

【研究費区分】：研究環

【研究代表者所属】：理学研究科 化学専攻

【研究代表者氏名】：廣田 耕志

【研究代表者氏名フリガナ】：ヒロタ コウジ

【研究代表者職】：教授

【研究分担者（所属,氏名,職）】

- ・ 東京都立大学 理学研究科, 阿部拓也, 助教
- ・ IFOM 研究所, Dana Branzei, Professor
- ・ NIH 研究所, Menghang Xia, Professor
- ・ NIH 研究所, Yves Pommier, Professor

【研究環組織名】：革新的癌治療薬品スクリーニング法開発に向けた国際共同研究環

【研究環 HP】

- ・ なし

【研究環の活動概要と、ここで形成された研究グループ・研究拠点の今後の研究活動について】

本研究では、化学物質と遺伝子間のシナジー効果を包括的に理解することである。この目的のために、ゲノム編集細胞コレクションを整備し遺伝学研究に強みのある**東京都立大学**と、化学物質の高速スクリーニングの研究分野で強みを持つ**NIH** とが国際共同研究交流を推進する。令和2年度の研究交流では、(1)ゲノム編集細胞コレクションを用いたケミカルジェネティクス手法による遺伝子と化学物質間のシナジーの抽出と、(2)DNA 損傷マーカー、 $\gamma$ H2AX を指標としたイメージング技術を用いた化学物質のスクリーニングシステムの構築、の2点の研究を実施した。(1)は東京都立大で実施し、21種類のヌクレオシドアナログ(薬品)の4種のゲノム編集細胞に対する応答を調査し、4つの化合物において特異的な変異遺伝子との相互作用を見いだすことができた(図1;特許提出前のため化合物名を番号で伏せて表示している)。さらに4種の化合物に関して、12 種の変異体に対して感受性プロファイルを検討した(図2)。(2)の研究では、良好な成績の高速スクリーニングシステムを構築できた(図 3, 4)。このスクリーニングシステムを用いて、ER(エストロゲン受容体)に依存して染色体を断切させる活性を持つ化学物質を3種同定することに成功した。

図1

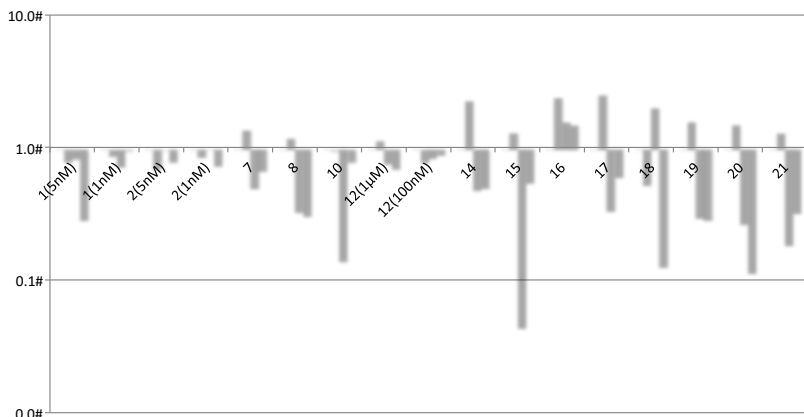


図1

様々なヌクレオシドアナログ(1~21)の4種の細胞に対する感受性。野生型を1とした時の生存率の比を表す。赤：*REV3<sup>+</sup>*、緑：*BRCA1<sup>+</sup>*、紫：*PolE<sup>-exo</sup>*変異細胞。

令和2年度は3名の渡米を予定していたが、コロナウィルスの蔓延に伴う海外渡航規制により渡米を断念せざるを得なかった。(1)の研究は都立大で実施したが、その研究成果はオンライン会議でNIHと共有し、NIHで開発したイメージング技術を用いたスクリーニングシステムでも同様の傾向を確認した。(2)の研究はロボットを用いた大規模スクリーニングはNIHで実施したが、得られた結果の手作業での確認は都立大において実施した。この研究で同定した、ER(エストロゲン受容体)に依存して染色体を断切させる活性を持つ化学物質および本スクリーニングシステムを紹介する論文を作成中であり、令和3年度中に受理されることを目指している。

図2

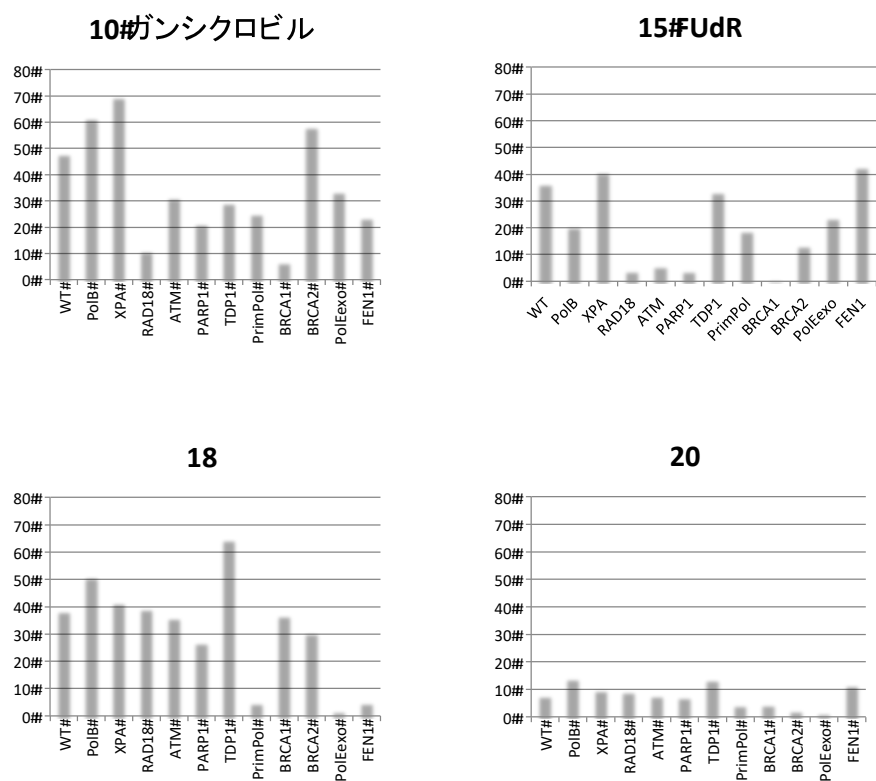


図2

ヌクレオシドアナログの中で、図1の試験で#10と#15の薬品は*BRCA1<sup>+</sup>*細胞の生存を特異的に下げ、#18と#20は*PolE<sup>-exo</sup>*細胞の生存を特異的に下げた。これらの4種の薬品について、12種の細胞の感受性プロファイルを調査した。横軸に各細胞を示し、縦軸に各細胞の生存率を示す。NIHでOoka博士が開発したDNA損傷を直接検出するイメージング手法で、DNA損傷活性を持つ薬品をスクリーニングする方法の概略。DNA損傷は、 $\gamma$ H2AXを指標に抗体を用いて定量する。定量はOperretaを使用する。

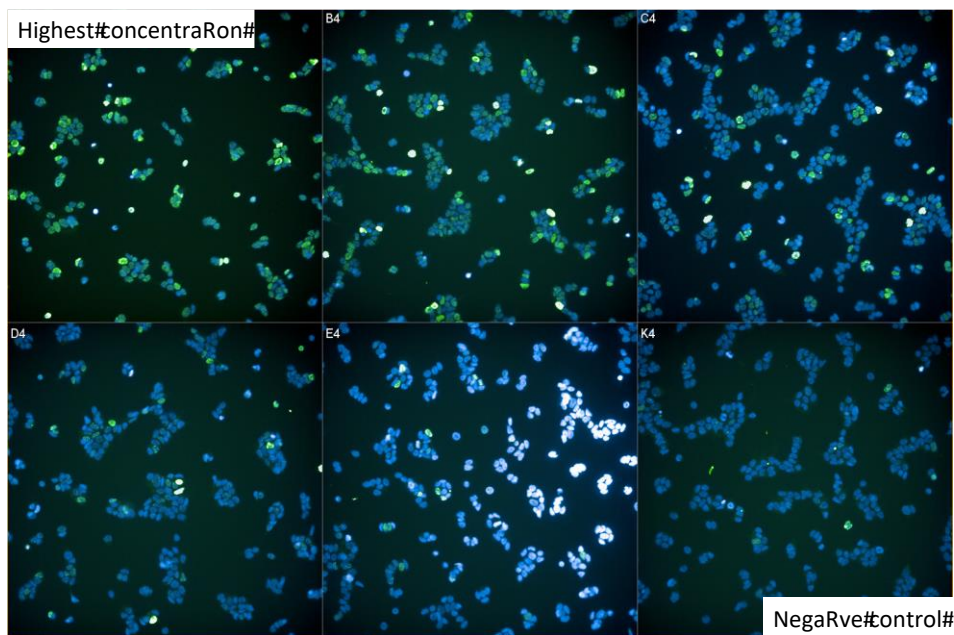
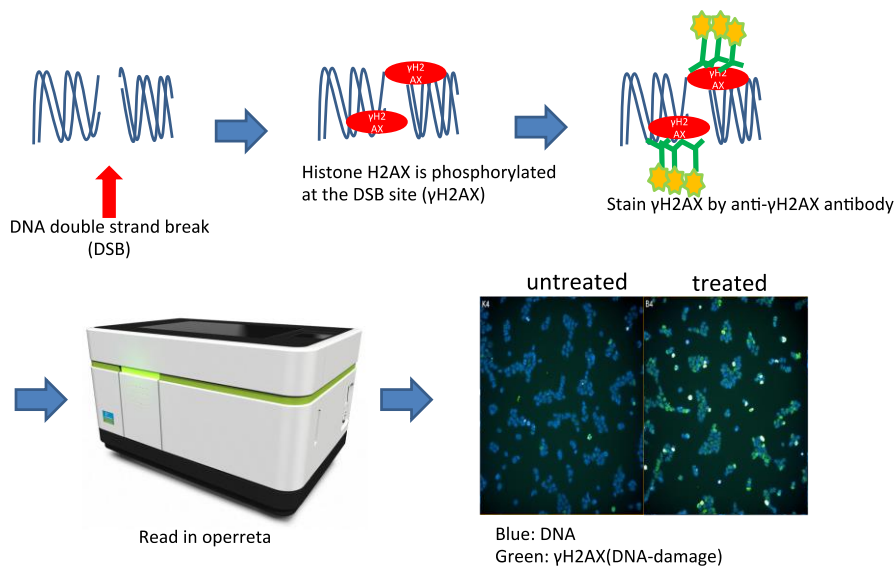


図 4

図 3 に説明した DNA 損傷を直接定量するイメージング手法による、DNA 損傷化合物の検出例。既知の DNA 損傷薬品であるブレオマイシンを様々な濃度で細胞に 24 時間暴露した。青は DNA(核)を表す。緑は、 $\gamma$ H2AX を表す。化学物質の濃度に従い緑の強度が強くなり検出されている。

令和2年度はコロナウイルス蔓延に伴う渡航規制のために、すべての渡米計画を断念し、オンラインでの交流・共同研究を実施した。このため、予定していた渡航経費は使用しなかった。一方、都立大での研究実施項目が増えたため、消耗品費((2)の研究の結果の手作業での確認実験に使用)は増加した。

**【学会発表（発表題目，発表大会名，年月）】**

- Hirota K. Role of proofreading exonuclease activity of replicative polymerase  $\epsilon$  in replication fork slowing at DNA damage 分子生物学会, 2020年12月4日 オンライン開催

**【論文発表又は著書発行（発表題目，著者，発表誌又は出版社，年月）】**

- Senmatsu S, Asada R, Oda A, Hoffman CS, Ohta K, Hirota K. (2021) lncRNA transcription induces meiotic recombination through chromatin remodelling in fission yeast. *Commun Biol.* 4(1):295.
- Kojima K, Ooka M, Abe T, Hirota K. (2020) Pold4, the fourth subunit of replicative polymerase  $\delta$ , suppresses gene conversion in the immunoglobulin-variable gene in avian DT40 cells. *DNA Repair (Amst).* in press
- Shibata T, Iwasaki W, Hirota K. (2020) The intrinsic ability of double-stranded DNA to carry out D-loop and R-loop formation *Comput Struct Biotechnol J.* 4;18:3350-3360.
- Asada R, Senmatsu S, Montpetit B, Hirota K. (2020) Topoisomerase activity is linked to altered nucleosome positioning and transcriptional regulation in the fission yeast *fbp1* gene. *PLoS One.* 15(11):e0242348.
- Senmatsu S, Hirota K. (2021) Roles of lncRNA transcription as a novel regulator of chromosomal function. *Genes Genet Syst.* 95(5):213-223.
- Nakano T, Shoukamy MI, Tsuda M, Sasanuma H, Hirota K, Takata M, Masunaga SI, Takeda S, Ide H, Bessho T, Tano K. Participation of TDP1 in the repair of formaldehyde-induced DNA-protein cross-links in chicken DT40 cells *PLoS One.* 2020 Jun 26;15(6):e0234859.
- Yamaki Y, Nobe Y, Koike M, Yamauchi Y, Hirota K, Takahashi N, Nakayama H, Isobe T, Taoka M. *Anal Chem.* (2020) Direct Determination of Pseudouridine in RNA by Mass Spectrometry Coupled with Stable Isotope Labeling 92(16):11349-11356.
- Saha LK, Wakasugi M, Akter S, Prasad R, Wilson SH, Shimizu N, Sasanuma H, Huang SN, Agama K, Pommier Y, Matsunaga T, Hirota K, Iwai S, Nakazawa Y, Ogi T, Takeda S. (2020) Topoisomerase I-driven repair of UV-induced damage in NER-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117(25):14412-14420.
- Akagawa R, Trinh HT, Saha LK, Tsuda M, Hirota K, Yamada S, Shibata A, Kanemaki MT, Nakada S, Takeda S, Sasanuma H. (2020) UBC13-Mediated Ubiquitin Signaling Promotes Removal of Blocking Adducts from DNA Double-Strand Breaks. *iScience.*

**【学会会議開催実績報告】**

- 該当なし  
(※国際学会会議にあたるものには「・」を「\*」にすること。)

**【海外研究者の招聘実績】**

- コロナウィルス蔓延による渡航規制のため中止した

**【国際研究環支援や外部資金への応募状況】**

- JSPS 拠点形成事業 (代表) 不採択

**【科学研究費助成事業や国等の提案公募型研究費，企業からの受託研究費・共同研究費の獲得状況】**

- JSPS 新学術領域研究 (代表) 不採択
- JSPS 萌芽的研究(挑戦) (代表) 応募中

- ・ JSPS 基盤研究(B) (代表) 採択
- ・ JSPS 基盤研究(S) (分担) 採択
- ・ JSPS 国際共同研究支援(B) (代表) 採択
- ・ JSPS 二国間交流事業 (代表) 採択

#### 【受賞等】

- ・ 該当なし

#### 【その他社会貢献】

[公的審議会・委員会等の公的貢献, 生涯学習支援・普及啓発, 国際貢献・国際交流等]

- ・ 都立科学技術高等学校での出張講義 (3月24日)

#### 【研究成果による特許等の産業財産権の出願・取得状況】

(産業財産権の種類, 名称, 出願番号, 出願年月日)

- ・ 該当なし

#### 【研究分担額】

(研究代表者・分担者名, 所属, 金額 (円))

(代表) 廣田耕志, 理学研究科化学専攻,  
1,000,000 (円)