

「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

相同組換えは、20種類以上の分子種が直接に関与する複雑な反応である。そのうちの半分以上が酵母の遺伝学と癌研究のそれぞれの分野の研究から解明された。一方、例えば、細胞周期をコントロールするCDKキナーゼが相同組換えも活性化することが報告されるなど、相同組換え制御機構は未知のことが多そうである。我々は、DT40細胞株という我々のユニークな実験系のメリットを生かして、相同組換え分子のニワトリホモログ遺伝子を逆遺伝学的手法で解析してきた。そして、各遺伝子のノックアウトクローンの表現型は、例え、酵母の遺伝学的研究の蓄積があっても、予想し難いことがわかった。現在も毎年、複数の、相同組換え分子（あるいは相同組換え調節分子）が同定されているので、それらの遺伝子の欠損細胞をDT40から作製するのが、我々の研究の基本方針である。

以上の逆遺伝学的解析を遂行する過程で、下の『研究実施内容』にまとめた、ターゲティング/ランダム相対比をそれぞれ数倍上昇させる方法を6種類開発した。

◆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。ただし、これまでの経験から、既知遺伝子の欠損株（あるいは高発現細胞）の表現型は、標的組み換えに与えるインパクトも含めて、事前に予測することは非常に困難である。ただし、相同組み換えに直接、間接に影響を与える分子は既にたくさん見つかったため、それらの既知分子の改変をトライ&エラーすることによって、DT40細胞なりに、

ターゲッティング／ランダム相対比を大きく上昇させることは、それほど困難ではない。

2. 研究実施内容

既知の遺伝子の解析から、以下に述べる方法によってDT40細胞でジーンターゲッティングの効率（ターゲッティング／ランダム相対比）を3～5倍程度上昇させることができることを確認した。

(A) 遺伝子過剰発現による標的組換え効率の効果

(A-1) Rad51パラログの一過性過剰発現

相同DNA組換えで中心的な役割を担うRad51蛋白に低いアミノ酸相同性をもつ遺伝子（Rad51パラログ）が脊椎動物細胞には5つ存在する（Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2, XRCC3）これらのRad51パラログはRad51蛋白の活性を調節・制御していると考えられているが、過剰発現している場合に標的組換え効率が正常よりも上昇することを発見した。

(A-2) Exo1の一過性過剰発現

Exo1は5'-3'エクソヌクレアーゼ活性とRNaseH活性を持つRad2 familyに属するヌクレアーゼの一つである。我々はDT40細胞において、Exo1の一過性過剰発現により標的組換え効率が上昇することを発見した。この現象をDT40以外の動物細胞でも確認する。

(A-3) HEL308の一過性過剰発現

HEL308はヘリカーゼ活性を持つ蛋白で、損傷乗り越えDNAポリメラーゼの一つであるPolQが持つヘリカーゼドメインとアミノ酸相同性を持つ。HEL308の一過性発現は、非相同DNA末端結合を阻害し、結果的に標的DNA組換えの効率を上昇させることを発見した。この現象をヒト細胞でも確認中である。

(B) 遺伝子ノックダウンによる標的組換え効率の効果

我々はこれまでにDNA修復に関与する遺伝子のノックアウト細胞を解析する中で、標的組換え効率が上昇している例を経験してきた。

(B-1) Ku遺伝子のノックダウン

Ku70/80ヘテロダイマーは二本鎖切断末端部位に結合し、非相同末端結合によるDNA二本鎖切断の修復を促進している。我々はKu70のノックアウトDT40細胞において、標的組換えの効率が上昇していることを見いだした。

(B-2) 53BP1遺伝子のノックダウン

P53 Binding protein 1 (53BP1)はDNA損傷チェックポイントに属する蛋白で、DNA二重鎖切断の部位に、最も初期に集合する。我々はDT40細胞で53BP1をノックアウトしたところ、非相同末端結合による外来遺伝子のランダムインテグレーションの頻度が下がり、相対的に標的組換えの効率が上昇していることを発見した。この現象をヒト細胞でも確認中である。

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(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：相同組換えに関与するタンパク質の構造解析

【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：DT40細胞株の変異株(特にヒストンやクロマチン形成などに関与する分子)の作成とその表現型解析

【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組み換えに関わる新規遺伝子の同定とその機能解析

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文発表

- Mitsuyoshi Yamazoe (CREST・京都大学), Eiichiro Sonoda (CREST・京都大学), Helfrid Hochegger (京都大学), Shunichi Takeda (CREST・京都大学)
“Reverse genetic studies of the DNA damage response in the chicken Blymphocyte line DT40” *DNA Repair* **3**, 1175-1185 (2004)
- Aki Mizutani (京都大学・病院皮膚科), Takashi Okada (京都大学・病院泌尿器科), Shinya Shibutani (ニューヨーク州立大学), Eiichiro Sonoda (京都大学), Helfrid Hochegger (京都大学), Chikako Nishigori (京都大学・病院皮膚科), Yoshika Miyachi (京都大学), Shunichi Takeda (京都大学), and Mitsuyoshi Yamazoe (京都大学)
“Extensive Chromosomal Breaks Are Induced by Tamoxifen and Estrogen in DNA Repair-Deficient Cells” *CANCER RESEARCH* **64**, 3144-3147 (2004)
- Atsushi Hatanaka (京都大学), Mitsuyoshi Yamazoe (京都大学・CREST), Julian E. Sale (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Division

of Protein and Nucleic Acid Chemistry, Cambridge) , Minoru Takata (川崎医科大学) , Kazuhiko Yamamoto (川崎医科大学) , Hiroyuki Kitano (川崎医科大学) , Eiichiro Sonoda (京都大学・CREST) , Koji Kikuchi (京都大学・CREST) , Yasukazu Yonetani (京都大学・大阪大学) , and Shunichi Takeda (京都大学・CREST) “Similar Effects of Brca2 Truncation and Rad51 Paralog Deficiency on Immunoglobulin V gene Diversification in DT40 Cells Support an Early Role for rad51 paralogs in Homologous Recombination” *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, **25**: 1124-1134 (2005)

- Ahyar Ahmad^{1, 4} Yasunari Takami^{2, 3} and Tatsuo Nakayama^{1, 2, 3, 4} (¹Department of Life Science, Frontier Science Research Center, ²Department of Biochemistry, Miyazaki Medical College, University of Miyazaki, 5200, Kihara, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan, ³CREST, JST (Japan Science and Technology), Kazusa, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan, and ⁴Department of Chemistry, Hasanuddin University, Makassar, 90245, Indonesia) “WD dipeptide motifs and LXXLL motif of chicken HIRA are essential for interactions with the p48 subunit of chromatin assembly factor-1 and histone deacetylase-2 in vitro and in vivo” *GENE* **342** (2004) **125-136**
- Helen Dodson (アイルランド-ゴールウェイ国立大学) , Emer Bourke (アイルランド-ゴールウェイ国立大学) , Liam J. Jeffers (アイルランド-ゴールウェイ国立大学) , Paola Vagnarelli (エジンバラ大学) , Eiichiro Sonoda (京都大学) , Shunichi Takeda (京都大学) , William C. Earnshaw (エジンバラ大学) , Andreas Merdes (エジンバラ大学) and Ciaran Morrison (アイルランド-ゴールウェイ国立大学) ” Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G2 phase and involves ATM” *The EMBO Journal*, **23**: 3864-3873 (2004)