

**【目的】** がんの発生・進展の要因の1つとして、ゲノムの安定化の維持を担うDNA損傷修復の機能の脆弱化が挙げられる。実際に、がん細胞でDNA損傷が相当に蓄積していることが、がんの全ゲノム解析によりわかってきた。しかしながら、DNA損傷修復に関与するタンパク質やシグナル分子が、いかにDNA損傷修復という生化学的な反応を適正にそして効率的に進めていくのか、関連分子の空間的な制御や、ポリマーとしての物性を持つクロマチンの動態はほとんど明らかとなっていない。そのため、DNA損傷修復のメカニズムに沿った理解は立ち遅れた状況にあり、なぜがんでDNA損傷が蓄積するのかといった、がんのゲノムの不安定性の本質的な理解には未だ至っていない。そこで本研究では、適正なDNA損傷修復反応がいかに制御されているのか、その局所に作り出される微小環境についての理解を目指し、DNA損傷に伴ってクロマチンにいかなる構造変換が誘導されるのかを解析する。

**【方法】** ヒトの正常2倍体細胞であるhTERT-RPE1を用いて、DNA損傷に伴ってクロマチンに集合する53BP1タンパク質の動態を解析し、DNA損傷によりクロマチンの構造変換が誘導されるタイミングを検討した。続いて、標的クロマチン全域を蛍光標識するOligopaint DNA-FISH法を立ち上げ、クロマチンの体積を定量的に解析する系を構築した。そして、UV照射によりCas9の活性を誘導しDNA二本鎖切断を導入できる細胞系であるvery fast CRISPR (vfCRISPR)法を用いて、DNA損傷を導入し、標的としたクロマチンの構造変換を定量的に解析した。

**【結果】** 53BP1は、DNA損傷を誘導するとDNA損傷のマーカーであるリン酸化ヒストンH2AX ( $\gamma$ H2AX)が豊富な損傷クロマチンの局所に集合した。その53BP1の集合体は、損傷の導入から3分後には小さな円形をしていたが、30分後にはフィラメント状に形を変え、120分後には $\gamma$ H2AXで標識された損傷クロマチンを取り囲むように観察された。53BP1はクロマチンに結合する性質を持つことから、53BP1集合体の形の変化はクロマチンの構造変化を反映していると考えられ、損傷を受けたクロマチンは時間経過とともに構造変換することが示唆された。そこで、vfCRISPR法によりDNA損傷を誘導し、その30分後にOligopaint DNA-FISH法を用いて標的クロマチンを可視化し解析すると、損傷クロマチンは顕著に凝縮して観察された。この観察より、DNA損傷を受けたクロマチンは顕著に凝縮することが明らかとなった。クロマチンはDNA損傷に伴ってダイナミックにその構造を再編成し、DNA損傷の修復反応を進める場を作り出していると考えられる。

DNA損傷に誘導されるクロマチン構造変換

