると、XRCC4の野生型、2DA変異体共に放射線刺激後の生存にはほとんど差がなかった。一方で、リン脂質スクランブル活性に関しては、スタウロスポリン刺激時と同様、XRCC4の2DA変異体では活性を誘導できないことが確認された。これは、Fasリガンドにより外因性アポトーシスを誘導した時、2000 J/m<sup>2</sup>のUV刺激により内因性アポトーシスを誘導した時にも同様の結果であった。以上より、アポトーシス刺激の種類によらず、Caspaseによって切断されたXRCC4はXkr4を活性化すると結論付けた。

## 6. タンパク質結合スクリーニング

それでは、XRCC4のC末側の断片はどのようにXkr4を活性化するのであるか？研究を進めると、C末側20アミノ酸中の核内移行シグナルに存在する最初のア르기ニン (R270) に変異を導入すると、Xkr4を活性化できないことが分かった。そこで、XRCC4の野生型、R270Aを発現する細胞においてXkr4に結合するタンパク質を調べた。アポトーシス刺激後、膜画分を調製し、SPOTタグを付加したXkr4をビーズにより沈降させ、結合してくるタンパク質を質量分析により解析した(徳島大、小迫英尊教授との共同研究)。すると、XRCC4の野生型を発現させた時のみ、Xkr4とXRCC4のC末端が相互作用

することが確認された。実際に、免疫沈降後ウエスタンブロッティングを行い、抗体を用いても、Xkr4とXRCC4の相互作用が確認できた。以上より、XRCC4のC末端は、Caspaseにより切断されることで細胞質に放出され、細胞膜スクランブラーゼXkr4に結合し活性化すると結論付けた(図2)(Maruoka et al., 2021)。

## 7. おわりに

本研究により、細胞膜スクランブラーゼXkr4は、自身のCaspaseによる切断によって形成されるダイマー化の後に、XRCC4の断片が結合することで活性化することが見出された。核内タンパク質の断片が細胞膜タンパク質を活性化することはこれまでの常識を覆すものであり、新しいコンセプトを提唱したと考える。Xkr4は神経細胞に特異的に発現するスクランブラーゼであり、今後ノックアウトマウスを用いてその生理的役割を調べる必要がある。また、神経細胞では、シナプスや細胞の老化した一部等の細胞内コンパートメントの貪食が知られておりその過程に関わるかは興味深い(Maruoka and Suzuki, 2021)。DNA修復に関わるタンパク質の多くがCaspaseによって切断されることが知られている。それらの作用は機能喪失であると考えられているが、切断後の断片が新たな役割をもつ可能性を今後検証する必要があるだろう。また本研究で樹立されたリバイバルスクリーニング法は、増殖が停止する細胞、または死にゆく細胞を用いた様々な研究において、活用されると考える。

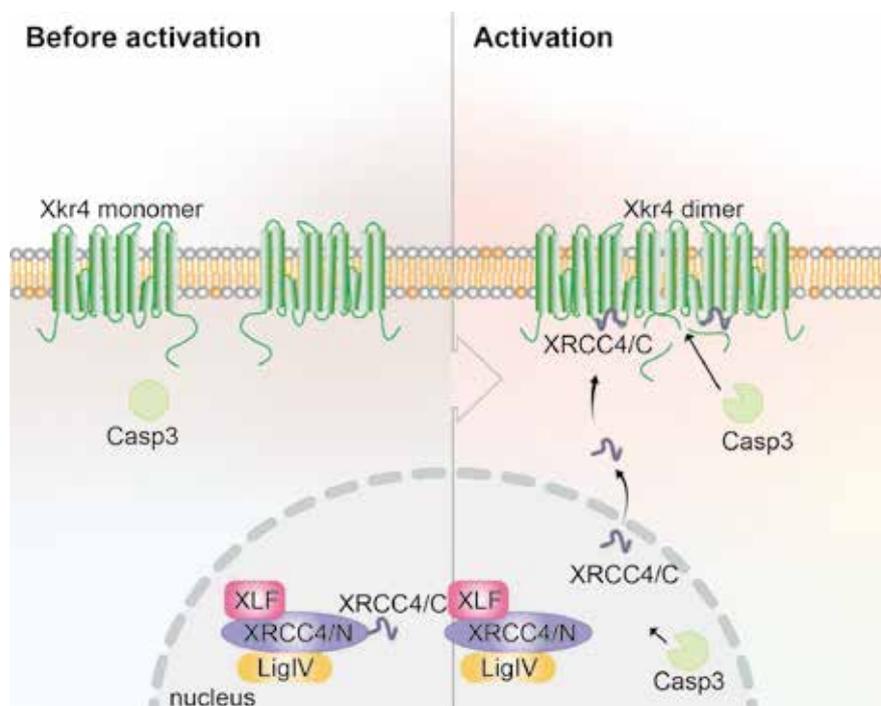


図2 Xkr4の活性化機構

## 8. 謝辞

本研究の一部の実験を行ったテクニシャンの森ひろみ、今西英一、また庶業務を行ってくれた秘書の藤本篤子に感謝すると共に、共同研究者のDaniel Packwood博士、原田浩博士、小迫英尊博士に感謝の意を表します。この研究は、AMED-PRIME、AMED-FORCE、文部科学省科研費 若手研究A、基盤

研究C、新学術領域研究(スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御)、徳島大学共同利用・共同研究拠点、京都大学共同利用・共同研究拠点、WPI-iCeMS、武田科学振興財団、小野医学研究財団などの支援を受けました。ここに感謝します。

### ● 引用文献

1. Bevers, E.M., and Williamson, P.L. (2016). Getting to the Outer Leaflet: Physiology of Phosphatidylserine Exposure at the Plasma Membrane. *Physiological reviews* 96, 605-645.
2. Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M., and Lieber, M.R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 388, 492-495.
3. Gyobu, S., Ishihara, K., Suzuki, J., Segawa, K., and Nagata, S. (2017). Characterization of the scrambling domain of the TMEM16 family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 6274-6279.
4. Gyobu, S., Miyata, H., Ikawa, M., Yamazaki, D., Takeshima, H., Suzuki, J., and Nagata, S. (2016). A Role of TMEM16E Carrying a Scrambling Domain in Sperm Motility. *Molecular and cellular biology* 36, 645-659.
5. Maruoka, M., and Suzuki, J. (2021). Regulation of phospholipid dynamics in brain. *Neuroscience research*.
6. Maruoka, M., Zhang, P., Mori, H., Imanishi, E., Packwood, D.M., Harada, H., Kosako, H., and Suzuki, J. (2021). Caspase cleavage releases a nuclear protein fragment that stimulates phospholipid scrambling at the plasma membrane. *Molecular cell* 81, 1397-1410.e1399.
7. Matsumoto, Y., Suzuki, N., Namba, N., Umeda, N., Ma, X.J., Morita, A., Tomita, M., Enomoto, A., Serizawa, S., Hirano, K., et al. (2000). Cleavage and phosphorylation of XRCC4 protein induced by X-irradiation. *FEBS letters* 478, 67-71.
8. Nagata, S. (2018). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual review of immunology* 36, 489-517.
9. Sanjana, N.E., Shalem, O., and Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature methods* 11, 783-784.
10. Suzuki, J., Denning, D.P., Imanishi, E., Horvitz, H.R., and Nagata, S. (2013a). Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science (New York, N.Y.)* 341, 403-406.
11. Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., and Nagata, S. (2013b). Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members. *The Journal of biological chemistry* 288, 13305-13316.
12. Suzuki, J., Imanishi, E., and Nagata, S. (2014). Exposure of phosphatidylserine by Xk-related protein family members during apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 289, 30257-30267.
13. Suzuki, J., Imanishi, E., and Nagata, S. (2016). Xkr8 phospholipid scrambling complex in apoptotic phosphatidylserine exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 9509-9514.
14. Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P.J., and Nagata, S. (2010). Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 468, 834-838.

左より

圓岡 真宏 (特定助教)<sup>1,3</sup>

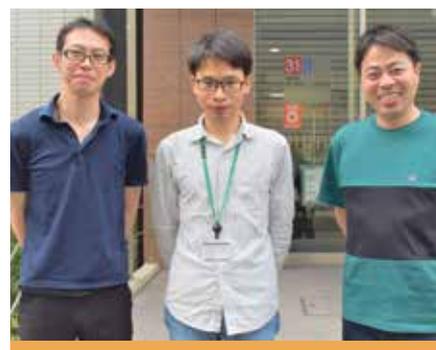
Panpan Zhang (大学院生)<sup>1,2</sup>

鈴木 淳 (PI)<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> 京都大学高等研究院 物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS)

<sup>2</sup> 京都大学大学院 生命科学研究科 細胞動態生化学

<sup>3</sup> 京都大学 オンサイトラボ 統合バイオシステムセンター @Academia Sinica



## 第36回放生研シンポジウムについて

令和3年度の第36回放生研シンポジウムは茨城県水戸市で開催される日本放射線影響学会第64回大会（茨城大学・田内 広 大会長）の2日目に、以下の様に開催いたします。

**日時** 令和3年9月23日（祝・木）

**場所** ザ・ヒロサワ・シティ会館 C会場（本館2階 県民ギャラリー）

**参加手続き** 日本放射線影響学会第64回大会への参加登録をお願いします

### プログラム

シンポジウム-I：9:10～10:40

ゲノム安定性を中心とした生命医学研究の最前線  
～分子機構から病態解明・治療戦略まで～

座長：高田穰（京大）、柴田淳史（群馬大）

演者：柴田淳史（群馬大）、中西真（東大）、谷口俊恭（東海大）、高田穰（京大）

シンポジウム-II：10:50～12:20

ユビキチン制御が彩る放射線応答

座長：松本智裕（京大）、勝木陽子（京大）

演者：西良太郎（東京工科大）、益谷央豪（名大）、太田智彦（聖マリアンナ医大）

留学促進ワークショップ：13:30～14:30

留学のすゝめ

座長：原田浩（京大）、南ジンミン（京大）

演者：香崎正宙（産業医大）、山内基弘（九大）、村井純子（慶應大）、勝木陽子（京大）、柴田淳史（群馬大）

お問い合わせ：ゲノム動態研究部門がん細胞生物学・池田

Tel: 075-753-7551 e-mail: lkeda.sachie.2m@kyoto-u.ac.jp

※JSPS研究拠点形成事業による支援の下で開催します。

第36回  
放生研シンポジウム  
2021年9月23日 Thu  
ザ・ヒロサワ・シティ会館（茨城県民文化センター）  
C会場（本館2F 県民ギャラリー）

Symposium 1 9:10～10:40  
ゲノム安定性を中心とした生命医学研究の最前線  
～分子機構から病態解明・治療戦略まで～  
座長：高田穰（京大）、柴田淳史（群馬大）  
登壇者：中西真（東大）、谷口俊恭（東海大）、高田穰（京大）、柴田淳史（群馬大）

Symposium 2 10:50～12:20  
ユビキチン制御が彩る放射線応答  
座長：松本智裕（京大）、勝木陽子（京大）  
登壇者：西良太郎（東京工科大）、益谷央豪（名大）、太田智彦（聖マリアンナ医大）

お問い合わせ先：京大ゲノム動態研究部門がん細胞生物学・池田  
TEL: 075-753-7551 E-mail: lkeda.sachie.2m@kyoto-u.ac.jp

留学促進  
ワークショップ  
留学のすゝめ  
2021 9.23 Thu  
時間：13:30-14:30  
会場：ザ・ヒロサワ・シティ会館 C会場  
（本館2F 県民ギャラリー）

座長：原田浩（京大）  
登壇者：香崎正宙（産業医大）、山内基弘（九大）、村井純子（慶應大）、勝木陽子（京大）、柴田淳史（群馬大）

「欧州留学での経験と意義」  
香崎正宙 産業医大  
「海外ラボで研究することの重要性」  
山内基弘 九州大  
「人生いろいろ、留学先もいろいろ、職種あり職場あり」  
村井純子 慶應義塾大  
「英国ポストドク体験記」  
勝木陽子 京大  
「留学のための準備～留学費はどのようにすればいいの？～」  
柴田淳史 群馬大

お問い合わせ先：京大ゲノム動態研究部門がん細胞生物学・池田  
TEL: 075-753-7551 E-mail: lkeda.sachie.2m@kyoto-u.ac.jp

## 本年度(2021年度)の第45回放射線生物研究連絡会議はオンラインで開催されます

一昨年度まで放射線影響学会会期中に開催されておりました放射線生物連絡会議ですが、本年度(2021年度)も昨年度同様、オンライン(Zoomにて)で開催をいたします。

日程は10月から11月にかけてのいずれかの日に、一時間ほどの時間をかけて執り行う予定です。

詳しい日程は決まり次第、日本放射線影響学会通信(メール配信)にて周知いたします。

何とぞよろしくお願い申し上げます。

(文責:放射線生物研究連絡会議、代表幹事:田代 聡、所内幹事:古谷寛治)

## 編集後記

放生研ニュース169号(2021年7月号)をお届けします。

東京オリンピックが開幕し、連日熱戦が繰り広げられています。とは言うものの、選手の活躍を平日の昼間にリアルタイムで応援するのは難しいですから、帰宅後にその日の競技をテレビで観戦して寝るに寝られない...、自国開催のメリットをなかなか活かせていない状況です。そんなオリンピックも残り数日で閉幕、早く寝不足から解放されたいと思いつつも、オリンピックロスを感じてしまいそうな、複雑な心境です。

今号では、放生研の共同利用・共同研究拠点事業の2つの成果をミニレビューとしてご紹介いただきました。読み応え十分の内容をお楽しみいただけましたでしょうか?加えて、9月23日に日本放射線影響学会(@水戸)の中で開催させて頂く第36回放生研シンポジウムに関してアナウンスさせて頂きました。本放生研ニュースの表紙イメージは、シンポジウムポスターデザインの一部です。放生研シンポジウムに奮ってご参加頂けましたら幸いです。

新型コロナウイルスに対する放生研の対応を、7月16日付けで見直しております。詳しくは放生研ホームページでご確認下さい。引き続き放生研の活動をご支援下さいますようお願い致します。

(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、南 ジンミン、小林 稔、池田 幸恵

お問い合わせ Tel: (075)753-7551 E-mail: 150hosei-jimu@mail2.adm.kyoto-u.ac.jp

