

「ゲノムの構造と機能」
平成12年度採択研究代表者

武田 俊一

(京都大学大学院医学研究科 教授)

「高等真核細胞で標的組み換えの効率を上昇させる方法の開発」

1. 研究実施の概要

研究のねらい

- (1) DT40を含むニワトリBリンパ細胞株でのみ、なぜ高頻度に標的組み換えが起るかを解明する。
- (2) ヒトや植物細胞で標的組み換え効率を上昇させる方法を開発する。
- (3) DNA組み換えに関与する遺伝子の、細胞レベルでの機能の同定。

平成12年度までの研究成果

酵母の遺伝学的解析より相同DNA組み換えに直接に関与する遺伝子は12種類単離され、これらの各遺伝子についてヒト相同遺伝子が合計13種類も存在することが解明された。これらの遺伝子の全ノックアウトクローンがDT40から既に作製された。各クローンは例外なく標的組み換え効率が低下していた。ただしノザンプロット解析で調べる限り各遺伝子の発現パターンは、標的組み換え効率が低いニワトリTリンパ細胞株とDT40との間で違いがなかった。また、相同DNA組み換えはDNA複製時に生じる損傷を修復するために体細胞の分裂中におそらく数十回の頻度で起っていることを解明した。

平成13年度のプロジェクト

以下の6プロジェクトを行なう

種々の遺伝子のDT40ノックアウトクローンの作成

標的組み換えの効率が高い細胞株とそうでない細胞株の間での、遺伝子発現パターン(転写とタンパクレベル)の比較

標的組み換え効率の低いニワトリBリンパ細胞株の検索と標的組み換え効率の低いDT40ミュータントの作成

発現cDNAライブラリーによる遺伝子クローニング

プロテオノミックスの手法による遺伝子ノックアウトクローン間の比較

人工的に標的組み換え効率を上昇させる実験方法の開発

進め方

上記の の研究が中心である。 では、相同組み換え機構は、DNA複製、チェッ

クポイント、他のDNA修復経路（特にミスマッチ修復とDNA複製後修復経路）と機能的に相互作用していることが解明されている。それぞれの経路に關与する遺伝子のノックアウトをDT40細胞で行い、各変異クローンの標的組み換え効率を定量する。我々は、相同遺伝子をノックアウトしても、DT40とマウスES細胞の間で完全には同じ表現型を示さない事例をいくつか経験している。この相違点が、DT40特異的に機能する相同組み換え機構を解明するヒントになる可能性が高いことは言うまでもない。この相違点をもとに上記のスクリーニング方法をデザインする。

このプロジェクトは以下のように進める。上に記述したDNA複製後修復経路はユビキチン化酵素によって制御されていることが遺伝学的解析からわかっているが、その基質は不明のままである。相同組み換えに關与する分子の多くは互いに結合してコンプレックス（Rad51と家族性乳癌の原因遺伝子Brca2などよりなるコンプレックスなど）を形成する。コンプレックスの構成因子の1つをノックアウトすることによりコンプレックス構成因子全体を不安定化できる可能性がある。ゆえに、ユビキチン化酵素のノックアウト細胞（ Δ rad18、作成済み）やコンプレックス構成因子のノックアウト細胞と野性型細胞の、タンパク発現パターンをプロテオミックスの手法によって比較して、ユビキチン化基質やコンプレックスの構成因子を同定することを試みる。

今後の見通し

相同組み換え機構は、酵母を使った遺伝学的解析により研究が高度に進み、かつ酵母からヒトまで保存されていることが解明されている。ゆえに、数年以内にはヒト細胞やDT40細胞での標的組み換え機構の詳細が解明されるであろう

2. 研究実施内容

(1) 相同DNA組み換えに關与するDNAポリメラーゼの同定

相同DNA組み換えは必ずDNA合成のステップを経て完了するが、これに關与する遺伝子は酵母でも完全には解明されていない。近年、酵母での研究の結果を基に、ヒト・マウスなどの動物細胞においてもDNA複製時における損傷乗り越えの機構が明らかにされつつある。最近新たに同定された8種類のDNAポリメラーゼがある。その中にはpol α （ヒトmus308や線虫mus-1のホモログ）のようにDNAヘリカーゼとDNAポリメラーゼが1つの遺伝子にコードされ、シスプラチンなどのDNA架橋剤による損傷の修復に關わりと予測されるものもある。又、酵母ではこれらのポリメラーゼはRad18と呼ばれるユビキチンリガーゼによって活性を制御されているが、それが動物細胞でもあてはまるか否かは不明である。ヒト細胞でのこれらの機能は、pol η （バリエーション色素性乾皮症の原因遺伝子）以外には分かっていない。これらのDNAポリメラーゼの機能解析、特に相同DNA組み

換えへの関与を解明するために、それぞれの遺伝子のノックアウトDT40細胞を作製する。

結果：8種類のDNAポリメラーゼのうちpol ζ とDinBと呼ばれる分子とRad18のノックアウト細胞を作製した。いずれも細胞レベルで致死でなく、紫外線に対して感受性を示した。標的組み換え効率はそれぞれ少しだけ低下していた。

(2) Mre11/Rad50/Nbs1の一次構造 - 機能の関係の解析

Mre11、Nbs1のヌルDT40細胞を既に作製し（Nbs1は広島、小松研より譲渡）、Rad50ヌルDT40細胞の作製を試みている。これらの分子のリン酸化に注目して、リン酸化状態およびリン酸化サイトの変異cDNAをヌル細胞で発現する。リン酸化状態葉、ヒト細胞でも種々の条件で解析する。酵母Mre11は、相同DNA組み換え、チェックポイント、end-joiningの3つの反応に関与するので、初期にDNA損傷部位にリクルートされ、3つの反応を制御している可能性がある。そして、個別の反応の制御が、Mre11分子中の種々の部位のリン酸化によって制御されている可能性がある。

結果：Mre11の特定部位のSQサイトが放射線照射後にATキナーゼ依存性にリン酸化されることを証明した。さらに、このSQサイトの変異Mre11分子を *MRE11*^{-/-} 細胞やA-T細胞で発現することによって、このサイトのリン酸化がDNA損傷後のG2/Mチェックポイントに関与することも証明した。今後、他のSQサイトについても放射線や紫外線照射後のリン酸化もパターンをchk1、chk2、Nbs1、DNA-dependent protein kinaseなどの各ミュータント細胞で系統的に解析する予定である。

(3) XPFとXPGのDNA組み換えへの関与の解析

XPFとXPGは、ヌクレオチド除去修復に関与すると同時に、ある種のDNA組み換え反応にも関与することが示唆されている。特に、XPF欠損マウスES細胞は、標的組み換え効率に関しては、Rad54欠損より重篤な表現型を示す。これらの遺伝子のノックアウト細胞を作製し、既に作製済みのXPA遺伝子欠損株（ヌクレオチド除去修復のみに関与）の表現型と比較することによって、これらの分子が標的組み換えにはたす役割をDT40細胞で解析する。まだデータが出ていない。

(4) DNA2重鎖切断部位のヒストンH2AXのリン酸化の機能解析

放射線照射によってDNA2重鎖切断が起こった数分後には、その部位付近に存在するヒストンH2AX、数百分子の特定アミノ酸（セリン）がリン酸化される。このDNA2重鎖切断に伴うリン酸化は、酵母からヒト細胞まで保存された機構であるが、その生理的意義は不明である。我々は、中山グループと共同でDT40細胞を使ってH2AXノックアウト細胞の作製を試みたが、ヘテロ(+/-)細胞しか作れずにホモ(-/-)ミュータント細胞は作製できなかった。このデータは、H2AXノッ

クアウト細胞は致死であることを示唆するので、現在、コンディショナルミュートアントの作製を試みている。

3．主な研究成果の発表（論文発表）

無し