

「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

世代間のみならず、個体発生・老化過程でもゲノム構成は動的存在である。この事実は、遺伝や進化だけでなく、老化、ガン化、遺伝疾患にも深く関わる。ゲノム動態を司る DNA 組換えの機構と制御の理解は、ゲノム制御の新技术の素材と結果予測・安全評価の理論基盤を提供できる。本研究は、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、新技术の基盤構築を目指す。提案者らが明らかにした生物界で普遍的な組換え蛋白質群・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、高頻度標的組換えができる唯一の高等動物細胞系(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 13 年度までに、原子スケール分解能での NMR 分子構造解析を含む研究で、相同的組換えは、DNA 特有の分子構造に依存した機能であることが示され、また、生物進化での重要な新遺伝子獲得機構であることが示唆された。一方、環状 AMP 依存性キナーゼ経路など 3 種のシグナル伝達経路の複合的支配下で、栄養飢餓ストレスにより、開始 cis 作動配列部位でクロマチン構造を開き、二本鎖 DNA 切断を導入することで組換えが誘導されることを明らかにしてきた。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、そこに働く蛋白質の一つは、CREB/ATF ファミリー転写因子の一つである。また、天然の CRE 様配列でも同様なクロマチン構造変化が示され、それらも組換え開始部位として機能する可能性が示された。一方、Mre11 蛋白質複合体は二本鎖 DNA 切断に反応する細胞周期チェックポイント制御のセンサー機能をも持つことが示され、相同組換え制御での重要性について更に理解を深めた。以上から、生体が生存に適さない環境に置かれると、ストレス応答転写制御、細胞周期制御に関わる因子群を借用して相同組換えを誘導して新機能の遺伝子を作ることで環境変動に適応してきたという像が見えてきた。他方、Rad52 蛋白質など相同 DNA 組換えでは、Rad51 蛋白質を助ける脇役と考えられていた蛋白質群も、それ自身ヘテロ二本鎖を作る活性を持つこと、RecA/Rad51 族蛋白質より広範囲の相同組換えに関わること、ミトコンドリアの相同組換えではむしろ主役であることが明らかになった。この研究の延長上で、遺伝子校正、ゲノム育種・改良などを進化の原理に添った形で行えるようになると期待される。

## 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、ゲノム技術面では標的組換え効率、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高頻度標的組換えをする唯一の高等動物細胞系である鳥類 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。

### 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) 組換え関連蛋白質・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 蛋白質による相同的対合反応(柴田)、真核生物の RecA ホモログ (Rad51 蛋白質 (小川))、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 (小川)、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 (太田)、高頻度標的組換え DT40 細胞 (武田) は全て提案者グループのオリジナルである、(5) 蛋白質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=>蛋白質構造・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 13 年度の成果

### 組換え開始制御、組換え修復に働く多機能蛋白質、Mre11

#### (1) Tel1 と Mre11 の複合体によって制御されている新 DNA 傷害チェックポイント経路(小川他)

Tel1 と Mre11 の複合体によって制御されている新 DNA 傷害チェックポイント経路を発見した。この Tel1-Mre11 複合体経路は、体細胞分裂期には、Rad53 の活性化と Rad53-Rad9 の相互作用を誘導して情報伝達を行うが、減数分裂期には Rad53-Rad9 の代わりに Mre4/Mek1 を通じて行う。この経路の活性化には、Mre11-Rad50-Xrs2 複合体(Mre11 複合体)が DNA 傷害のセンサーの役割を果たしている。このセンサーが検出する DNA 傷害は、少なくとも減数分裂期には、DNA 二重鎖切断で、その切断端がプロセスを受けていないものである。そしてこの経路が活性化されると、Mre11 複合体の DNA 二重鎖切断修復機能が促進される。このことから、Mre11 複合体の機能変化の仕組みが明らかになった。つまり Mre11 複合体は、プロセスされる前の DNA 二重鎖切断を検知して、Tel1-Mre11 複合体 DNA 傷害チェックポイント経路を活性化するが、活性化された経路は、今度は逆に Mre11 複合体に働き、その DNA 二重鎖切断修復能を促進する事が明らかになった。

#### (2) 組換え蛋白質 Mre11 複合体の多機能性と Xrs2 蛋白質の役割(塚本他)

Mre11-rad50-Xrs2 複合体は相同組換えや DNA 末端同士を直接繋ぐ DNA 二本鎖切断修復、細胞周期チェックポイント制御、テロメア複製、減数分裂においても DNA に二本鎖切断を導入するなど相同組換えの初期過程に重要な働きを果たすなど、多く生体機能を持っている。その酵素活性の主役を担うのは Mre11 で、DNA nuclease 活性、unwinding 活性、annealing 活性などを持つが、それらをどのように使い分けているかは分かっていない。我々は Xrs2 が Mre11 複合体の活性を制御する因子であると考え、特定の機能が欠損した *xrs2* 変異株を単離した。テロメア複製に欠損を示すが、細胞周期チェックポイント制御は正常な変異株、またはテロメア複製は正常だが、細胞周期チェックポイント制御に欠損を示す変異株などが得られ、またこれらの変異株が減数分裂の際の相同組換えや DNA 末端連結反応に異常を示すか現在調べている。遺伝学的解析から、Xrs2 蛋白質が Mre11 の酵素活性を調節していることが示唆されたので、現在 *in vitro* 系の構築などの実験を進めており、Xrs2 蛋白質による制御調節機構について詳細な解析を行っている。

#### (3) Mre11 蛋白質による減数分裂期転写制御の可能性(太田 他)

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、また孢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、孢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孢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。これら全ての遺伝子の制御領域には減数分裂中期遺伝子の発現に必要な Middle Sporulation Element (MSE) と言う配列が見出された。また、抗 Mre11 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法を行

ったところ、減数分裂初期に Mre11 が一群の MSE 配列の周辺に顕著に集積していることが明らかになった。おそらくは、MSE に結合する転写因子 Ndt80 の転写活性化に Mre11 蛋白質が何らかの形で寄与していること、言い換えると、Mre11 蛋白質もまた広い意味での転写因子であることが示唆された。また、以上の結果は、組換えの制御と組換え以降に起きる配偶子形成のための遺伝子活性化が分子レベルでリンクしている可能性を示唆する。

#### 組換え制御に働く染色体構造動態

(1) 分裂酵母の減数分裂期組換え開始制御 cis 作動配列、CRE 様配列におけるクロマチン再編成の普遍性(太田、水野 他)

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ことで減数分裂期に周辺のクロマチン再編成を誘導し組換え酵素の接近を助け、組換えが活性化されると考えられる。今回、遺伝学的な解析(米国 G. Smith 博士との共同研究)の結果、新たに数種の配列が同様の組換え活性化、クロマチン再編成誘導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。これらの CRE 様配列はストレス応答に関わる種々の遺伝子の転写制御領域などに多く見られるが、これら天然の CRE 類似配列でも類似したクロマチン再編成が起きることを見出した。以上から、分裂酵母染色体に存在する多数の 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、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。

(2) ストレス応答 MAP キナーゼや減数分裂誘起シグナルによるクロマチン再編成の制御(太田、水野 他)

分裂酵母の CREB/ATF 型転写因子 Aft1-Pcr1 ヘテロ二量体が、CRE 類似配列である 7 塩基配列特異的に結合することで誘導されるクロマチン再編成が、性分化を誘導するシグナル伝達経路(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)によって複合的に制御されていることを、それぞれの経路に特異的に働く遺伝子の変異の効果を解析することで示した(水野 他; Genetics)。これらの結果は、栄養飢餓ストレス下で倍数体細胞が、転写因子群を使って染色体構造レベルで相同組換えを誘導する機構を示す。また以上の結果は、ストレス応答キナーゼと環状 AMP キナーゼ経路が、相反的にクロマチン再編成の制御に関わる事を示した最初のデータである。

(3) M26 クロマチン再編成におけるヒストンアセチル化の関与(太田、水野 他)

分裂酵母組換えホットスポット M26 におけるクロマチン再編成の分子機構を調べる目的で、ATP 依存型クロマチンリモデリング因子およびヒストンアセチル化酵素の関与について検討を始めた。まず、組換え開始以前の減数分裂期初期に M26 アリルに依存したヒストン H3 および H4 のハイパーアセチル化が観察された。このアセチル化は M26 配列結合因子である Aft1 に完全に依存していた。Aft1 には、ヒストンアセチル化酵素活性は存在していなかったため、Aft1-Pcr1 が M26 ホット

スポット配列に結合することにより、何らかのヒストンアセチル化酵素が呼び込まれた可能性が示唆された。

分裂酵母のゲノム配列データベースのうちで最もヒトと出芽酵母の Gcn5 ヒストンアセチル化酵素に類似した遺伝子について解析を行った。大腸菌抽出液から精製したこのリコンビナント遺伝子産物は、ヒトヌクレオソーム八量体のヒストン H3 を特異的にアセチル化する活性を有していた。点突然変異を導入実験により、同遺伝子がヒストンアセチル化酵素 Gcn5 の分裂酵母ホモログ(SpGcn5)であり、SpGcn5 が M26 におけるヒストンアセチル化に関与することが判明した。また、この変異株では M26 における減数分裂時のクロマチン再編成が遅れて起きることを観察した。現在組換えや M26 における DNA 二本鎖切断に対する影響を調べている。

#### 組換えとその制御に働く分子機構

##### (1) ヒト Xrcc3 蛋白質と Rad51 蛋白質 C 蛋白質との複合体の組換え機能(胡桃坂、井川 他)

プログラムされた二本鎖 DNA 切断は相同組換えにより、損傷として導入された二本鎖 DNA 切断は、相同組換えまたは非相同末端再結合により修復される。相同組換え修復の特徴は、二重鎖切断を受けた DNA 部位を、無傷の相同染色体、または姉妹染色分体を鋳型として1塩基の間違ひもなく修復できる点にある。そのためには、二重鎖切断部位と、相同な塩基配列を持つ DNA 配列を相同染色体中、姉妹染色分体中より探し出して対合させ、相同組換えの普遍的中間体であるヘテロ二本鎖を形成(相同 DNA 対合反応)する必要がある。相同 DNA 対合反応を行う蛋白質として、原核生物では RecA 蛋白質が、真核生物では Rad51 蛋白質が報告されている。加えて、ヒトでは、Rad51 蛋白質とおおよそ 20%の相同性を有する 5 種類の Rad51 蛋白質パラログ(Xrcc2, Xrcc3, Rad51B, Rad51C, Rad51D)、Rad51 蛋白質と直接相互作用するタンパク質群(Rad52, Rad54, RPA)などが同定され、Rad51 蛋白質を中心とする超分子複合体である“相同組換え装置”の存在が示唆されている。

ところが酸化的損傷のため二重鎖 DNA 切断を高頻度で受ける脳において、相同組換え反応の中心酵素である Rad51 蛋白質がほとんど発現しておらず、脳では、Rad51 蛋白質に依存しない相同組換え修復経路が存在することが示唆されていた。そこで、これら Rad51 蛋白質関連因子の中で、脳における発現が顕著である Xrcc2 蛋白質および Xrcc3 蛋白質に着目し、それらの相互作用因子を、ヒトの脳由来の cDNA ライブラリーを用いて Two-hybrid 法によりスクリーニングした結果、ヒトの脳において、Xrcc2 蛋白質は Rad51D 蛋白質と、Xrcc3 蛋白質は Rad51C 蛋白質と特異的に複合体を形成することを明らかにした。大腸菌で共発現し、精製した Xrcc2-Rad51D 複合体および Xrcc3-Rad51C 複合体のそれぞれの生化学的および電子顕微鏡解析の結果、これらの蛋白質複合体が、Rad51 蛋白質非依存的に相同 DNA 対合反応を行うこと、単鎖 DNA と結合してフィラメント状の複合体を形成すること、そして DNA 非存在下ではリング状の多量体を形成することなどを見いだした。Xrcc2-Rad51D 複合体のリング構造は、Rad51 蛋白質の相互作用因子の1つである Rad52 蛋白質のそれと酷似していた。そして Rad52 蛋白質が、リング構造のみならず、相同 DNA 対合活性においても Xrcc2-Rad51D 複合体および Xrcc3-Rad51C 複合体と同様であることを明らかにした。

これらの結果は、らせん状繊維構造を基盤とする RecA/Rad51 族とは異なり、Xrcc2-Rad51D 複合体および Xrcc3-Rad51C 複合体、そして Rad52 蛋白質は、リング構造を基盤として相同 DNA 対合反応を行う新規の組換え蛋白質クラスであることを示した。この新しいクラスの組換え酵素の反応機構を明らかにするために、Rad52 蛋白質の機能ドメインの解析を行った。そして、Rad52 蛋白質は、N 末端側の約 200 アミノ酸の領域で DNA 結合、相同 DNA 対合反応など組換え反応に重要な活性を担い、そして C 末端領域で Rad51 蛋白質との結合を行うことが明らかになった。このことは、N 末端領域が Rad52 蛋白質の組換え触媒部位であることを示している。そこで、この Rad52 蛋白質の組換え触媒領域である 1-212 アミノ酸領域を含む欠変異 Rad52 (Rad521-212) 蛋白質を作製し、その高次構造を X 線結晶構造解析によって行った。そして、2.85 オングストロームの分解能で Rad52 リングの立体構造を決定した。全長の Rad52 蛋白質は 7 量体を形成することが報告されているが、Rad521-212 蛋白質は、11 量体のリング構造を形成することが明らかになった。実際に、Rad52 蛋白質の N 末のみからなる isoform がヒトで確認されており、さらに出芽酵母では Rad52 蛋白質の N 末領域のホモログである Rad59 蛋白質が見出され、これらの DNA 組換え反応への関与が明らかにされつつある。さらに、Structure-based mutagenesis により、11 量体リングの外周に相同 DNA 対合反応を触媒するための DNA 結合溝が存在することを見いだした。

## (2) ミトコンドリア相同組換えに働く相同 DNA 対合反応 (凌 他)

ミトコンドリア DNA (mtDNA) の相同組換えの存在は、哺乳類細胞ではごく最近まで知られていなかったが、酵母、カビ、植物界では普遍的である。酵母ミトコンドリアには、RecA/Rad51 族蛋白質の存在は、2 種の酵母について全ゲノム DNA 塩基配列解析が完了して数年経つ現在でも見つかっていない。ミトコンドリア相同組換え欠損変異の最初の例として我々がパン酵母から分離した *mhr1-1* 変異を相補する DNA 群から、*MHR1* 遺伝子を単離し、大腸菌で発現させて Mhr1 蛋白質を精製した。この蛋白質は、RecA 蛋白質と異なり、ATP に依存せずに相同 DNA 対合反応を行うことを見いだした。*mhr1-1* 変異をもつ *mhr1-1* 蛋白質は、相同 DNA 対合反応活性を持っていなかったことからこの変異の組換え欠損と mtDNA 修復欠損表現型とを合わせて、Mhr1 蛋白質が、酵母ミトコンドリアにおいて RecA 蛋白質に代わって相同組換えにおいてヘテロ二本鎖形成反応を行うと結論した。前項の、Xrcc2-Rad51D 複合体および Xrcc3-Rad51C 複合体、Rad52 蛋白質の相同 DNA 対合反応を行う新クラスの蛋白質は、いずれもこの反応に ATP を必要としない点で、RecA/Rad51 族蛋白質と異なる。Mhr1 蛋白質もこのクラスに属する蛋白質である。更に、これまで、それぞれ出版論文が一つ宛しかなく、半ば無視されていた大腸菌の RecT 蛋白質、RecO 蛋白質も機能的にはこのクラスに属する。一方、ミトコンドリア以外でも、大腸菌の  $\lambda$  ファージ、プラスミド、酵母染色体中にある数 kbp 程度の相同配列間での組換え等、RecA/Rad51 族蛋白質を使わない相同組換えの例が知られているが、こうした RecA/Rad51 族蛋白質に依存しない相同的組換えには ATP を使わずに相同 DNA 対合反応を行う蛋白質が働く。このように、ATP を使わずに相同 DNA 対合反応を行う蛋白質クラスは、原核生物から真核生物の細胞核、ミトコンドリアにまで分布する普遍性の高い蛋白質群である。また、RecA/Rad51 族蛋白質に依存する相同組換えと依存しない相同組換えとの比較は、RecA/Rad51 族蛋白質の ATP 依存反応の生物学的機能について新たな示唆

を与える。なお、Rad51 蛋白質に類似した Xrcc2 蛋白質などを除くと、このクラスの蛋白質の相互間にはアミノ酸配列に全く類似性が見いだすことができなかった。

### (3) 組換え蛋白質上の DNA 結合部位周辺の立体分子構造 (伊藤、美川 他)

RecA/Rad51 族蛋白質が行う組換え反応を原子レベルで明らかにする試みで、RecA/Rad51 族蛋白質で高度に保存されている領域(コアドメイン)に注目し、その機能と構造の関係について調べた。可溶性コアドメインのみの調製に成功し、その生化学的解析から、コアドメインが組換え反応に必要な大部分の活性を保持していることを明らかにした。さらに、NMR 分光法を用いてコアドメインと基質 DNA との相互作用を解析し、コアドメインが ATP を結合することにより構造変化を起こし、その結果基質 DNA に対する結合力を増すことを明らかにした。

### 動物細胞株でのゲノム改変技術

我々は、標的組み換えが容易なニワトリ B リンパ細胞株、DT40 で系統的に DNA 組み換えに関与する既知の様々な遺伝子をノックアウトすることにより、各 DNA 組み換えの機能を解析した。以下に我々の研究業績を3項目にわけて説明する。

#### (1) Rad51 パラログの機能解析 (武田 他)

相同 DNA 組み換えは、生殖細胞が減数分裂するときに起こることが知られている。我々は細胞分裂のときに DNA 複製に伴う損傷を修復するために、相同 DNA 組み換えがおそらく数十回/分裂の頻度で起っていることを示した。相同 DNA 組み換えは、少なくとも十数種類のタンパク分子 (RAD52 エピスタシスグループと呼ぶ) によって進行する。そのなかで中心的な役割をもつ分子が大腸菌の RecA ホモログである Rad51 である。さらに RAD52 エピスタシスグループのなかには Rad51 パラログ分子 (Rad51 と構造が似た分子) が合計5種類 (Rad51B、Rad51C、Rad51D、XRCC2、XRCC3) 存在する。我々は、これらの各ノックアウト細胞を作製し、これらが Rad51 の補助因子として機能することを示した。さらに抗体遺伝子座においてノックアウト細胞で点変異が高頻度で蓄積することを示した。

#### (2) Rad51 パラログと Rad52 の機能の相補性 (藤森、園田、武田 他)

Rad52 は、酵母では相同 DNA 組み換えでもっとも重要な機能をもつが、マウスやニワトリでは Rad52 欠損では異常な表現型がほとんど顕われない。我々は、XRCC3 欠損細胞より Rad52/XRCC3 2重欠損細胞がはるかに強い異常が出現することから、(i) Rad52 は高等真核細胞で重要な機能をもつこと、(ii) ただし Rad52 の機能は Rad51 パラログのそれとオーバーラップしているために、Rad52 が欠損してもほとんど異常が出現しないこと、の2点を解明した。

#### (3) 相同 DNA 組み換えと非相同性 DNA 切断端結合との機能的相互作用 (武田 他)

DNA2重鎖切断は1サイトでも修復されないままに残ると致死性である。DNA2重鎖切断の修復経路には、相同 DNA 組み換えと非相同性 DNA 切断端結合との2種類がある。これらの経路の関係を解析するために、これら2種類の経路の2重欠損細胞を作製したその結果、これらの経路は、互いに相補的であると同時に競合的な関係でもあることがわかった。非相同性 DNA 切断端結合が欠損すると標的組み換えの相対的な効率も上昇することも解明した。

### 3. 研究実施体制

#### (1) DNA 鎖切断導入・修復、ゲノム流動化制御遺伝子グループ

##### ① 研究者名(所属、役職)

小川英行 岩手看護短期大学 学長

##### ② 研究項目

DNA 鎖切断導入・修復、ゲノム流動化制御遺伝子特に *MRE11* の細胞周期チェックポイントへの関与の仕方について

#### (2) 染色体レベルのゲノム流動性・恒常性制御研究グループ

##### ① 研究者名(所属、役職)

柴田武彦 理化学研究所 遺伝生化学研究室 主任研究員

##### ② 研究項目

染色体レベルのゲノム流動性・恒常性制御:組換え開始制御に働くクロマチン構造とその制御タンパク群の構造と機能の解析

#### (3) 動物細胞株でのゲノム改変技術研究グループ

##### ① 研究者名(所属、役職)

武田俊一 京都大学大学院 医学研究科 放射線遺伝学研究室 教授

##### ② 研究項目

トリ DT40 細胞を用いた、ヒト組換え蛋白群、その変異蛋白の細胞機能解析

### 4. 研究成果の発表

#### (1) 論文発表

- Shibata, T., Nishinaka, T., Mikawa, T., Aihara, H., Kurumizaka, H., Yokoyama, S., Ito, Y.: “Homologous genetic recombination as an intrinsic dynamic property of a DNA structure induced by recA/Rad51-family proteins: A possible advantage of DNA over RNA as genomic material.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 8425-8432 (2001).
- Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ikawa, S., Yokoyama, S., and Shibata, T.: “Homologous pairing promoted by the human Rad52 protein.” *J. Biol. Chem.*, 276: 35201-35208 (2001).
- Mizuno, K., Hasemi, T., Ubukata, T., Yamada, T., Lehman, E., Kohli, J., Watanabe, Y., Iino, Y., Yamamoto, M., Fox, M. E., Smith, G. R., Murofushi, H., Shibata, T. and Ohta, K.: “Counteracting regulation of chromatin remodeling at a fission yeast cAMP responsive element-related recombination hotspot by stress-activated protein kinase, cAMP-dependent kinase and meiosis regulations.” *Genetics* 159: 1457-1478 (2001).
- Kurumizaka, H., Ikawa, S., Nakada, M., Eda, K., Kagawa, W., Takata, M., Takeda, S., Yokoyama, S. and Shibata, T.: “Homologous-pairing activity of the human DNA-repair proteins Xrcc3•Rad51C.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 5538-5543 (2001).
- Takata, M., Sasaki, M.S., Tachiiri, S., Fukushima, T., Sonoda, E., Schild, D., Thompson,



- L.H., and Takeda, S.: "Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs." *Mol. Cell Biol.*, 21: 2858-2866 (2001).
- Fujimori, A., Tachiiri, S., Sonoda, E., Thompson, L.H., Dhar, P.K., Hiraoka, M., Takeda, S., Zhang, Y., Reth, M., and Takata, M.: "Rad52 partially substitutes for the Rad51 paralog XRCC3 in maintaining chromosomal integrity in vertebrate cells." *EMBO J.*, 20: 5513-5520 (2001).
  - Sale, J.E., Calandrini, D.M., Takata, M., Takeda, S., and Neuberger, M.S.: "Ablation of XRCC2/3 transforms immunoglobulin V gene conversion into somatic hypermutation." *Nature (London)*, 412: 921-926 (2001).
  - Fukushima, T., Takata, M., Morrison, C., Araki, R., Fujimori, A., Abe, M., Tatsumi, K., Jasin, M., Dhar, P.K., Sonoda, E., Chiba, T., and Takeda, S.: "Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair." *J. Biol. Chem.*, 276: 44413-44418. (2001).
  - Adachi, N., Ishino, T., Ishii, Y., Takeda, S., and Koyama, H.: "DNA ligase IV-deficient cells are more resistant to ionizing radiation in the absence of Ku70: implications for DNA double-strand break repair." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 12109-12113 (2001)
  - Sonoda, E., Takata, M., Yamashita, Y.M., Morrison, C., and Takeda, S.: "Homologous DNA recombination in vertebrate cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 8388-8394. (2001).
  - Usui, T., Ogawa, H. and Petrini, J. H. J.: "A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex." *Mol. Cell*, 7, 1255-1266 (2001).
  - Tsukamoto, Y., Taggart, A.K., and Zakian, V.A.: "The role of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomerase-mediated lengthening of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres." *Curr. Biol.*, 11: 1328-1335. (2001).

(2) 特許出願

なし