

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| 32    正確な修復を導くナノ修復複合体の構築原理と機能解析 | 柴田 淳史 |
|---------------------------------|-------|

**【目的】** DNA 損傷の中でも、DNA 二本鎖切断 (DSB : DNA double strand break) は欠失・挿入変異や染色体転座を誘発することから最も重篤な損傷の一つと考えられている。これまでの我々の研究から、非相同末端連結 (NHEJ : non-homologous end joining) および相同組換え (HR : homologous recombination) が、「DSB 末端の削り込み」によって制御されていることが明らかになってきた。さらに我々は、NHEJ と HR の両方の修復経路が利用可能な G2 期において、NHEJ が第一経路として働き、NHEJ が停滞した場合に、DSB 末端を削りこむ DNA ヌクレアーゼ MRE11/CtIP が HR を開始させ、修復経路を HR へと向かわせることを発見した。また、DSB 近傍のクロマチン構造を蛍光イメージングにより解析すると、乳がん原因遺伝子である BRCA1 が 53BP1 の空間的再配置を促進させ、DSB 末端の削り込みを促進することを見出し報告している。すなわち、DSB 発生直後、53BP1 は DSB 近傍に集積し DSB 末端の削り込みを一時的に抑制し、その後 HR の進行時に伴い、53BP1 は DSB 遠位へと移動していた。一連の研究により得られた知見を統合することで、我々は「DSB 発生後、53BP1 が一過性に DNA 損傷部位に集積し不必要な削り込みを抑制することで、正確な DSB 修復経路へと導いている」という仮説を現在導き出している。一方、その他の研究グループから 53BP1 は液-液相分離により DNA 損傷部位に集積することが示された。また、次世代シーケンスを用いた ChIP-seq 解析から、1 か所の DSB に対して 53BP1 は 1~2 Mbp と非常に広範囲にわたり分布することが明らかになってきた。このように最新の知見を統合すると、53BP1 は DSB 部位に 1~2 Mbp と広範囲にわたり集積し、それらが液-液相分離を使い、DNA 修復に最適なクロマチン構造を再構築している可能性が考えられた。そこで本研究では、53BP1 およびその関連 DNA 修復分子について、超解像顕微鏡を使いその複合体の解析を行った。

**【方法】** ヒト正常網膜色素上皮 (RPE : Retinal Pigment Epithelium) に対して X 線照射により DSB を誘発し、53BP1 および RAP80 を蛍光免疫染色によりラベルした後、超解像画像は 3D-SIM 顕微鏡 (DeltaVision OMX バージョン 4、GE Healthcare UK Ltd) により取得した。得られた画像は Imaris 8.1.2 (Bitplane) により解析を行った。

**【結果】** ヒト正常細胞である RPE 細胞に対し、1 Gy の X 線を照射し、30 分後の 53BP1 シグナルを 3D-SIM OMX を用いて超高解像イメージングを行った結果、53BP1 は DSB 周囲に微小な集積体 (ナノドメイン) を形成することを見出した。すなわち DNA 損傷近傍において 53BP1 は、ヌクレオソームが構成するドメイン単位で修復を促進している可能性が考えられた。また我々は、53BP1 が欠損した状態だと別の修復因子である RAP80 が 53BP1 に代わり損傷部位に集積することを見出した。興味深いことに、53BP と RAP80 の同時欠損細胞を用いて、DSB 近傍のクロマチン構造を gH2AX シグナルによりモニターすると、異常な DNA 修復クロマチン構造体を示すことを見出した。以上の結果から、53BP と RAP80 は DSB 近傍にそれぞれ排他的に集積することで損傷近傍のクロマチン構造を制御し、DNA 修復を促進している可能性が考えられた。

DNA 修復タンパク質による適正なクロマチン構造構築

