

「ゲノムの構造と機能」  
平成10年度採択研究代表者

柴田 武彦  
(理化学研究所 主任研究員)

## 「組換えを介したゲノム動態制御」

### 1. 研究実施の概要

詳細な解析が進んだ結果、ゲノムは動的な存在であることが明らかになった。この事実は、更に、老化、ガン化、遺伝疾患にも深く関わる。遺伝の基本的な機構そのものについても再検討が必要になった。組換えを介したゲノム動態の機構と制御の理解を通して、新技術の素材と結果予測・安全評価の理論基盤を提供する目的で、(1) DNA 鎖切断の導入・修復とゲノムの動態制御、(2) 染色体レベルでのゲノム流動性・恒常性制御の研究を行う。ゲノム流動化の要因である DNA 鎖切断は生命活動で不可避免的に生じ、組換えで修復される。組換えは、DNA の再編成でゲノム流動化に、また、非自己 DNA ・変異の排除の機構としてゲノムの恒常性維持にも働く。提案者らは、組換えの制御で染色体構造の挙動が大きな機能を果たすことを明らかにしている。更に提案者らが明らかにした酵母からヒトまで保存されている組換え蛋白質群・染色体の挙動・分子反応と酵母変異体の表現型を手がかりに、酵母、鳥類、ヒトのシス・トランスに作動する因子群を取りあげる。組換えを介したゲノム動態制御について、遺伝子・分子機能から染色体・細胞の挙動までの総合的な理解と、例外的な高頻度で標的組換えをする鳥類 DT40 細胞を検証系として高等動物での普遍性の検証、新技術の基盤構築を目指す。

### 2. 研究実施内容

#### 背景

酸素呼吸の副作用であるDNA酸化損傷、DNA複製の異常等が原因で、生命活動の過程でDNA鎖切断は避けられない。特に二本鎖切断の修復（組換え修復）でおこる誤りがゲノムの流動化を招くと考えられている。発ガン、遺伝疾患（Nijmegen breakage syndrome、ataxia telangiectasia、Bloom's syndrome、Werner's syndrome 等）、加齢に伴うゲノムDNAへの変性の蓄積は、ゲノムの動的性質が深く関わると思われているが、これらに対する予防と治療には、ゲノムの動的性質とそれを支配する機構についての理解が必要である。更に、ゲノム加工技術における課題として、(1) 標的組換え効率の改善、(2) 非標的組換えの抑制、(3) 組

込みコピー数制御、(4) 導入遺伝子の不安定性、(5) 高等動植物細胞の株化に伴うゲノムの再編成といった問題への対策が待たれている。また、結果予測・制御可能なゲノム改変技術の開発や、遺伝子の未知機能を明らかにする最も有効な手段である普遍的な逆遺伝学手法の開発も待たれている。こうした課題に対してゲノム動的性質を支配する二本鎖切断、組換え修復の制御機構の解明が必要であり、また有効である。一方、近年、染色体組換え制御についての理解の急速な進展があり、生体が持つ二本鎖切断、組換え修復の制御機構を利用した技術が現実の目標になってきた。またそれを巡る国際競争の兆しも見えてきた。

## 研究の概要

1. ゲノムは組換えを介して変化し、また逆に変異を取り除く。この組換えを介したゲノム動態制御の機構を酵母、鳥細胞で明らかにする。
2. 組換えシステムは、生物種間で高度に保存されており、それらの機能、構造、挙動の解析は真核生物のゲノム動態制御解明の大きな突破口である。特にクロマチンレベルを中心に解析する。
3. 組換え関連因子・酵素のヒトホモログを鳥の高頻度標的組換えDT40細胞へ導入し、その解析から高等動物ゲノム改変技術の構築を目指す。

本研究課題の特徴として以下の諸点があげられる。(1) クロマチンレベルでの制御を中心に置く、(2) 生体が普遍的に持つ相同組換え機能を利用した高等動物のゲノム改変新技術の開拓を目指す、(3) ヒト組換え関連蛋白・因子の機能を高等動物細胞DT40を用いてin vivoで検証する、(4) 本課題のかぎとなるRecA蛋白 (RecAp) による相同的対合反応、真核生物のRecAホモログ (Rad51p)、減数分裂期相同組換え開始と体細胞増殖期の二本鎖切断修復の要に働く *MRE11* 遺伝子、組換え頻発部位 (ホットスポット) における染色体構造の挙動、高頻度標的組換えDT40細胞は全て提案者グループのオリジナルである、(5) 蛋白立体構造解析の専門家を内部に持ち、変異体取得⇒遺伝子解析⇒蛋白構造・分子機能⇒細胞内部構造・生理の一貫した解析による分子構造を基礎にした展開と理解を図る。

## これまでの成果

### ゲノム動態に働く遺伝子、蛋白質

- (1) 出芽酵母の *MER3* 遺伝子は、ヘリカーゼ様蛋白質をコードし、減数分裂期組換えで交叉型組換え体形成を制御することを明らかにした。
- (2) 減数分裂期組換えの開始に働く二本鎖切断導入と、減数分裂期・体細胞増殖期を通して二本鎖切断修復に関与する出芽酵母の Mre11 蛋白 (Mre11p) が持つ2種の

DNA結合能、DNase活性などその多機能性を明らかにした。

#### 組換え制御に働く染色体構造動態

(3) Mre11pのもつ減数分裂期二本鎖切断導入に必要なクロマチン構造動態に特異的に働くドメインと、二本鎖切断修復とテロメア維持に働くドメインとの互いに独立した2つの機能ドメインの存在を明らかにし、それぞれの生化学機能を解析した。

(4) 減数分裂期組換えのホットスポット間の競合においても染色体構造レベルでの修飾が重要な働きをしていることを明らかにした。

#### 組換えとその制御に働く分子機構 (図1)

(5) RecApにはなく、真核生物のRad51pに共通するN末端ドメインの立体構造をヒトRad51pについて解き、その上のDNA結合部位を明らかにし、更にその部位がRad51pのDNA結合に重要な機能を果たすことを明らかにした。

(6) ヒトRad51pとRad52pとの相互作用の部位をマップし、酵母とヒトでは、Rad51pとRad52pとが相互作用するという点では保存されているが、その相互作用の部位は互いに異なり、その機能も異なることがうかがわれた。

#### 高等動物細胞ゲノム動態に働く組換え機能

(7) 自身のRad51pをヒトのRad51pに置き換えたDT40細胞を用いたRad51pの発現を停止させる実験によって、Rad51pに依存する組み換え修復は高等真核細胞の増殖に必須であることを明らかにした。

(8) 組み換え修復と非相同的末端再結合の両方の、二本鎖切断修復機構が欠損したDT40細胞の変異体 ( $\Delta$ Rad54/ $\Delta$ Ku70) を作成・解析することで、DNA複製前は非相同的末端再結合が使われ、DNA複製後はまず組換え修復系が使われ次にバックアップとして非相同的末端再結合が使われることがわかった。

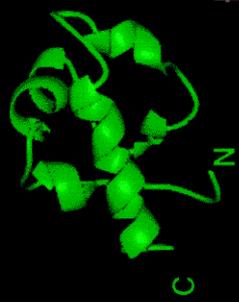
(9) Rad51BのRad54の一方または両方の欠損DT40細胞のDNAはシスプラチンによって誘導された損傷修復を解析する事で、ゲノム上の2本鎖切断とクロスリンクに対してそれぞれ違うタイプの相同組み換え修復が行われている可能性を示した。

(10) MRE11の発現を停止させることができるDT40細胞を作り、MRE11の発現停止の効果を調べた結果、MRE11が介する相同組み換えは細胞分裂や染色体の維持に必須であることを示した。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Furuse, M., Nagase, Y., Tsubouchi, H., Murakami-Murofushi, K., Shibata, T. and Ohta, K. (1998) Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *EMBO J.*, 17, 6412-6425.
- Ohta, K., Wu, T.-C., Lichten, M. and Shibata, T. (1999) Competitive inactivation of a double-strand DNA break site involves parallel suppression of meiosis-induced changes in chromatin configuration. *Nucleic Acids Res.*, 27, 2175-2180.

他 1 件



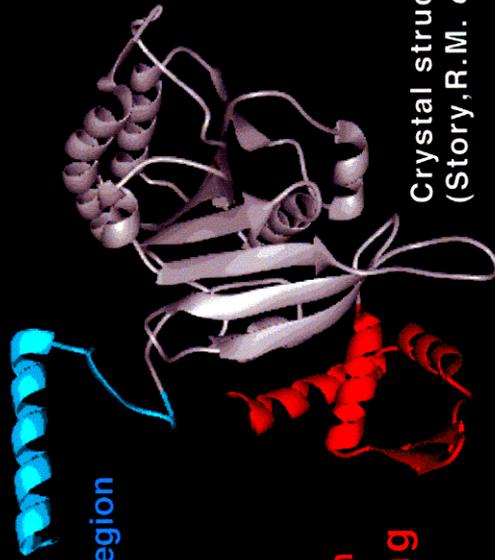
homologous region



HsRad51



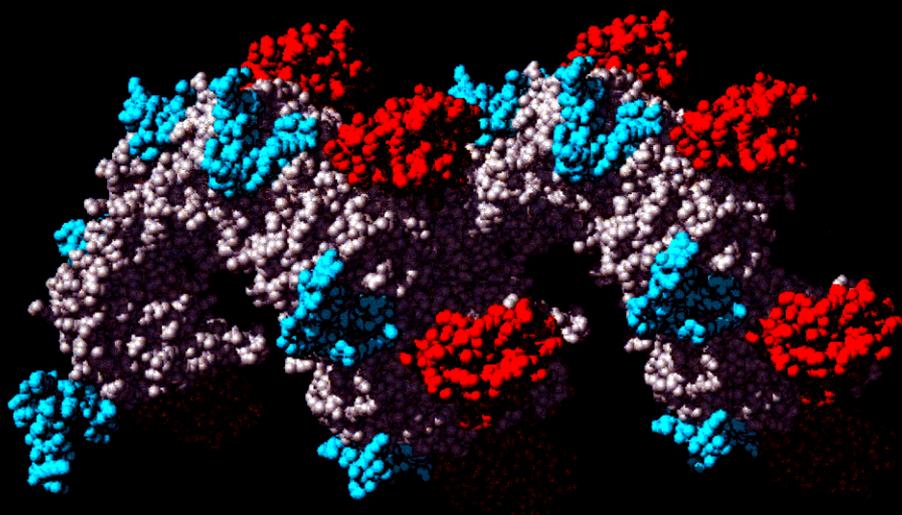
*E. coli* RecA



N-terminal region

C-terminal domain  
Involved in DNA-binding

Crystal structure of RecA  
(Story, R.M. et al., 1992)



crystal structure of  
helical RecA filament

ヒトRad51蛋白のN末端ドメインはRad51蛋白繊維の溝に突きだしている。このドメインはRecA蛋白のC末端ドメインと同様にDNA結合の機能を持つ。このドメインの構造の違いは更に他の機能があることの反映かもしれない。