

「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

DT40を含むニワトリ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。

◆研究の概要

標的組み換えは、導入したDNAと染色体DNAとの相同DNA組み換え (homologous recombination = HR) である。HRの機構は、酵母からヒトまでほぼ保存されている (研究実施内容の図1参照)。我々は、酵母遺伝子のニワトリホモログ遺伝子をDT40細胞でノックアウトする逆遺伝学的解析により、高等真核細胞のHR機構を解析する。このような進化上の保存は、HR以外のDNA組み換え・修復機構にもあてはまる。そこで、HRと機能的に相互作用する組み換え・修復経路についても逆遺伝学的方法で解析をおこなう。

◆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。平成14年度は、DNAポリメラーゼとBrca2 (家族性乳癌原因遺伝子) とを主に解析した。

◆今後の見通し等

DNA組み換えに関与する新規遺伝子が複数種類分裂酵母で見つかり (分担研究者、岩崎グループおよび阪大、品川研究室)、そのヒト・ニワトリホモログと考えられる遺伝子も同時に見つかっている。

2003年度中にニワトリゲノムプロジェクトがイギリスで完了する。よって遺伝子ノックアウトクローン間のタンパク発現のパターンを比較して、差違のある分子を同定できるようになる。

2. 研究実施内容

① 標的組み換えの機構解析

研究目的) 本申請書の研究目的は、DT40を含むニワトリ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ことにある。

方法) これまで、酵母で相同組み換えに関与することが解明された遺伝子のニワトリホモログの機能解析をおこなってきた。本年度は、高等真核細胞にのみ存在する遺伝子(図1)、Brca2の遺伝子座に様々な変異を人工的にノックインしたDT40細胞を作製した(図3)。

結論) Brca2ヌル細胞は致死であった。Brca2分子のなかでRad51との結合に関与するモチーフ(BRC1-8)のなかのBRC1、BRC3、BRC8より3'側を削ったtruncation mutantsを作製した。そして、BRC1 truncationは致死だが、BRC3 truncationは生存でき、BRC8 truncationとC末端のNLSのみを削った欠損細胞はほぼ同じ表現型を示すことがわかった。BRC3 truncationでは、標的組み換え効率が約1桁低下していた。

② 分裂酵母で見つかった相同DNA組み換えに関与する新規遺伝子: swi5とSfr1

研究目的・方法) Rhp51と共同して機能する分子を遺伝学的手法でスクリーニングする。

結論) 岩崎グループは、接合型変換に関与する遺伝子swi5を解析した。その結果、Swi5はRhp51依存的且つRhp55/Rhp57非依存的な組換え修復経路で機能することを明らかにした。また、この経路は、Swi5-Sfr1-Rhp51というタンパク質複合体が関わることを示した。

武田グループは、swi5のニワトリホモログの候補をDT40でノックアウト中である。

③ 複製時に生じた損傷を修復するシステムの系統的解析

研究目的・方法) 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(図2)。この経路は、主に複製のときに生じた損傷(2重鎖切断と複製ブロック)を修復するのに使われる。相同DNA組み換え以外の、複製にリンクして機能する修復経路(例、損傷乗り越え修復(図2))を、DT40を使った系統的な逆遺伝学的解析方法で調べる。

結論) 損傷乗り越えに機能するDNAポリメラーゼ ζ をDT40でノックアウトした。そのpol ζ 細胞は、損傷乗り越えにもならず、放射線照射によって生じた2重鎖切断の、相同組み換えによる修復にも関与することがわかった。

④ 2重鎖切断後の初期反応

研究目的) 2重鎖切断が起こってから数分以内に、様々な生化学反応が始ることが最近明らかになってきた。そして数分以内の反応が修復経路の選択に関与する可能性がある。本研究の目的は、2重鎖切断後の初期反応を、DT40を使った系統的な逆遺伝学的解析方法で調べることである。

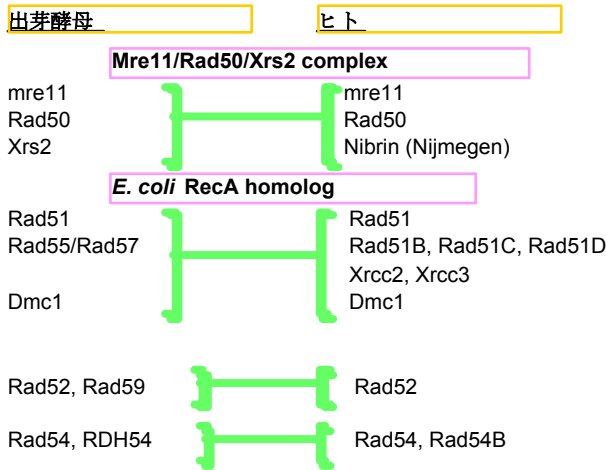
方法) その最初のステップとして、中山グループと武田グループは共同で、ヒストンH2AXのセリン139のリン酸化の意義について、セリン139をアラニンに置換した(S139A/null)細胞を作製することによって解析した。

結論) S139A/null細胞では、電離放射線照射によって誘導されるG2チェックポイントが起こらなかつた。相同組み換えは、正常であった。

⑤ DNA組み換えに関与するタンパクの構造解析

DNA組換えに関与する蛋白質の多くは、重合して働く。伊藤グループは、重合状態を構造解析する目的で、高分子蛋白質複合体のNMR測定手法を開発した。

図1



相同組み換えに関与する遺伝子の一次構造は、酵母からヒトまで保存されている。

図2 塩基の損傷

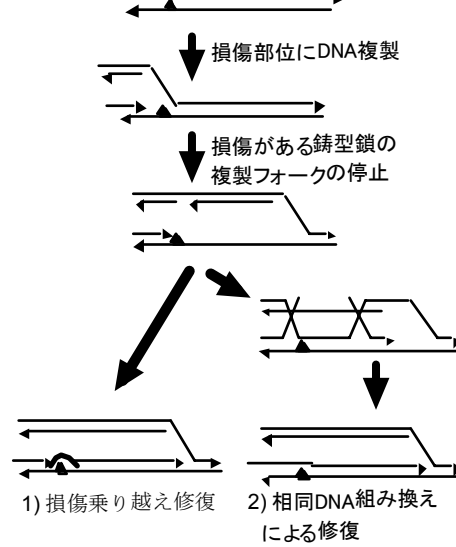
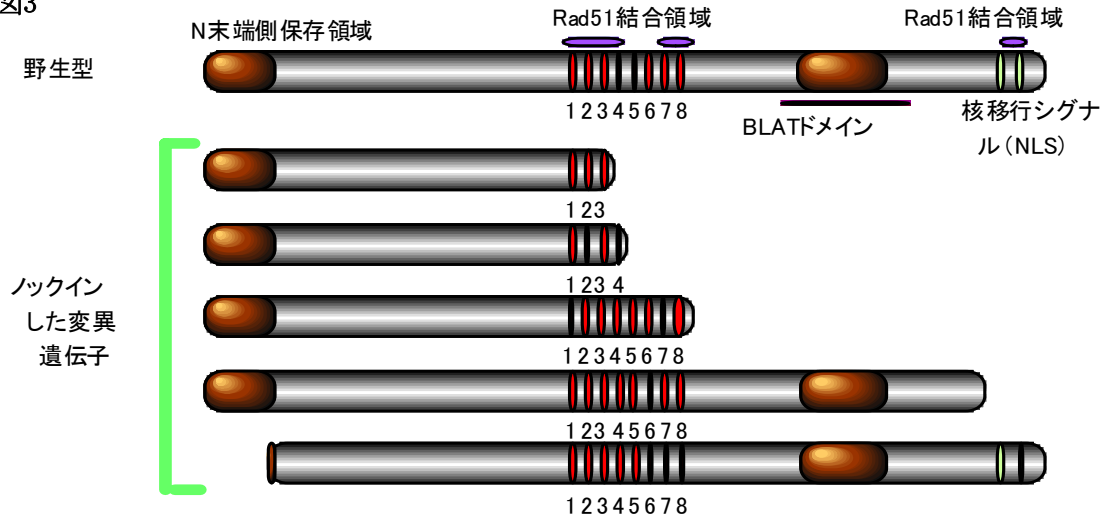


図3



3. 研究実施体制

武田グループ

① 研究分担グループ長：

武田 俊一 (京都大学大学院医学研究科、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：

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：DT 4 0 細胞由来の新規分子の構造及び生化学的解析

篠原グループ

① 研究分担グループ長：

篠原 彰 大阪大学大学院理学研究科、助手

② 研究項目：生化学的解析、酵母two-hybrid解析を担当

中山グループ

① 研究分担グループ長：

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

岩崎グループ

① 研究分担グループ長：

岩崎 博史 横浜市立大学 助教授

② 研究項目：相同DNA組み換えに関わる分裂酵母の新規遺伝子の同定とその機能解析
を担当

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Sarah J. Cumbers, Gareth T. Williams, Sarah L. Davies, Richard L. Grenfell, Shunichi Takeda, Facundo D. Batista, Julian E. Sale and Michael S. Neuberger :“Generation and iterative affinity maturation of antibodies in vitro using hypermutating B-cell lines.” nature biology, vol 20, 1129-1134. (2002)
- Takashi Okada, Eiichiro Sonoda, Yukiko M. Yamashita, Shogo Koyoshi, Satoshi Tateishi, Masaru Yamaizumi, Minoru Takata, Osamu Ogawa and Shunichi Takeda. “Involvement of Vertebrate Polk in Rad18-independent Postreplication Repair of UV Damage.” The Journal of Biological Chemistry. Vol. 277, No. 50, pp. 48690-48695. (2002)
- Yukiko M. Yamashita, Takashi Okada, Takahiro Matsusaka, Eiichiro Sonoda, Guang Yu Zhao, Kasumi Araki, Satoshi Tateishi, Masaru Yamaizumi and Shunichi Takeda. “RAD18 and RAD54 cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells” The EMBO Journal, Vol.21 No.20 pp.5558-5566, (2002)
- 山添 光芳、“DNA複製とDNA修復に関与するDNAポリメラーゼ遺伝子群”、細胞工学、Vol.22, No. 3, p283-p291 (2003)

- Masatoshi Yoshimasu, Hideki Aihara, Yutaka Ito, Sundaresan Rajesh, Satoko Ishibe, Tsutomu Mikawa, Shigeyuki Yokoyama and Takehiko Shibata. “An NMR study on the interaction of Escherichia coli Din1 with RecA-ssDNA complexes” *Nucleic Acids Research*, Vol.31, No. 6, 1735-1743, 2003.
- Masatoshi Yoshimasu., Honda, M., Tsutomu Mikawa, Takehiko Shibata, and Yutaka Ito,
“NMR approaches to investigate protein-protein and protein-nucleic acid complexes” *RIKEN Review* **46**, 32-35 (2002)
- Miki Shinohara, Kazuko Sakai, Akira Shinohara and Douglas K. Bishop.
“Crossover interference in *Saccharomyces cerevisiae* requires a TID1/RDH54 and DMC1-dependent pathway” in press.
- Miki Shinohara, Kazuko Sakai, Tomoko Ogawa and Akira Shinohara. “The mitotic DNA damage checkpoint proteins Rad17 and Rad24 are required for repair of double-strand breaks during meiosis in yeast.” in press.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：0件）