

【目的】放射線照射が誘発する DNA 二本鎖切断 (DSB : DNA double strand break) は non-homologous end joining (NHEJ) 又は homologous recombination (HR) のいずれかにより修復される。近年の我々の研究により、S/G2 期細胞であっても放射線誘発 DSB 修復の第一選択は NHEJ であり、DSB の約 70% は NHEJ により修復されることが明らかになってきた (Shibata, EMBO J, 2011)。一方で約 30% の DSB に対しては、NHEJ が停滞又は遅延した場合に CtIP/MRE11 依存的に修復経路が NHEJ から HR への移行することを報告している (Shibata, Mol Cell, 2014)。さらに我々は、放射線照射直後は全ての DSB 末端付近で Ku80 及び 53BP1 が結合し、DSB 修復を NHEJ に向かわせる NHEJ 環境 (pro-NHEJ environment) を形成していることを見出している (Isono and Shibata*, Cell Rep, 2017 *責任著者; Barton and Shiabta*, Mol Cell, 2017 *共責任著者)。ゲノム上で変異を残すべきではない場所に DSB が生じた場合、細胞は HR を優先すると考えられ、実際に転写活性遺伝子領域に生じた DSB は HR により修復される (Aymard, NSMB, 2014; Pfister, Cell Rep, 2014)。本研究では転写活性領域で起こる HR に着目し、転写と共役する新規 HR 因子の同定を目指した。

【方法】ヒト正常細胞である RPE 細胞 (網膜色素上皮細胞) または U2OS 細胞を用いて、DNA 損傷応答の解析を行った。DSB のマーカーである γ H2AX foci を指標とすることで DSB 修復能を計測した。また HR 時に生じる DSB end resection については、RPA foci を指標として解析を行った。また、DSB 部位における DNA 修復タンパク質の集積をリアルタイムで計測するために、東京大学・安原崇哲助教との共同研究により、二光子顕微鏡でのリアルタイムライブイメージングを行った。HR 頻度の計測には、U2OS DR-GFP アッセイ系を用いた。

【結果】転写因子として知られる遺伝子群の中で、HR に関わる新規因子を同定するため、siRNA スクリーニングを行った結果、我々は IWS1 が HR の開始に必要なことを見出している (未発表)。そこで、これらの因子が DSB 部位に集積するかどうかを、東京大学・安原崇哲助教との共同研究により、二光子顕微鏡を用いたライブイメージング解析を行った。HR は S/G2 において引き起こされるため、本実験では mCherry-Geminin を発現する U2OS 細胞に、GFP-IWS1 を一過性に発現させ、Hoechst 33342 を増感剤として用いた上で、730 nm (365 nm 励起) の照射を行った。その結果、DSB 部位への IWS1 の集積が確認された。またこの集積は転写阻害剤の添加により低下したことから、転写依存的に IWS1 が DSB 部位へ集積することが示唆された。また HR 頻度を測定する DR-GFP アッセイを行った結果、IWS1 ノックダウン細胞では HR 効率の顕著な低下が認められた。以上の結果から、IWS1 は HR を導く新規因子であることが示唆された。

転写に関わる新規 HR 候補因子の DSB 部位への集積解析

