

平成 30 年 2 月 21 日

若手研究者海外挑戦プログラム報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

受付番号 201780015

氏 名 藤澤 遼 Ryo Fujisawa

(氏名は必ず自署すること)

若手研究者海外挑戦プログラムによる派遣を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記記載の内容については相違ありません。

記

1. 派遣先：都市名 ダンディー (国名 英国)
2. 研究課題名（和文）：複製フォークに局在するヒト小頭症原因因子 DONSON の機能を *C. elegans* を用いて探る
3. 派遣期間：平成 29 年 10 月 1 日 ～ 平成 30 年 1 月 31 日 (123 日間)
4. 受入機関名・部局名：MRC Protein phosphorylation and ubiquitination unit, University of Dundee
5. 派遣先で従事した研究内容と研究状況（1/2 ページ程度を目安に記入すること）

ヒト遺伝性疾患小頭症の原因遺伝子として同定された DONSON (downstream neighbor of SON)は、DNA 複製に機能する (Reynolds et al., 2017, *Nat. Genet.*)が、その詳細は明らかではない。派遣先研究室では *C. elegans* の DONSON オーソログが複製フォーク複合体に結合することを明らかにしていた。よって *C. elegans* をモデルとして DONSON が DNA 複製の場に局在するメカニズムの解明に取り組んだ。複製フォーク複合体のコアである複製ヘリカーゼはハブ因子 (CTF-4, CTF-18, TIM-1, TIPIN-1, CLASPIN)と結合することで多くの因子を複製フォークに呼び込む。DONSON がこれらの因子を介して複製フォーク複合体に結合しているかを検証するため、CTF-4, CTF-18, TIM-1, TIPIN-1, CLASPIN をそれぞれ RNAi でノックダウンした。その *C. elegans* の初期胚抽出液を作成し、複製ヘリカーゼのサブユニットである TAP-SLD-5 を bait として複製フォーク複合体の免疫沈降を行った。得られた複合体を質量分析によって解析した結果、いずれの RNAi 処理によっても DONSON の結合は影響を受けなかった。

複製フォーク複合体は複製反応の終了後、複製コアヘリカーゼがポリユビキチン化修飾を受けることにより分解制御がなされる。派遣先研究室では複製フォーク複合体の分解において S/G2 期と M 期では異なる反応経路が存在すること、及びこれらの 2 つの経路を部分的に阻害することで *C. elegans* は合成致死となることを見出していた (Sonneville et al., 2017, *Nat. Cell Biol.*)。これらの細胞周期に応じた複製フォーク複合体の分解制御の機構の解明を目指し、合成致死アッセイとライブイメージングの 2 つの実験系を用いて複製フォーク複合体の分解に関わる E2 酵素の RNAi スクリーニングに取り組んだ。その結果、UBC-3, UBC-7 の 2 つの E2 酵素が S/G2 期に複製フォーク複合体の分解に機能していることを見出した。

6. 研究成果発表等の見通し及び今後の研究計画の方向性 (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

複製フォーク複合体のコアヘリカーゼ、CMG ヘリカーゼはハブ因子 (CTF-4, CTF-18, TIM-1, TIPIN-1, CLASPIN) と結合することで多くの因子を複製フォークに呼び込む。しかしこれらハブ因子の RNAi は DONSON の複製フォーク複合体への結合には影響しなかった。このことから DONSON は複製フォーク複合体のコアヘリカーゼ、CMG ヘリカーゼに直接結合している可能性が考えられる。CMG ヘリカーゼは 10 以上のポリペプチド鎖からなる巨大な複合体である。結合ドメインの同定については、近年電子顕微鏡により CMG ヘリカーゼの構造が報告されている (Zhou et al., 2016, *PNAS*) ことから、CMG ヘリカーゼ、DONSON の複合体構造解析による結合部位の同定を視野に入れている。この目的から組み換え精製 CMG ヘリカーゼ、DONSON の調整を予定している。

RNAi スクリーニングにより 2 つの E2、UBC-3, UBC-7 が、E3 リガーゼ CUL-2^{LRR-1} と共に S/G2 期における CMG ヘリカーゼのポリユビキチン化修飾に機能することが示唆された。これまで Cullin タイプの E3 ユビキチンリガーゼと UBC-3 の連携については報告があったが、本研究により UBC-7 という過去に報告のなかった E2 も機能することが明らかとなった。今後は、両者のユビキチン化反応に機能的差異 (ユビキチン鎖のプライミング、エロンゲーション等) が存在するかを明らかにするために精製タンパク質を用いた生化学的解析を予定している。一方 M 期における CMG ヘリカーゼの分解経路については、RNAi スクリーニングがあまり機能しなかった。合成致死アッセイに用いる RNAi 対象因子の変更など、その手法の改善を試みる。

7. 本プログラムに採用されたことで得られたこと (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

私はこれまであまり国際色豊かとは言えない研究室に所属していました。この理由から、特に国際会議等で科学的な議論をする時に、私は英語でのコミュニケーションについていけない状態でした。この点において自身の研鑽の必要性を常感じていました。若手研究者海外挑戦プログラムでは、大学院での指導教員からほぼ独立した状態で、4 ヶ月間海外の研究機関でサイエンスに没頭することができました。これに伴い派遣先機関との受け入れ交渉、申請書作成、フラットの確保、などの交渉を行う機会もありました。このようにサイエンスでのコミュニケーションに限らず、通常日本で生活しては遭遇し得ないことを多く経験することができました。これらの経験は私の英語能力やコミュニケーションスキルの向上のみならず、他国からの留学生に対する寛容性にも大きく影響を与えました。さらに派遣先ではポストドクトラルフェローとして研究機関で働かれている方や製薬企業から出向されている日本人の方々との交流もできました。いずれの出会いも日本の大学院で研究してはなかなか巡り会えないネットワークであり、博士課程修了後の幅広いキャリアを考慮する上では極めて重要な経験でした。このような機会を与えてくださった日本学術支援機構に深く感謝申し上げます。