

「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 本申請書の研究目的は、動物細胞で増殖中に起こる多数のゲノム DNA 損傷とその修復システムについて様々な DNA 修復経路の変異クローンを作成することによって解明することにある。この目的のために、標的組み換え効率が高いため動物細胞で唯一系統的な遺伝学的解析が可能なニワトリ B リンパ細胞株、DT40 を使い、系統的に遺伝子ノックアウト細胞を作製する。
- ② 相同 DNA 組み換えは、DNA 損傷修復システムの1つの経路である。この相同 DNA 組み換えを特に重点的に解析することにより、ニワトリ B リンパ細胞株でなぜ高効率に標的組み換えが起こるかを解明する。

{成 果}

酵母を使った遺伝学的解析からこれまで15種類の相同 DNA 組み換えに関与する遺伝子が単離され、そしてそれらのヒトホモログも場合によっては複数種類(合計18種類)見つかった。これらのホモログのなかの12種類の遺伝子の欠損細胞を既に作製し、その表現型を解析した。

{今後の見通し等}

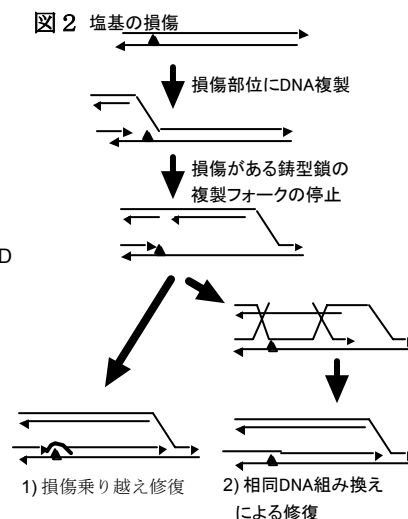
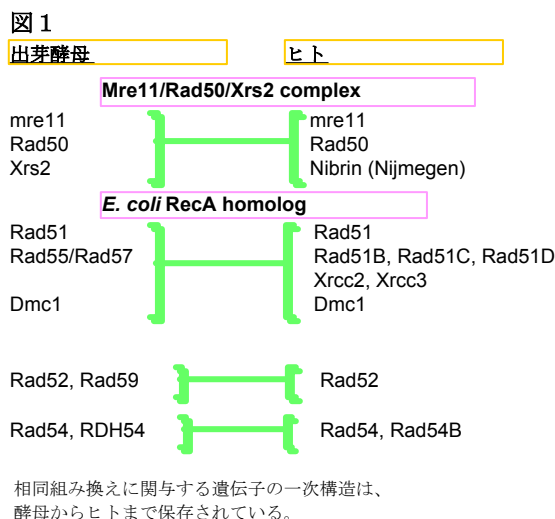
DNA 組み換えに関与する遺伝子がコンスタントに発見されている。我々は、これらの遺伝子の変異株を作製することにより、いかなる哺乳動物細胞株よりも多種類のミュータントが使えるという実験系のメリットをより拡大できる。そして既知遺伝子を網羅的に解析する方法によって、概要②の目標を達成できるであろう。

2. 研究実施内容

① 遺伝子ノックアウト細胞の作製(論文2)

相同 DNA 組み換えに関与する遺伝子は、酵母からヒトまで保存されている(図1)。そして相同 DNA 組み換えは、生殖細胞が減数分裂するときにかか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。我々は、RAD52 エピスタシスグループの各分子の欠損細胞を系統的に作製、解析することにより、相同 DNA 組み換えの機能は以下の4種類の方法

で評価しうることを明らかにした(相同 DNA 組み換えの機能の低下の程度にしたがってよりローマ数字の高い異常が加わる):(I)標的組み換え効率、(II)姉妹染色分体交換、(III) late S - G2 期の放射線感受性、(IV)染色体段裂の自然発生。



② 相同 DNA 組み換えと DNA 合成とのあいだのリンク

相同 DNA 組み換えは、次の2点で DNA 合成とリンクしている。まず、相同 DNA 組み換えは、DNA 合成のステップを必ず伴うが、それに関与する DNA ポリメラーゼは酵母でもよくわかっていない。このステップにより組み換え中間体は安定化されるはずであり、標的組み換えの律速段階の1つであろう。もう1つのリンクは、相同 DNA 組み換えが DNA の塩基損傷によって停止した複製を回復させる2種類の複製後修復経路(図2、もう1つの経路が損傷乗り越え DNA 合成)の1つである点である。

最近新規 DNA ポリメラーゼが7種類以上単離された。これらの複製後修復経路への関与を解明するために、これらのポリメラーゼの欠損細胞を作製した。そして、Pol zeta は、従来予想されたように損傷乗り越え DNA 合成に関与するだけでなく、相同 DNA 組み換えにも関与することがわかった(論文作成中)。

③ コヒーシンの機能解析(論文 1)

姉妹染色分体はM期の中期までコヒーシンと呼ばれるタンパク分子群により結合する(コヒージョン)。そしてコヒーシンのなかで Scc1 と呼ばれる分子が分解されることが引き金になって、M 期は中期から後期に移行し、姉妹染色分体は互いに解離し紡錘糸によって各姉妹染色分体はそれぞれ両極に引かれていく。この姉妹染色分体のコヒージョンが、分体間の相同組み換えにも影響を与えるか否かを解明するために、Scc1 の条件致死欠損細胞を作製した。そして、コヒージョンが、相同組み換えにはそれほど重要ではないが、M 期においてこれまで知られていなかった機能を持つことを解明した。

④ DNA 組み換えに関与するタンパクの構造解析(伊藤グループ)

RecA や Rad51 などの、DNA 組み換えに関与する蛋白質の多くは、重合して DNA 分子に結合し、

生物機能を発揮する。NMR法は、生体内に近い条件での測定が可能で、相互作用の解析に優れているが、重合しやすい蛋白質や分子量の大きな蛋白質への応用は困難であった。これを解決するために、高分子蛋白質複合体の構造解析に向けたNMR測定手法、解析手法の開発を行った。

論文

1. Sonoda, E., Matsusaka, T., Morrison, C., Vagnarelli, P., Hoshi, O., Ushiki, T., Nojima, K., Fukagawa, T., Waizenegger, I. C., Peters, J.-M., Earnshaw, W. C., and Takeda, S. (2001) Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells, *Developmental Cell*, Vol.1: 759-770
2. E. Sonoda, M. Takata, Y. M. Yamashita, C. Morrison, and S. Takeda (2001) レビュー: Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98: 8388-8394

3. 研究実施体制

武田グループ

- ① 研究分担グループ長名(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 教授
- ② 研究項目
DT40の標的組み換えの遺伝学的研究を担当

伊藤グループ

- ① 研究分担グループ長名(所属、役職)
伊藤 隆 理化学研究所 遺伝生化学研究室 研究員
- ② 研究項目
DT40細胞由来の新規分子の構造及び生化学的解析

中山グループ

- ① 研究分担グループ長名(所属、役職)
中山 建男 宮崎医科大学 教授
- ② 研究項目
新規タンパク質の同定を担当

篠原グループ

- ① 研究分担グループ長名(所属、役職)
篠原 彰 大阪大学 助手
- ② 研究項目
生化学的解析、酵母 two-hybrid 解析を担当

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- H. Utsumi, K. Tano, M. Takata, S. Takeda, and M. M. Elkind.: “Requirement of homologous recombinational DNA double-strand break repair in the split-dose recovery.” *Radiation Research*, 155: 680–686. (2001)
- Wang H., Zeng Z.-C., Bui T.-A., Sonoda E., Takata M., Takeda S., Iliakis G., G Iliakis.: “Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the *RAD52* epistasis group.” *Oncogene*, 20: 2212–2224. (2001)
- Imamura, O., Fujita, K., Shimamoto, A., Tanabe, H., Takeda, S., Furuichi, Y. and Matsumoto, T.: “Bloom helicase is involved in DNA surveillance in early S phase in vertebrate cells.” *Oncogene*, 20: 1143–1151. (2001)
- Adachi, N., Tishino, 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)
- Sudo, T., Ota, Y., Kotani, S., Nakao, M., Takami, Y., Takeda, S. and Saya, H.: “Activation of Cdh1-dependent APC is required for G1 cell cycle arrest and DNA damage-induced G2 checkpoint in vertebrate cells.” *EMBO J.*, Vol.20: 6499–6508. (2001)
- Sonoda, E., Matsusaka, T., Morrison, C., Vagnarelli, P., Hoshi, O., Ushiki, T., Nojima, K., Fukagawa, T., Waizenegger, I. C., Peters, J.-M., Earnshaw, W. C., and Takeda, S. “Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells.” *Developmental Cell*, Vol.1: 759–770. (2001)
- E. Sonoda, C. Morrison, Y. M. Yamashita, M. Takata and S. Takeda.: “Reverse genetic Studies of homologous DNA recombination using the chicken B lymphocyte line, DT40.” *Philosophical Transactions of the Royal Society Series B*, 356, 356: 111–117. (2001)
- 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. U.S.A.* 98, 8425–8432. (2001)
- Nakayama, T. and Takami, Y. “Participation of histones and histone-modifying enzymes in cell functions through alterations in chromatin structure.” *J. Biochem.* 129, 491–499. (2001)
- Ahmad, A., Nagamatsu, N., Kouriki, H., Takami, Y. and Nakayama, T. “Leucine zipper motif of chicken histone acetyltransferase-1 is essential for in vivo and in vitro interactions with the p48 subunit of chicken chromatin assembly factor-1.” *Nucleic Acids Res.* 29, 629–637. (2001)
- Kim, J.-M., Maraboeul, F., Kim, S.K., Shinohara, A., and M. Takahashi.: “Effect of ions and

nucleotides on the interaction of yeast Rad51 and E. coli RecA proteins with single-stranded oligonucleotides.” *J. Biochem.* 129. 469-475. (2001)

- Hong, E. L., Shinohara, A., and D. K. Bishop.: “S. cerevisiae Dmc1 protein promotes renaturation of ssDNA and assimilation of ssDNA into homologous super-coiled duplex DNA.” *J. Biol. Chem.* 276, 41906-41912.(2001)

(2) 特許出願

H13年度 なし