

「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 リンパ細胞株は、標的組み換えを効率良く起こす。この現象のメカニズムを分子レベルで解明する。
- (2) DT40 では、標的組み換え効率を簡単に定量できる。その性質を利用して、標的組み換え効率を上昇させる人工的方法を開発する。

◆これまでの研究の概要と成果

- (1) 動物細胞で、相同組み換えに関与する DNA ポリメラーゼは全く不明であった。我々は、Rev3 と呼ばれるポリメラーゼが放射線照射で生じた DNA 2 重鎖切断を相同組み換えで修復する時に働くのを解明した (EMBO J, 2003)。さらに別のポリメラーゼである Rad30 が、抗体遺伝子可変領域の多様化 (Ig gene conversion) に関与することを明らかにした (論文準備中)。
- (2) Brca2 は、家族性乳癌の原因遺伝子の 1 つであり、その完全欠損は胎生致死である。我々は、Brca2 完全欠損細胞を初めて作製した。この細胞は、Rad51 と Brca2 の相互作用や Brca2 非依存性の Rad51 機能を調べる上で有用である。

◆今後の見通し等

相同組み換えに関与する分子は、少なくとも半分以上が既に同定されたと考えられる。ゆえに、五年以内には、標的組み換え効率を上昇させる実用的な方法が開発されるであろう。

2. 研究実施内容

I. 研究内容

当該年度における研究の進め方

(1) 概要

本研究の最終目標は、ニワトリ B リンパ細胞株、DT40 でなぜ高頻度に標的組み換え

が起こるかを解明することにある。標的組み換えに必要な分子の同定は進んでいるが、DT40特異的な分子機構はまだ解明できていない。

標的組み換えの原因である相同DNA組み換え（HR）は、酵母からヒトまで保存された機構である。これまで酵母遺伝子のニワトリホモログを単離し、その遺伝子破壊DT40株を解析することによってHRの解析を進めてきた（逆遺伝学による解析、2-1から2-4まで）。

（2）研究成果

2-1. Rad51の活性補助因子（京大、山添）

バックグラウンド：

大腸菌ではRecAと呼ばれる分子がHRで中心的な役割をもつ。真核細胞でのRecAホモログは、Rad51と呼ばれる。動物細胞（ここでは哺乳類とトリを指す）ではHRに関与する十数種類の分子（RAD52エピスタシスグループ）のうちRad51が圧倒的に重要な働きをするが、酵母ではRad51、Rad52、Rad54の重要性は同程度である。さらに酵母ではRad51の活性補助因子（cofactor）は、2種類しかないが、動物細胞では少なくとも7種類（Rad51B、Rad51C、Rad51D、XRCC2、XRCC3、Brca1、Brca2、ファンコニ貧血原因遺伝子群）が知られている。おそらく動物細胞ではRad51の活性がHRの効率を決定するのであろう。

研究成果：

- ◆ Brca2ヌル欠損細胞が生存可能であることを確認した。この知見は、Brca2欠損とRad51欠損とが似た表現型を示すある種の酵母とは対照的に、動物細胞ではRad51の重合はBrca2がなくても起こりうることを示す。
- ◆ Brca2のC末半分が欠損した細胞（BRC3 truncation）では、抗体遺伝子可変領域に大量の点変異が蓄積することを見出した。
- ◆ 同様に、5種類のRad51パラログ遺伝子（Rad51B、Rad51C、Rad51D、XRCC2、XRCC3）全部でも抗体遺伝子可変領域に大量の点変異が蓄積することを見出した。点変異蓄積は、HR反応の後期に機能する分子が欠損した場合には観察されない。ゆえに、Rad51が効率よく重合する場合、抗体遺伝子可変領域に生じたDNA切断は、相同DNA組み換えによって修復されるが、遺伝子変換Rad51が重合しにくい場合、エラーを伴うDNA合成点変異によって修復されることが明らかになった。
- ◆ 我々は過去に、Rad52欠損では新たな表現型が出現しないにもかかわらず、Rad52/XRCC3の2重欠損では合成致死であることを証明した（EMBO J, 2001）。この知見は、Rad52とXRCC3とが両方ともHR初期に互いに独立しながら平行して働くことを示唆する。一方、Brca2 truncationおよびXRCC3の各欠損細胞はその表現型が非常に類似している。にもかかわらず、Rad52/Brca2 truncationの2重欠損ではBrca2 truncation単独欠損とほぼ同じ表現型であった。現在、Rad52/XRCC3とRad52/Brca2 truncationとが、なぜ異なる表現型を示すかを解析中である。

2-2. Swi5 (横浜市大、岩崎博士と京大、山添)

バックグラウンド:

岩崎は、分裂酵母でSwi5がRad51と共同でHRに関与することを解明した。

研究成果:

Swi5のニワトリホモログが存在することを見出したので、それを山添がDT40細胞でノックアウトした。しかし単離したSwi5欠損クローンは、その増殖能がクローン毎に異なり、かつHRの機能不全の表現型を示さなかった。この理由から我々は欠損クローンの解析を中断している。

2-3. DNAポリメラーゼ (京大、園田)

バックグラウンド:

HR反応では、相同配列が会合 (Dループ形成) したあとに、必ずDNA合成のステップを伴う。Dループ構造は不安定化なので、素早いDNA合成はHRの律速段階の1つと考えられている。動物細胞では、HRに関与するDNAポリメラーゼは全く分かっていない。最近5年間に、DNA修復 (損傷乗り越えDNA合成) に関与する酵母遺伝子のヒトホモログ (8種類のDNAポリメラーゼとその制御因子、Rad18) が発見された。

研究成果:

- ◆ rev3 欠損もしくは Rad18 欠損、rev1 欠損でそれぞれ有意に標的組み換え効率が低下することを確認した。
- ◆ Rev1、Rev3、Rev7 の各欠損株および Rev1/Rev3/Rev7 の3重欠損株を作製した。そして酵母の場合と同様に、人工的に誘導した DNA 損傷に対する感受性が各 Rev 欠損株および3重欠損株で類似していることを見出した。一方、HR による Ig V 多様化に関しては、Rev1 欠損株および Rev1/Rev3/Rev7 3重欠損株のみが低下していた。Rev1 は単独では DNA ポリメラーゼとして働けないので、我々はある種の HR の場合には Rev1 が他の DNA ポリメラーゼと結合して機能すると結論づけた。
- ◆ Rad30 も HR による Ig V 多様化に関与することを見出した。

2-4. エンドヌクレアーゼ (京大、菊池)

バックグラウンド:

HRに関与しうるDNA分解酵素には、XPG、XPG-like molecule、XPF、Mus81、Fen1、Exo1がある。

研究成果:

Fen1とExo1が、互いにミスマッチが存在する配列どうしのHRに関与することがわかった。Fen1欠損では、標的組み換え効率が3-5倍低下する。

2-5. 損傷発生初期にリクルートされる分子（宮崎医大、高見博士と京大、園田）

バックグラウンド：

Poly[ADP ribose]polymerase (PARP) の活性化やヒストンH2AXのリン酸化が、染色体断裂発生の数十秒後に観察される。

研究成果：

ヒストンH2AX遺伝子をリン酸化できない点変異遺伝子に置換すると、標的組み換え効率が3倍程度低下する。

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 （本務）理化学研究所 中央研究所 遺伝生化学研究室 前任研究員

（兼務）理化学研究所 横浜研究所 生体超分子構造・機能研究協力グループ 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：

中山 建男 宮崎大学 フロンティア科学実験総合センター 生命科学研究部門生体機能制御分野 教授

（兼任）宮崎大学 医学部 医学科生化学講座 機能生化学分野 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 横浜市立大学大学院 総合理学研究科 生体超分子システム科学専攻 生体超分子創製科学研究室 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) 論文発表

- M. Hashimoto, S. Rao, O. Tokuno, K. Yamamoto, M. Takata, S. Takeda, and H. Utsumi. “DNA-PK: the Major Target for Wortmannin-mediated Radiosensitization by the Inhibition of DSB Repair via NHEJ Pathway” *Journal of Radiation Research*, 44:151-159 (2003)
- J. Henry-Mowatt, D. Jackson, J.-Y. Masson, P. A. Johnson, P. M Clements, F. E. Benson, L. H. Thompson, S. Takeda, S.C. West, and K.W. Caldecott. “XRCC3 and Rad51 Modulate Replication Fork Progression on Damaged Vertebrate Chromosomes” *Molecular Cell*, Vol.11:1109-1117 (2003)
- Sonoda, E., Okada, T., Zhao, G. Y., Tateishi, S., Araki, K., Yamaizumi, M., Yagi, T., Verkaik, N. S., van Gent, D. C., Takata, T., and Takeda, S. “Multiple roles of Rev3, the catalytic subunit of pol ζ in maintaining genome stability in vertebrate” *The EMBO Journal* 22: 3188-3197 (2003)
- Yu, D., Sonoda, E., Takeda, S., Huang, C. L. H., Pellegrini, L., Blundell, T. L., and Venkitaraman, A.R. “Dynamic control of Rad51 recombinase by self-association and interaction with Brca2” *Molecular Cell* 12(4):1029-1041 (2003)
- P. Vagnarelli, C. Morrison, H. Dodson, E. Sonoda, S. Takeda, and W. C. Earnshaw “Analysis of Scc1-deficient cells defines a key metaphase role of vertebrate cohesin in linking sister kinetochores” *EMBO Reports*, 5(2):167-171 (2004)
- Hohegger, H., Sonoda, E., and Takeda, S. “post-replication repair in DT40 cells: translesion polymerases versus recombinases” *Bio Essays* 26(2):151-158 (2004) Review
- Masayoshi Honda, Sundaresan Rajesh, Daniel Nietlispach, Tsutomu Mikawa, Takehiko Shibata & Yutaka Ito. “Letter to the Editor: Backbone ^1H , ^{13}C , and ^{15}N assignments of a 42KDa RecR homodimer” *Journal of Biomolecular NMR* 28:199-200 (2004)
- Ahmad, A., Takami, Y. and Nakayama, T. “WD dipeptide motifs and LXXLL motif of chicken HIRA are necessary for transcription repression and the latter motif is essential for interaction with histone deacetylase-2 in vivo” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312-4 :1266-1272 (2003)
- Yufuko Akamatsu, Dorota Dziadkowiec, Mitsunori Ikeguchi, Hideo Shinagawa, and Hiroshi Iwasaki. “Two different Swi5-containing protein complexes are involved in mating-type switching and recombination repair in fission yeast” *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol.100 No.26 15770-15775 (2003)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：0件）