

# RBC 放生研ニュース NEWSLETTER

丹羽 太貴先生 スウェーデン王立科学アカデミー  
ゴールドメダル受賞記念シンポジウム



丹羽太貴先生・スウェーデン王立科学アカデミー・ゴールドメダル  
受賞記念シンポジウム参加者が丹羽先生を囲んで

## Contents

丹羽先生受賞記念シンポ印象記	2
第38回放生研国際シンポジウム・開催報告	2
Martin Niklas 博士セミナー印象記	4
ミニレビュー	4
NHEJタンパク質フォーカス可視化への新戦略： S/N比問題克服によるDSB修復機構解明の新展開	

トピックス	14
日本学術振興会・研究拠点形成事業 (JSPS Core-to-Coreプログラム) について	
放射線生物研究センター 各種委員会委員候補者の選挙結果	14
令和7年度放生研各種委員	15
編集後記	16

印象記1

## 丹羽先生受賞記念シンポ印象記

放生研の元教授である丹羽太真先生（京都大学名誉教授）が「スウェーデン王立科学アカデミー・ゴールドメダル」を受賞されたことを祝して、2024年12月6日、受賞記念シンポジウムが開催された。



受賞講演に先立ち、放生研のセミナー室において大学院生や若手研究者たちを対象に丹羽先生のこれまでの歩みや興味を持って取り組んでこられたこととお話いただいた。半世紀前の古典的な実験においても未解決の疑問があるといった話や、仮説と異なるデータを得たときに背後に潜む真実にどれだけ真剣に向き合えるかといった科学者としての姿勢について数々の金言を聞くことができた。また、若い世代が直面する様々な社会情勢や経済的状況に憂慮を示されたが、こういう時こそcuriosity-drivenな姿勢でサイエンスに向き合うことが大切であるというメッセージを送っていただいた。

受賞講演では芝蘭会館において丹羽先生にゆかりの先生方に丹羽先生との思い出をご紹介いただいた後、今回の受賞理由となった福島第一原子力発電所事故後の取り組みについて丹羽先生にご講演いただいた。

最初に笹谷めぐみ先生（広島大学准教授）には「丹羽先生からの贈り物」と題して丹羽先生の教え子代表として丹羽研究室での数々の思い出や懐かしい写真を披露していただくとともに、そこで紡いだご縁やつながりの大切さについてお話いただいた。次に藤堂剛先生（大阪大学名誉教授）は「丹羽先生と放射線生物学」の題で先生が若手研究者の頃から放生研の教授時代を経て、今に至るまでの丹羽先生とのつながりについてお話いただいた。また、丹羽先生を評するキーワードとして、Cutting-edge science

を展開される深い「知識」と「知恵」、根底に流れる「Fighter」としての気概を挙げ、原発事故後の対応は丹羽先生だからこそ成し得たことと賛辞を贈られた。最後に勝見五月先生（元福島県伊達市立富成小学校校長）は「3.11からの科学と対話」と題して、原発事故で被災した小学校の校長として子供たちのプールに入りたいという声に応えるために除染を行ったエピソードなど、現地で実際に復興までに行われた取り組みをお話されるとともに、丹羽先生が主導して立ち上げられた地域住民と世界中から来訪した専門家たちが車座になって対話する「ダイアログ」に対する深い感謝を述べられた。

そして丹羽先生の受賞講演で丹羽先生は、「福島の人こそがゴールドメダルを受賞するべきだ」とおっしゃられ、被災して日常が潰れ自由を失われた人々に対するサイエンスの無力さに直面したこと、チェルノブイリ事故後の回復を参考に住民との対話の重要性に着目し、地域住民も専門家も車座になって平等に意見や知識を出し合い対話する「ダイアログ」の実施に至ったことや、ダイアログを通じた福島の方々との交流が語られ、人々の主観である日常と客観のサイエンスが重なるためには信頼が何よりも大事であるということをお話いただいた。



丹羽太真先生と笹谷めぐみ先生

## 第38回放生研国際シンポジウム・開催報告

2024年9月27日～28日に北九州国際会議場で開催された日本放射線影響学会第67回大会にて、第38回放生研国際シンポジウム（オーガナイザー：松本智裕教授）を開催しました。The power of the latest technologies for radiation biologistsというテーマの下、全8名の演者をお招きして（1名は演題取り下げ）、ご講演頂きました（右ページの写真は放生研外からの演者6名）。



シンポジウムの趣旨説明を行う松本教授

2024年9月27日9:30-11:30

## Session 1 : The power of the latest technologies for radiation biologists-1 (最新テクノロジーによる放射線生物学の進展)

### Imaging/Biosensor/Reconstruction

**Chair** : Prof. Takaaki Yasuhara @RBC, GSB, Kyoto Univ., Japan

**Speakers** : Prof. Kazuhiro Aoki@Kyoto Univ., Japan

Dr. Martin Niklas@Heidelberg Univ., Germany

Dr. Josephine Galipon@Yamagata Univ., Japan

Dr. Marco Foiani@National Univ. of Singapore, Singapore (withdraw)



Prof. Kazuhiro Aoki



Dr. Martin Niklas



Dr. Josephine Galipon

2024年9月28日9:30-11:30

## Session 2 : The power of the latest technologies for radiation biologists-2 (最新テクノロジーによる放射線生物学の進展)

### Genome/Chromosome analysis

**Chair** : Prof. Hiroshi Harada@RBC, GSB, Kyoto Univ., Japan

**Speakers** : Dr. Arikuni Uchimura@RERF, Japan

Dr. Toshiaki Nakano@QST, Japan

### Biodosimetry/Machine-learning

**Chair** : Prof. Tomohiro Matsumoto@RBC, GSB, Kyoto Univ., Japan

**Speakers** : Dr. Tsuyoshi Ikura @RBC, GSB, Kyoto Univ., Japan

Dr. Igor Shuryak@Columbia Univ., USA



Dr. Arikuni Uchimura



Dr. Toshiaki Nakano



Dr. Igor Shuryak

## 印象記2

## Martin Niklas博士セミナー印象記

10月1日、放生研セミナー室にてドイツがん研究センター・ハイデルベルク大学病院のMartin Niklas博士にBiosensor for deconvolution of individual cell fate in response to ion beam irradiationという題で講演していただいた。博士はイオンビームを用いたがん治療において腫瘍に付与されたエネルギー量とそれに対する腫瘍の応答の関係を調べるためのデバイスを開発している。本講演では、蛍光飛跡検出器 (FNTD) を取り付けたディッシュと、DNA damageや細胞周期停止に関わる遺伝子のレポーター、超解像度顕微鏡システムを組み合わせた実験系 Cell-Fit-HD<sup>4D</sup>を紹介していただいた。イオンビーム照射後、FNTD上のイオンビーム照射部位の座標と細胞の位置を対応させることで個々の細胞のどの部位にどのくらいのエネルギーが与えられたかが算出でき、またDNA損傷応答因子である53BP1タンパク質を

可視化することで個々の細胞に生じたDNA損傷とその修復過程をタイムラプスで観察できる仕様だった。個々の細胞に付与されたエネルギー量とイオンビーム照射直後のDNA損傷の数の間には正の相関が見られたが、4日後以降の細胞の増殖能力との間には明確な相関関係は見られなかった。この結果は細胞応答の確率的な側面を反映していると思われ大変興味深い。一方でがんの治療という側面においては付与されたエネルギーの「量」以外のパラメータに注目することで応答を予測することも大変重要と考えられ、今後の解析の進展が期待される。また、発表後、会場からイオンビーム照射部位とDNAダメージ部位のずれなどについて質問があり、照射後からDNAダメージfoci検出までの細胞の動きによるものだと考えている旨の回答など、活発な質疑応答も行われた。

(文責 高堂将広・小林稔)

## ミニレビュー

NHEJタンパク質フォーカス可視化への新戦略：  
S/N比問題克服によるDSB修復機構解明の新展開

国立がん研究センター 研究所 RI 実験施設<sup>1</sup>

柳原 晃弘<sup>1\*</sup>、石合 正道<sup>1</sup>

A Novel Strategy for Visualizing NHEJ Protein Foci: Overcoming the S/N Ratio Problem to Advance Our Understanding of DSB Repair Mechanisms.

<sup>1</sup>Central Radioisotope Division, Research Institute, National Cancer Center Japan

Akihiro Yanagihara<sup>1\*</sup>, Masamichi Ishiai<sup>1</sup>

DNA二重鎖切断 (DSB) の修復は、主に非相同末端再結合 (NHEJ) と相同組換え (HR) の二経路で進行する。HR関連タンパク質は容易にフォーカスとして観察され、その動態解析によって修復機構の理解が大きく前進してきた。しかし、NHEJ関連タンパク質のフォーカス可視化は長らく困難とされ、これがNHEJ経路解明、ひいてはDSB修復全体像解明の大きな障壁となっていた。また、その原因や課題についても、十分な共通理解は得られていなかった。

本総説では、この課題を整理し、それを突破するために開発した革新的なイメージング戦略を概説する。筆者らは、NHEJフォーカス不可視化の本質的理由を、「限られた局所領域にごく少量のNHEJ因子しか集積しないことに起因するシグナル対ノイズ比 (S/N比) の極端な低さ」と見定めた。このS/N比問題に特化し、その克服を目指して独自のシグナル増幅手法 (分岐型タンデムスプリットGFP) を新たに開発・適用した結果、NHEJタンパク質フォーカスのライブセル観察をついに実現した。本成果は、NHEJ経路がDSB部位でいかに機能し、HRと競合・協調するかを初めて時空間的に解明するための扉を開くものである。

キーワード : DNA二重鎖切断修復、NHEJ、フォーカス、イメージング

DNA double-strand break (DSB) repair primarily proceeds through two major pathways: non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR). While HR-related proteins readily form visible foci, enabling significant progress in elucidating repair mechanisms through dynamic analyses, visualizing NHEJ protein foci has remained a longstanding challenge. This difficulty has posed a substantial barrier not only to understanding NHEJ itself but also to comprehending the full spectrum of DSB repair pathways. Moreover, there was insufficient shared understanding of the causes and problems.

In this review, we clarify the nature of this issue and introduce our newly developed, innovative imaging strategy to overcome it. We have identified the core problem as the extremely low signal-to-noise (S/N) ratio resulting from the minimal accumulation of NHEJ factors within a very limited local region. Focusing on this S/N ratio problem, we developed and applied a unique signal amplification method, the branched tandem split-GFP system, to finally achieve live-cell visualization of NHEJ protein foci. Our achievement opens the door to spatiotemporal analyses of how NHEJ operates at DSB sites and how it competes or cooperates with HR, ultimately paving the way for a deeper understanding of DSB repair mechanisms.

Key words: DNA double-strand break repair, NHEJ, foci, imaging

## 1. はじめに

イメージング技術は生命現象を可視化し、空間・時間的な情報を得る強力なツールとして重要な役割を担ってきた(1, 2)。DNA二重鎖切断(DSB)の修復研究においても、損傷応答因子の動態観察はDSB修復機構解明の要となっている(3, 4)。放射線照射によるDSB発生時には、修復因子や制御因子が切断部位に集積し、蛍光標識や蛍光免疫染色によってドット状(フォーカス状)のシグナルとして観察される(図1)。これらはIRIF (Ionizing Radiation-Induced Foci)あるいは「フォーカス」と呼ばれる(4)。フォーカスの観察は免疫染色によるものが一般的だが、蛍光タンパク質を目的タンパク質に融合させることで、ライブセルで観察することも可能である。DSBは、主に非相同末端再結合(NHEJ)と相同組換え(HR)の二つの修復経路によって修復される。このうち、HRで中心的な役割を果たすタンパク質ではフォーカスが容易に観察され、DSB応答経路やシグナル伝達網を理解する上で大きな役割を果たしてきた。一方、NHEJ関連タンパク質のフォーカス可視化は長年実現困難な壁であり、この壁はNHEJ経路の詳細や修復制御機構の深い理解を阻んできた。筆者らは、NHEJ因子がなぜフォーカスとして観察しにくいのかという問題の本質を明確にし、この障壁を突破する新たなイメージング手法を開発した。我々が確立したシステムにより、ライブセルでNHEJフォーカスが明瞭に捉えられるようになり、これにより、NHEJ経路がDSB領域でどのように振る舞い、HRとのせめぎ合いが如何に生じるのか、その理解が新たな段階へと押し上げられるだろう。本総説では、従来の問題点とその克服方法、ならびに新技術の基盤について概説し、最後に今後の展望を述べる。

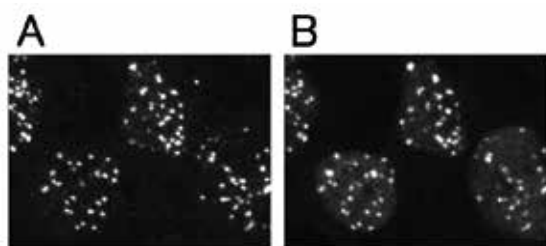


図1. 放射線によってできる代表的なフォーカス

A. ヒトU2OS細胞における $\gamma$ H2AXフォーカス。一つ一つのドットが一つのDSBに一致すると考えられている。B. ヒトU2OS細胞における53BP1フォーカス。 $\gamma$ H2AXフォーカスとよく一致する。

## 2. DSB修復研究におけるフォーカス利用の概要

まず、DSB修復研究でフォーカス観察がどのように利用され、何が明らかになってきたかをまとめ、その後NHEJタンパク質に特有の問題点を整理する。

### 2-1. DSBマーカーとしてのフォーカス

DSBの修復や損傷応答に関わる因子は数多く存在するが、すべてがフォーカスを観察できるわけではない。その中で最もよく利用されているのは、DSBの指標として知られる $\gamma$ H2AX(ヒストンH2AXのセリン139番目リン酸化体)である(5, 6)(図1A)。 $\gamma$ H2AXフォーカスの数はDSBの数と極めて良く相関するため(7, 8)、DSBマーカーとして広く活用されている(9, 10)。同様に、53BP1フォーカスもDSBマーカーとしてしばしば利用される(11)(図1B)。 $\gamma$ H2AXフォーカスが免疫染色でのみ観察可能なのに対し、53BP1フォーカスはライブセルでの観察も可能である(12)。

### 2-2. DSBシグナル伝達経路解析へのフォーカス活用

フォーカス形成の有無やその変動は、遺伝子変異やノックダウン、スクリーニング手法と組み合わせることで、DSB応答因子の相互関係やシグナル伝達カスケードの解明に役立てられてきた。 $\gamma$ H2AXや53BP1フォーカス解析は、DSB誘導性のリン酸化・ユビキチン化を介したシグナルネットワーク、53BP1-Rif1とBRCA1-CtIP間の拮抗による修復経路制御機構、さらに53BP1-Shieldinによる修復進行メカニズムなど、DSB応答を詳細に明らかにする上で重要なツールとなってきた(13-15)。

### 2-3. HRタンパク質のフォーカス形成とその利用

HRは、MRE11-RAD50-NBS1(MRN)複合体とCtIPによってDSB末端付近にニックが導入されることから始まり、このニックを起点としてDNA消化が行われ、DSB末端の両側数kbに渡って3'突出した長い一本鎖DNA領域が形成される(図2)。この一本鎖DNA領域はRPAが結合することで保護され、その後BRCA1-PALB2-BRCA2複合体の機能によりRAD51フィラメントへと置換される。RAD51フィラメントは、修復の鋳型となる姉妹染色分体中の相同配列を探索し、HR過程で最も重要な役割を果たす。その後RAD51はRAD54によって除去され、修復合成と

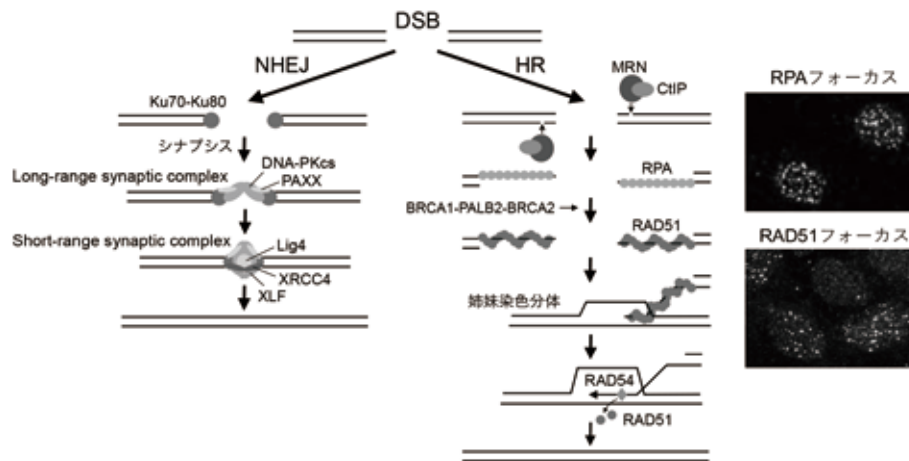


図2. DSB 修復経路のモデル図

DSB 修復の主要経路であるNHEJとHRのモデル図を示す。NHEJではまず末端にKu70-Ku80が結合する。その後、DNA-PKcsが結合し、long rangeでのシナプシスが行われる。さらにXRCC4-Lig4、XLFが集積し、short rangeでのシナプシスが行われ、再結合反応が行われる。HRでは、まずMRN-CtIP複合体により末端近傍にニックが導入される。ここを起点としてDNAの消化が起こり、3' 突出一本鎖DNA領域が形成される。一本鎖領域はRPAが結合することで保護され、BRCA1-PALB2-BRCA2の働きによりRAD51に置換される。RAD51で覆われた一本鎖DNAは、姉妹染色体中の相同配列の検索を行う。RAD51はRAD54によって除去され、末端部分の合成を終えた後、再結合が行われる。RPAとRAD51のDSBへの集積は、いずれもフォーカスとして観察され、細胞内のHR進行の指標として頻繁に利用される。

末端結合が行われる (16)。これらHRに関与する主要なタンパク質は、いずれも放射線によりフォーカスとして観察することが可能であり (17-24)、BRCA2やRAD54はライブセルでの観察も可能である (25, 26)。これらのうち、RPAおよびRAD51のフォーカスは、HR進行を示す有用な指標として特に頻繁に用いられてきた (図2)。こうした指標は、HR機構のカスケードや、DSB修復経路選択制御の解明に大きく貢献してきた。

#### 2-4. NHEJタンパク質のフォーカス観察が抱える問題

NHEJ経路では、まずKu70-Ku80によってDSB末端が保護され、これを起点としてDNA-PKcs、XRCC4-Lig4、XLF、PAXXが集積し、末端同士の間接反応であるシナプシスや、末端再結合を行う (27-34) (図2)。しかし、HR因子が容易にフォーカスとして観察可能なのに対し、NHEJ因子は長年フォーカス観察が難しく (35)、このことがNHEJ経路解明を阻んできた。2013年にBrittonらが独自の免疫染色法でKuやXRCC4のフォーカス可視化に成功したものの (36)、その追従例はごく少数であり (36-40)、放射線誘発DSBで明瞭なNHEJフォーカスを獲得する汎用的手法は未確立である。

では、なぜNHEJタンパク質ではフォーカスが観察できないのだろうか。この問題を考える前に、まず、RAD51やRPAのようなHR関連タンパク質、ならびにDSBマーカーである $\gamma$ H2AXや53BP1がなぜフォーカスとして観察されるのかを整理してみたい。まず $\gamma$ H2AXについては、DSBから数メガbpにわたってH2AXがリン酸化されていると考えられ、その範囲に約2000分子のH2AXが存在すると見積もられている (5)。その全てがリン酸化されるわけではないが、一つのフォーカスにつき少なくとも数百分子の $\gamma$ H2AXが含まれているとされており (41)、実際

にChIP-qPCRやChIP-seq解析によって1-2 Mbに渡る広範な $\gamma$ H2AXの存在が確認されている (42-45)。同様に、53BP1もDSBから広範囲に集積しており (42)、これにより局所的なタンパク質密度が大幅に増加し、バックグラウンドとのコントラストが強まってフォーカスとして検出可能になるのだと推測される (図3)。HRでは、DSB末端近傍でおよそ3.5 kbにわたる長い一本鎖DNA (ssDNA) が形成されるが (46, 47)、RPAは約30塩基あたり一分子の割合で、RAD51は3塩基に一分子の割合でssDNAに結合するため (48)、3.5 kbではそれぞれ100分子以上と1000分子以上が集積することになり、同様に局所的な高密度状態が生まれ、フォーカスとして観察可能になると考えられる (図3)。実際、RAD51が2-4 kbの範囲に渡って集積していることがChIP-seqによって確認されており (42, 43)、RPAの集積範囲もssDNAの範囲と一致することが高解像度ゲノム解析によって示されている (47)。

一方NHEJタンパク質は、XRCC4とLig4のChIP-seq解析から、DSB両側の約500 bp程度の範囲にしか集積せず、RAD51よりもはるかに集積が限定的であることが示されており (42, 43)、そのため局所的なタンパク質密度がバックグラウンドを上回るほど高まらず、フォーカスとして識別できないと推測される。すなわち、NHEJフォーカス可視化困難の本質は、シグナル対ノイズ比 (S/N比) の問題にあるのだ、と我々は考えた。事実、レーザーマイクロ照射ではNHEJ因子の集積が観察可能だが (28, 49, 50)、これは高密度なDSB生成によって局所的な集積分子数が増え、S/N比が高まるからと考えられる。高密度にDSBを作らせればNHEJ因子の集積が観察できるという考えは、制限酵素I-SceIの200リピートの認識配列によって、人為的に局所に多数のDSBを導入することでKuの集積が観察できるという報告からも支持される

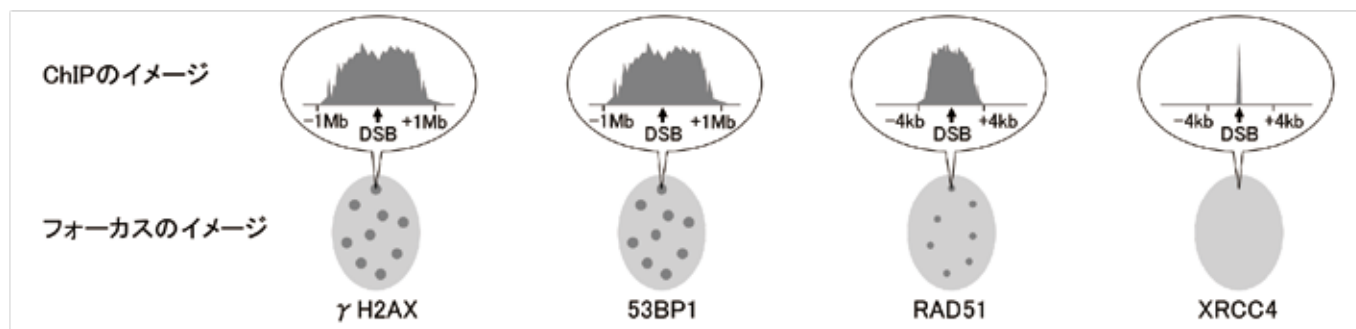


図3. DSBへのタンパク質集積量とフォーカスとの関係の概念図

ChIP-seqとフォーカスのイメージを示す。 $\gamma$ H2AXや53BP1はフォーカスとしてクリアに観察できるが(図下)、ChIP解析では、これらのタンパク質がDSB両側の広い範囲に渡って多量に集積していることが確認されている(図上)。RAD51は、 $\gamma$ H2AXや53BP1よりは狭い範囲ではあるものの、DSB両側の一定の範囲に渡って幅広く集積しており、そのためフォーカスとして観察できる。XRCC4はDSBのごく近傍にしか集積せず、集積量が少なすぎためフォーカスとしては可視化されない。

(51)。このように、NHEJタンパク質のフォーカス観察問題は、S/N比をどのように向上させるかという課題に集約されると考えられる。その一方で、レーザーマイクロ照射実験では損傷環境が放射線とは異なっており、再現性や汎用性には限界があるため(52, 53)、放射線誘発DSBの実験系でS/N比を向上させる方策はやはり必要である。

### 3. NHEJタンパク質フォーカス観察の実現に向けた戦略

#### 3-1. S/N比改善への基本的アプローチ

S/N比を向上させるには、シグナル(S)を上げるか、ノイズ(N)を下げる必要がある。フォーカス可視化の原理は、DSB近傍への多数の分子の集積により、集積シグナル(S)がバックグラウンド(N)を凌駕する点にある。理論的には、NHEJ因子をDSB付近へ大量に集積させればフォーカスとして可視化できるはずだが、そのような操作は難しい。一方、バックグラウンドを低減する手法は比較的实现しやすい。免疫染色では、細胞膜や核膜に穴を開けるpre-extraction法を用いて、過剰な目的タンパク質を洗い流し、バックグラウンドを下げるのがよく行われる。実際、BrittonらはKuフォーカスの観察に際してpre-extraction法を用い、さらにRNase処理を組み合わせることでバックグラウンドを一層低減し、NHEJタンパク質のフォーカス観察に成功したと報告している(36)。

ライブ観察での方策としては、バックグラウンド光を除去できれば理想的だが、これは技術的に非常に

困難である。より現実的な戦略として、タンパク質の発現量を細かく調整し、発現量と集積量のバランスをとることでS/N比を改善する方法が考えられる。例えば、GFP-NBS1やGFP-MRE11などフォーカス観察が可能な系では、過剰発現した細胞においてフォーカスが観察されないことがある。これは、発現量が過剰になることでバックグラウンドと集積シグナルのアンバランスが生じるためと考えられ、すなわち、バックグラウンドと集積シグナルの適切な比率が重要であることを示唆する。具体的には、発現量の増加により全体的なシグナルが強くなる一方で、DSB部位に集積するタンパク質量が飽和状態に達する。その結果、バックグラウンドシグナルが相対的に高くなり、集積自体が起きていてもフォーカスとして識別できなくなる。このように、発現量と集積量のバランスは、フォーカス観察において重要な要素であり、観察の基礎となるファクターである。特にNHEJ因子の場合、DSB部位への集積

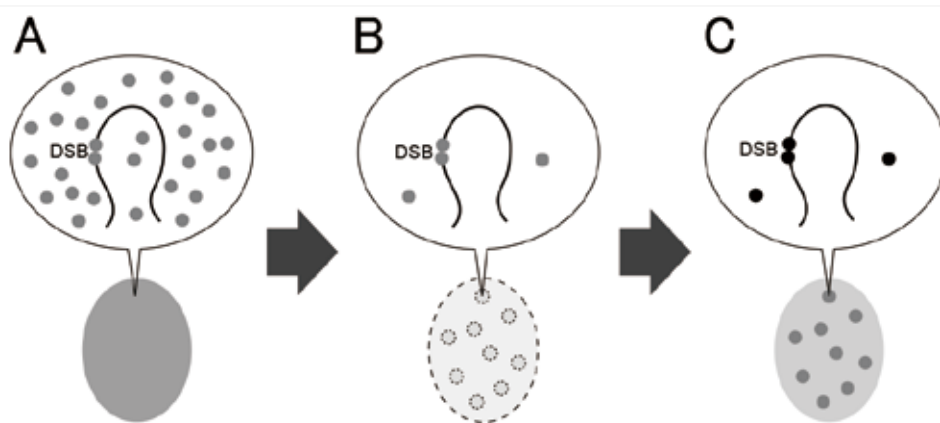


図4. NHEJタンパク質フォーカス可視化のためのS/N比の向上戦略

A. 現状では、バックグラウンドシグナルにフォーカスシグナルが埋もれ、フォーカスを可視化できない。S/N比の向上が必要。B. 発現量を減らすことでバックグラウンドシグナルが下がりS/N比が向上する。一方、暗すぎてシグナルが見えないという新たな問題が生じる。C. 一分子が持つ輝度を上げることで検出可能なレベルまでシグナルを増強し、フォーカスを可視化する。そのためには極めて明るい蛍光標識が必要。

量がもともと少ないため、相対的にバックグラウンドシグナルが高くなり、フォーカスとしての可視化が困難になっていると考えられる(図4A)。

このアンバランスを解消するには、タンパク質の発現量を減少させるのが効果的だと考えられる。これにより、フォーカスシグナルの相対的な比率が高まり、S/N比の改善が期待される(図4B)。しかし、DSB部位に集積する分子数自体が極めて少ない場合、発現量を下げすぎるとシグナルが弱くなりすぎ、結果として可視化が困難になる可能性がある。この問題は、一分子あたりの蛍光強度を大幅に増幅させることで解決できると考えられる(図4C)。したがって、NHEJ因子をフォーカスとして観察するためには、発現量の最適化に加え、一分子あたりの蛍光強度を大幅に増幅させる工夫が不可欠である。近年、より明るい蛍光タンパク質が開発されているものの(2, 54)、NHEJタンパク質のフォーカス可視化に必要な増幅度は未知数である。そこで、SunTagやタンデムスプリットGFPなど、GFP分子数を段階的に増幅可能なシステムが注目される(55, 56)。これらは微弱的な集積でも明瞭なシグナルが得られるシステムであり(57, 58)、NHEJ因子フォーカス可視化に有望なツールと考えた。

### 3-2. SunTagについて

SunTagは、標的タンパク質に短いペプチドの繰り返し配列を融合させた「ペプチドアレイ融合標的タンパク質」と、そのペプチドに特異的に結合する「抗体-GFP融合タンパク質」を同時に発現させることで、ペプチドの繰り返し数に比例してGFPを標的タンパク質に結合させることが可能なシグナル増幅システムである(55)(図5A)。しかし、「抗体-GFP融合タンパク質」はそれ単独で蛍光を発するため、過剰に存在するとバックグラウンドシグナルが上昇するという欠点がある。このため、両者の発現量を精密にコントロールする必要があり、技術的な難易度が高い。1リピートあたりの分子量は、ペプチド配列と抗体とGFPの合計でおよそ60kDaである。24個のペプチドの繰り返しで、平均24倍の輝度が得られると報告されており(55)、繰り返しを56個まで増やした例も報告されている(59)。SunTagはゲノム配列の可視化にも応用されている。ライゼセルにおけるゲノム配列の可視化は、CRISPR/Cas9をベースにして近年目覚ましい発展を見せており(60)、従来のdCas9-GFPをsgRNAによって標的ゲノムlocusに局在させる方法では、高リピート配列のゲノムlocusしか可視化できなかったが、GFPの代わりにSunTagを利用することで低リピートlocusの可視化が達成されている(57)。これはSunTagによるシグナル増幅の効果と考えられる。

標的タンパク質に標識を融合する際には、標識が生化学的機能に及ぼす影響に注意する必要がある。特にSunTagはそのサイズが大きいため、影響のリスクは重要な懸念事項となる。Tanenbaumら(55)は、SunTag融合型タンパク質をいくつかのモデルで検証している(例：運動性を要するキネシン、ミトコンドリア局在のMitoNEet、細胞骨格関連タンパク質Camsap2、

Histone H2B、dCas9など)。その結果、これらのモデルにおいては、タンパク質の活性や細胞内局在に明らかな影響は観察されなかった。しかしながら、タンパク質ごとにその構造や機能は異なるため、各タンパク質において個別に影響を検証することが不可欠である。

### 3-3. タンデムスプリットGFPについて

蛍光タンパク質を複数の断片に分割し、それらが再会合することで蛍光を発するように設計されたものは、split FP(分割蛍光タンパク質)と呼ばれる(61)。この分割蛍光タンパク質には、大きく二つのタイプが存在する。一つは、分割断片が自己再会合して蛍光を発するシステムであり、特に「split-FP」(本稿ではスプリットFPと呼ぶ)とハイフン付きで呼ばれ(62)、その先駆けとなったのがスプリットGFPである(63)。もう一つは、外的因子に依存して蛍光を発するシステムである。外的因子依存型の代表例として、タンパク質間相互作用の検出に利用される二分子蛍光補完法(BiFC: Bimolecular Fluorescence Complementation)が挙げられる(64)。BiFCも分割蛍光タンパク質を利用したシステムであるが、スプリットFPでは分割された蛍光タンパク質断片が自律的に再構成されて蛍光を発するのに対し、BiFCでは分割断片が、それぞれを融合させた標的タンパク質同士の相互作用によって近接し、再構成されて蛍光を発する。このため、両者は性質や利用用途が異なる。一般に、「split FP」は自己再会合型と外的因子依存型の両方を含む分割蛍光タンパク質全般を指し、「split-FP」は特に自己再会合型を指すことが多い。しかし、文献によってはこの区別が明確でない場合もあり、混乱を招きやすい。本稿では、「スプリットGFP」を自己再会合型分割GFPのみを指す用語として使用する。

GFPは11本の $\beta$ ストランドにより籠状の構造をしているが、スプリットGFPではこれを最初の10本の $\beta$ ストランド(GFP1-10)を含む断片と、最後の一本の $\beta$ ストランド(GFP11)の二つの断片に分ける。これらを同時に細胞で発現させると、細胞内で完全な籠状のGFPが再構成され、GFPが光る(図5B)。ここでは、GFP1-10とGFP11が細胞内で勝手に、自分自身で会合して光り始めることがポイントとなる。余計な操作や要素は不要であり、システムはシンプルである。

タンデムスプリットGFPは、スプリットGFP技術をベースにしたGFP連結技術である(56)。GFP11はわずか16アミノ酸とサイズが小さいため、これをタンデムに目的タンパク質に連結させることが容易である。タンデムスプリットGFPでは、「GFP11リピート融合目的タンパク質」と「GFP1-10」を同時に細胞で発現させることで、GFP11のリピート数と同数のGFPで目的タンパク質を標識できる(図5C)。SunTagと異なり、どちらの部品も単独では蛍光を発しないため、片方の部品だけによるバックグラウンドを考慮しなくて良い点が利点である。基本的な戦略として、「GFP1-10」の方を過剰発現させれば良いことになる。最大で7個までのデータではあるものの、GFP11の連結数と輝度が比例すると報告されている



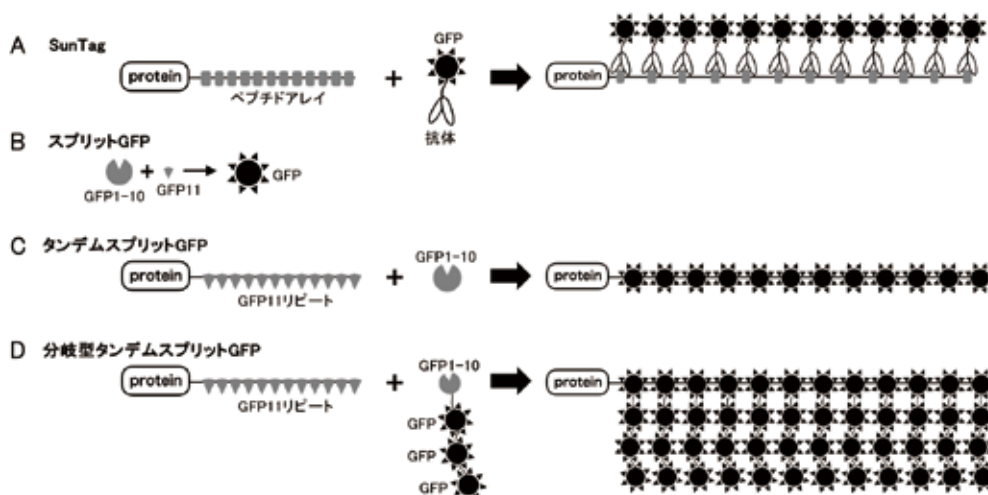


図5. 複数のGFPを標的タンパク質に連結させる方法

A. SunTagシステムの概要。標的タンパク質に短いペプチドのアレイを融合し、GFP-抗体複合体と同時に細胞内で発現させる。ペプチドに抗体が結合することで、標的タンパク質を多数のGFPで標識できる。B. スプリットGFPの概要。GFPを大きい断片(GFP1-10)と小さい断片(GFP11)に分割し、同時に細胞内で発現させる。細胞内で自己会合が起こりGFPとして蛍光を発する。C. タンデムスプリットGFPの概要。GFP11リピートを標的タンパク質に融合させ、GFP1-10と一緒に細胞で発現させる。細胞内でGFPが再構成され、標的タンパク質に多数のGFPが連結される。D. 分岐型タンデムスプリットGFPの概要。GFP1-10の代わりに、GFP1-10に複数のGFPを融合させたものを用いることで、GFPが分岐構造で連結され、標的タンパク質をさらに多数のGFPで標識できる。

(56)。また、GFP11を14個連結させた例ではS/N比の向上も示されており、SunTagと同様、低リピートlocusの可視化も達成されている(58)。1リピートあたりの分子量はおおよそ26kDaなので、SunTagに比べて総分子量を抑えることができる。

Kamiyamaらの報告(56)では、dCas9や繊毛内輸送に関わるIFT20の機能が、タンデムスプリットGFP標識によっても維持されていることが示されている。しかし、SunTag同様、最終的には各タンパク質ごとに機能検証を行う必要がある。

### 3-4. タンデムスプリットGFPの限界と更なる改良の必要性

タンデムスプリットGFPでは、短いGFP11をリピートでいくつも連結できることに利点があるが、それにも限界はある。16アミノ酸のGFP11に5アミノ酸のリンカーを繋ぎ、この21アミノ酸を1単位とした場合、DNAではこの1単位で63bp必要である。リピートを100個持たせると考えた場合は6.3kb、200個で12.6kb、300個で18.9kbとなる。標的タンパク質のcDNAも数kbになることがあることを考えると、プラスミド上でタンデムGFP11を連結させられるのは、100個から多くても数百個くらいが上限になりそうであり、これ以上のGFPを連結させようとした場合、他の手段が必要になる。免疫染色においては、リピートと分岐の組み合わせによってシグナルをさらに増幅させる方法が考案されており(65)、筆者らは、これをタンデムスプリットGFPにも適用できる可能性があると考えた。具体的には、GFP1-10に完全長の光るGFPを連結させる方法である(図5D)。この方法を、分岐型タンデムスプリットGFPと呼ぶことにする。この方法では、(GFP11のリピート数) × (GFP1-10に結合させたGFPの数+1)の数のGFPが標的タン

パク質に連結されることになる。例えば、GFP11リピートが100個で、GFP1-10にGFPを二つ繋いだ場合は、300個のGFPが連結される。これにより、理論上は数百個単位のGFPを標的タンパク質に結合させることが可能となる。ただし、莫大に増えたGFPがアグリーゲーションを起こさないか、標的タンパクや近接するタンパクの生化学的特性に影響を与えないかなど、別の問題は考慮しなければいけない。また、タンデムスプリットGFPの利点であった、片方の部品だけによるバックグランドシグナルがないという特徴が、GFP1-10に光るGFPを連結させることによって無くなってしまったため、SunTag同様に精密な発現コントロールの必要性が生じ、技術的な難易度は上がる。

## 4. NHEJタンパク質フォーカス可視化への挑戦

我々は、NHEJフォーカス不可視の本質が極度の低S/N比にあると判断し、これを克服すべく、SunTag、タンデムスプリットGFP、そして独自考案の分岐型タンデムスプリットGFPなど、シグナル増幅技術を活用した新戦略に挑んできた。2024年の日本放射線影響学会第68回大会で中間成果を報告したので、ここでその内容を簡単に紹介する。詳細なデータについては、現在準備中のオリジナル論文の発表をお待ちいただきたい。

まずSunTagに取り組んだが、フォーカスを見る以前の問題で、発光条件の最適化に難航したため、その有用性や潜在性について十分評価するまでに至らなかった。問題解決の見通しが立たなかったため、こちらの計画は断念し、スプリットGFP法に集中することにした。

タンデムスプリットGFP法では、14リピートまでの実例しかなく、

それ以上のリピートについては独自に検証が必要だった。また、分岐型タンデムスプリットGFPは我々が新たに考案した手法であり、先行例がないため自ら開発を進めることにした。そこで、数個から数百個規模までGFP標識数を変えた広範なシリーズを用意し、リンカー配列や長さ、パーツ配置など多面的な条件検討を行った。その結果、予想通り非常に明るい蛍光シグナルを得ることができた。

次に、この標識法がフォーカス観察に適しているかを簡易的に評価するため、GFP-NBS1を対照として比較実験を行った。U2OS細胞で放射線照射後の観察を行うと、GFP-NBS1同様、タンデムスプリットGFP-NBS1でも分岐型タンデムスプリットGFP-NBS1でも迅速にフォーカスが形成され、しかも単独GFPより数段明るく高コントラストであった。NBS1のN末端領域を欠失すると、いずれもフォーカス形成が消失したことから、これらの手法が標的タンパク質本来のフォーカス形成能を忠実に反映していることが強く示唆された。

こうしたNBS1を用いた初期検証を踏まえ、今度はKuなどのNHEJタンパク質にこれらの手法を適用した。数個程度のGFPではフォーカスを確認できなかったが、レーザーマイクロ照射での局所集積が観察されたため、標識自体がNHEJ因子のDSB集積能を阻害することはないと考えられた。タンデムスプリットGFPでのフォーカス可視化はできなかったが、我々独自の工夫で更なるシグナル増幅を施した分岐型タンデムスプリットGFPを適用することで、Kuを含む主要なNHEJタンパク質が放射線照射後に明瞭なフォーカスを形成することが確認された。これらは線量依存的に現れて $\gamma$ H2AXフォーカスとも共局在し、DSBに集積するフォーカス特有の性質をよく示していた。また、時間経過とともにフォーカスが消失していく様子も観察され、この新たな標識法で可視化されたフォーカス形成が可逆的な反応であることが示唆された。したがって、NHEJタンパク質がDSBに集積・離脱するダイナミックな挙動を、リアルタイムで解析することが可能になったと考えられる。

一方、本手法にはいくつかの技術的課題も残されている。現時点ではU2OS細胞での検証に限られているため、他の細胞種での利用可能性については、さらに検証を進める必要がある。また、フォーカス形成を示す細胞の割合には現状ばらつきがあり、安定性を高める余地が残されている。これらの課題は、導入効率や発現制御の最適化を行うことで解消できると期待される。加えて、標識のサイズが大きいことから、特定の標的タンパク質に対する生化学的特性への影響が懸念される場合もある。これらの課題を克服することが、本手法をより汎用的かつ強力な技術へと発展させる鍵となるだろう。

## 5. 今後の展望

筆者らの手法によって放射線誘発DSB上でNHEJ因子のフォーカス可視化が実現したことは、NHEJ経路研究を大きく前進させる成果である。一方で、この新技術をさらに洗練させ、生理的条

件に近い環境下での反応解析や、適用範囲の拡大を図る余地がまだ残されている。

まず、修復レポーター (66) や生存率評価といった定量的手法に加え、生化学アッセイによるタンパク質間相互作用や酵素活性などの機能的評価を組み合わせることで、標識が生化学的特性や修復活性を十分に維持しているかを見極めることが肝要である。これにより、NHEJフォーカス可視化法の利用範囲を適切に設定でき、研究精度が一段と高まる。また、標識サイズや発現制御の最適化により、より小型で細胞への負担が少ない標識系を実現できる可能性がある。Casilio (67)、CRISPR FISHer (68)、SIMBA (69)、CRISPR/Pepper-tDeg (70) など、近年急速に進歩している先端的な高S/N比イメージング技術では、バックグラウンド低減技術が進んでおり、これらの技術を取り入れることで、わずかなGFP分子数でも十分なシグナルを得ることが可能となり、より自然な細胞環境での観察が実現されるだろう。さらに、発現調節プラットフォーム (71) の活用や導入手法の工夫によって、フォーカス観察の安定性や再現性を向上させることも期待できる。これらの改良は、NHEJ因子にとどまらず、レーザーマイクロ照射で集積が示されながらフォーカスとして捉えにくかった多くの因子にも有効であり、DNA損傷応答に関わる分子群の相互作用や協働メカニズムを、これまで以上に的確な視点で掘り下げることを可能にする。具体的には、NHEJ経路がDSB部位でどのように機能するのか、またHRとどのように競合・協調するのか、さらにシグナル伝達や修復制御因子、クロマチンリモデリング因子、ヒストン修飾といった多岐にわたる分子ネットワークが、どのようにDSB修復に関与しているのかといった、より包括的なDSB修復機構の理解につながる可能性がある。

我々の取り組みがこの分野における新たな一歩となり、NHEJタンパク質フォーカス可視化技術の一層の発展と、DSB修復機構に対するさらなる理解の深化をもたらすことを心より期待したい。

## 謝辞

本総説で紹介した我々の研究は、JSPS科研費JP19K12325、JP22K12380、ならびに国立がん研究センター研究開発費2023-J-02の助成を受けたものである。放射線生物研究誌より許可を得て転載。

## ● 参考文献

1. Specht EA, Braselmann E, Palmer AE. A Critical and Comparative Review of Fluorescent Tools for Live-Cell Imaging. *Annu Rev Physiol* 2017; 79: 93-117.
2. Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, et al. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev* 2010; 90: 1103-63.
3. Heemskerck T, van de Kamp G, Essers J, et al. Multi-scale cellular imaging of DNA double strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 2023; 131: 103570.
4. Rothkamm K, Barnard S, Moquet J, et al. DNA damage foci: Meaning and significance. *Environ Mol Mutag* 2015; 56: 491-504.
5. Rogakou EP, Boon C, Redon C, et al. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 1999; 146: 905-16.
6. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998; 273: 5858-68.
7. Rothkamm K, Löbrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5057-62.
8. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, et al. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* 2002; 158: 486-92.
9. Löbrich M, Shibata A, Beucher A, et al. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 2010; 9: 662-9.
10. Kinner A, Wu W, Staudt C, et al. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 5678-94.
11. Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, et al. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 2000; 151: 1381-90.
12. Anderson L, Henderson C, Adachi Y. Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 1719-29.
13. Setiawati D, Durocher D. Shieldin – the protector of DNA ends. *EMBO reports* 2019; 20: 122-11.
14. Zimmermann M, Lange Td. 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends Cell Biol* 2014; 24: 108-17.
15. Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 7-18.
16. Ranjha L, Howard SM, Cejka P. Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma* 2018; 127: 1-28.
17. Golub EI, Gupta RC, Haaf T, et al. Interaction of human Rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 5388-93.
18. Scully R, Chen J, Ochs RL, et al. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 1997; 90: 425-35.
19. Maser RS, Monsen KJ, Nelms BE, et al. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6087-96.
20. Haaf T, Golub EI, Reddy G, et al. Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2298-302.
21. Carney JP, Maser RS, Olivares H, et al. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 1998; 93: 477-86.
22. Tan TL, Essers J, Citterio E, et al. Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. *Curr Biol* 1999; 9: 325-8.
23. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, et al. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell* 2006; 22: 719-29.
24. Chen L, Nievera CJ, Lee AY-L, et al. Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J Biol Chem* 2008; 283: 7713-20.
25. Reuter M, Zelensky A, Smal I, et al. BRCA2 diffuses as oligomeric clusters with RAD51 and changes mobility after DNA damage in live cells. *J Cell Biol* 2014; 207: 599-613.
26. Agarwal S, van Cappellen WA, Guenole A, et al. ATP-dependent and independent functions of Rad54 in genome maintenance. *J Cell Biol* 2011; 192: 735-50.
27. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 2001; 412: 607-14.
28. Ochi T, Blackford AN, Coates J, et al. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science* 2015; 347: 185-88.
29. Buck D, Malivert L, de Chasseval R, et al. Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* 2006; 124: 287-99.
30. Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP. XLF Interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining. *Cell* 2006; 124: 301-13.
31. Nick McElhinny SA, Snowden CM, McCarville J, et al. Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2996-3003.
32. Gottlieb TM, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 1993; 72: 131-42.
33. Graham TGW, Walter JC, Loparo JJ. Two-Stage Synapsis of DNA Ends during Non-homologous End Joining. *Mol Cell* 2016; 61: 850-58.

34. Stinson BM, Loparo JJ. Repair of DNA Double-Strand Breaks by the Nonhomologous End Joining Pathway. *Annu Rev Biochem* 2021; 90: 1-28.
35. Polo SE, Jackson SP. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev* 2011; 25: 409-33.
36. Britton S, Coates J, Jackson SP. A new method for high-resolution imaging of Ku foci to decipher mechanisms of DNA double-strand break repair. *J Cell Biol* 2013; 202: 579-95.
37. Bossaert M, Moreno AT, Peixoto A, et al. Identification of the main barriers to Ku accumulation in chromatin. *Cell Rep* 2024; 43: 114538.
38. Britton S, Chanut P, Delteil C, et al. ATM antagonizes NHEJ proteins assembly and DNA-ends synapsis at single-ended DNA double strand breaks. *Nucleic Acids Res* 2020; 48: 9710-23.
39. Chanut P, Britton S, Coates J, et al. Coordinated nuclease activities counteract Ku at single-ended DNA double-strand breaks. *Nature Communications* 2016; 7: 12889.
40. Reid DA, Keegan S, Leo-Macias A, et al. Organization and dynamics of the nonhomologous end-joining machinery during DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: E2575-84.
41. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, et al. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 957-67.
42. Clouaire T, Rocher V, Lashgari A, et al. Comprehensive Mapping of Histone Modifications at DNA Double-Strand Breaks Deciphers Repair Pathway Chromatin Signatures. *Mol Cell* 2018; 72: 1-43.
43. Aymard F, Bugler B, Schmidt CK, et al. Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nature Structural & Molecular Biology* 2014; 21: 366-74.
44. Iacovoni JS, Caron P, Lassadi I, et al. High-resolution profiling of  $\gamma$  H2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *The EMBO Journal* 2010; 29: 1-12.
45. Savic V, Yin B, Maas NL, et al. Formation of Dynamic  $\gamma$ -H2AX Domains along Broken DNA Strands Is Distinctly Regulated by ATM and MDC1 and Dependent upon H2AX Densities in Chromatin. *Mol Cell* 2009; 34: 298-310.
46. Zhou Y, Caron P, Legube G, et al. Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: e19.
47. Canela A, Sridharan S, Sciascia N, et al. DNA Breaks and End Resection Measured Genome-wide by End Sequencing. *Mol Cell* 2016: 1-30.
48. Bhat KP, Cortez D. RPA and RAD51: fork reversal, fork protection, and genome stability. *Nat Struct Mol Biol* 2018; 25: 446-53.
49. Yano K, Morotomi-Yano K, Wang SY, et al. Ku recruits XLF to DNA double-strand breaks. *EMBO Rep* 2008; 9: 91-6.
50. Mari PO, Florea BI, Persengiev SP, et al. Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 18597-602.
51. Lan L, Ui A, Nakajima S, et al. The ACF1 Complex Is Required for DNA Double-Strand Break Repair in Human Cells. *Mol Cell* 2010; 40: 976-87.
52. Kochan JA, Desclos ECB, Bosch R, et al. Meta-analysis of DNA double-strand break response kinetics. *Nucleic Acids Res* 2017: 1-18.
53. Kong X, Mohanty SK, Stephens J, et al. Comparative analysis of different laser systems to study cellular responses to DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: e68.
54. Nienhaus K, Nienhaus GU. Fluorescent proteins for live-cell imaging with super-resolution. *Chem Soc Rev* 2014; 43: 1088-106.
55. Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, et al. A Protein-Tagging System for Signal Amplification in Gene Expression and Fluorescence Imaging. *Cell* 2014; 159: 635-46.
56. Kamiyama D, Sekine S, Barsi-Rhyne B, et al. Versatile protein tagging in cells with split fluorescent protein. *Nature Communications* 2016; 7: 11046.
57. Ye H, Rong Z, Lin Y. Live cell imaging of genomic loci using dCas9-SunTag system and a bright fluorescent protein. *Protein & Cell* 2018; 8: 853-55.
58. Chen B, Zou W, Xu H, et al. Efficient labeling and imaging of protein-coding genes in living cells using CRISPR-Tag. *Nature Communications* 2018; 9: 5065.
59. Pichon X, Bastide A, Safieddine A, et al. Visualization of single endogenous polysomes reveals the dynamics of translation in live human cells. *The Journal of Cell Biology* 2016; 214: 769-81.
60. Thuma J, Chung YC, Tu LC. Advances and challenges in CRISPR-based real-time imaging of dynamic genome organization. *Front Mol Biosci* 2023; 10: 1173545.
61. Romei MG, Boxer SG. Split Green Fluorescent Proteins: Scope, Limitations, and Outlook. *Annu Rev Biophys* 2019; 48: 19-44.
62. Pedelacq J-D, Cabantous S. Development and Applications of Superfolder and Split Fluorescent Protein Detection Systems in Biology. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20: 3479-19.
63. Cabantous S, Terwilliger TC, Waldo GS. Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 2004; 23: 102-07.
64. Kudla J, Bock R. Lighting the Way to Protein-Protein Interactions: Recommendations on Best Practices for Bimolecular Fluorescence Complementation Analyses. *Plant Cell* 2016; 28: 1002-8.
65. Saka SK, Wang Y, Kishi JY, et al. Immuno-SABER enables highly multiplexed and amplified protein imaging in tissues. *Nat Biotechnol* 2019; 20: 1-42.
66. van de Kooij B, van Attikum H. Genomic Reporter Constructs to Monitor Pathway-Specific Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Front Genet* 2021; 12: 809832.

67. Clow PA, Du M, Jillette N, et al. CRISPR-mediated multiplexed live cell imaging of nonrepetitive genomic loci with one guide RNA per locus. *Nat Commun* 2022; 13: 1871.
68. Lyu XY, Deng Y, Huang XY, et al. CRISPR FISHer enables high-sensitivity imaging of nonrepetitive DNA in living cells through phase separation-mediated signal amplification. *Cell Res* 2022; 32: 969-81.
69. Peng Q, Huang Z, Sun K, et al. Engineering inducible biomolecular assemblies for genome imaging and manipulation in living cells. *Nat Commun* 2022; 13: 7933.
70. Chen M, Huang X, Shi Y, et al. CRISPR/Pepper-tDeg: A Live Imaging System Enables Non-Repetitive Genomic Locus Analysis with One Single-Guide RNA. *Adv Sci (Weinh)* 2024; 11: e2402534.
71. Duan M, Dev I, Lu A, et al. SEMPER: Stoichiometric expression of mRNA polycistrons by eukaryotic ribosomes for compact, ratio-tunable multi-gene expression. *Cell Syst* 2024; 15: 597-609 e4.

**柳原 晃弘**

国立がん研究センター 研究所  
RI実験施設



トピックス

## 日本学術振興会・研究拠点形成事業 (JSPS Core-to-Coreプログラム) について

令和2～6年度の5年間に亘って進めてきた「生体内の複雑系を対象とする統合放射線科学の国際研究拠点の形成」を狙うプロジェクトを、令和7年3月をもって終了致します。8ヶ国17機関で開始したプロジェクトが5年間で大きく発展し、8カ国78機関による巨大研究ネットワークを形成するに至りました。これまでご尽力いただいた多くの先生方にこの場をお借りしてお礼申し上げます。

その後継プロジェクトとして申請していた「高次生体内ゲノム維持機構学に関する国際研究拠点の形成」が採択され、令和7年度から5年間の予定で新たな国際研究拠点の形成を目指すこととなりました。これまでと同様、放射線生物学分野の若手研究者の国際的な往来を強力に支援して、人材育成と国際共同研究の推進を図ります。引き続きご支援賜ります様、お願い致します。

### 放射線生物研究センター各種委員会委員候補者の選挙結果

標記の件、郵送投票にて実施しました。ご協力いただき有り難うございました。

令和6年12月1日現在の登録会員総数が269、投票数は89、投票率は33.1%でした。

投票締め切り日 令和7年1月31日 開票日 令和7年2月5日 開票立会人 田代 聡、古谷 寛治

#### 1. 放射線生物研究センター運営委員候補について(以下敬称略、五十音順)

今岡 達彦 (QST放医研)

笹谷 めぐみ (広島大・原医研)

田内 広 (茨城大)

これら3名の方々は連絡会議よりセンター長宛に推薦されました。

(次点：富田 雅典 (電力中央研究所)、次々点：小林 純也 (国際医療福祉大学))

#### 2. 放射線生物研究センター共同利用・共同研究専門委員候補について

飯塚 大輔 (QST放医研)

菓子野 元郎 (奈良県立医大)

鈴木 正敏 (東北大・加齢研)

これら3名の方々は連絡会議よりセンター長宛に推薦されました。

(次点：大塚 健介 (電力中央研究所)、次々点：柳原 晃弘 (国立がん研究センター研究所))

#### 3. 放射線生物研究センター将来検討専門委員候補について(敬称略)

田内 広 (茨城大)

今岡 達彦氏は連絡会議よりセンター長宛に推薦されました。

(次点：松本 義久 (東京科学大))

(田代、古谷 記)

## 令和7年度放生研各種委員（数字は任期を年度で標記）

氏名	所属・職	運営委員	共同利用専門委員	将来検討 専門委員
		選出人数の目安： ▽京大内部：≤7 ◎連絡会議：7 ★影響学会：1	選出人数の目安： △放生研：4 ◇運営委員：2 ◎連絡会議：6	選出人数の目安： △放生研：2 ◇運営委員：3 ◎連絡会議：2 ☆若手代表：1
学内				
鈴木 淳	京大・iCeMS・教授	▽7		
溝脇 尚志	京大・医学研究科・教授	▽7		
小野 正博	京大・薬学研究科・教授	▽8		
放生研				
松本 智裕	放生研・教授	▽7	△◇7	
安原 崇哲	放生研・教授	▽8	△◇8	△◇8
原田 浩	放生研・教授	▽7	△◇7	△◇8
井倉 毅	放生研・准教授		△8	
連絡会議				
今岡 達彦	QST放医研・部長	◎8		◇◎7
笹谷 めぐみ	広島大学・准教授	◎8	◇◎7	
田内 広	茨城大学・教授	◎8		◇◎8
中村 麻子	茨城大学・教授	◎7		
細谷 紀子	東京大学・准教授	◎7		
鈴木 啓司	長崎大学・准教授	◎7		
松本 義久	東京科学大学・教授	◎7		
飯塚 大輔	QST放医研・グループリーダー		◎8	
菓子野 元郎	奈良県立医大・准教授		◎8	
鈴木 正敏	東北大学・講師		◎8	
島田 幹男	東京科学大学・助教		◎7	
香崎 正宙	産業医科大学・講師		◎7	
影響学会				
篠原 美紀	近畿大学・教授	★7		
若手研究者（将来検討専門委員）				
砂押 正章	QST放医研・主任研究員			☆8

## 編集後記

放生研ニュース175号をお届けします。今年度、一番のビッグニュースはやはり、丹羽太貫名誉教授のスウェーデン王立科学アカデミー・ゴールドメダル受賞に尽きると思います。12月6日に開催させて頂いた記念イベントには、全国から多くの皆さまにご参集頂きました。この場をお借りしてお礼申し上げます。本175号の巻頭写真や印象記で当日の晴れやかな雰囲気を感じて頂ければ幸いです。

(はらだ)



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、池田 幸恵

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

