

「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、世代間のみならず、個体発生・老化の過程においてもゲノム構成は動的な存在であることが明らかになった。この事実は、老化、ガン化、遺伝疾患にも深く関わる。更に、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は、新ゲノム制御技術の素材と結果予測・安全評価の理論基盤を提供すると期待できる。本研究では、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、高等動物での普遍性の検証、新技術の基盤構築を目指す。提案者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・酵母変異体の表現型を手がかりに、また、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、(1)DNA鎖切断導入・修復、ゲノム流動化制御遺伝子、(2)染色体レベルのゲノム流動性・恒常性制御、(3)動物細胞株でのゲノム改変技術の研究を行う。平成12年度までのNMRによる原子スケールの分解能での分子構造解析を含む研究により、二本鎖DNAの相同的組換えは、RNAにはないDNA特有の分子構造に依存した機能であることが強く示唆された。RNA生物はウイルス、ウイロイドに限られること、相同DNA組換えによって新規の機能をもつ遺伝子を進化させる系が、試験管内、生体内に存在することとを考えると、相同DNA組換えの生物進化での重要さが示唆される。一方、栄養飢餓ストレスがかかると、ストレス応答MAPキナーゼ経路、環状AMP依存性キナーゼ経路、接合型フェロモン応答シグナル伝達経路の複合的な支配下で、組換え開始部位でクロマチン構造を開く形で組換え開始が誘導されることを明らかにしてきた。ここで、組換え開始部位の塩基配列は cAMP感応配列 (CRE) のコア配列と共通であり、そこに結合しクロマチン構造を開閉する蛋白質の一つは、CREB/ATFファミリー転写因子の一つであったが、更に、相同DNA 組換え、組換え修復に重要な機能をもつMre11 蛋白もまた、広義の転写制御因子の一つであることが示唆された。これらの結果は、生体が生存に適さない環境に置かれると、DNAが内在する機能である相同DNA組換えを誘導、活性化する系を、ストレス応答の転写制御に関

わる因子群を借用する形で獲得し、環境変動に適応してきたという像が見えてきた。これらの相同DNA組換え制御系を更に深く理解することで、目的に合わせて遺伝子校正（遺伝子治療など）、ゲノム育種・改良などを、進化の原理に添った形で行うことができるようになることが期待される。

2．研究実施内容

背景

進化を見るまでもなく、世代間交代、個体発生・老化の過程でもゲノムは動的な存在である。発ガン、遺伝疾患（Nijmegen breakage syndrome 等）加齢に伴いゲノムDNAへ変性が蓄積するが、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。酸素呼吸の副作用であるDNA酸化損傷自身、DNA複製点の損傷箇所通過などが原因で、生命活動の過程でDNA鎖切断は避けられない。特に二本鎖切断の組換えによる修復の誤りがゲノムの流動化を招くと考えられている。有性生殖においては配偶子形成初期に位置的、時間的に制御された二本鎖切断が入ることにより相同DNA組換えが誘導され、種の遺伝的な多様性創出に働くといわれている。更に、標的組換え効率、組込みコピー数制御、導入遺伝子の安定性、高等動植物細胞の株化に伴うゲノムの再編成といった遺伝の基本に関わる問題への対策が待たれている。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確立に必要な相同DNA組換えの誘導技術の開発も待たれている。組換えのDNA動態での諸機能を理解しその制御技術を確認するには、二本鎖切断、組換えの生体内での制御機構の解明が必要であり、また有効である。近年、核染色体の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、組換えの制御機構を利用した技術が現実の目標になり、それを巡る国際競争の兆しも見えてきた。

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、及び、酵母からヒトまで組換え蛋白質群・染色体の挙動・分子反応が保存されていることを明らかにしている他、高等動物での普遍性の検証、新技術の基盤構築に有効な例外的な高頻度で標的組換えをする鳥類DT40細胞を用いた検証系を開発したという実績をもつ。生物種間の保存は、研究に適した生物系を選択することを可能にする。

研究の概要

本研究では、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、高等動物での普遍性の検証、新技術の基盤構築を目指す。そこで、以下の課題について研究を行う。

- (1) DNA鎖切断導入・修復、ゲノム流動化制御遺伝子の研究：DNA障害及び組

換えのチェックポイント機構との相互作用の解明。

- (2) 染色体レベルのゲノム流動性・恒常性制御の研究：組換えを特にクロマチンレベルを中心に解析する。
- (3) 動物細胞株でのゲノム改変技術の研究：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

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)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蛋白による相同的対合反応、真核生物のRecAホモログ(Rad51蛋白)、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。

平成12年度の成果

DNA障害及び組換えのチェックポイント機構との相互作用の解明

DNA障害のチェックポイントに関与する酵母のMEC1遺伝子が欠損すると、電離放射線やメチルメタンスルホン酸(MMS)などによるDNA二重鎖切断障害に対して、高感受性となる。しかしこの高感受性の性質がrad50S 変異或いはsae2の欠失変異の導入によって大幅に軽減されることを発見した。この二つの変異では、減数分裂の組換えの際にその開始過程であるDNA二重鎖切断は入るが、次の過程が進行しない。つまりDNA端のプロセシングが起らない。だが同じDNA端のプロセシングの過程が進行しないもう一つの変異mre11-58の導入では、mec1欠損によるMMS高感受性を軽減できなかった。この同じ組換え過程に欠損を持つ三変異の中で、mre11-58の唯一の違いはMre11蛋白質複合体を形成できないことであるので、mec1欠損の場合DNA鎖切断修復の促進にはMre11複合体形成が必要であることが分かった。さらに、この促進には、MRE4, TEL1が必要であり、そしてRAD53の活性化も必要であることが分かり、プロセシングのない二重鎖切断に特有のDNA障害チェックポイント機構があり、それにMre11複合体が関与することが強く示唆された。

組換え制御に働く染色体構造動態

(1) Mre11蛋白による減数分裂期転写制御の可能性

出芽酵母mre11遺伝子破壊株は減数分裂期にDNA二本鎖切断を起こすことができず、また胞子形成に欠損を示す。一方、同様に二本鎖切断を欠損するspo11遺伝子変異株では、胞子形成に問題は生じない。したがって、mre11遺伝子破壊株で見られる胞子形成異常は二本鎖切断の欠損にともなう結果ではなく、何らかの別の要因によってもたらされている可能性が高い。そこで、mre11遺伝子破壊株における減数分裂期の全ゲノムの転写プロファイルを、DNAマイクロアレイを用いて調べた。その結果、ほとんどの遺伝子では野生型同様の転写レベルの変動が見られたが、減数分裂中期遺伝子のうち、ごく一部の遺伝子群の発現活性化が特異的かつ強く阻害されていた。これらの遺伝子はいずれも転写制御領域に共通の転写制御配列を有しており、これに結合する転写因子の転写活性化にMre11蛋白が何らかの形で寄与していること、言い換えると、MRE11蛋白もまた広い意味での転写因子であることが示唆された。

(2) 分裂酵母の減数分裂期組換え開始制御

一塩基置換変異である分裂酵母のade6M26 変異は、cAMP感応配列 (CRE) に類似した7塩基配列を変異箇所周辺に形成し、その周辺で相同組換えが、減数分裂期特異的に活性化される。この配列にはCREB/ATF 型転写因子Aft1-Pcr1が特異的に結合するが、この因子は減数分裂期に周辺のクロマチン再編成を誘導し、結果として組換え酵素の接近が容易になって、組換えが活性化されると考えられる。今回この配列にランダム突然変異を施し、組換え活性化に必要な共通配列を検索し、組換えやクロマチン構造への役割を検討した (米国G. Smith 博士との共同研究) 結果、新たに数種の配列が同様の組換え活性化能を有することが判明した。それらの配列を比較すると、CREのコア配列が共通要素として認められた。また、Aft1-Pcr1がこれらの配列いずれもと特異的に結合する事が示された。さらに、新たに見出された配列が、M26配列同様のクロマチン再編成を誘起することを明らかにした。また、染色体に存在する天然のヘプタマー配列でも、ade6M26と同様なクロマチン再編成が起きることを確認した。以上の結果から、染色体上に散在する多数のCRE類似配列が、減数分裂期のクロマチン再編成部位として機能し、ある場合には組換えホットスポットとしても機能する可能性が示唆された。

(3) 減数分裂期組換えとDNA合成の共役

減数分裂期の組換え開始は、必ず減数分裂期DNA合成後に起きる。そこで、減数分裂期DNA合成に特異的欠損を示す出芽酵母変異体 (clb5 6 二重変異株など) を用いて、DNA合成と組換え開始反応の相関を調べた (フランスNicolas博士、

オーストリアKlein教授、米国Lichten博士との共同研究)。その結果、減数分裂期DNA合成に依存して、ホットスポット部位におけるクロマチン構造転換やDNA二本鎖切断・シナプトネマル構造の形成が誘導されることがあきらかになった。すなわち、減数分裂期のDNA合成と組換えが共役していることが示された。

組換えとその制御に働く分子機構

(1) ヒトXrcc3蛋白とRad51C蛋白との複合体の組換え機能

RecA蛋白のヒトホモログであるXrcc3蛋白とRad51C蛋白とは1 : 1で安定な複合体を形成し、二本鎖DNAと一本鎖DNAとの間で、普遍的な相同DNA組換えの中間体であるヘテロ二本鎖を形成する活性を持つことを昨年度明らかにした。このヘテロ二本鎖形成は、RecA蛋白の場合と異なりATPの添加を必要としない。今年度の研究では、Rad51C蛋白を単独で精製することに成功した。電子顕微鏡観察の結果では、Xrcc3蛋白とRad51C蛋白との複合体、Rad51C蛋白単独でDNAと繊維状の複合体を作ることが分かった。現在得られている分解能では複合体とRad51C蛋白単独との間では違いが認められなかった。この観察結果から予測されるようにRad51C蛋白は単独でもDNA結合能を示し、ヘテロ二本鎖形成反応を行うことが分かったが、いずれも、Xrcc3蛋白が共存したときに比べて極めて活性が低かった。このことは、Rad51C蛋白のDNAへの結合、活性の制御にXrcc3蛋白との直接作用が働いていることを示唆する。

(2) 大腸菌DinIの構造とRecA蛋白不活性化機構

大腸菌のRecA蛋白は、ATPとの結合、ATP分解で、自身のDNAへの結合の強さを制御することによって、ヘテロ二本鎖形成、安定化の反応全過程を行う。一方、ヒトのRecA蛋白ホモログは、Rad51C蛋白-Xrcc3蛋白、Xrcc3-HsRad51蛋白

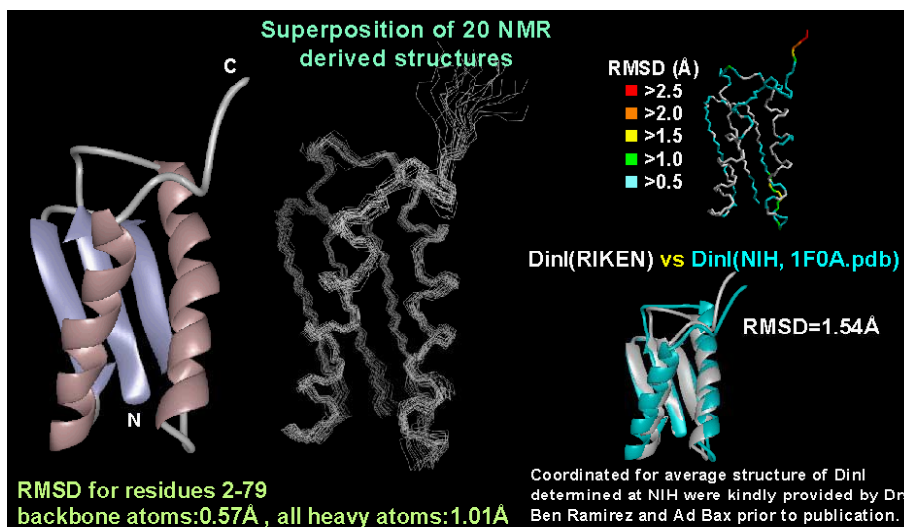


図1 . NMRによって解かれたDinI蛋白の立体構造

白、HsRad51蛋白-BrcA2 蛋白などのようにRecA蛋白ホモログ同士、他の蛋白と、互いの直接作用のネットワークを持つ。一方、特にRad51C蛋白の場合は、上記のようにヘテロ二本鎖形成にATPを必要とせず、DNAへの結合の強さは、Xrcc3との会合によって支配されている。そこで、蛋白-蛋白相互作用による活性調節をRecA蛋白をモデルに分子構造の面から解析した。DinI蛋白は81アミノ酸残基からなる蛋白で、自身はDNAへの結合のを持たないが、DNA修復が完了した時点で、RecA蛋白に結合しそれを不活性型に戻す機能がある。まず、DinI蛋白の全構造をNMR 光法で決定した(図1)。次に、Transferred NOE 法によって、RecA蛋白に結合することによるオリゴ一本鎖DNAの伸長構造の誘導は、DinIが、RecA 蛋白に結合しても誘導されることが明らかになった。この結果は、DinIとの結合で、RecA蛋白がDNA結合能を失うという説を排除する。

動物細胞株でのゲノム改変技術

(1) ヒトとニワトリのBrca2遺伝子の一次構造の比較

Brca2遺伝子は、家族性の乳癌と卵巣癌の原因になる腫瘍抑制遺伝子である。Brca2は、相同DNA組み換えに参与するが、酵母に相同遺伝子が存在しない。Brca2のヌル変異は、細胞レベルで致死性である。我々は、Brca2のコンディショナルヌル変異細胞をDT40から作成する第一歩として、Brca2 cDNA (約10kb)のクローニングを行なった。ニワトリBrca2 cDNA のアミノ酸配列は、25%程度しか保存されておらず、これまで重要なモチーフと言われていた部分が必ずしも保存されていないことがわかった。

(2) Rad51パラログ遺伝子の機能解析

抗癌剤、シスプラチンによるDNA損傷を修復する機構の解析シスプラチンなどのクロスリンカーは、主にDNA複製中に2本鎖の間に共有結合(インターストランドクロスリンク)を作ることによって分裂細胞を殺す。我々の作成した相同組み換えのミュータントのうちRad54とRad51B (Rad51類似遺伝子群の1つ)の欠損細胞は、それぞれ同程度の放射線感受性を示した。しかしそれと対照的に、Rad51B 欠損細胞のみがシスプラチンやマイトマイシン-Cなどに非常に高感受性であった。この所見は、クロスリンクに対しては放射線による損傷とは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す。

Rad51B 遺伝子の欠損細胞と似た表現型は、他のRad51類似遺伝子群であるRad51C、Rad51D、XRCC2、XRCC3の各遺伝子の欠損細胞でも観察された。この知見は、これらの遺伝子は相補的ではなく、むしろ5種類のRad51類似分子がコンプレックスを形成して相同DNA 組み換え反応に参加し、しかもそのコンプレックス形成に各分子が必須であることを示す。

(3) XRCC3とRad52の機能相補性

Rad52欠損がもっとも重症な表現型を示す酵母と異なり、動物細胞では、Rad51パラログ欠損は重症な表現型を示す（ノクアウトマウスは胎生致死）のに対してRad52欠損細胞はほとんど異常を示さない。生化学的解析により酵母の、Rad51パラログとRad52はどちらもRPA（1本鎖DNA結合タンパク）存在下に1本鎖DNA上でのRad51の重合を促進する機能を持つ。そこで、Rad52欠損細胞の相同組み換え能力がほぼ正常なのはRad51パラログがほぼ完全にその欠損を相補できるからであるという作業仮説をたてた。それを検証するためにRad51パラログの1つであるXRCC3とRad52との2重欠損株をDT40から作製した。驚いたことには、XRCC3やRad52の1重欠損株はそれぞれ増殖可能であるのに対して2重欠損株は致死性であった。よってこれらの分子は互いに相補的である。DT40細胞では5種類のRad51パラログ欠損株がそれぞれ同じ表現型を示すことから、このデータはRad51パラログとRad52が相補的であることを示唆する。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

H. Tsubouchi and H. Ogawa, : "Exo1 roles for repair of DNA double-strand breaks and meiotic crossing over in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Biol. Cell*, 11, 2221-2233 (2000)

Kurumizaka, H., Aihara, H., Ikawa, S. and Shibata, T. : "Specific defects in double-stranded DNA unwinding and homologous pairing of a mutant RecA protein", *FEBS Lett.*, 477, 129-134 (2000)

Fox, M. E., Yamada, T., Ohta, K. and Smith, G. R. : "A Family of CRE-related DNA sequences with meiotic recombination hotspot activity in *Schizosaccharomyces pombe*", *Genetics*, 156, 59-68 (2000)

Miyajima, A., Seki, M., Onoda, F., Shiratori, M., Odagiri, N., Ohta, K., Kikuchi, Y., Ohno, Y. and Enomoto, T. : "Sgs1 helicase activity is required for mitotic but apparently not for meiotic functions", *Mol. Cell. Biol.*, 20, 6399-6409 (2000)

Ling, F., Morioka, H., Ohtsuka, E. and Shibata, T. : "A role for MHR1, a gene required for mitochondrial genetic recombination, in the repair of damage spontaneously introduced in yeast mtDNA", *Nucleic Acids Res.*, 28, 4956-4963 (2000)

Smith, K. N., Penkner, A., Ohta, K., Klein, F. and Nicolas, A. : "B-type cyclins CLB5 and CLB6 control the initiation of recombination and synaptonemal complex formation in yeast meiosis", *Current Biology* 11, 88-97 (2001)

Takata, M., M. S. Sasaki, E. Sonoda, T. Fukushima, J. Albala, S. Swagemakers, R. Kanaar, L. H. Thompson and S. Takeda, : "Targeted disruption of the RAD51B, a member of RAD51-related gene family, impairs homologous recombination and

repair of crosslink DNA damages." *Mol. Cell. Biol.* 20: 6476-82 (2000)

Takata, M., M. S. Sasaki, S. Tachiiri, T. Fukushima, E. Sonoda, D. Schild, L. H. Thompson, and S. Takeda, : "Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs." *Mol. Cell. Biol.* 21 : 2858-66(2001)