

## 研究課題別中間評価結果

1. 研究課題名：高等真核細胞で標的組換えの効率を上昇させる方法の開発

2. 研究代表者名：武田 俊一

3. 研究概要：

武田グループは、導入した DNA と染色体 DNA との相同 DNA 組換えによる標的組換えを高効率で行う方法を開発することを課題としている。特に、酵母遺伝子のニワトリホモログ遺伝子をニワトリ B リンパ細胞株、DT40 細胞でノックアウトする逆遺伝学的解析により、高等真核細胞の相同組換え機構を解析し、DT40 でなぜ高効率に標的組換えが起こるのかを解明することを最終目標としている。

4. 中間評価結果

4-1. 研究の進捗状況と今後の見込み

武田グループは、従来酵母を中心に発見された約 20 種類の相同組換えに関する遺伝子のうちヒト・ニワトリにおいて組換えにおける関与が相対的に高いと思われる Rad51 およびその補助因子として機能する分子の機能を解析してきて、当初の提案に沿う成果を得ている。

4-2. 研究成果の現状と今後の見込み

研究の成果としては、まずニワトリにおいて酵母で相同組換えに関与することが明らかになった遺伝子のホモログの機能解析を行い、特に高等真核細胞にのみ存在する遺伝子 (Brca 2) の遺伝子座に様々な変異を人工的にノックインした細胞を作製した。Brca 2 遺伝子をノックアウトした細胞は致死であったが、様々なノックした DT40 細胞の解析から Brca 2 は、BRC モチーフと N' 保存領域とが共同して細胞増殖に必要な相同的組換えによる修復を行っていることが示唆された。

また、分裂酵母で見つかった相同的組換えに関与する新しい遺伝子 swi5 の解析を行い、この遺伝子と共同して働く遺伝子を明らかにし、この遺伝子のニワトリのホモログをノックアウトした DT40 細胞を作製した。

また、修復に関係する DNA polymerase の相同組換えにおける役割を解明するためにこれら DNA polymerase の欠損株を作製した。損傷された DNA と正常な DNA との間の相同的組換えについての分子機構の解明も行った。また、相同的組換えに対する様々な DNA 分解酵素の関与を逆遺伝学的手法での解析を行っている。

さらに、DNA 損傷の損傷位置における複製 DNA polymerase がどのようにしてこの損傷を乗り越え、ブロックが解除されるかどうかそのメカニズムの解明を分子メカニズムについての解明も行った。一方、DNA 組換えに関係する蛋白質の多くは重合して働くことから、この重合状態を構造解析する目的で高分子蛋白質複合体の NMR 測定手法を開発した。

#### 4-3. 今後の研究に向けて

武田グループは、このように相同組換えに関係する幅広い研究を展開している。今後の見通しとしては、さらに多くの相同的組換えに関係する新規遺伝子を分裂酵母で見つけ、そのヒトやニワトリのホモログをも同定しこれらの新しい相同組換え遺伝子の役割を明らかにすることを目的として、これら遺伝子のノックアウトクローンの作製とそれらに対する抗体の作製を計画している。また、近々完了が予定されているニワトリのゲノムプロジェクトから得られるゲノム・データを有効に使う為にニワトリにおける相同的組換えの基本的役割をより分子機構が解明されている酵母の相同的組換えと比較する目的でプロテオミクス的手法を導入することも予定されている。

#### 4-4. 戦略目標に向けての展望

武田グループの当初の目的はニワトリのBリンパ細胞株 DT40 細胞においてどうして高効率で標的組換えが起こるのか、その分子メカニズムを解明することであり、さらにより効率的に標的組換えを行う DT40 細胞株の樹立することであり、特に後者はその実用面での有効性が非常に高いと思われ今後の研究に期待するところは大きい。

#### 4-5. 総合的評価

武田グループの研究課題の中間報告のアドバイザーの評価は、非常に高いとは言えないものの平均よりやや上の達成度とする見方が多い。研究が多くの課題を抱え散漫になっているという指摘もあったが、本来の目的である DT40 細胞での組換え系遺伝子の網羅的な破壊によるその高効率組換えのメカニズムの解明という点では確実に進んでいるという評価が多かった。また、これまでの成果の科学的・技術的インパクトについては今後の研究の進歩によるという意見が多いが、大きなブレークスルーを期待するにはやや物足りないという意見もあった。その為には技術的にもっと革新的な方法論の導入が必要であろう。今後、武田グループにどのような成果が期待できるかについては一部の人があまり期待できないと評価したが、多く的人是比較的もしくは少しは期待できるという判断であった。結論として、中間評価としては一応評価されるが、今後大きな成果を挙げるには今一段の研究の新しい展開が必要と思われる。