

京都大学大学院医学研究科
教授

武田俊一

「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」

研究期間：平成12年11月～平成18年3月

1. 研究実施の概要

高等真核細胞ではゲノム DNA を含むプラスミドを導入しても、それと染色体 DNA とが相同 DNA 組換えして、プラスミドが標的組換えすることは非常に稀である。本申請の目標は、高等真核細胞で例外的に標的組換えの効率が低いニワトリ B リンパ球細胞株 DT40 を解析して、その原因を明らかにし、他の高等真核細胞でも効率よく標的組換えする方法を開発することである。その最終ゴールに到達する方法として以下の 3 種類の方法がある：

- (A) 相同 DNA 組換えに関与する遺伝子の機能解析
- (B) 標的組換えに関与する未知分子の同定
- (C) 細胞の本来もつ標的組み換え能力を刺激する方法の開発

(A)の方法による研究は順調に進んだ。(B)は候補遺伝子を 1 つ見つけただけに終わった。(C)は 2 種類それぞれ 5 倍程度に標的組み換えを上昇させる人工的な方法を開発できた。本申請で提案した技術開発はヒト細胞でも近々に十分に実現可能である。

(A) 相同 DNA 組換えに関与する遺伝子の機能解析

この実験方法では、DT40 細胞で『遺伝子破壊→表現型解析→多重遺伝子破壊で複数種類の分子の機能的相互作用』という手続きで研究を進めた。表現型解析では、(i)新しい解析方法を樹立することと、(ii)多くの種類の表現型を比較することとが重要である。(i)により分子の新しい機能を見つめることができた。(ii)の方法で相同 DNA 組換えの研究が進められるのは、DT40 だけである。そして、この安定な親株から作った遺伝子破壊株のコレクションを動物細胞で持ち、相同 DNA 組み換え機構を系統的に研究できるのは我々だけである。我々は、表現型解析比較と多重遺伝子破壊とを組み合わせることによって、効率よく分子間機能的相互作用を網羅的に解析できた。

(A-1) 相同組換えの中心分子、Rad51 およびそれと機能的に相互作用する分子の機能解析

各変異株の表現型の定量的比較より、3 種類の重要な組み換え遺伝子 (Rad51、Rad52、Rad54) が、酵母では $Rad52 \geq Rad51 = Rad54$ の順で相同組換えに貢献するのに対して、ヒトやニワトリでは $Rad51 \gg \gg Rad54 > Rad52$ の順であり Rad51 が圧倒的に重要であることがわかった。この圧倒的な重要性を反影して、ヒトやニワトリでは酵母に比べて、Rad51 の機能を調節していると考えられる遺伝子の種類が多い。そのなかには、家族性乳癌の原因遺伝子、Brca1 と Brca2、Bard1 (Brca1 と結合)、5 種類ある Rad51 類似遺伝子 (Rad51 パラログ) が含まれる。

(A-1-1) Rad51 分子の機能解析

CREST 開始までに、(i)Rad51 がないと染色体断裂が多発して細胞が増殖できないこと (論文: E. Sonoda et al., EMBO J, 1998)、(ii) Rad51 の ATPase 活性の機能 (論文: C. Morrison et al., MCB., 1999) を明らかにした。CREST 開始後には、共同研究者が、機能のある Rad51-GFP をデザインすることによって DNA 損傷部位での、Rad51 のダイナミクスを明らかにした (論文 H15-4)。

(A-1-2) Rad51 パラログ分子の機能解析

CREST 開始までに、5 種類の Rad51 類似遺伝子群 (Rad51B、Rad51C、Rad51D、XRCC2、XRCC3) の各欠損株が非常に似た表現型を示すことを明らかにした(論文: M. Takata et al., MCB., 2000)。ゆえに 5 種類の Rad51 パラログは各々が必須の構成因子としてコンプレックスを作り、損傷部位において Rad51 が重合する (相同組み換えの初期ステップ) のを促進することが明らかになった。本 CREST 開始後には、Rad51 パラログの一部が相同組み換えの後期ステップにも関与することを明らかにした[武田グループ報告書 15)]。また、相同組み換えの初期ステップにおいて、Rad51 パラログコンプレックスと他の組み換えタンパクとの機能的相作用を多重遺伝子欠損細胞を作製することによって解析した。多重遺伝子欠損には、XRCC3/Rad52 (合成致死, 論文: H13-8)、XRCC3/ヒストン H2AX S139A 点変異[合成致死、武田グループ報告書 6]、XRCC3/Brca2[Brca2 単独欠損とほぼ同じ表現型、武田グループ報告書 11)] が含まれる。

(A-1-3) Brca2 分子の機能解析

遺伝学的解析が可能な担子菌では、Rad51 欠損、Brca2 欠損、Rad51/Brca2 の 2 重欠損が同じ表現型を示す。一方、マウスでは Brca2 完全欠損が致死のために、その表現型が全くわかっていなかった。そして担子菌の知見から Rad51 と Brca2 とは互いに相互依存的な関係にあると推定されてきた。それに対して我々は、Brca2 非依存的に Rad51 が機能し、その Rad51 の機能の一部は Rad54 との相互作用によることを明らかにした[武田グループ報告書 11)]。

(A-2) DNA ポリメラーゼの機能解析

6 年前に阪大の花岡教授らによる Pol η の発見がブレイクスルーになり、それまでに同定されていた 5 種類のポリメラーゼの他に少なくとも 9 種の新規ポリメラーゼが存在することが明らかになった。次章の研究構想に述べたように、DNA 合成のステップが相同組み換えの律速段階の 1 つのはずである。我々は全ポリメラーゼの機能を多重遺伝子破壊により網羅的に解析することを開始した。そして複数種類のポリメラーゼ間の複雑な関係 (A-2-3) を明らかにしつつある。

(A-2-1) Pol η の、相同組み換えへの貢献 [武田グループ報告書 1)]

pol η 欠損によって、相同組換えによる抗体遺伝子可変領域の多様化の効率が 3 倍程度低下し、制限酵素によって生じた 2 重鎖切断が相同組換えによって修復される効率が 10 倍程度低下することを見出した。ただし標的組み換え効率は正常であった。

(A-2-2) Pol ζ の、相同組み換えへの貢献 [武田グループ報告書 3)]

pol ζ 欠損によって、放射線照射によって生じた 2 重鎖切断が相同組換えによって修復される効率が低下することがわかった。

(A-2-3) Pol η /Pol ζ の機能的相互作用 [武田グループ報告書 4)]

pol η 欠損は弱い表現型しか観察されない (患者さんが生存) のに対して、pol ζ 欠損は重篤な表現型を示し、マウスは胎生致死である。驚いたことに、Pol η /Pol ζ の 2 重欠損では pol ζ 欠損の重篤な表現型が相同組換えの表現型も含めてかなり正常化した。

(A-2-4) Rad18 の機能解析 [武田グループ報告書 8]]

Rad18 は、出芽酵母では Pol η を含むすべての損傷乗り越えポリメラーゼを制御する E3 ユビキチン化酵素である。ところがこの出芽酵母の知見は動物細胞では必ずしもあてはまらないことが明らかになりつつある。すなわち、相同組み換えと拮抗する非相同末端結合という 2 重鎖切断修復経路を抑制することがわかった。Rad18 欠損では標的組み換え頻度が 6 倍程度低下していた。

(A-3) 損傷発生初期に集合する分子の機能解析

DNA 損傷が発生したときに秒のオーダーで多種類の分子が損傷部位に集まってくる。例えば、2 重鎖切断のあとに数百分子のヒストン H2AX がリン酸化され、切断部位に Atm、Nbs1、53BP1 が集合することが最近 5 年間で明らかになった。損傷発生初期の現象は、その後の組み換えや DNA 修復に影響を与えるはずであると考え、2 重鎖切断直後に集合する分子の遺伝子破壊株を網羅的に作製することにした。酵母では、損傷チェックポイントは損傷が修復されるまで分裂周期を一時停止して細胞の生存率を上昇させるのに貢献している。ところが我々の研究により、酵母の損傷チェックポイントに働く分子のニワトリホモログが相同組み換えや DNA 修復を促進することが明らかになりつつある (論文: C. Morrison et al., EMBO J., 2000)。

(A-3-1) ヒストン H2AX がリン酸化による相同組み換えの促進

[武田グループ報告書 6]]

H2AX のリン酸化サイト (Ser139) をアラニンに置換したミュータント細胞を作製した。*H2AX*^{S139A} 細胞は、少しだけ標的組み換え頻度が低下し、損傷部位への Rad51 の重合が遅れていた。さらに同様の表現型を示す XRCC3 欠損との 2 重欠損を作製したところ、Rad51 の重合が大きく遅れ、合成致死になった。以上の知見から、ヒストン修飾と Rad51 パラログとが互いに相補しながら Rad51 の重合を促進していることがわかった。

(A-3-2) 53BP1 による非相同末端結合の促進

[武田グループ報告書 7]]

損傷チェックポイントにしか機能していないと考えられた 53BP1 が、2 重鎖 DNA 切断の修復に貢献することがわかった。

(A-3-3) Mre11/Rad50/Nbs1 コンプレックスの機能解析 [武田グループ報告書 9]]

CREST 開始までに Mre11 欠損 (致死) を論文発表し、Nbs1 欠損の表現型は他のグループが 2002 年に論文発表した (論文 H14-11)。我々は、Nbs1 欠損の表現型解析をさらに発展させ、コンプレックスが単鎖ギャップの、相同組み換えによる修復に関与することを示した。また Nbs1 と Rad50 のそれぞれの完全欠損が細胞レベルで致死になることも確認した。

(A-3-4) CDK による相同組み換えの制御 [武田グループ報告書 21]]

酵母では、細胞周期のどのフェーズでも相同組み換え経路が活性化され、2 重鎖切断修復に使われる。ところが動物細胞では、G1 期では相同組み換え経路が活性化されず、S/G2 期でのみ相同組み換え経路によって 2 重鎖切断が修復される。我々は、薬品によ

って可逆的に CDK(Cyclin-dependent kinase)を迅速に ON/OFF できる実験系を作った。
この系によって、CDK による 2 重鎖切断修復経路の選択機構が解明できるはずである。
さらに CDK による分裂周期のコントロール機構も詳細に解析できるはずである。

(B) 標的組換えに関与する未知分子の同定

[武田グループ報告書 17) 参照]

(C) 細胞の本来もつ標的組み換え能力を刺激する方法の開発

[武田グループ報告書 10) 参照]

2. 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

◆相同組み換え機構の研究の現況

1) 遺伝学的研究の生化学に対する優位性

相同組み換えは、必ず損傷（1本鎖もしくは2本鎖切断）されたDNAとその相同配列（損傷がない）とのあいだで起こる（図1のなかの朱で示したDNAは損傷がない相同配列を示す）。相同組み換えは、2種類の相同DNAと10種類以上のタンパク分子とが参加する複雑な生化学反応である。相同組み換えは、その反応のごく一部が試験管内で再現されているだけである。したがって、相同組み換えの研究は、遺伝学的手法によって、新規分子の同定とその機能の検証とがなされなければならない。

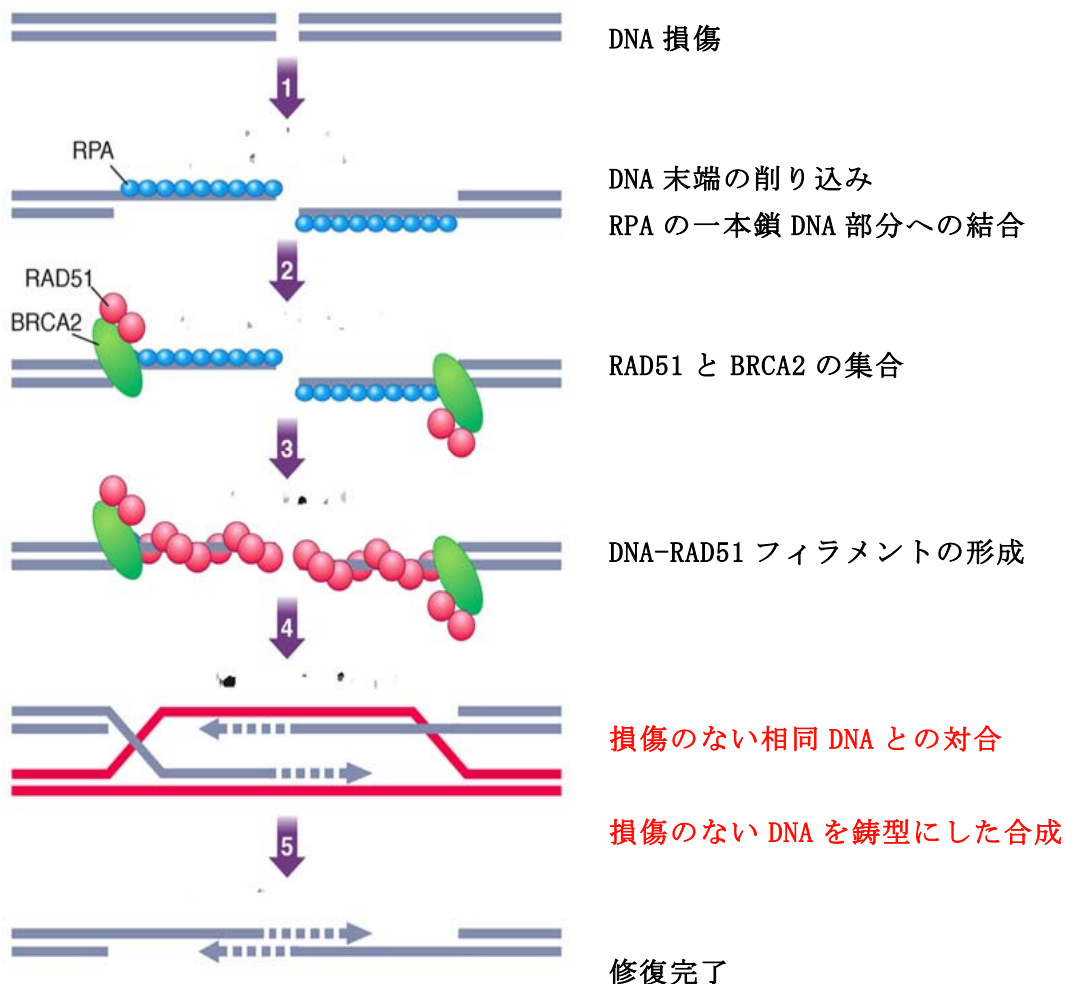


図1 相同DNA組み換え経路（朱字で示したステップは相同DNA組み換えの律速段階）

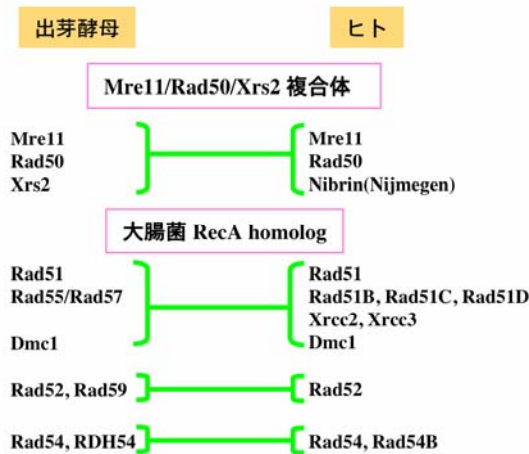


図2 相同DNA組換えに関与する分子は酵母からヒトまで保存されている

2) 酵母から動物細胞へ

相同組み換え機構は、1980年後半から出芽酵母を使った遺伝学的手法によって研究が進んだ。そして *RAD52* エピスタシスグループに属する遺伝子が約 10 種類同定された。その後 1993 年に本 CREST 研究に参加した篠原らによって、*RAD52* エピスタシスグループに属する遺伝子 (*RAD51*) のヒトホモログが発見された。驚いたことには、アミノ酸レベルで 70% も相同性が保たれていた。このブレークスルーを契機に、*RAD52* エピスタシスグループに属する他の遺伝子のヒトホ

モログも続々と見つかった。そして図 2 に示されたように、多くの *RAD52* エピスタシスグループ遺伝子がヒトと酵母とで 1:1 に対応している。ゆえに、ヒト細胞の相同組み換えの解析は、まず酵母で先行した研究から学び、酵母遺伝子のヒトホモログを同定することによって研究が開始された。

ただし、酵母でも相同組み換えの分子機構は未だ半分程度しか解明されていない。特に、共同研究者の篠原教授らが解析している減数分裂に伴う相同組み換えは体細胞のそれよりも、さらに複雑である。哺乳動物細胞では、出芽酵母に存在しない分子が相同組み換えに関与する。そのような分子には、家族性乳がんの原因遺伝子である *Brca1*、*Brca2* がある。そして *Brca1*、*Brca2* と相互作用する分子として、*Bard1*、*Dss1* が単離された。

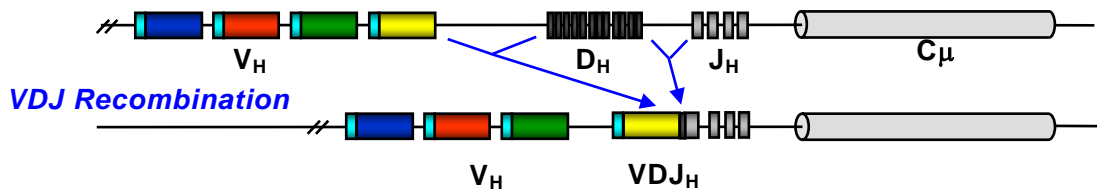
3) ニワトリ B リンパ細胞株を使った逆遺伝学的解析

ヒトやマウスの B リンパ細胞は、抗体遺伝子可変領域を、V(D)J 組み換えと呼ばれる部位特異的組み換え (site specific recombination) によって多様化する (図 3)。一方、ニワトリ、ウシ、ヒツジ、ウサギは、抗体遺伝子可変領域を V(D)J 組み換えと相同組み換え (Ig gene conversion) の両方によって多様化する。この Ig gene conversion は、以下の 2 点の理由から、我々の研究目標実現のために重要な研究課題である。第一の理由は、ニワトリ B リンパ細胞のみが、高い標的組み換え効率を示し、かつ相同組み換えによって可変領域を多様化する (ヒト B リンパ細胞やニワトリ T リンパ細胞では、標的組み換え効率が低いし、可変領域多様化に相同組み換えが使われない) ので、この Ig gene conversion 機構が副産物として標的組み換え効率を上昇させている可能性があるからである。第二の理由は、Ig gene conversion は塩基配列が少し違った相同配列同士の組み換え (Homeologous recombination と呼ぶ、配列が違うがゆえに組み換えによる多様化が可能) であるので、組み換えされた塩基配列がほぼ同定できるので、詳細な組み換えの表現型解析が可能であるからである。

本研究プロジェクト進行中に、ドイツのグループによって Ig gene conversion が

AID と呼ばれる deoxycytidine deaminase によって組み換え反応が開始されることが解明され、さらに理研の太田らによって TSA(ヒストンデアセチラーゼ阻害剤)が DT40 細胞での Ig gene conversion 頻度を 50 倍も上昇させることを発表した(論文 H17-10)。この 2 つの研究成果によって、DT40 の Ig gene conversion は、相同組み換え機構を詳細に解析する目的で、非常に優れた表現型解析方法になった。

Human and mouse



Chicken

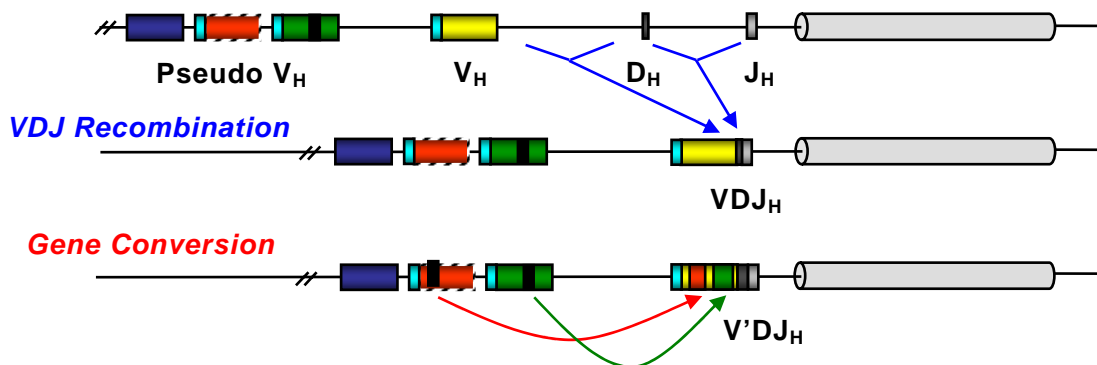


図3 抗体遺伝子H鎖の可変領域がBリンパ前駆細胞で形成される過程を示した。ニワトリ抗体遺伝子の上流領域には Pseudo-V と呼ばれる断片が 20-30 存在し、その配列が数塩基から 200 塩基程度、下流の VDJ_H 断片において、相同組み換えの機構によってコピー&ペーストされる。

4) 標的組み換えはどこで起こるか？複製とリンクした相同組み換え

相同組換えの役割は、従来、減数分裂時の組換えや放射線照射によって生じた 2 重鎖 DNA 切断を修復することと考えられた。ところが、酵母の相同組み換え完全欠損(ヌル変異)細胞は増殖できるのに対して、動物細胞から同様のヌル変異細胞を作ると、染色体断裂を多発して細胞が 1 回たりとも分裂できない(論文: E. Sonoda et al. *EMBO J*, 1998)。この実験結果から、動物細胞では相同組換えは増殖の為に必須の役割をもつことが解明された。その役割は、損傷を受けた鋳型鎖における複製ブロック(複製 DNA ポリメラーゼは損傷部位を複製できない)からの解除と考えられている。すなわち、相同組換えが、鋳型鎖を損傷鎖からもう一方の姉妹染色分体の鋳型鎖にスイッチすることによって、複製の完了に貢献している(図4、“姉妹染色分体どうしの相同組み換え”のなかの朱の矢印)と推定されている。この複製ブロックからの解除機構を“複製後修復機構”と総称する(図4)。ヒトやニワトリ細胞は酵母に比べて、そのゲノムが数百倍大きいので、1回の複製あたりに発生する複製ブロックの頻度も数百倍多いはずであり、したがって相同組換えはゲノムの構造維持のために動物細胞で必須の役割をもつのであろう。

2種類の複製後修復機構

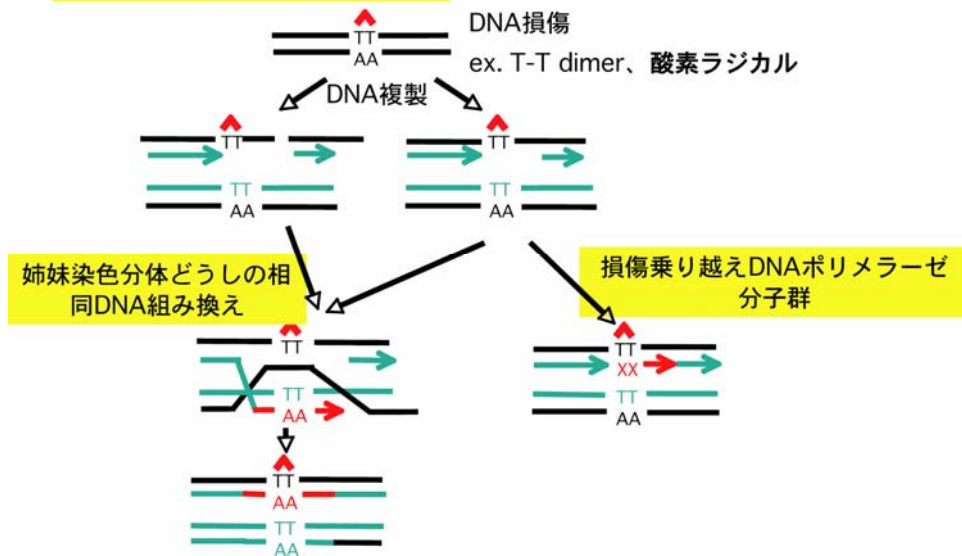


図4 複製ポリメラーゼは、鋳型鎖に少しでも損傷（1列目、赤で示す）があると停止する（2列目）。複製停止は、相同組み換え（3列目左）か、損傷乗り越え（3列目右）かによって解除される。

以上に述べた複製ブロック解除機構（相同組み換えと損傷乗り越え）を遺伝学的手法によって解析するうえで、DT40細胞は、以下の3点の理由から優れた実験系である：①細胞周期のなかでS期（複製）の占める割合が大きく60%以上ある、②p53が欠損しているので、複製ブロックが起こっても間期に細胞が死ににくく、その結果、S期でのトラブルをM期において染色体分析によって解析しやすい、③p53が欠損しているので、複製ブロックによりDNA損傷が発生しても、細胞分裂にブレーキ（DNA損傷チェックポイントの活性化）があまりかからずに、細胞が増え続けることができる。

このように複製中に高頻度におこる相同組換えが、標的組換えにも関与していると、我々は考えている（図5）。すなわち、相同組換えによる複製ブロック解除の場合に、もう一方の姉妹染色分体の鋳型鎖にスイッチする（図5左）代わりに、ノックアウトプラスミドと組換えする（図5右）ことによって、標的組換えが成立するのであろう。

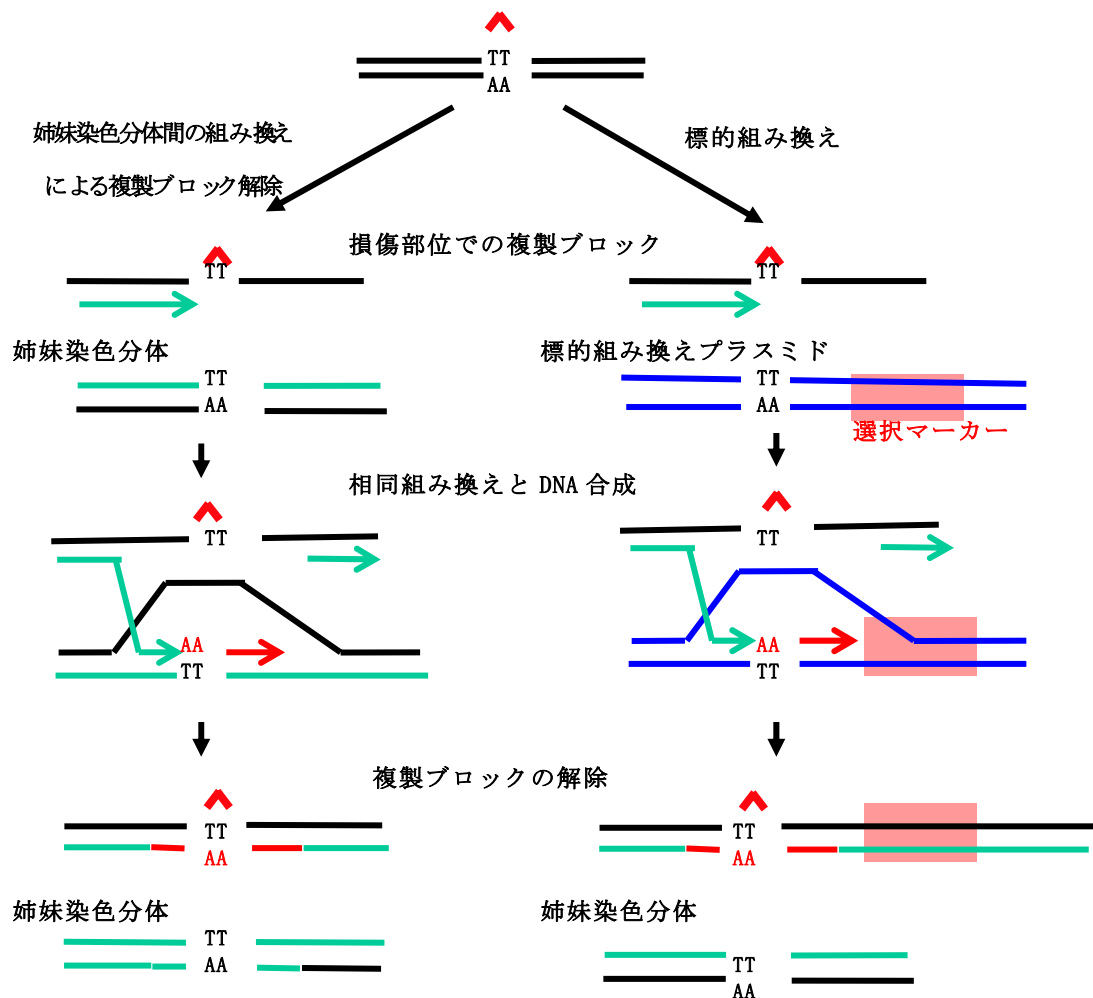


図5 標的組み換えのモデル。
複製ブロックの、相同 DNA 組み換えによる解除において、標的組み換えプラスミドが複製鋳型として機能する。その結果、選択マーカーがノックインされる。

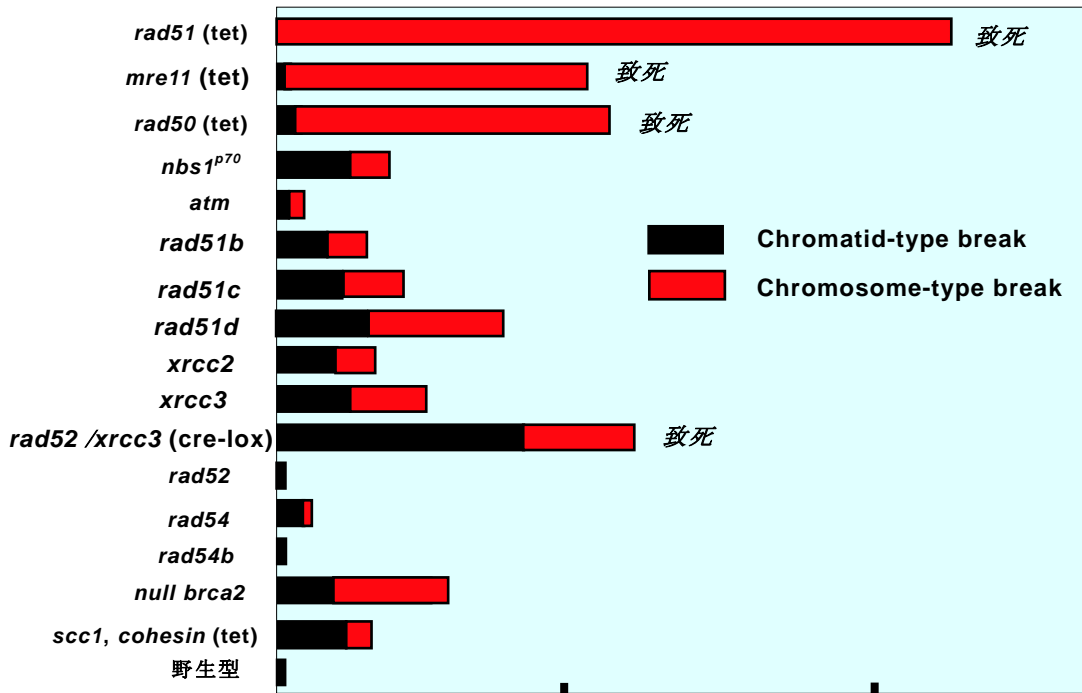
◆ 相同組み換え機構の研究の方向性

以上の、相同組み換え研究分野をふまえた上で、目標到達のために、我々は以下の点に焦点を絞って共同研究を進めるべきだと考えた。

(1) 相同組み換え反応の各ステップのなかでどれに注目すべきか？

相同組換えの律速段階は、対合の段階（ゲノム全体から相同配列を見つける）とその後の DNA 合成の段階（対合構造は不安定であり、素早い DNA 合成が、相同組換えが成立するか否かの鍵を握る）の2段階と考えられている（図1のなかで朱で文字をマーク）。ゆえに、対合の段階と DNA 合成の段階にそれぞれ関与する分子が重要と考えた。

対合の段階においては、酵母では RAD51, RAD52, RAD54 がほぼ同レベルの貢献をする。一方、動物細胞では篠原が発見した RAD51 が他のいかなる組み換え因子よりもはるかに重要な働きをすることが我々の研究からわかった（図6）。



M期に観察できる1細胞あたりの染色体断裂数

図6 相同組み換え欠損株で発生する染色体断裂

動物細胞ではRAD51分子が、それが損傷部位で重合のステップ（図1、3列目、朱で示した分子）において酵母よりも、より複雑な制御を受けているようである。そして酵母に存在しない組み換えタンパク（例、家族性乳癌の原因になるBrca1とBrca2、Rad51パラログ遺伝子群：Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2, XRCC3など）が、そのRAD51重合のステップを制御しているようである。ゆえに我々は、Brca2、Rad51パラログ遺伝子群に焦点を注目して、それらの機能をDT40細胞で逆遺伝学的手法を使って研究した。[武田グループ報告書11), 12), 13), 14), 15)参照] 篠原グループには、RAD51に働きかける分子の作用機序について多くの指導を受けた。

相同組み換えのDNA合成に関与するDNAポリメラーゼも網羅的に解析した。そしてPolηとPolζとがそれぞれある種の相同組み換えに関与することを、現在SORSTのプロジェクトリーダーである阪大、花岡教授との共同研究によって、明らかにすることができた。ただし標的組み換えに関与するDNAポリメラーゼは未だ不明である。[武田グループ報告書1), 2), 3), 4), 5)参照]

(2) 酵母の組み換え研究者、篠原グループとの共同研究

出芽酵母の順遺伝学的解析によって、組み換えの初期から中期のステップで働く分子がおそらく半分以上、既に同定された。遅れて分裂酵母でも、出芽酵母で見つかった遺伝子のホモログが同定され、さらに分裂酵母のみに存在する組み換え遺伝子が岩崎や品川教授（阪大微研）らによって複数種類発見された。我々は、彼等が発見した酵母遺伝子のヒトホモログの候補を合計3種類、共同研究として遺伝学的手法で解析した。そのうちFbh1は、DT40でも相同組み換えに関与していることが確認できた。

(3) クロマチン修飾と組み換えとのリンク、

中山グループおよび岩崎グループとの共同研究

相同性検索によって、細胞のなかではコンパクトにパックされた 2 重鎖 DNA のなかからでも組み換え機構は効率よく相同配列を見つける。しかも大腸菌や出芽酵母よりもさらに高次のクロマチン構造をもつ動物細胞では、どのようにクロマチン構造のなかから相同配列を探しだせるのであろうか？

この問題は、出芽酵母にヒトと相同なクロマチン構造が存在しない為に、出芽酵母を使った遺伝学的手法で研究することはできない。岩崎グループは、ヒト細胞とより似たクロマチン構造をもつ分裂酵母で相同組み換えを解析している。分裂酵母は、出芽酵母の相同組み換え遺伝子ホモログの他に、分裂酵母にしか存在しない相同組み換え遺伝子を持ち、その中には、クロマチン構造のなかで相同組み換えを遂行するのに重要な働きをしている分子も見つかっている。

中山グループは、DT40 細胞を使ってヒストンおよびヒストン修飾酵素群を解析している。ヒストン修飾は、マススペクトロメーターによる実験方法が高感度になった結果、2 重鎖切断の部分でさまざまな修飾が短時間内に起こっていることも明らかになった。この修飾が相同組み換えに影響を与えていることを示唆する状況証拠が昨年より数報発表されている。ただし、この問いに確実に答える為には、修飾アミノ酸に点変異を挿入したヒストンを、2 重鎖切断直前に発現することが必要である。ニワトリはヒストン遺伝子の数がほ乳類より少ない(コアヒストン遺伝子クラスターが 3 遺伝子座にある)ので、ヒストン修飾の意味を遺伝学的に解析するのに、ほ乳動物細胞より優れた実験系である。中山グループは、既に 3 遺伝子座 (6 対立遺伝子クラスター) のうち 5 対立遺伝子クラスターを除去した DT40 を作製した。したがってヒストン修飾を遺伝学的に解析する為には、最高の実験系を既に自作している。彼等は、ヒストン修飾酵素群の遺伝子破壊を本プロジェクト前に実施したが、これらの酵素は多彩な機能を持つので、必ずしもヒストン修飾の、相同組み換えにおける役割は十分に解明できなかった。

本プロジェクト開始時に、相同組み換え分子とクロマチンとの相互作用が将来に重要な研究課題になることを予想して、この 2 グループを共同研究者に加えた。中山グループとの共同研究によって、ヒストン H2AX リン酸化と組み換えタンパク (XRCC3) とが互いに協調して、損傷部位において Rad51 が重合するのを促進することを解明した。[武田グループ報告書 6) 参照]

(4) 組み換えタンパクの構造解析、伊藤グループとの共同研究

伊藤グループは、我々の共同研究者の柴田教授 (理研、和光) が統括する大講座の 1 グループである。構造解析から予想される特定のアミノ酸の機能は、そのアミノ酸に変異を入れたミュータントを遺伝学的手法で解析することによって、検証する必要がある。一方、患者さんで同定された変異によるアミノ酸置換の生物学的意義は、構造生物学者の協力なしには得ることはできない。さらに Rad51 や Mre11/Rad50/Nbs1 コンプレックスのように、細胞の生存に必須のタンパクの機能解析は、温度シフトや化合物を使って迅速かつ可逆的に、それらの分子の機能を ON/OFF できないと調べる

ことは困難である。以上の目的を実現するために、我々は、タンパクの構造解析（伊藤グループ）と DT40 の遺伝学的解析とを平行して研究することを本プロジェクト開始当時に目論んだ。まだ共著論文発表に至るまでの成果をあげていないが、彼等との情報交換はたいへん有意義であった。また柴田教授のサブグループである太田博士と共同研究することによって、ヒストンのアセチル化が抗体遺伝子の相同組み換えによる多様化（Ig gene conversion、図 3）を 50 倍促進することを明らかにした（論文 H17-10）。

（5）標的組み換えを促進させる人工的な方法の開発

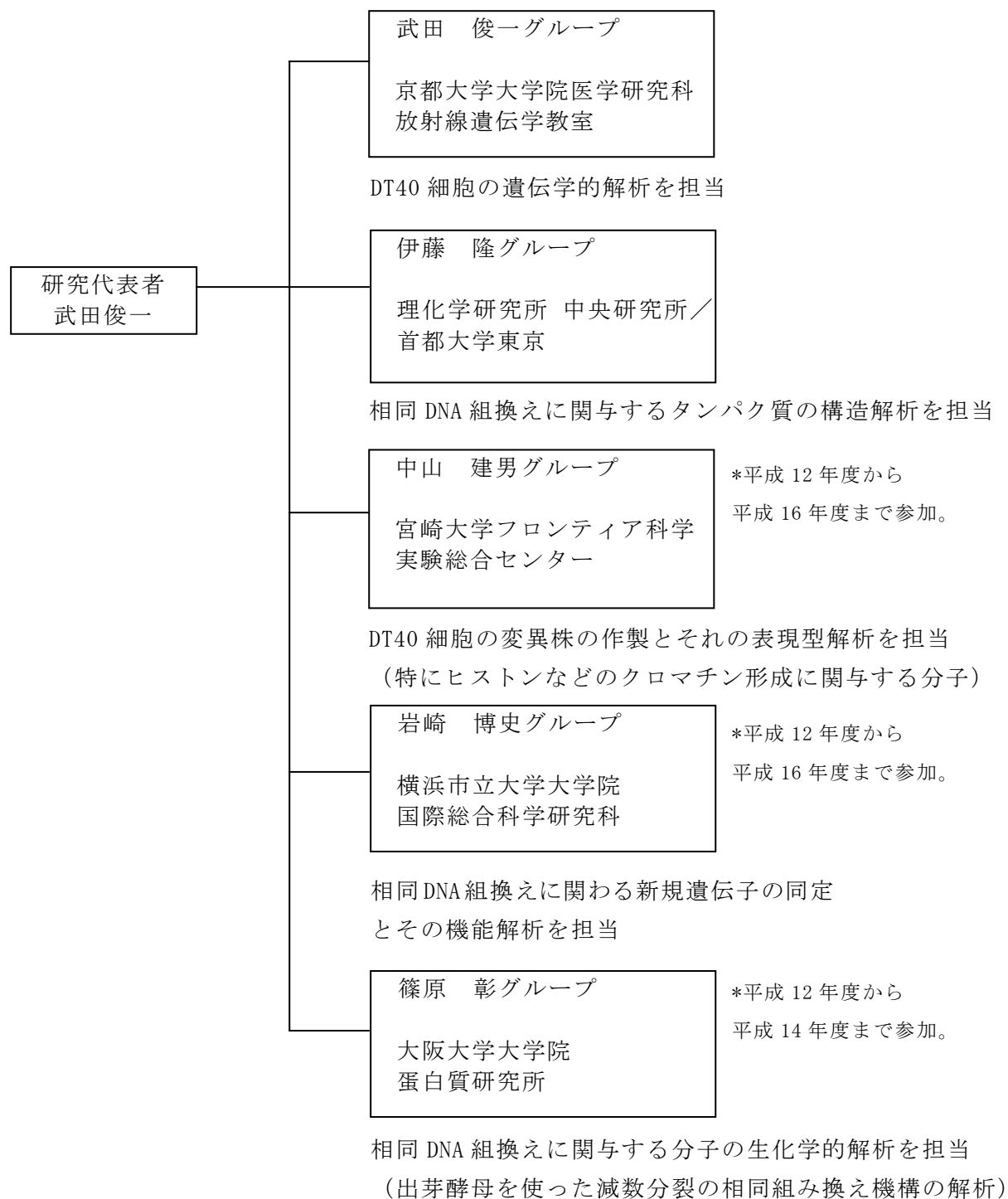
相同組み換えでは、10 種以上の分子が互いに協調しながら反応が進む。そのなかの 1 種類の分子を改変して標的組み換えを促進させることは、現在の研究レベルでは困難である。一方、DNA 切断酵素やヘリカーゼ（2 重鎖をほどく酵素）は 1 種のポリペプチドでも細胞のなかで染色体 DNA に働きかけることができるものが多い。さらに大腸菌由来の酵素でもヒト細胞の環境で働くことができる場合もある。我々は、ある種の DNA 切断酵素が実際に標的組み換え効率を上昇させることを明らかにした。[武田グループ報告書 10) 参照]

（6）DT40 特異的に働く相同組み換え分子の検索

相同組み換え分子の遺伝子破壊の表現型は、ほとんどの場合にマウスと DT40 細胞とで同じである。ただし、定量的には完全に同じではない。この差異に着目して、DT40 特異的に働く分子の検索を進めている。

相同組み換えは、10 種類以上の分子が関与する複雑な生化学反応であり、しかも体細胞分裂のときには複製とリンクして機能する。この反応の全貌を理解するためには、DT40 を使った遺伝学的手法がベストである。我々は、相同組み換えに関連した全分子を網羅的に解析することにより、数年以内にヒト細胞で簡単に遺伝子破壊できるようになると予想する。[武田グループ報告書 17) 参照]

(2) 実施体制



3. 研究成果

3.1 DT40 細胞の遺伝学的解析 (京都大学 武田グループ)

(1) 研究内容及び成果

1) 損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ η の相同 DNA 組換えにおける役割の解析

(1) 目的

DNA ポリメラーゼ η (Pol η) は、色素性乾皮症のバリエーション型 (XP-V) の原因遺伝子がコードするタンパク質で、損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼである。この Pol η の欠損株を、標的組み換え効率の高いニワトリ DT40 細胞を用いて作成し、相同 DNA 組換え (HR) における Pol η の役割の解析をする。

(2) バックグラウンド

HR は DNA 合成のステップを伴うはずだが、この DNA 合成ステップに関与する DNA ポリメラーゼは、研究の進んでいる酵母でもほとんどわかっていない。Pol η は、XP-V の原因遺伝子として同定され、複製 DNA ポリメラーゼが紫外線で損傷された鋳型鎖で停止したときに、複製 DNA ポリメラーゼに代わって損傷鎖を鋳型にして DNA 合成できる柔軟性に富む損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼである。我々は、この柔軟性に富む Pol η が、HR において、DNA 合成のステップに関与している可能性があると考えた。

(3) 方法

ニワトリ DT40 細胞を用いて、Pol η 欠損株を作成し、紫外線や電離放射線、あるいはシスプラチンなど薬剤に対する感受性や、増殖速度が、ヒト XP-V と同様の表現型を示すかどうか確認した。HR において Pol η の関与を調べるために、作成した Pol η 欠損株を用いて、I-SceI 制限酵素で作られた 2 重鎖 DNA 切断が HR によって修復される効率について調べた。さらに、HR の一種である遺伝子変換 (gene conversion) による抗体遺伝子可変領域の多様化 (図 7) の起きる頻度や、多様化がどのように起きているかを調べ、Pol η の HR における役割について検討を加えた。

(4) 結果

ニワトリ DT40 細胞を用いて、Pol η 欠損細胞が 4 株得られ、これらの株は、野生型とほぼ同等の増殖速度を示した。得られた Pol η 欠損ニワトリ DT40 細胞 (*pol* η) は、シスプラチンなどの薬剤や、電離放射線に対して感受性を示さなかったが、紫外線に対しては感受性を示した。以上のことから、*pol* η は、ヒト XP-V とほぼ同じ表現型を示すことが確認できた。そこで、Pol η が HR に関与しているかどうか調べるために、I-SceI 制限酵素で作られた 2 重鎖 DNA 切断が HR によって修復される効率を調べたところ、*pol* η においては修復効率が、野生型と比べ 10 倍低かった。この *pol* η にヒト Pol η を発現させたところ、修復効率は野生型と同程度まで回復した。次に、HR の一種である遺伝子変換による抗体遺伝子可変領域の多様化 (図 7) を調べたところ、*pol* η においては遺伝子変換の頻度が野生型に比べ 2-6 倍低下することを見出した。この *pol* η にヒト Pol η を発現させたところ、この頻度も野生型と同程度まで回復した。さらに、*pol* η において、どのように遺伝子変換が起きているかを調べると、野生型に比べ遺伝子変換によってコピーされる長さが著しく長くなっていることが明らかと

なり、本来働くべきプロセッシビティの低い Pol η に代わって、プロセッシビティの高い DNA ポリメラーゼが働いていることがわかった。

(5) 結論

Pol η が HR に関与していることを明らかにすることができ、HR に関与する DNA ポリメラーゼを初めて同定できた。さらに、*pol η* において遺伝子変換のコピーの長さが野生型と異なることから、Pol η が、HR において、DNA 合成のステップ (図 8) に関与していることも確認できた。

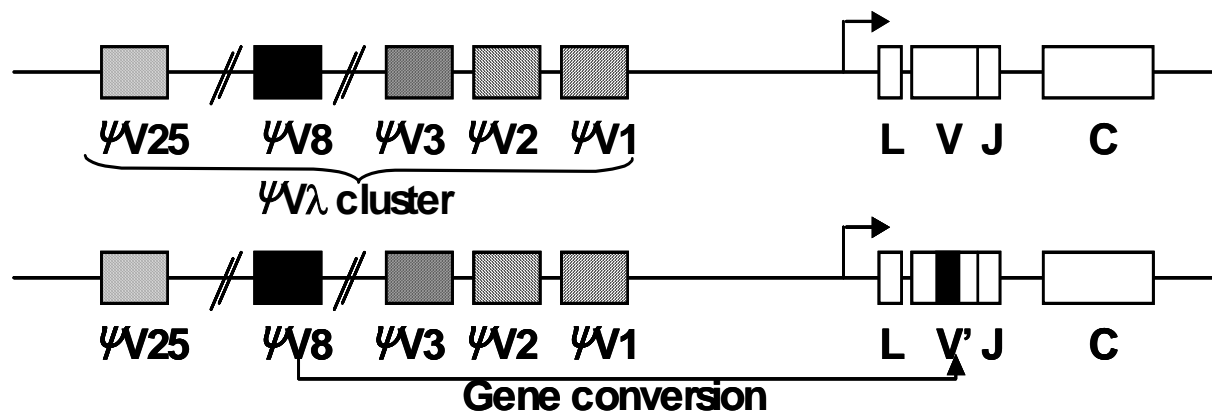


図 7 相同 DNA 組換えの一種、遺伝子変換 (gene conversion) によるニワトリ抗体遺伝子座の多様化の例。複数個ある鑄型遺伝子 ($\psi V\lambda$ cluster) が相同 DNA 組換えにより、活性化している抗体遺伝子座にコピーされる。図 3 と共通。

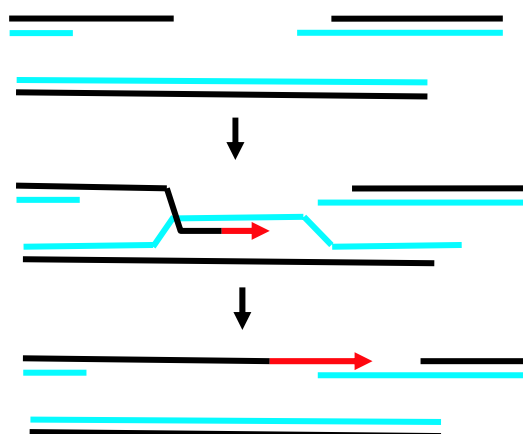


図 8 相同組み換えは、必ず損傷をもつ DNA (図最上段の 2 重鎖切断) と損傷をもたない相同配列とのあいだでおこる。切断端の 3' 単鎖 DNA が損傷をもたない相同配列に侵入しハイブリダイズ (図 2 段目) して相同組み換えが始まる。そして損傷をもたない相同配列を鑄型に、侵入 3' 端をプライマーにして、DNA 合成がおこる (赤矢印)。合成された DNA が損傷をもたない相同配列から離れて、2 重鎖切断修復が完了する (図 3 段目)。

(6) 論文

H17-15: *pol η* の、相同 DNA 組み換えへの関与

2) 損傷乗り越え DNA 合成酵素 Pol κ の DNA 修復における役割の解明

(1) 目的

近年明らかになってきた損傷乗り越え DNA 合成酵素の 1 つである Pol κ が、生体内でどのような DNA 損傷乗り越えに関与しているかを、DT40 ニワトリ B リンパ細胞株の系を用いて解析する。

(2) バックグラウンド

損傷乗り越え DNA 合成は近年見出された新しい DNA 合成であり、遺伝情報の伝達に重要な役割を果たしている一方で、その不正確さから放射線や環境変異原を原因とする突然変異誘発や発癌に関与している可能性が示唆されている。我々はこれまでに Pol ζ の活性サブユニットである *REV3* 破壊株が放射線、紫外線、及び各種化学変異原に対して極めて強い感受性を示すのに対し、Pol κ 破壊株は弱い感受性を紫外線に示すのみであることを明らかにしていた。一方で試験管内の実験では Pol κ が化学的損傷を受けた鋳型鎖に対して相補鎖を合成し得ることが示されており、生体内における Pol κ の役割についてより詳細に検討される必要があった。

(3) 方法

我々の作製した *REV3* 破壊株を親株として、*POLK* 破壊コンストラクトを用いて *REV3*^{-/-}*POLK*^{-/-}二重破壊株を作製する。薬剤耐性遺伝子をつなぎあわせた *POLK* ターゲティングベクターを *REV3* 破壊株に導入、薬剤で選択後、サザンブロットによって標的組換えの起こったノックアウト細胞 (*REV3*^{-/-}*POLK*^{-/-}細胞) を取得する。当研究室で確立された DNA 修復、組換えに関するさまざまな試験を行い、2 重破壊株の DNA 修復における役割を評価する。

(4) 結果

REV3^{-/-}*POLK*^{-/-}細胞は *REV3*^{-/-}細胞と同じく、野生型よりやや遅い増殖速度を示した。姉妹染色体分体交換効率及び染色体断裂効率の測定を行なった所、*REV3*^{-/-}*POLK*^{-/-}細胞と *REV3*^{-/-}細胞に有意な差は見られなかった。次にメチルセルロース培地でのコロニー形成能を用いた感受性測定を行なった。放射線や紫外線、シスプラチンやマイトマイシン C などの各種抗癌剤 (DNA 架橋剤)、ENS や MMS や MNNG といったモノアルキル化剤に対する感受性の測定を行なった結果、モノアルキル化剤に対してのみ *REV3*^{-/-}*POLK*^{-/-}細胞は *REV3*^{-/-}細胞よりも強い感受性を示した。この強い感受性は *REV3*^{-/-}*POLK*^{-/-}細胞に *POLK* 遺伝子を戻すことにより抑制された (図 9)。さらに *REVI*^{-/-}細胞を親株として *REVI*^{-/-}*POLK*^{-/-}細胞を作製し同様の感受性試験を行なった。その結果モノアルキル化剤に対して *REVI*^{-/-}*POLK*^{-/-}細胞は *REV3*^{-/-}*POLK*^{-/-}細胞と同じ感受性を示すことが明らかとなった。このことは我々が最近報告した、*REVI* が *REV3* と epistasis の関係にあるという結果と整合すると共に、モノアルキル化損傷乗り越えにおいては Pol κ が Rev1 や Rev3 とは独立に機能していることを示している。

(5) 結論

DT40 を用いた逆遺伝学的解析により、Pol κ の生体内でのモノアルキル化 DNA 損傷乗り越えへの関与が明らかになった。紫外線損傷に対しては、*REV3*^{-/-}*POLK*^{-/-}細胞は *REV3*^{-/-}細胞と同じ感受性を示したことから、Pol κ はチミン 2 量体の乗り越えに inserter ではなく extender として関わっているモデルが考え得る。

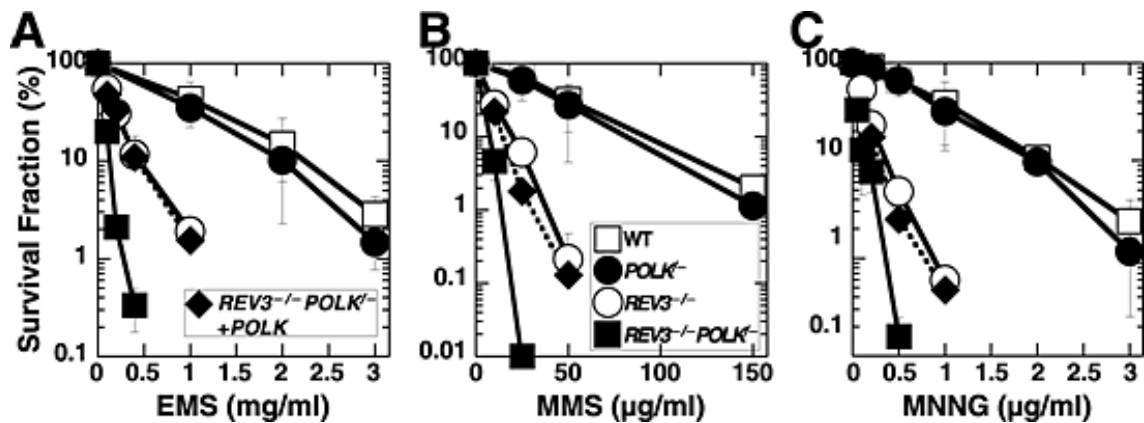


図9 3種類のモノアルキル化剤に対する $REV3^{-/-}POLK^{-/-}$ 細胞の感受性の解析。 $REV3^{-/-}POLK^{-/-}$ 細胞は $REV3^{-/-}$ 細胞よりも強い感受性を示し、この強い感受性は $REV3^{-/-}POLK^{-/-}$ 細胞に $POLK$ 遺伝子を戻すことにより相補された。

(6) 論文

H14-2: Pol κ 欠損細胞の解析

H17-17: Pol μ / Pol ζ 2重欠損細胞の解析

3) 損傷乗り越えポリメラーゼは染色体安定性に関与し、相同組み換え経路とともに複製中におこるフォークの破綻を防止する

(1) 目的

複製のバックアップ機構としての複製後修復経路(損傷乗り越え修復と相同組換え)のゲノム安定性における役割を明らかにする。

(2) バックグラウンド

近年、生存に必須ではない新規 DNA ポリメラーゼが酵母、動物細胞で次々に単離されてきた。これらのポリメラーゼは損傷乗り越えポリメラーゼと呼ばれ、その多くは、複製フォークが乗り越えられない傷に出会ったとき、一時的にその機能を代行し、正常なゲノムの複製を補助すると考えられている。その中でも、酵母 $\Delta rev1$, $\Delta rev3/\Delta rev7$ (Pol ζ) 変異株は、紫外線損傷時の突然変異率が極端に低下するため、これらは複製中に紫外線損傷を乗り越えると同時に、その修復時に変異を導入する主要なポリメラーゼと考えられている。

(3) 方法

ポリメラーゼの触媒サブユニット Rev3 分子のポリメラーゼドメイン欠失変異株を作製した。さらに、複製後修復の2つの主要な経路、相同組換えと損傷乗り越え修復を同時に欠損した株 ($\Delta Rad54/\Delta Rev3$) を Cre-loxP をつかったコンデシヨナル法で作製した。また、Rev1, Rev3, Rev7 の遺伝学的相互作用を明らかにするために、 $\Delta rev1/3/7$ の三重変異株を作製した。

(4) 結果

Pol ζ 変異株 ($\Delta rev3$) は、紫外線、 γ 線、架橋剤、過酸化水素とすべての DNA 傷害

剤に強い感受性を示し、広範な DNA 損傷に重要な役割を担っていた。とりわけ、G2 期に放射線を照射すると著しい染色体断裂を呈し、G2 期に機能する組み換え修復が傷害されている可能性が示唆された。また、ゲノム不安定性の指標である染色体断裂、姉妹染色分体交換頻度の上昇をみとめた。Δrev1, Δrev3, Δrev7, Δrev1/3/7 これらの株は、上述した DNA 損傷に対してすべて同じ反応を示し、これらの分子は同一の経路で働いていることが示唆された。さらに、複製後修復の 2 つの主要な経路—相同組み換え (Rad54) と損傷乗り越え (Rev3) の両分子を欠損した株をコンデシヨナル法で作製した。タモキシフェン添加にて、Rad54 遺伝子をとばし、両方の遺伝子を欠損した状態にすると、この株は染色体断裂を多発して死亡した。

(5) 結論

Pol ζ (Rev3/Rev7), Rev1 は広範なゲノム損傷の修復に重要な役割を担っている。さらに、この分子群は相同組み換え経路と互いにオーバーラップしながら、細胞内で絶えず発生している複製破綻を防止し、ゲノム複製に必須の働きをしている。これらは酵母細胞にはみられない動物細胞に特有な現象であり、複製後修復は動物細胞の生存にとって生存に必須の修復機構であることを明らかにした。(図 10)

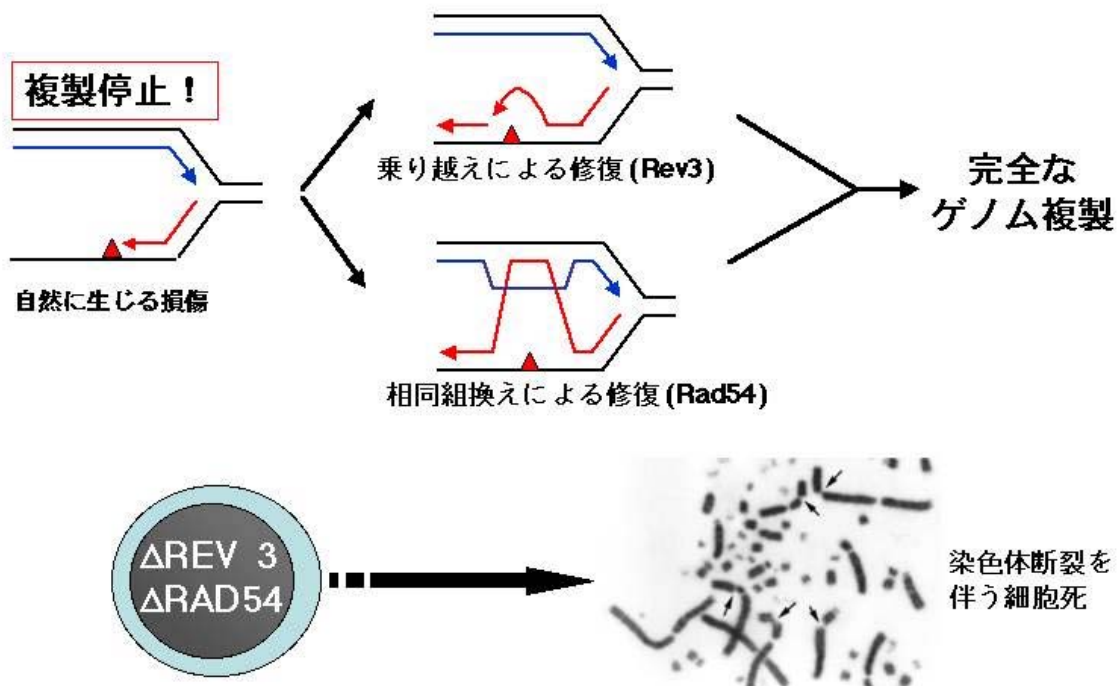


図 10 損傷乗り越えと相同組換えは動物細胞の生存に必須である。損傷乗り越えと相同組換えは互いにバックアップしながら、複製を補助している。この 2 つの機構がなくなると、細胞は染色体断裂をとめない死亡する。

(6) 論文

- H15-3: rev3 (Pol ζ) は、相同 DNA 組み換えに働きうる。
- H17-11: rev1/rev3/rev7 3 重欠損株の表現型解析

4) DNA ポリメラーゼ η とポリメラーゼ ζ との機能的相互作用

(1) 目的

DNA ポリメラーゼ η (Pol η) と DNA ポリメラーゼ ζ (Pol ζ) とは、それぞれ損傷乗り越えポリメラーゼと呼ばれる 9 種類のポリメラーゼの 1 つである。これら 2 種類のポリメラーゼの機能的相補性を、その 2 重欠損細胞を作製、表現型解析することによって明らかにする。

(2) バックグラウンド

損傷乗り越えポリメラーゼと呼ばれるポリメラーゼの 1 つであるこれらは、鋳型鎖の損傷部位で立ち往生した複製ポリメラーゼに代わってワンポイントリリーフ役として、損傷鎖を鋳型にして数塩基 DNA 合成する。Pol η と Pol ζ とともに酵母からヒトまで保存され、酵母では両者が互いに相補的に機能する。

(3) 方法

Pol η /Pol ζ 2 重欠損細胞を DT40 から作製した。さらに Pol η /Pol ζ 2 重欠損細胞をヒトもしくはニワトリ Pol η cDNA で相補した細胞も作った。そして、これらの細胞の、DNA 損傷誘導 (X 放射線照射、紫外線照射、アルキル化剤処理、クロスリンカー処理) に対する感受性を計測した。

(4) 結果

Pol η 欠損細胞は紫外線にしか高感受性を示さない。一方 Pol ζ 欠損細胞は、上記の DNA 損傷誘導処理すべてに対して高感受性を示す。驚いたことに、Pol η /Pol ζ 2 重欠損細胞は上記の DNA 損傷誘導処理すべてに対して Pol ζ 欠損細胞より高い耐性を示した。Pol η /Pol ζ 2 重欠損細胞に Pol η cDNA を発現すると、Pol ζ 欠損細胞と同じ表現型を示した (図 11)。

(5) 結論

我々の知見は、損傷乗り越えで、まず Pol η が働いてから Pol ζ が乗り越えを完了する 2 ステップモデルを支持する (図 12)。Pol η が機能しないと他の経路が複製停止を解除できるのに対して、Pol η が働いてから Pol ζ が機能しないと他の複製停止解除機構が働けないのであろう。

(6) 論文

H15-3: Pol ζ 欠損細胞の解析

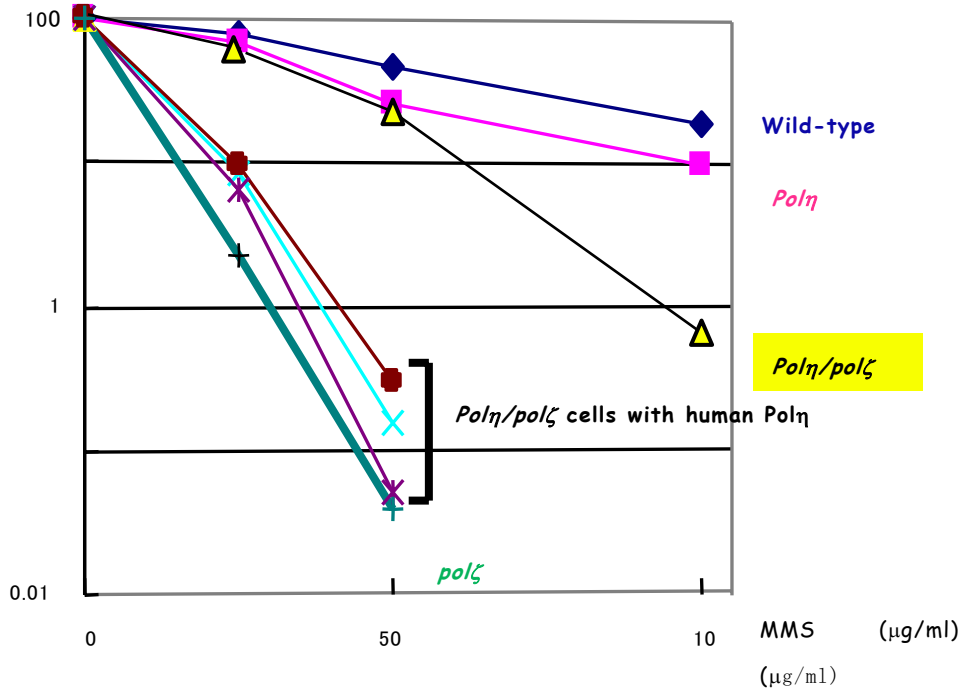


図 11 右に示した各ポリメラーゼ欠損細胞 (+野生型) を、横軸に示した濃度の、MMS (DNA の塩基をメチル化するアルキル化剤) で 1 時間処理した後、細胞をメチルセルロース入り培地にまき、1 週間後に出現したコロニーを数えた。薬剤処理のないときに出現するコロニー数を 100% にした時に、薬剤処理後のコロニー数を縦軸に log で示した。

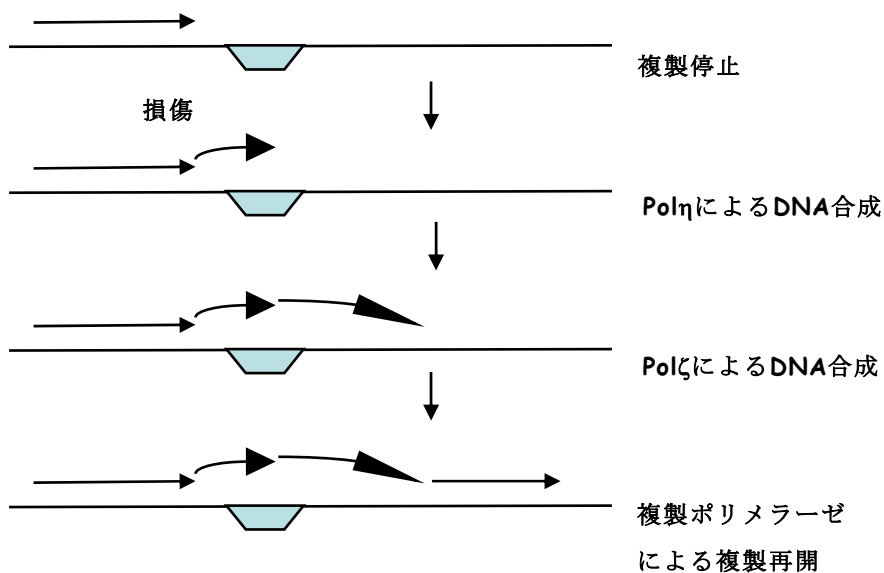


図 12 2ステップ損傷乗り越えモデル

5) DNA ポリメラーゼ θ の、塩基除去修復における役割の発見

(1) 目的

DNA ポリメラーゼ θ (Pol θ) は、B タイプ DNA ポリメラーゼとの相同性からヒトゲノム上で見つかった新規遺伝子である。Pol θ の役割を、その欠損 DT40 細胞を作製することにより同定する。

(2) バックグラウンド

Pol θ は、N 末にヘリカーゼドメイン、C 末にポリメラーゼドメインをもつ。相同遺伝子がショウジョバエで見つかっており (Mus308)、その欠損によりクロスリンカーに高感受性を示すようになる。ヒトでは、Pol θ を含めて 3 種類のパラログ (ヘリカーゼドメインのみを持つ Hel308、ポリメラーゼドメインのみを持つ Pol ν) が存在する。2004 年度に Pol θ の生化学的解析が発表され、ポリメラーゼ活性が証明された。そして 2005 年度には、Pol θ 遺伝子ノックアウトマウスが抗体遺伝子可変領域の点変異の解析により、Pol θ が抗体の Hyper mutation (損傷乗り越え) に関与することが証明された。

塩基除去修復は、酸素ラジカルによって生じた塩基を除去する修復機構である。その最後にステップ (除去後のギャップをうめる) に DNA 合成を伴うはずだが、この合成に関与する DNA ポリメラーゼは、DNA ポリメラーゼ β 以外わかっていない。

(3) 方法

ニワトリ DT40 細胞を用いて、Pol θ 、Pol ν 、Hel308 の各欠損株を作成し、紫外線や電離放射線、シスプラチン、過酸化水素、アルキル化剤、5MedU など薬剤に対する感受性を解析した。各欠損株は、ほとんど異常を示さなかったため、Pol θ /Hel308、Pol θ /Pol ν 、Pol β /Pol θ のそれぞれの 2 重欠損ミュータントを作製した。塩基除去修復経路は、過酸化水素、アルキル化剤、5MedU のそれぞれの薬剤処理によって生じた損傷を修復できる。除去後のギャップを定量するために、薬剤処理後、アルカリコメットアッセイとグリオキサールゲル電気泳動 (両方とも単鎖 DNA 切断を定量するアッセイ) とをおこなった。

ヒト Pol θ の機能を推定するために、ヒト細胞でレーザー照射による塩基損傷誘導後に Pol θ の動態を解析した。

(4) 結果

Pol β /Pol θ 欠損細胞は、過酸化水素、アルキル化剤、5MedU のそれぞれに対して、野生型細胞よりも高い感受性を示した (図 13)。これらの薬剤処理 1 時間後に、Pol β /Pol θ 欠損細胞では、野生型細胞や Pol β 欠損細胞、Pol θ 欠損細胞に比べて、Poly[ADP ribose]polymerase (単鎖 DNA によって活性化され、NAD を基質にしてそのポリマーを標的タンパクに結合させる) がより活性化されていた。5MedU 処理後、処理細胞の染色体 DNA をグリオキサールゲル電気泳動で解析することにより、Pol β /Pol θ 欠損細胞では単鎖 DNA が長く残ることがわかった。ヒト HeLa 細胞では、Pol θ は損傷発生部位に分のオーダーで集合することがわかった。

(5) 結論

ニワトリ Pol θ が、Pol β と互いに相補しながら、塩基除去修復に関与していることを明らかにすることができた。Pol θ は、損傷乗り越え DNA 合成にも関与していることが明らかになっているので、この知見は 1 種類のポリメラーゼが複数種類の機能を持ちうることを示している。

(6) 論文投稿中

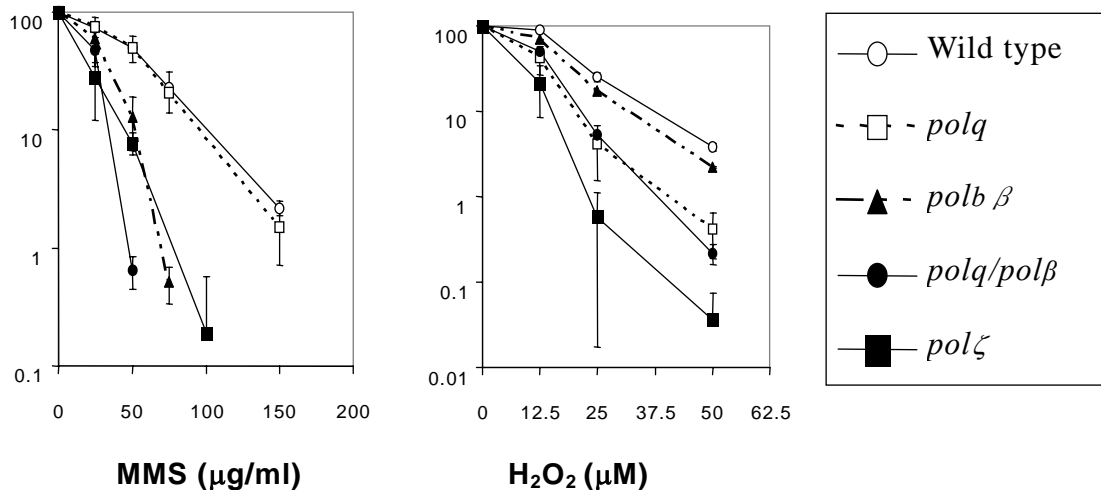


図 13 右に示した各ポリメラーゼ欠損細胞 (+野生型) を、横軸に示した濃度の、MMS (DNA の塩基をメチル化するアルキル化剤) もしくは過酸化水素で 1 時間処理した後、細胞をメチルセルロース入り培地にまき、1 週間後に出現したコロニーを数えた。薬剤処理のないときに出現するコロニー数を 100% にした時に、薬剤処理後のコロニー数を縦軸に log で示した。

6) H2AX のリン酸化は相同組換えを介して染色体安定性に寄与している

(1) 目的

ヒストン蛋白 H2AX リン酸化の DNA 損傷修復および染色体安定性における役割、およびその作用機構を解析する。

(2) バックグラウンド

H2AX はヒストン H2A 亜系の一種で、2 重鎖切断後速やかにリン酸化される。H2AX 欠損マウスは、不妊、免疫異常、易発ガン性などの染色体の調節異常に由来すると考えられる多彩な症状を示す。しかしながら、H2AX がどのようなクロマチン代謝・DNA 修復経路を調節してこれらの表現型をもたらしているかは不明である。

(3) 方法

H2AX 遺伝子座をジーンターゲティング法でリン酸部位を欠損した H2AX(S139A) に置換して、リン酸化のみ起こらないような変異株を作製した。さらに、染色体不安定性を示す組み換え欠損株 Δ xrc3 と H2AXS139A の 2 重欠損株を作製し、組み換え機能低下/染色体不安定性の表現型がどのように増強されるかを調べた。

(4) 結果

H2AXS139A 株は軽度のチェックポイント異常を示し、抗癌剤カンプトテシンに高感受性を示した (図 14)。さらに、放射線照射後の Rad51 フォーカスの出現が遅れ、遺伝子ターゲティングの頻度が低下した。これらの結果は、H2AX のリン酸化が相同組換えに関与していることを示唆していた。相同組み換え欠損株 Δ xrc3 と H2AXS139A との 2 重欠損株は単離できなかったため、コンディショナル法で樹立した (H2AXS139A/ Δ xrc3+tetH2AX)。テトラサイクリンの添加直後より、野生型の H2AX が減少し、3 日後にはほとんど検出できなくなった。4 日後には、細胞増殖が停止し、また放射線を照射しても Rad51 フォーカスが全く誘導できなかった (図 15)。その後、細胞は染色体断裂を呈して徐々に死亡した (図 16)。

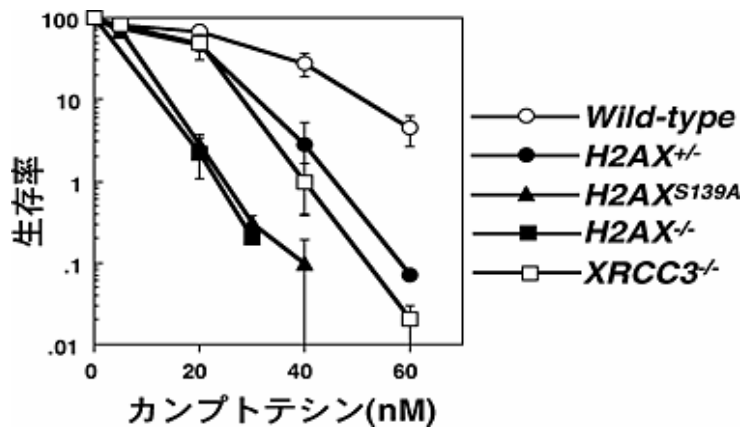
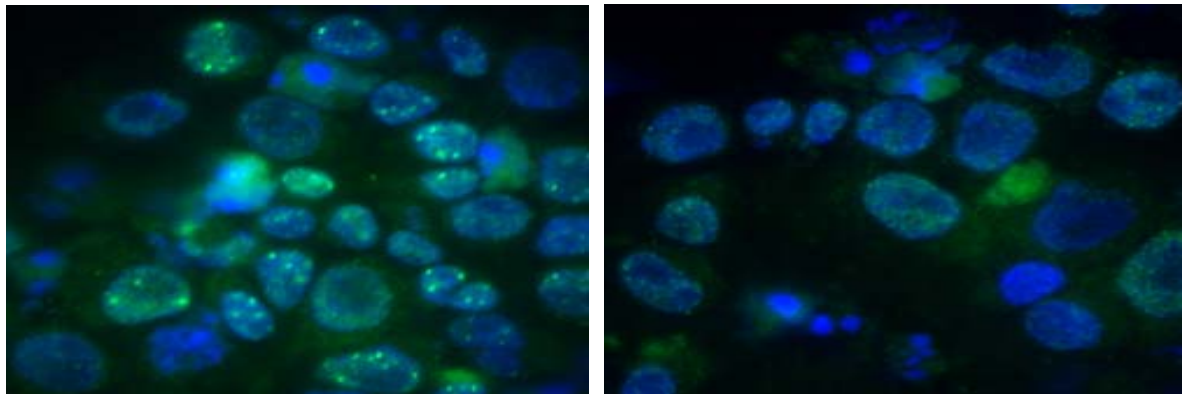


図 14 H2AX139A 変異株はカンプトテシンに高感受性を示す



$\Delta xrcc3$

$H2AXS139A/\Delta xrcc3$

図 15 H2AXS139A/ $\Delta xrcc3$ が死ぬ前 (野生型 H2AX^{wt} トランスジーンを除去して4日目)に、この2重欠損株は放射線照射してもRad51フォーカス(DNA切断部位にRad51が重合するのを免疫細胞染色で検出)がなくなる。

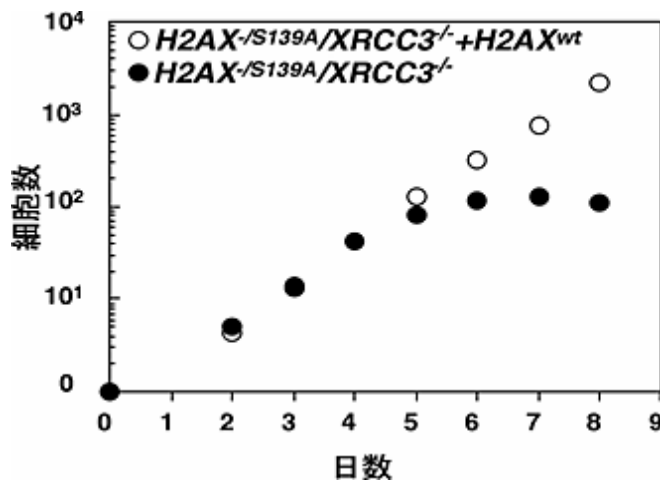


図 16 増殖カーブ。H2AX^{wt} トランスジーンを Day zero に Cre 組み換え酵素を活性化して除去した。その結果、生じた H2AXS139A/ $\Delta xrcc3$ 細胞は染色体断裂を多発して増殖できなくなった。

(5) 結論

H2AX のリン酸化は相同組換えを促進することで、ゲノムの安定性に貢献している。特に組換えの補助因子である XRCC3 とはお互いに相補しながら Rad51 の DNA 損傷部位への取り込みを促進している。この H2AX の機能は、 $\Delta xrcc3$ のように組換え機能低下で様々なゲノムストレスが発生するような状況でより重要になってくると考えられた。

(6) 論文投稿中。 中山グループとの共同研究。

7) 53BP1 チェックポイントタンパクの DNA 修復における役割の解明

(1) 目的

チェックポイントに重要な役割をすることが知られている 53BP1 タンパクが、DNA 修復、とくに DNA 二本鎖切断の修復においてどのような役割を担っているかを、DT40 ニワトリ B リンパ細胞株の系を用いて解析する。

(2) バックグラウンド

53BP1 は DNA 二本鎖切断に伴って早期に傷口にリクルートされてくるタンパクである。ヒト細胞でこの遺伝子の発現をノックダウンするとチェックポイントの異常が現れることから、53BP1 は DNA 損傷のセンサーとして働くのではないかと推測されている。以前我々の研究室では、ATM キナーゼが DNA 修復活性を持つことを明らかにし、チェックポイントタンパクが DNA 修復に積極的に関与しうることを証明した。(論文: C.Morrison et al., EMBO J., 2000) 53BP1 にも DNA 修復作用がある可能性が考えられた。

(3) 方法

ニワトリゲノムデータベースより 53BP1 のゲノムの塩基配列を得る。ゲノム DNA を鋳型にして 53BP1 遺伝子を PCR 増幅し、これに薬剤耐性遺伝子を繋ぎあわせてターゲティングベクターを構築する。DT40 にこのベクターを導入、薬剤で選択後、サザンブロットによって標的組換えの起こった 53BP1 ノックアウト細胞 (以降 53BP1^{-/-}細胞) を取得する。当研究室で確立された DNA 修復、組換えに関するさまざまな試験を行い、53BP1 の DNA 修復における役割を評価する。さらに、53BP1 の役割を遺伝学的に明確にするために、他の遺伝子の 2 重破壊株を作成し、薬剤や放射線に対する感受性を評価する。

(4) 結果

53BP1^{-/-}細胞は野生型よりやや増殖速度は遅かったが、おおむね良好な分裂を示した。mRNA や機能的なタンパクが存在しないことは、RT-PCR やウェスタンブロットで確認した。この細胞は 1 から 2 Gy といった低い線量の放射線に比較的感受性であり、4 Gy 以上の線量に対しては野生型並みの感受性を示した。これは非相同末端結合 (以降、NHEJ) 経路の因子である Ku の欠損細胞と似た表現型であることから、NHEJ を標的にしたさまざまな薬剤感受性試験を行った。その結果、トポイソメラーゼ I の阻害剤であるカンプトテシンに対してはより耐性を示し、トポイソメラーゼ II の阻害剤であるエトポシドには感受性を示すこと、標的組み換え効率が上昇していること、放射線の感受性は G1 フェーズでもっとも亢進していることが明らかとなった。これらは全て Ku 欠損細胞で見られる表現型である。53BP1 の NHEJ での役割をさらに明らかにするために、と 53BP1 と NHEJ 経路の因子である Ku70、および Artemis の 2 重欠損細胞を作成した。放射線感受性を調べたところ、53BP1 と Ku70、また 53BP1 と Artemis は epistasis の関係になった (図 17)。

(5) 結論

DT40 を用いた逆遺伝学的解析により、53BP1 の NHEJ 経路での役割が明らかになった。53BP1 は DNA 損傷に対して、チェックポイント機能により細胞周期を停止させるだけではなく、NHEJ により損傷を修復していることが示された。他に、チェックポイント分子 Rad17 が、DT40 では相同 DNA 組み換えに働くことを解析中である。

(6) 論文投稿中

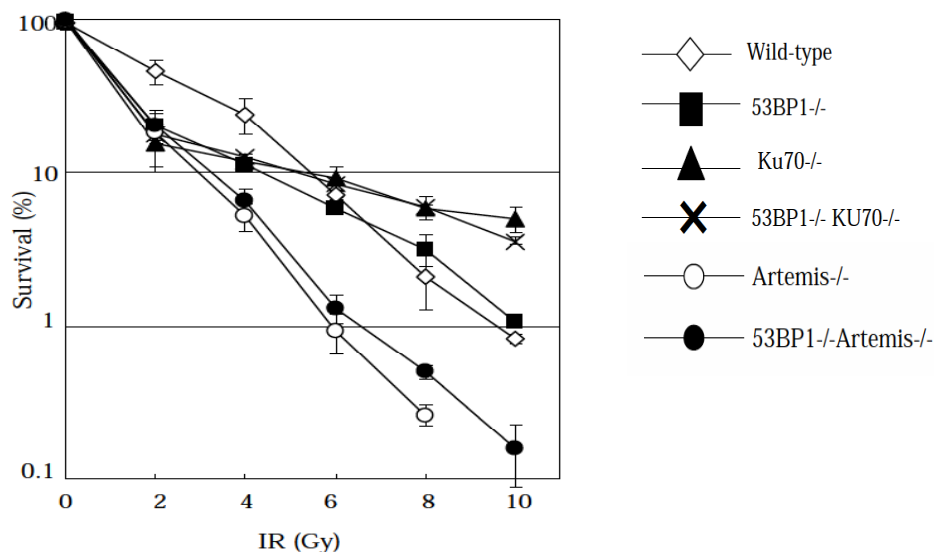


図 17 53BP1 と Ku70 ないし Artemis の遺伝学的解析。53BP1 と NHEJ 因子との 2 重欠損細胞は、放射線感受性において epistasis の関係になる。横軸に照射 X 線量を、縦軸にコロニー形成率（照射しない時を 100% コロニー形成率と定義）を log でプロットした。Ku70^{-/-}細胞が 2 Gy で多く死ぬのは、G₁ 期では放射線照射による 2 重鎖切断の修復に NHEJ が必須であり、Ku70^{-/-}ではその NHEJ が欠損しているからである。53BP1^{-/-}細胞でも同様に 2 Gy 照射で 70% ぐらいの細胞が死ぬ。10Gy 照射でこれらの細胞が野生型細胞よりむしろ耐性なのは、NHEJ との競合がないので、相同 DNA 組み換えが働きやすいことによる。

8) Rad18 と Poly[ADP ribose]polymerase による非相同末端結合による 2 重鎖切断修復の抑制

(1) 目的

DNA2 重鎖切断は、相同組み換えと非相同末端結合 (Nonhomologous end-joining) という 2 種類の経路によって修復される。酵母では相同組み換えが非相同末端結合に対して圧倒的に優位であるのに対して、動物細胞では非相同末端結合の活性が高い。動物細胞でも、複製ブロックによって姉妹染色分体に生じた 2 重鎖切断は、もう一方の姉妹染色分体との相同組み換えによって修復される。複製ブロックの時には非相同末端結合はなぜ働かないのであろうか。我々は、Rad18 と Poly[ADP ribose]polymerase (PARP) との、それぞれの遺伝子欠損細胞の表現型解析から、これらの分子が複製ブロック時に非相同末端結合を抑制していることを解明した。

(2) バックグラウンド

Rad18 は、ユビキチン E3 リガーゼであり、酵母ではすべての損傷乗り越えに必須である。ところが、DT40 やマウスにおいて Rad18 欠損細胞を作ってもその表現型はマイルドである。

PARP は 10 種類以上のファミリーメンバーから成る酵素であり、そのうち PARP-I と PARP-II とは、1 本鎖もしくは 2 重鎖切断の部位に秒のオーダーで集合し、その周囲のタンパク分子を Poly ADP リボシル化 (NAD の重合) する。1 重鎖 DNA 切断の修復に関与することは知られていたが、2 重鎖 DNA 切断修復への関与は不明であった。

PARP-II はニワトリには存在しない。PARP-I 欠損マウスは弱い放射線感受性を示すのに対して、PARP-I/II 2重欠損マウスは胎生致死である。

(3) 方法

ニワトリ DT40 細胞を用いて、Rad18、PARP-I の各欠損株を作成した。これらの細胞がいずれもカンプトテシン (= CPT、トポイソメラーゼ I の阻害剤、トポイソメラーゼ I が DNA から乖離できなくなるので、複製ブロック→2重鎖 DNA 切断の原因になる、図 4 と図 18 参照) に高感受性を示した。Rad18 と PARP-I とが、それぞれ相同組み換えと非相同末端結合のどちらの経路に属して働いているかを明らかにするために、まず、非相同末端結合の最初のステップに働く Ku70 との 2重欠損細胞 (rad18/ku70 と PARP-I/ku70) を作製し表現型を調べた。

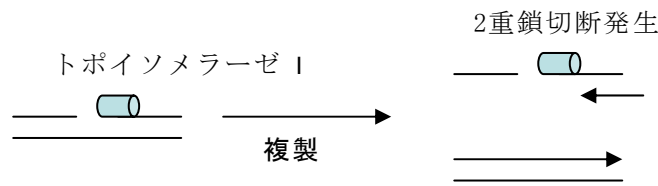


図 18 トポイソメラーゼ I は CPT が存在すると、自らが作った 1重鎖切断端から解離できなくなり、複製時に 2重鎖切断をおこす。

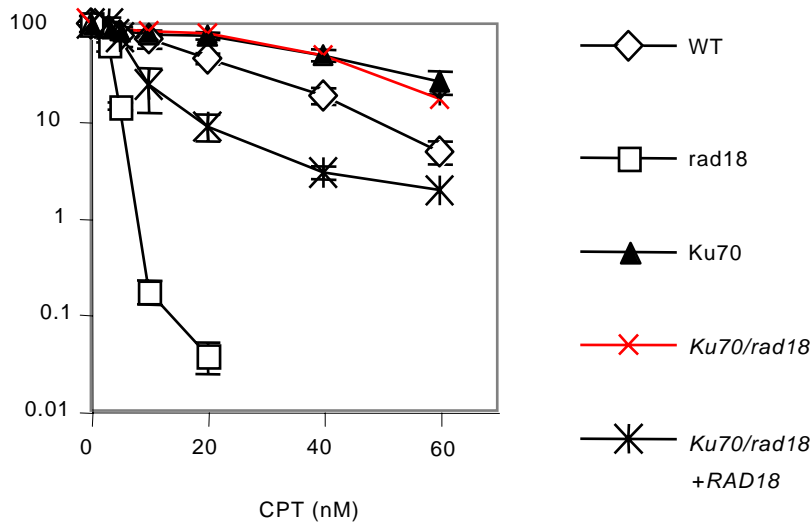


図 19 右に示した各遺伝子欠損細胞 (+野生型: WT) を、横軸に示した濃度の CPT を含むメチルセルロース入り培地にまき、1週間後に出現したコロニーを数えた。薬剤処理のないときに出現するコロニー数を 100%にした時に、薬剤処理後のコロニー数を縦軸に log で示した。

(4) 結果

rad18 欠損細胞の高い CPT 感受性は、ku70 欠損を rad18 欠損に加えることにより完全に抑制され、ku70 欠損細胞と同じ感受性になる。Ku70/rad18 の 2重欠損がカンプトテシンに耐性になるのは、相同 DNA 組み換え経路が rad18 欠損細胞よりも有効に働くからであることも証明した。

PARP-I 欠損細胞には全く PARP 活性が生化学的に検出できなかった。すなわち、こ

の欠損細胞は、ほ乳類細胞の、PARP-I と PARP-II との 2 重欠損に相当した。PARP-I 欠損はカンプトテシンに高感受性を示したが、PARP-I /Ku70 2 重欠損細胞は、rad18/Ku70 と同様に、野生型よりもむしろカンプトテシンにより耐性であった。PARP-I /rad18 2 重欠損も既に作成済みである。

(5) 結論

Rad18 と PARP とは、それぞれ複製ブロック発生時に非相同末端結合を抑制し、その結果、相同組み換えによる 2 重鎖切断修復を促進していることを明らかにした。RNAi の実験により、ヒト細胞でも同様のメカニズムが存在することも明らかにした。

(6) 論文

H14-3: rad18 欠損細胞の作製

H17 年 論文投稿中 (2 報)

9) Mre11/Rad50/Nbs1 コンプレックスが単鎖ギャップを相同組み換えで修復する

(1) 目的

Mre11/Rad50/Nbs1 の 3 遺伝子は、酵母では、それにコードされたタンパクがコンプレックスを形成し、相同組み換えによる DNA2 重鎖切断の最初のステップに働く。このコンプレックスが、抗体遺伝子が相同組み換えで多様化する反応にも関与するかどうかを決定する。

(2) バックグラウンド

Mre11/Rad50/Xrs2 (Nbs1) の 3 遺伝子の変異株は、酵母では、全く同じ表現型を示し、DNA2 重鎖切断端のプロセッシング (Blunt-end から 3' overhang を作る、図 20、左と図 26) に関与する。その結果生じた 3' overhang に Rad51 (大腸菌 RecA ホモログ) が重合する。一方、動物細胞においては、Mre11 の欠損は致死である (論文: Yamaguchi-Iwai et al., EMBO J., 1999) のに、Nbs1 の欠損は致死でないと報告されていた (論文: H14-11)。この知見は、動物細胞では Mre11/Rad50 が Nbs1 なしに機能することを意味するのであろうか?あるいは、未知の Nbs1 相同遺伝子がもう 1 つ存在するのであろうか?

DT40 細胞では、培養中に抗体遺伝子が相同組み換えで多様化し、その塩基配列が連続的に変化する。この相同組み換えは、AID と呼ばれる Deoxycytidine deaminase によって抗体遺伝子可変領域中の dC がウラシルに変換され、そしてウラシルが除去される時に生じる DNA 1 重鎖切断で開始される (図 20、中央)。1 重鎖切断で開始されるタイプの相同組み換えに Mre11/Rad50/Xrs2 (Nbs1) が必要か否かは、酵母でも、そのタイプの相同組み換えを特異的に解析できるアッセイ系がないので、全く解っていない。

(3) 方法

Nbs1 欠損 DT40 細胞が 増殖可能であることは既に論文発表されていた (論文 H14-11)。この実験では、Nbs1 遺伝子を完全には破壊していない可能性を考え、新しい遺伝子ノックアウトプラスミドを作製し直した。Rad50 欠損 DT40 細胞も新規に作製した。

Nbs1 が部分欠損した遺伝病 (ナイミーヘン症候群) で発現しているタンパク (Nbs1^{p70}、

野生型は Nbs1^{p95}) のみを発現した細胞を作製し、抗体遺伝子が相同組み換えで多様化する動態を観察した。さらに、AID 遺伝子をウイルス感染によって DT40 細胞に導入し、AID 強発現が、抗体遺伝子多様化に与える影響を調べた。

(4) 結果

Nbs1 完全欠損は致死であることを確認した。

Rad50 完全欠損は致死であることを確認した。

Nbs1^{p70} 発現細胞は生存できる。ただし、標的組み換え効率が野生型に比べて 2 桁以上低下し、カンプトテシン (トポイソメラーゼ I 阻害剤、複製をブロックすることによって DNA2 重鎖切断の原因になる、図 18、その切断は相同組み換えによって修復される) に高感受性を示した。

Nbs1^{p70} 発現細胞では、抗体遺伝子の相同組み換えによる多様化もその頻度が 2 桁以上低下した。ただし、その正確さは損なわれていなかった。AID 強発現によって、相同組み換えによる多様化は正常レベルに戻った (図 20、右)。

(5) 結論

酵母と同様、Mre11/Rad50/Nbs1 の 3 種類の分子は常にコンプレックスを作って機能する。コンプレックスは複製中に発生した DNA 損傷を修復するのに必須である。Mre11/Rad50/Nbs1 は、AID の働きによって生じた単鎖損傷を修復するタイプの相同組み換えを促進する (図 20、中央)。

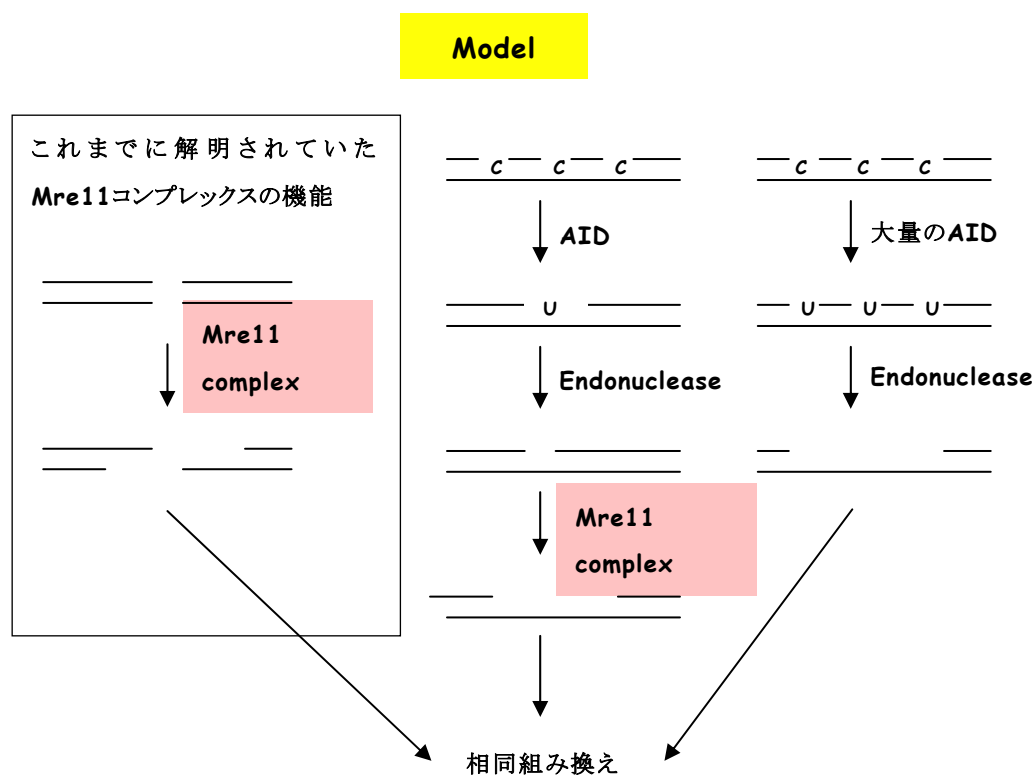


図 20 抗体遺伝子可変領域の相同 DNA 組み換え機構のモデル

(6) 論文

H17 年 論文投稿中

10) 高等真核生物における相同組換えに関与するヌクレアーゼの同定

(1) 目的

我々は、標的組み換え効率が高いため、高等真核生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 を用い、相同組換えに関与する可能性があるヌクレアーゼを解明すべく、ヌクレアーゼをコードする全遺伝子の破壊株を作成し、相同組換えに関する表現型解析を行うことにした。また、相同 DNA 組換えに関与するヌクレアーゼを同定した上で、哺乳類細胞株においても標的組み換え効率を上昇させる技術を確認すべく研究を行うことにした。

(2) バックグラウンド

相同組換えは複数の段階（開始、プロセッシング、DNA 鎖交換反応、修復合成、解離など）からなる複雑な分子機構である（図 21 参照）。そして、その過程においてヌクレアーゼが重要な役割を担っていることが考えられている。例えば、出芽酵母の H0 ヌクレアーゼは相同組換えで行われる接合型変換の開始に必要であり、Mre11 及び Exo1 は DNA 2 重鎖切断（DSB）部位のプロセッシングを行う。また、Rad1 は *in vitro* においてホリデイ構造の解離を行うことが知られている。しかし、高等真核生物において、相同組換えに関与するヌクレアーゼの知見は依然としてあまり得られていなかった。

(3) 方法

染色体にノックインしたプラスミドを 2 重鎖切断することにより誘導される標的組み換え定量アッセイ系を作った。2 重鎖切断部位の相同性のレベルを変えて、標的組み換え効率に与える影響を調べる実験系を作った。

(4) 結果

本プロジェクトが開始する以前に我々はエキソヌクレアーゼである Mre11 が相同組換えに関与することを明らかにしていたが（論文: Yamaguchi-Iwai et al., EMBO, 1999）、今回、新たに、DT40 細胞において非相同配列の長さが組み換え効率に与える影響を系統的に測定するアッセイ系を確立し、エンドヌクレアーゼ Fen-1 が組み換え開始点にある非相同配列を除去して組み換え効率を上昇させることを証明した。また、この研究の過程で Fen-1、エキソヌクレアーゼ Exo1、エキソヌクレアーゼの活性を有するヘリカーゼ Wrn の過剰発現により DSB により誘導される標的組み換え効率が上昇することを見だし、さらに、ある種のヌクレアーゼについては DSB によらない通常の標的組み換え効率も上昇することがわかった。

本プロジェクトではさらに、ヌクレアーゼをコードする遺伝子として数種類の遺伝子を単離し、エンドヌクレアーゼをコードする XPF 遺伝子の遺伝子破壊株の作成を行った。Xpf は出芽酵母等の研究から塩基除去修復及び標的組換えに関与することが予想されたが、我々の研究からホリデイ構造の解離段階に関与することが示唆された（投稿準備中）。

(5) 結論

本プロジェクトでは相同組換えに関与するヌクレアーゼとして 4 つの遺伝子を同定した。さらに、ある種のヌクレアーゼの過剰発現は哺乳類細胞株においても標的組換えの頻度を上昇させる可能性があると考えられる。現在、我々は哺乳類細胞株において Exo1 を一過性に過剰発現させ、標的組換えの頻度が上昇するか否かを検討している。

(6) 論文

H17-12: Fen1 が DNA 複製のみならず相同 DNA 組み換えに関与することを示した。

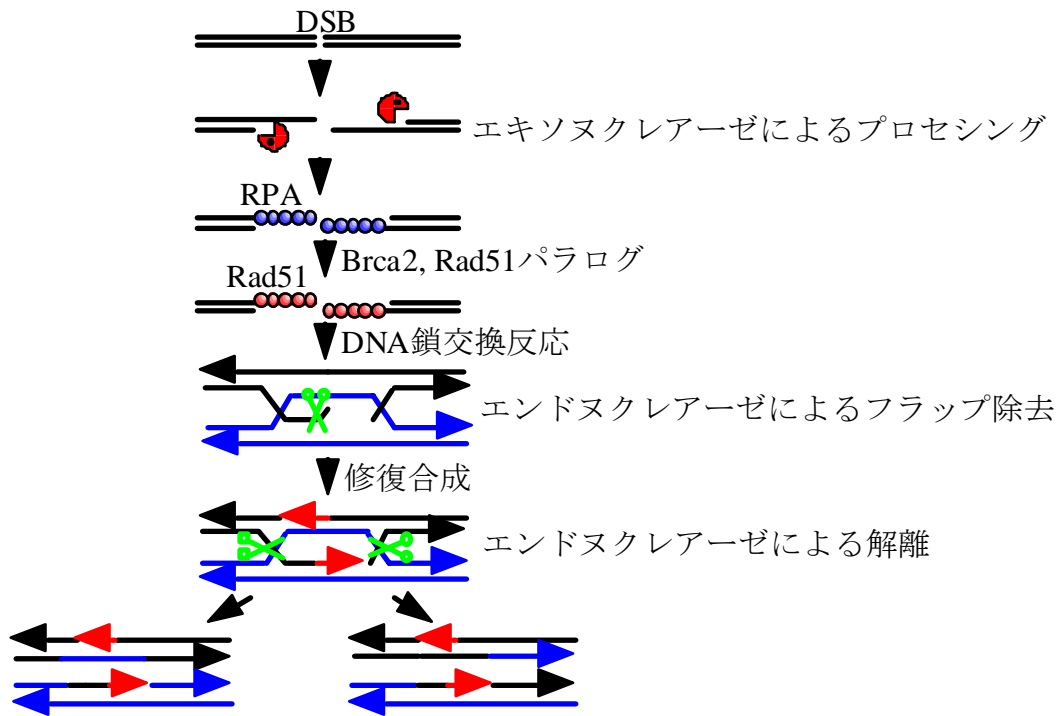


図 21 相同組換えの分子機構

相同組換えは複数の段階からなる複雑な分子機構であり、ヌクレアーゼが関与しうる段階は上記の3段階が考えられる。

11) 家族性乳癌原因遺伝子 BRCA2 の相同 DNA 組み換え機能の解析

(1) 目的

BRCA2 と Rad51 との機能的相互作用を明らかにする。

(2) バックグラウンド

家族性乳癌の原因遺伝子 *BRCA2* は、相同 DNA 組換えの中心的なプレーヤーである Rad51 と相互作用して、相同 DNA 組み換え修復に関与している。相同 DNA 組み換え修復は高等動物細胞の生存にとって必須の機構である。実際 *BRCA2* や Rad51 のノックアウトマウスは胎生致死であり、ニワトリ B リンパ細胞株 DT40 においても Rad51 破壊細胞は増殖できない。また *BRCA2* と Rad51 の両方を持つ真核生物で最も下等な担子菌では、*brca2*、*rad51* 単独欠損株、*brca2/rad51* 二重欠損株は全て同じ表現型を示す。本研究では予想外にも、*BRCA2* ノックアウト DT40 細胞は生存可能であることがわかった。

(3) 方法

(a) *brca2* 条件破壊細胞の作製

brca2 遺伝子の片方の allele を完全に欠失させ、もう片方の allele は Cre-loxP システムで *brca2* 遺伝子が切り出されるような条件破壊細胞を作製した。この条件破壊細胞で Cre recombinase を活性化した後、サブクロニングによって *brca2* ナル細胞を樹立した。

(b) BRCA2 非存在時の Rad51 機能を評価する。

- ・ X 線で DNA 二本鎖切断を誘導した時に、クロマチン分画にローディングされる Rad51 の量を評価する。
- ・ UV-レーザーで *brca2* ナル細胞の DNA に高密度の二本鎖切断を導入し、Rad51 が損傷部位に集合するかどうか調べる (図 23)。

(c) BRCA2 非依存的に働く Rad51 補助因子を明らかにする。

BRCA2 と Rad52、XRCC3 (高等真核細胞にある 5 つの Rad51 類似蛋白の一つ)、Rad54 の二重欠損細胞を作製し、各シングル欠損細胞と表現型を比較する。

(4) 結果

(a) BRCA2 非存在時の Rad51 機能

BRCA2 完全ノックアウト細胞でも、レーザー照射で高密度に DNA 損傷を与えると、レーザーの軌跡に沿って Rad51 の集積が観察できた (図 23 参照)。また電離放射線照射後のクロマチン分画に Rad51 が検出できた。

(b) BRCA2 非依存的に働く Rad51 促進因子の探索

brca2/rad52、*brca2/xrcc3* 二重変異株はいずれも生存可能であった。これらの 2 重変異株の増殖中に自然発生する染色体異常は、全て *brca2* 細胞と同レベルであった。またトポイソメラーゼ I 阻害剤であるカンプトテシンに対する感受性も、2 重変異株は *brca2* 細胞と同じであった。これらより Rad52、XRCC3 は BRCA2 と同じ経路で働いていることがわかった。一方、*brca2/rad54* は単離できていない (論文投稿中)。

(5) 結論

BRCA2 が無くても、効率は悪いものの Rad51 蛋白は損傷 DNA 部位に集合する。BRCA2 に依存しない Rad51 の機能を促進している因子は、Rad52 や XRCCC3 では無く Rad54 である。

(6) 論文

H13-6: ニワトリ *Brca2* 遺伝子のクローニング

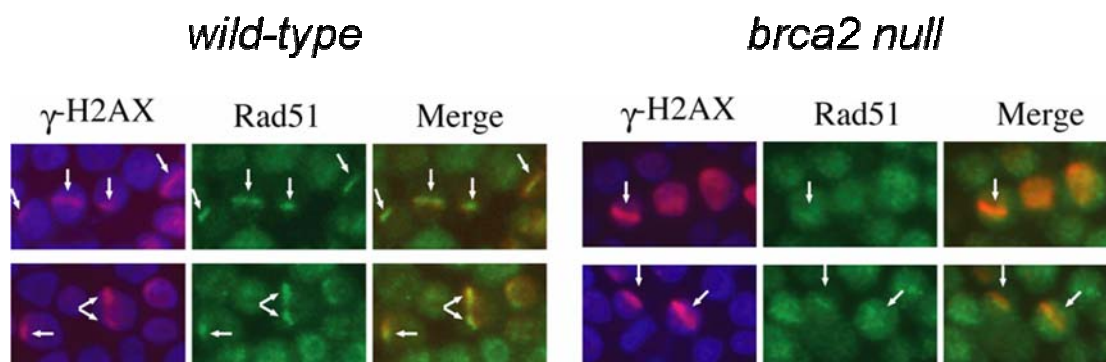


図 23 野生型細胞と *brca2* ナル細胞を UV レーザー照射 30 分後固定し、 γ -H2AX 抗体及び Rad51 抗体で 2 重染色した。各パネルの一番右は、 γ -H2AX 抗体の染色像と Rad51 抗体の染色像を重ね合わせたもの。

12) 家族性乳癌原因遺伝子 BRCA2 の機能ドメイン解析

(1) 目的

家族性乳癌原因遺伝子 *BRCA2* がコードしている蛋白は 3,397 アミノ酸からなる巨大な蛋白質で、相同 DNA 組換えに必須な Rad51 蛋白を始めとする他の蛋白や、DNA と相互作用して働くと考えられる。このような機能的に重要なドメインは、種を超えてアミノ酸配列が保存されている。この研究ではニワトリ B リンパ球 DT40 細胞を使って、ゲノム上の *BRCA2* 遺伝子を改変し、それぞれのドメインの欠失変異株の解析から、各ドメインの機能を明らかにすることを目的とする。

(2) バックグラウンド

BRCA2 蛋白は、Rad51 蛋白と相互作用して、相同 DNA 組み換え修復に関与していると考えられている。BRCA2 蛋白のアミノ酸配列は種間での保存度が低いが、N 末端領域、8 つの BRC リピート、C 末端領域、最 C 末端の核移行シグナル (NLS) 配列は例外的にアミノ酸がよく保存されていて、機能的に重要な領域であると予想される (図 24 参照) (論文 H13-6)。これらのうち BRC リピートは Rad51 蛋白と、C 末端保存領域は DNA と相互作用することがわかっており、核移行シグナルは BRCA2 蛋白が核に移動するのを促進する配列である。しかし BRC リピートが複数個ある意味や、N 末端の保存領域と相同 DNA 組み換え機能の関係については、ほとんど知られていない。

(3) 方法

BRCA2 遺伝子の一方の対立遺伝子を条件破壊できるようにしておき、もう一方の対立遺伝子をゲノム上で改変して、図に示したような様々な欠失型変異 BRCA2 蛋白を発現させる。作製した BRCA2 ミュータント細胞で、DNA 損傷に対する感受性、DNA 損傷後の Rad51 フォーカス形成能などの表現型を調べる。

(4) 結果

(a) ミュータント細胞での BRCA2 蛋白発現レベルと Rad51 フォーカス形成能

Western Blotting でそれぞれのミュータント BRCA2 蛋白がほぼ同量認められたので、蛋白の安定性には差がないと考えられる。またいずれのミュータント細胞も DNA 損傷後の Rad51 フォーカス形成は見られなかった。

(b) BRCA2 最 C 末端の核移行シグナルの欠失ミュータント (Δ NLS)

増殖速度は野生型細胞とほぼ同じで、シスプラチンに対してわずかに感受性があった。

(c) BRC リピートの様々な場所で truncate した N 末端蛋白を発現する細胞

N 末端から BRC リピート 3 までの BRCA2 (BRC3) を発現する変異細胞は、シスプラチンに対して Δ NLS 細胞よりやや強い感受性を示した。一方 N 末端から BRC リピート 1 までの BRCA2 (BRC1) や BRC リピート 8 までの BRCA2 (BRC8) を発現する変異細胞は、シスプラチンに強い感受性を示した。これらの感受性は BRCA2 完全欠損細胞の感受性と一致した。

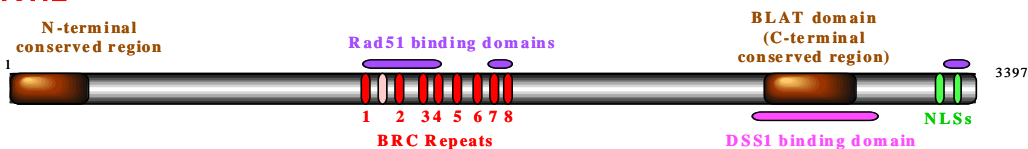
(d) BRCA2 の N 末端保存領域を欠失した BRCA2 を発現する細胞

ゲノム上でニワトリ BRCA2 遺伝子のエクソン 3~7 を欠失させ、N 末端の保存領域を欠く BRCA2 を発現する細胞 (Δ N) を樹立した。 Δ N 細胞は、シスプラチンに対して、BRC3 細胞とほぼ同程度の感受性を示した。

(5) 結論

BRCA2 の C 末端にある核移行シグナルは BRCA2 の機能において重要であるが、必須ではなかった。BRC リピートの数が多いほど必ずしも BRCA2 の DNA 修復機能が高いという傾向では無かった。BRCA2 の N 末端保存領域にも、C 末端保存領域と同様の、相同 DNA 組換えに重要な働きをするドメインが存在することがわかった。

野性型 BRCA2



変異型 BRCA2

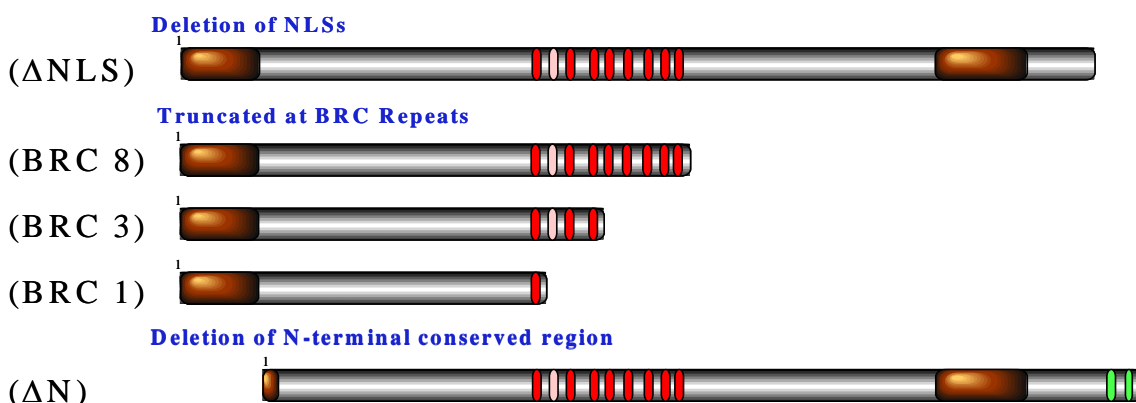


図 24 BRCA2 蛋白のドメイン構造及び各欠失型変異 BRCA2 蛋白の構造。
BRC リピート 1 と 2 の間の桃色の領域は、ニワトリと哺乳類の BRCA2 蛋白間で今回見つかった保存領域。

13) Fanconi 貧血原因遺伝子群による DNA 修復経路と、家族性乳癌原因遺伝子 BRCA2 による相同 DNA 組み換え修復経路の相互関係についての解析

(1) 目的

BRCA2 蛋白による相同 DNA 組み換え修復経路と Fanconi 蛋白群による DNA 修復経路の相互関係を遺伝学的手法で明らかにする。

(2) バックグラウンド

Fanconi 貧血は骨髄不全、好発癌性などを特徴とするゲノム不安定性疾患で、細胞レベルではシスプラチンなどの DNA 架橋剤処理後の高頻度な染色体断裂が特徴的である。少なくとも 13 の相補群に分類され、そのうちの一つである *FanCD1* 遺伝子は *BRCA2* 遺伝子そのものであった。また *in vitro* では BRCA2 蛋白と FANCG 蛋白及び FANCD2 蛋白が相互作用し、DNA 損傷依存性に核内で共局在するフォーカスを形成する。以上の状況証拠から BRCA2 蛋白による相同 DNA 修復経路と Fanconi 蛋白による DNA 修復経路が、ある局面では密接に関係して働いていると予想される。しかし両者の相互関係の遺伝学的な証明は、なされていない。

(3) 方法

Fanconi 相補群の一つである *fance* 遺伝子と *brca2*、*xrcc3*、*rad54* 遺伝子などの相同 DNA 組換えに関与する遺伝子の 2 重欠損株を作製し、表現型を各遺伝子の単独欠損

株と比較する。主な表現型としては、シスプラチンに対する感受性、自然発生及びシスプラチンによって誘導される染色体異常について調べる。

(4) 結果

(a) シスプラチンに対する感受性

*brca2*細胞、*fancC*細胞、*fancC/brca2*細胞はほぼ同じ感受性を示した(図 25-A)。*xrcc3*細胞は *fancC*細胞より感受性が弱く、*fancC/xrcc3*細胞は *fancC*細胞と同じ感受性を示した。*rad54*細胞も *fancC*細胞より感受性が弱い、*fancC/rad54*細胞は *fancC*細胞よりさらに強い感受性を示した(図 25-B)。

(b) 染色体分析

*brca2*細胞と *fancC*細胞は、シスプラチンによってほぼ同数の染色体異常を生じた。*fancC/brca2*細胞はこれらの単独変異細胞と同じレベルの染色体異常を示した(図 25-C)。また自然発生する染色体異常は *brca2*細胞が群を抜いて多く、*fancC/brca2*細胞は *brca2*細胞とほぼ同レベルであったが(図 25-C)、*fancC/rad54*細胞は単独変異細胞より多くの染色体異常を示した(図 25-D)。

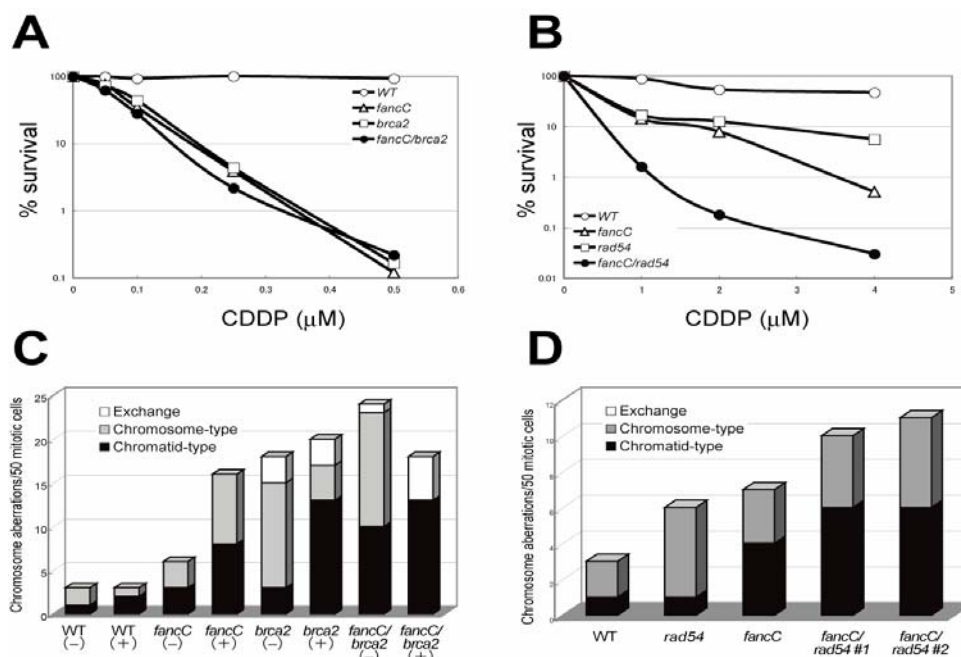


図 25 (A) *fancC/brca2*細胞のシスプラチンに対する感受性
 (B) *fancC/rad54*細胞のシスプラチンに対する感受性
 (C) *fancC/brca2*細胞の自然発生する染色体異常 (-) とシスプラチン曝露後の染色体異常 (+) ただし自然発生分の数を差し引いてある。
 (D) *fancC/rad54*細胞の自然発生する染色体異常

(5) 結論

クロスリンカーによるDNA損傷はFanconi経路がBRCA2と共同して修復している。同様にFanc DNA修復経路はXRCC3を必要とする。

一方Rad54による相同DNA組み換えは、Fanc修復経路とは独立に機能する。自然発生するDNA損傷やUV、X線による損傷は、BRCA2がFanconi経路非依存的に相同DNA組み換えによって修復する。

これまで相同 DNA 組み換えによる修復経路は、1 種なのか複数種類あるのか不明であった。今回の結果、複数種あり、それが Fanc 依存性と非依存性に区別されることがわかった。

(6) 論文 投稿準備中

14) 相同組み換えによる抗体遺伝子可変領域の多様化を指標した Brca2 の機能解析

(1) 目的

相同組み換えによる複製ブロックの解除は、今のところ特定の遺伝子座にブロックを誘導できないので、その解析が困難である。Brca2 欠損 DT40 細胞の表現型解析から、複製ブロックの解除機構の解明に、DT40 細胞における抗体遺伝子可変領域の多様化を調べるのが有効であることがわかった。

(2) バックグラウンド

ニワトリ B リンパ細胞の抗体遺伝子可変領域は、AID (Deoxy Cytidine Deaminase) による dC 脱アミノ化によるウラシル形成で開始される (図 20、図 26)。そのウラシルが除去修復される際に生じる 1 本鎖切断がギャップ (gap) に拡大され、そのギャップが相同組み換えによって修復される。この相同組み換え (Ig gene conversion) によって可変領域は多様化される。この系は、真核細胞のなかでは、ギャップによって誘導される相同組み換えを解析できる唯一の表現型アッセイである。ギャップが相同組み換えによって効率よく修復できない場合には、そのギャップは損傷乗り越えポリメラーゼによって埋められて修復される。以上のように、ギャップが相同組み換えもしくは損傷乗り越えポリメラーゼによって修復されることは、複製ブロックによって生じたギャップの場合にも起こっているはずである。

Brca2 は、その変異が家族性の乳がんの原因になる。細胞周期特異的に Rad51 (RecA のホモログで相同組み換えに必須) の集合をコントロールすることが示唆されている。

(3) 方法

Brca2 完全欠損は、マウスでは致死であるが、中央部から C 末側を除去したミュータントは生まれる。この生存可能マウスと同じ変異をニワトリ DT40 細胞に導入した (*brca2tr* 細胞)。染色体断裂の自然発生、放射線などの DNA 損傷誘導に対する感受性、放射線照射によって 2 重鎖切断部位への Rad51 の集合を免疫染色で検出、抗体遺伝子可変領域の多様化などの表現型解析をおこなった。

(4) 結果

ヒトやマウス細胞における Brca2 欠損と同様に、放射線高感受性、シスプラチン高感受性、損傷 DNA への Rad51 の集合の遅れが観察できた。抗体遺伝子可変領域の多様化を調べると、予想通り Ig gene conversion の頻度は大きく低下していた。ただし相同組み換えの正確さは損なわれていなかった。予想外なことに、低下と逆相関して点変異が蓄積していた (図 27)。点変異のパターンは、Rad51 paralog (XRCC2, XRCC3, Rad51B/C/D) 欠損 DT40 で観察されたものと同じであり C→T と C→G とが圧倒的に多かった。

(5) 結論

よって、1 本鎖ギャップを、相同組み換えで修復するかあるいは損傷乗り越えで修復するかを決定する司令塔の役割をもつことが示唆された (図 28)。

(6) 論文

H17-7: Brca2 による抗体遺伝子多様化の 2 つの経路間のスイッチ (図 28)

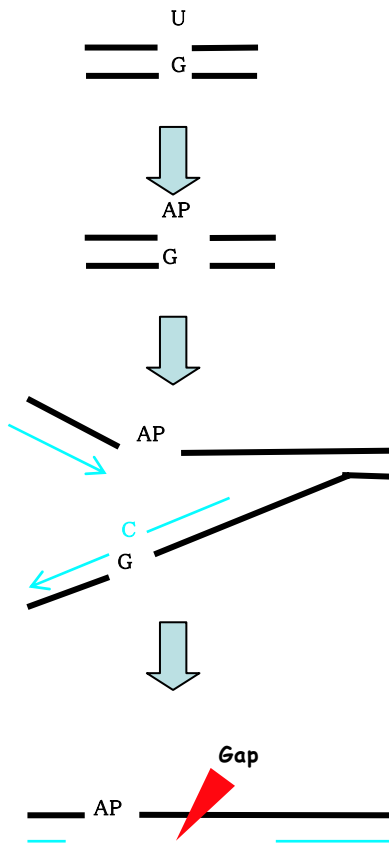


図 26 AID によって生じた U は、塩基損傷修復機構によって Abasic (AP) site に変換される。それが複製ブロックを起こし、単鎖ギャップが生じる。

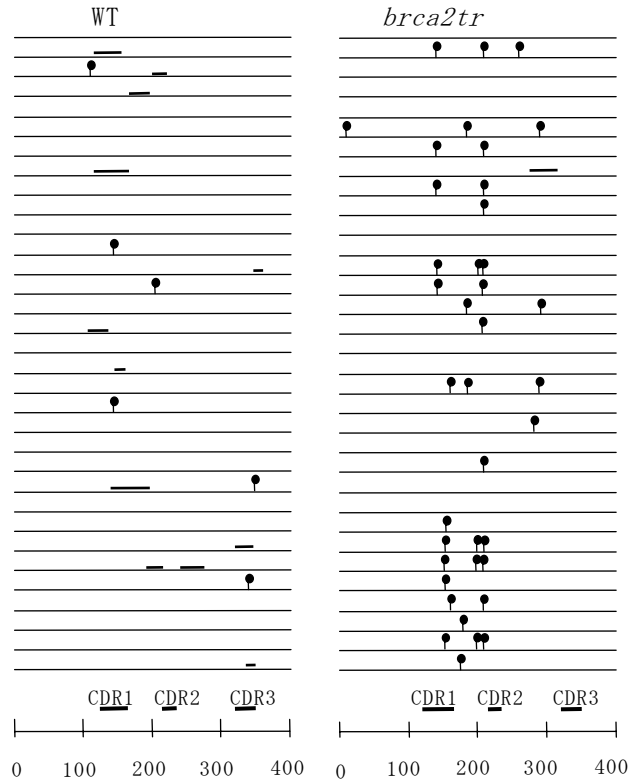


図 27 各横線が Ig λ 可変領域、太線が相同組み換え、黒点が点変異を示す。

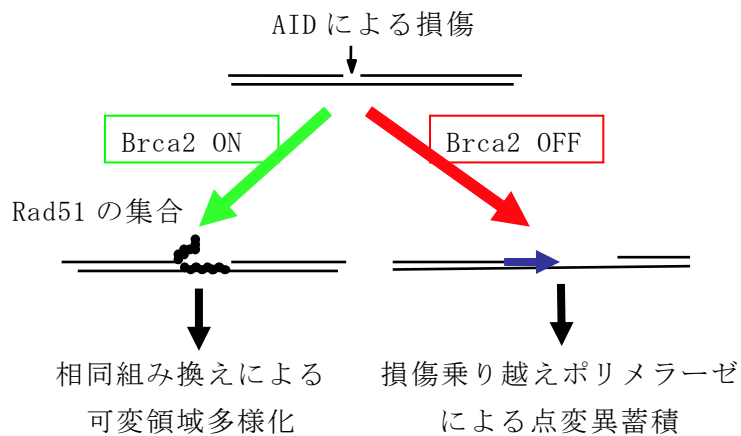


図 28 Brca2 は CDK 等によってその活性が制御されている。おそらく、その Brca2 によって Rad51 組み換え因子が損傷に重合するか否かが決定されている。重合すると相同組み換えによる抗体可変領域の多様化が進み、Rad51 が集合しないと単鎖ギャップは損傷乗り越えポリメラーゼによって埋められるのであろう。

15) 遺伝学的手法による Rad51 パラログ

(Rad51B/Rad51C/Rad51D/XRCC2/XRCC3)の機能的相互作用の解析

(1)目的

Rad51 (RecA ホモログ) は相同組み換えに中心的役割をもつ。2重鎖切断がおこると、そこに生じた1本鎖上にRad51が集合し重合する。この1本鎖DNA-Rad51コンプレックス (Nucleofilament) は、相同組み換えのための相同配列を探す。Rad51とアミノ酸配列が30%相同な遺伝子がヒトにはあと5種類 (Rad51B/Rad51C/Rad51D/XRCC2/XRCC3) 存在し、Rad51パラログと呼ばれる。Rad51パラログ同士アミノ酸配列を比較しても、互いに30%程度しか相同性がない。DT40から各Rad51パラログ分子の破壊株を作ってこれらの機能を同定する。

(2)バックグラウンド

相同組み換えは、損傷部位においてRad51組み換え分子が重合することで開始し(初期ステップ)と、組み換えに参加した2種類のDNAが分離する(後期ステップ)で終了する。

Rad51パラログは、出芽酵母で2種見つかっている。この2種のタンパク分子は、損傷部位でのRad51の重合を促進する役割をもつ。生化学的解析から、5種類のRad51パラログは2通りの複合体を作ることが推定されている(図29)。

(3)方法

各Rad51パラログ分子の破壊株をつくる。

各破壊株の表現型(シスプラチン、カンプトテシン、X線にそれぞれ細胞を曝露したときの細胞応答、Rad51フォーカス形成=X線照射で生じた2重鎖切断にRad51が集合するのを抗体免疫染色で定量)を調べる。

各Rad51パラログ分子の機能重複を調べる為に、2重欠損株(*xrcc3/rad51d*、*rad51b/rad51d* 2重欠損株)を作り、その表現型を調べる。

(4)結果

当初、各Rad51パラログ分子間の相同性から、機能的な重複もあると予想した。ところが予想に反し、各Rad51パラログ分子破壊株は、よく似た表現型を示した。いずれも同レベルの、シスプラチン感受性およびカンプトテシン感受性を示した。そして弱い放射線感受性を示した。

各Rad51パラログ分子破壊株で、2重鎖切断発生部位でのRad51フォーカス形成(初期ステップ)が遅れていた。破壊株間でその遅れに差異はなかった。

rad51b/rad51d 2重欠損株は、相加的なシスプラチンおよびカンプトテシンへの感受性増加を示した。*xrcc3/rad51d* 2重欠損株は、そのような増加を示さなかった(図30)。カンプトテシン(トポイソメラーゼI阻害剤、複製時に姉妹染色分体の一方のみを断裂する)処理後に染色体分析すると、姉妹染色分体の分離(後期ステップ)の異常を示唆するChromosome type breaks(2本の姉妹染色分体が同じサイトで両方断裂)が多く誘導された。ただし、いずれの2重欠損株もRad51フォーカス形成の遅れについては、各Rad51パラログ分子破壊株と同レベルであった。

(5) 結論

初期ステップについては、5種類の Rad51 パラログ分子は1つの複合体として機能し、しかもその機能に各 Rad51 パラログ分子が必須の働きをするのであろう。後期ステップについては、生化学的解析から示唆されているような Rad51B/Rad51C/Rad51D/XRCC2 と Rad51C/XRCC3 という2種類の複合体が別々に機能している可能性が大きい。

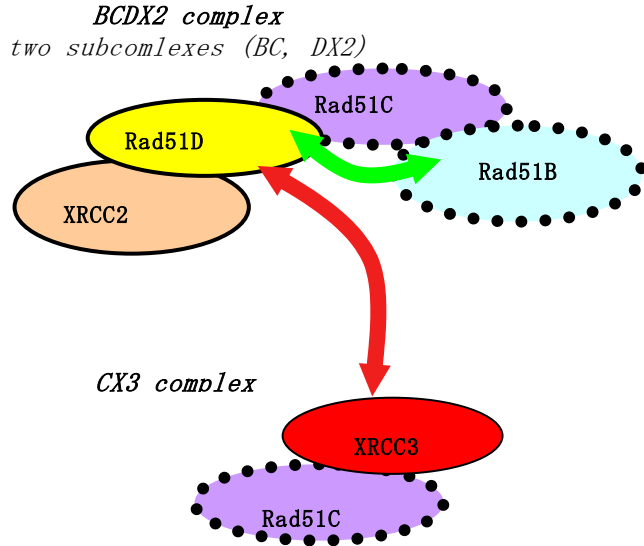


図 29 生化学的解析によると Rad51B/C, Rad51D/XRCC2, Rad51C/XRCC3, Rad51B/C/D/XRCC2 の4種類の複合体が細胞内にあることが確認されている。ただし、これらの分子の機能は生化学的になんら再現できていない。RAD51D/XRCC3 (赤矢印) と RAD51B/RAD51D (緑矢印) という2種類の2重欠損株を作製した。

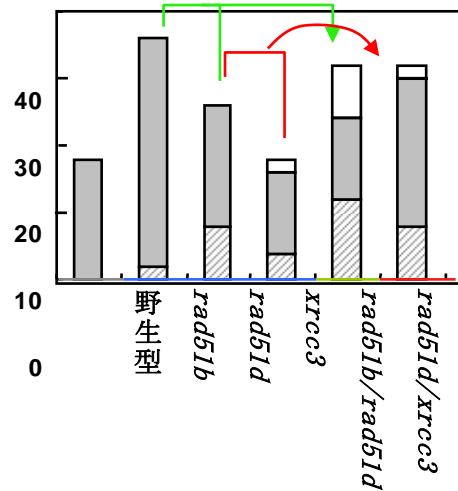
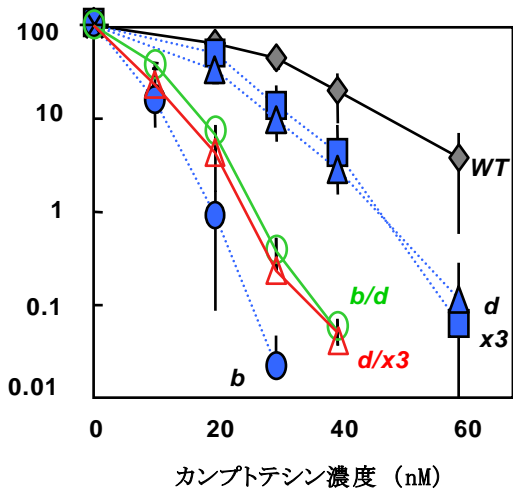


図 30 左図は、縦軸：カンプトテシン処理後のコロニー形成効率(処理なしを100%とする)、横軸にカンプトテシン濃度をプロットした。右図は、カンプトテシン処理によって誘導される染色体断裂。Chromosome-typeとは姉妹染色分体両方が同じ位置で断裂したもの。赤と緑で示したデータは前の図の、矢印の色に対応。

(6) 論文 H17-13: 図 29, 図 30 のデータ

16) コヒーシン Rad21/Scc1 は組み換え修復を促進し、

分裂期染色体の正常な配置を介して染色体の安定性に寄与している

(1) 目的

姉妹染色分体を接合する分子コヒーシンの DNA 損傷修復、染色体安定性における役割を明らかにする。

(2) バックグラウンド

酵母 rad21 変異株は γ 線に高い感受性を示すことから、Rad21 は DNA2 重鎖切断修復に関与することが示唆されていた。近年、Rad21 (SCC1/MCD1) は姉妹染色分体の接合に関わるコヒーシン複合体 (図 31) の一分子であることが明らかとなった。この複合体は動物細胞まで保存されており、姉妹染色分体の接合を介して、複製や修復に多彩な機能を担っていると考えられる。しかしながら、Rad21 の完全欠損株は分裂期に異常をきたして致死となるため、その詳細な解析はなされていなかった。

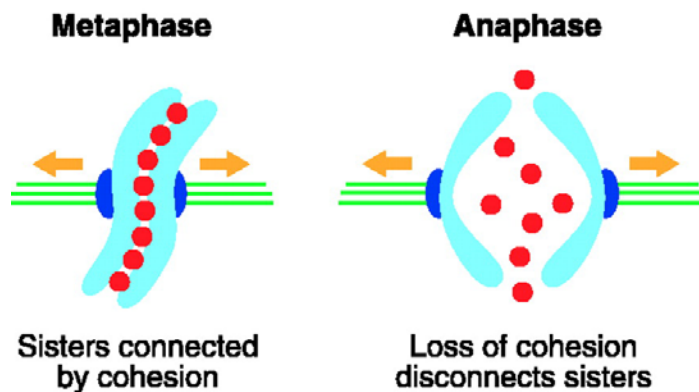


図 31 コヒーシンの概念図
コヒーシンは複製直後から姉妹染色分体を結合し、分裂期に分解され染色体より解離する。赤の丸がコヒーシンを示す。

(3) 方法

動物細胞 Rad21 の機能を解析するため、ニワトリ DT40 細胞でノックアウトをおこなった。酵母細胞の結果より Rad21 は細胞の生存に必須と考えられたので、テトラサイクリン制御システムを利用したコンディショナルノックアウト法にて、Rad21^{-/-}/DT40 を樹立した。

(4) 結果

RAD21^{-/-}/DT40 は、外来より導入したニワトリ RAD21 遺伝子より、野生株と同じように増殖分裂した。テトラサイクリンにより RAD21 トランスジーンが発現をおさえると、細胞内 Rad21 の減少にともない、RAD21^{-/-}株は細胞周期 G2/M に集積した。顕微鏡にて分裂指数を解析したところ、多くの細胞は M 期で停止していた。その M 期細胞の染色体を分析すると、姉妹染色分体はお互いに並んでいるが、分体間の距離は野生型に比べると大きく解離していた (図 32)。姉妹染色分体交換 (SCE) の頻度を測定すると、野生型に比べてその頻度は減少しており、一部染色体の断裂も観察された。また、分裂期の細胞を詳細に観察すると、分裂期プレートに整列しない染色体や、分裂した染色体間に取り残される染色体などが多数出現し、動原体の機能不全を示す所見が多数得られた (図 33)。また同時に染色体と細胞質分裂の調節にかかわる INCENP 蛋白質の局在に変化をきたしていた。

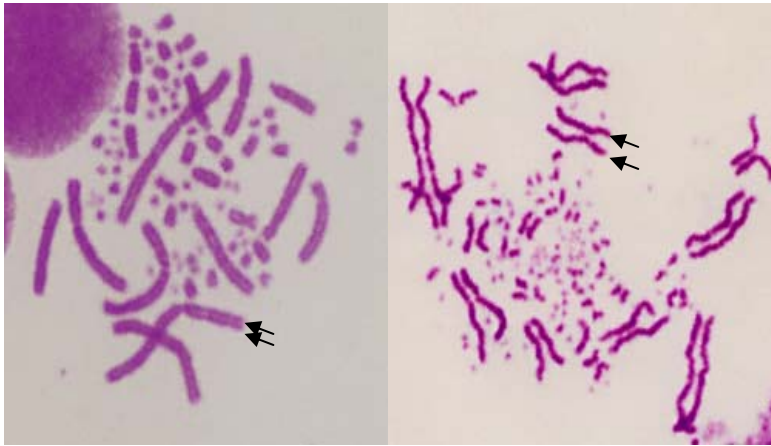


図 32 姉妹染色分体の解離
 コヒーシン欠損株(右)
 は野生型(左)に比較
 して、姉妹染色分体が
 大きく解離している。
 矢印が姉妹染色分体。

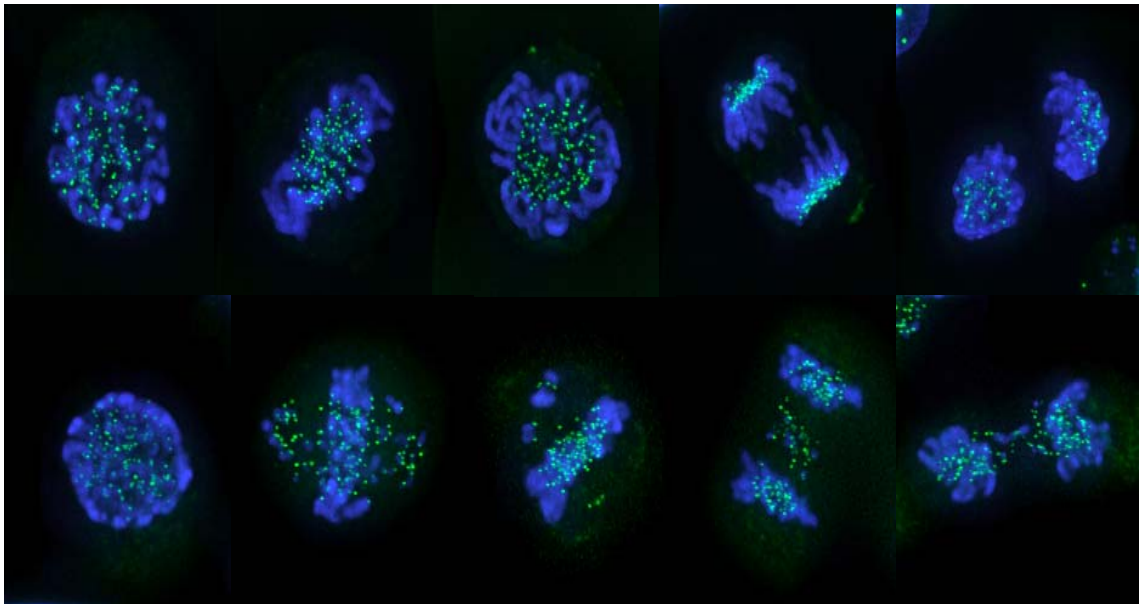


図 33 コヒーシン欠損に伴う分裂期の異常
 コヒーシン欠損株(下段)は、動原体の機能不全により、分裂期の染
 色体配列異常、分配異常を伴い、ほとんどは分裂中期で死亡する。

(5) 結論

高等真核細胞の Rad21 は、姉妹染色分体の接合を介して染色分体間の組み換え修復に重要な役割を担っている一方、姉妹染色分体の正常な分配による染色体安定性や正常な細胞周期の進行にも重要な役割をしていることが示唆された。

(6) 論文

H13-7: コヒーシン欠損による姉妹染色分体間の相同 DNA 組換え低下と動原体の機能不全

17) 動物細胞で高頻度の標的 DNA 組み換え効率を有する

ニワトリ DT40 細胞の分子機構解明を目指した、新規 DNA 修復因子の単離・同定

(1) 目的

相同 DNA 組み換え機構に関わる因子 *RAD54* を欠損したマウス ES 細胞では標的組み換え効率は半減するだけだが、*RAD54* が欠損したニワトリ DT40 細胞では、その効率は著しく低下する。また、強発現した Rad51 は、DT40 では機能するが哺乳動物細胞ではトキシックである。この違いは Rad51 シャペロン分子の機能の違いによるだろう。これらのことから、Rad54 や Brca2 (Rad51 シャペロン) が DT40 細胞の高い標的組み換え能に寄与していると考えられる。そこで、DT40 細胞における相同 DNA 組換えに特異的な因子を模索するために、*RAD54* または *BRCA2* 欠損細胞にタグを付加したそれぞれの遺伝子を発現させ、免疫沈降法により各々の複合体を精製し、Rad54 や Brca2 と相互作用する新規 DNA 修復因子を単離・同定することを目的としている。

(2) バックグラウンド

相同 DNA 組み換え機構において、Rad54 は DNA ヘリカーゼモチーフがあるにも関わらず、*in vitro* でその活性は検出されていない。また Brca2 は多数の DNA 修復因子と相互作用し、相同 DNA 組み換え機構の中心的な役割を果たしている。当研究室では、DNA 修復に関わる様々な因子をニワトリ DT40 細胞を用いて系統的にノックアウトしており、*RAD54* および *BRCA2* のそれぞれの欠損細胞を樹立している。

(3) 方法

PCR により目的遺伝子の 3' 側に HA と FLAG タグを付加させ、これらのプラスミドを *RAD54* または *BRCA2* 欠損細胞で発現させる。その細胞をイギリス癌研究所 (Dr. Simon Boulton) に持ち込み、共同で Rad54 もしくは Brca2 と共沈する分子を同定する。S. Boulton は、その分子の機能を線虫の RNAi で評価する。

(4) 結果

タグ Rad54 発現細胞を大量培養し、二本鎖 DNA 切断を誘導するために 10Gy の放射線を照射した。細胞から核抽出液を分画し、FLAG ビーズと混合させた後に、FLAG ペプチドを用いた競合反応により Rad54 複合体を溶出した。この Rad54 複合体を、HA ビーズおよび HA ペプチドを用いてさらに精製し、電気泳動により分離後、銀染色により可視化した。非照射の野生型細胞ならびに *RAD54* 欠損細胞、タグ Rad54 発現細胞をコントロールとした。また、タグ Brca2 発現細胞に関しては、現在解析中である。

(5) 結論

放射線照射したタグ Rad54 発現細胞に特異的に見られるバンドをゲルから切り出し、マスペクトル解析を行った結果、Chd2 が同定された。Chd2 はクロマチンリモデリング因子であり、メチル化されたリジン残基を認識する chromo ドメイン、および DNA ヘリカーゼモチーフを有している。DNA 損傷が起こると、DNA 修復因子の損傷部位へのアクセスをより容易にするために、複雑に絡み合ったクロマチン構造が Chd2 により緩められると考えられる。*CHD2* 欠損細胞が DNA 修復異常を示すことを予想して、現在作製中である。

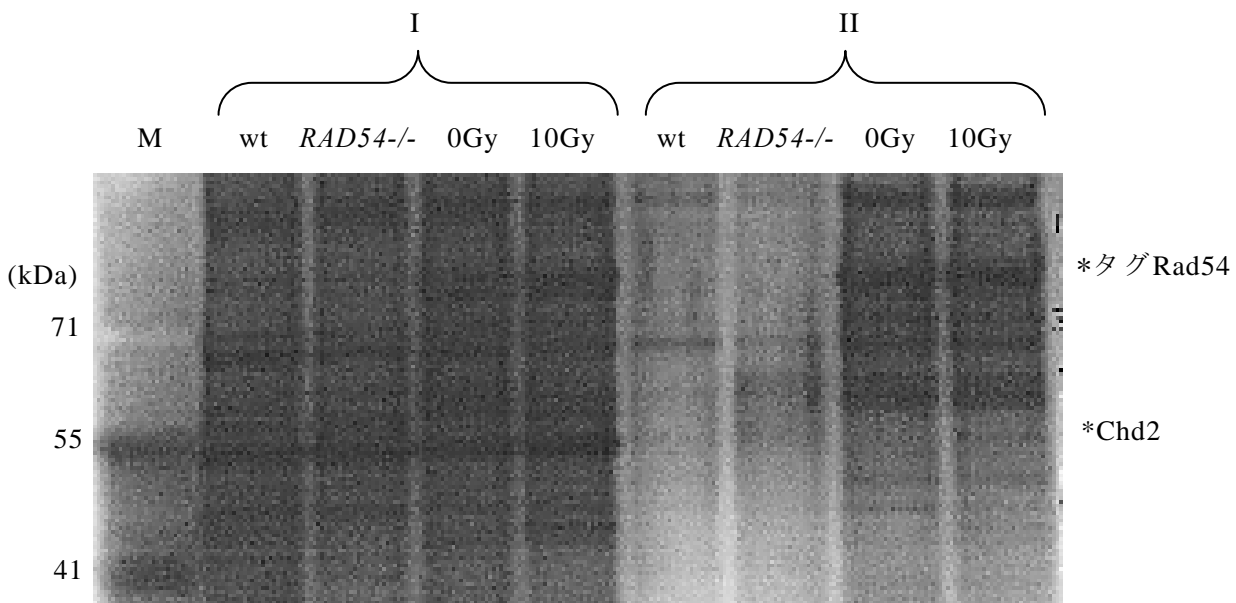


図 34 銀染色により可視化された Rad54 複合体
放射線照射したサンプルに特異的なバンドを切り出し (*印)、トリプシン処理後にマスペクトル解析を行った。I; FLAG ビーズで精製、II; HA ビーズでさらに精製した。タグ Rad54 のバンドをポジティブコントロールとした。

18) 複数の DNA 修復経路が抗癌剤シスプラチンの感受性機構に関与する

(1) 目的

我々が樹立した、動物細胞の変異株パネル—約 40 種類にもおよぶ、DNA 修復経路変異株のライブラリーをもちいて、シスプラチンをはじめとする DNA 架橋型の抗癌剤により生ずる DNA 損傷の修復経路を明らかにする。

(2) バックグラウンド

効果的で副作用の少ない化学療法の確立のためには、抗癌剤の正確な作用機構を理解し、個々の癌細胞の薬剤感受性を知ることが必須である。抗癌剤の作用機構は複数の DNA 修復経路が関与する複雑な反応であり (図 35)、このような系の解析には、関連分子を一つ一つ潰してゆく遺伝学的解析が有効である。特に、DNA 架橋型の抗癌剤は臨床で最も頻用される薬剤であるが、その DNA 架橋の修復機構はよくわかっていない。

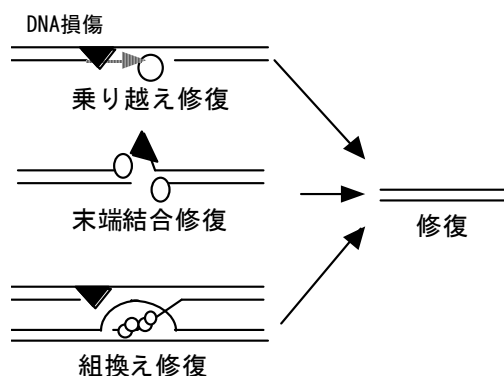


図 35 様々な DNA 修復経路
DNA 損傷、例えば 2 重鎖切断は図のような異なる 3 つの経路により修復される。

(3) 方法

約 40 種類にも及ぶニワトリ細胞 DT40 の DNA 修復欠損株パネルを使用して、架橋剤—シスプラチン、マイトマイシン C、メルファラン、アルキル化剤—MMS、の様々な DNA 修復経路欠損株に及ぼす殺細胞効果を、軟寒天をもちいたコロニー形成法により判定した。

遺伝子機能	対応遺伝子
相同 DNA 組み換え	RAD51, RAD52, RAD54/54B, Rad51B/C/D, XRCC2/3, MRE11, RAD50, BRCA1, BRCA2
ファンコニー遺伝子群	FANCD2, FANCC, FANCG,
ヘリカーゼ	BLM, WER, FBH1,
非相同 DNA 末端結合	KU70, DNA-PKcs, LIGIV, ARTEMIS, SNM1/2
塩基除去修復	PARP-I, FEN1
DNA ポリメラーゼとその制御因子 (損傷乗り越え合成を含む)	POL λ , POL β , POL κ , POL ζ , POL θ , REV1, REV7, REV3, HEL308 RAD18, MMS2
ヌクレオチド除去修復	XPA, XPF, XPG
DNA 損傷チェックポイント	ATM, NBS1, RAD9, RAD17, 53BP1, BIRD1
クロマチン関連	ヒストン H2AX、コヒーシン(RAD21), ヒストンアセチル複合体 (TIP49, TIP60)

表 1 樹立した DNA 修復欠損株の一覧

(4) 結果

損傷乗り越えに関与する遺伝子群 (REV1, Pol ζ (REV3/7 複合体)、RAD18)、ファンコニー貧血の原因遺伝子群 (FANCC, FANCG)、相同組換えに関わる遺伝子群 (XRCC2/3)、これら 3 つの経路に関わる遺伝子の欠損株が、シスプラチンに最も高い感受性を示した (図 36)。これらの修復経路欠損株は、その他の架橋剤マイトマイシン C、メルファランにも高感受性を示し、薬剤処理により野生型に比べ多数の染色体断裂を認めた。また、rev3/fancC の 2 重変異株を作製したところ、その感受性は rev3 単独欠損株と全く同じであった。

(5) 結論

シスプラチンを含む架橋剤の修復には、複数の DNA 修復経路が関与していることが明らかとなった。その中でも Pol ζ は最も重要な役割を演じており、FANC の修復経路もこの中に含まれることが明らかとなった。このような独自の細胞株パネルは、薬剤の作用機構や副作用を発見するのに非常に有用であることが証明された。

(6) 論文

H17-14: 図 36 を発表

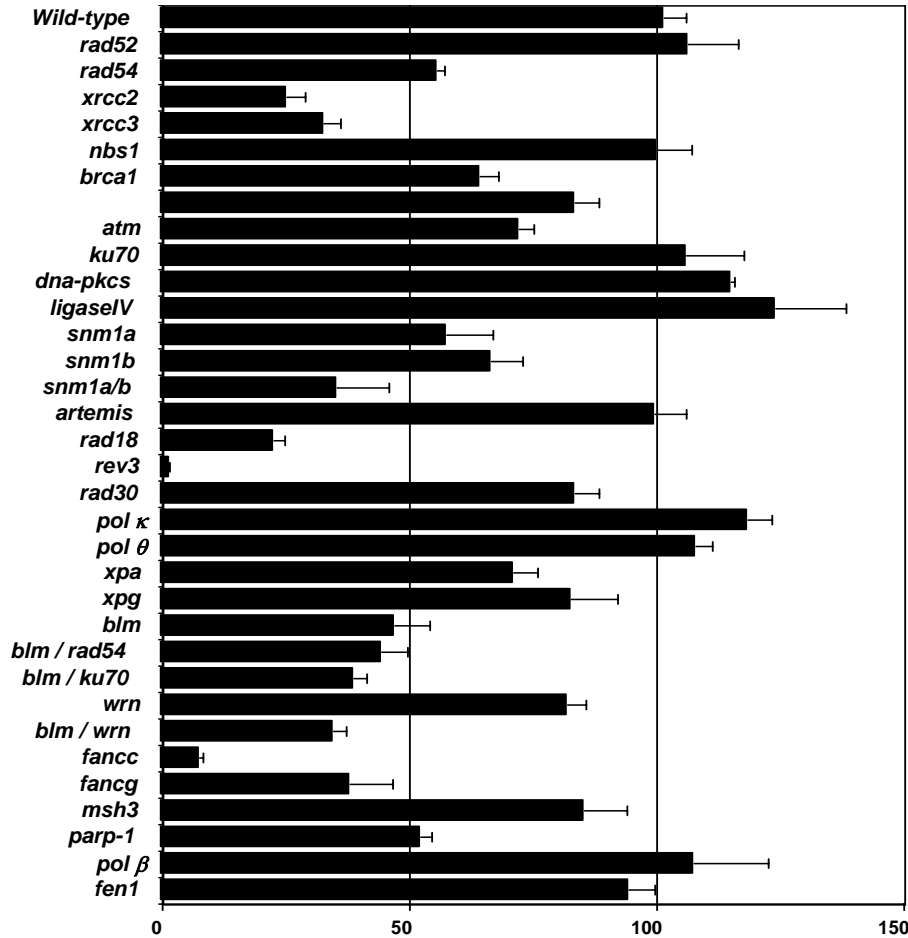


図 36 各変異株のシスプラチン感受性 D_1 値 (コロニー形成率を 100%から 1%に低下させるシスプラチン濃度) で表示。野生型を 100%とした。

19) タモキシフェンや女性ホルモン (エストロゲン) によって DNA 損傷が生じる、それによって生じた複製ブロックを損傷乗り越え経路が解除している。

(1) 目的

乳癌の治療薬として広く使用されているタモキシフェン、及び女性ホルモンによる DNA 損傷それに引き続く突然変異誘導の分子メカニズムを、DNA 修復関連遺伝子のノックアウト DT40 細胞パネルを用いて明らかにする。

(2) バックグラウンド

タモキシフェンは女性ホルモン (エストロゲン) 受容体に拮抗剤として作用し、女性ホルモンの働きをブロックする。そのため、乳癌や卵巣癌など女性ホルモンによってその増殖が刺激される癌の治療、さらには発癌リスクの高い女性の予防薬として広く使われてきた。一方、タモキシフェンを投与した患者では子宮癌の発生率が高いこと、動物実験でも発癌の副作用があることが指摘されてきた、また生化学的実験ではタモキシフェンが DNA に損傷を起こしうるということがわかっていた。しかしタモキシフェンが突然変異誘発物質として機能するか否かは、タモキシフェンの持つ多様な薬理作用の為に検証することができなかった。我々は、タモキシフェンの DNA 損傷作用に注目し、様々な DNA 修復機構が欠損した細胞株を使って、タモキシフェンに対する感

受性を解析した。

(3) 方法

研究室が保有する様々な DNA 修復機能欠損 DT40 細胞株のタモキシフェン (TAM)、及び TAM の代謝誘導体である α -hydroxy TAM、4-hydroxy TAM に対する感受性を網羅的に調べた。野生型 DT40 細胞と比べて高感受性を示したのものについては、薬剤曝露後の染色体異常を調べた。

また女性ホルモン (estrogen、E2)、およびその代謝誘導体である 2-OHE2、4-OHE2 についても同様の実験を行った。

(4) 結果

我々は損傷乗り越え DNA 合成 (Translesion DNA synthesis=TLS) に関与する遺伝子のうち *rad18*、*rev3*、*pol κ* 遺伝子欠損株が TAM 及びその代謝産物に対して高感受性を示し、染色体断裂を多数発生することを発見した (図 37 参照)。また女性ホルモンである 4-OHE2 も、TAM とは化学構造が全く違うにもかかわらず、これらの TLS 欠損株で多数の染色体断裂を誘導した。

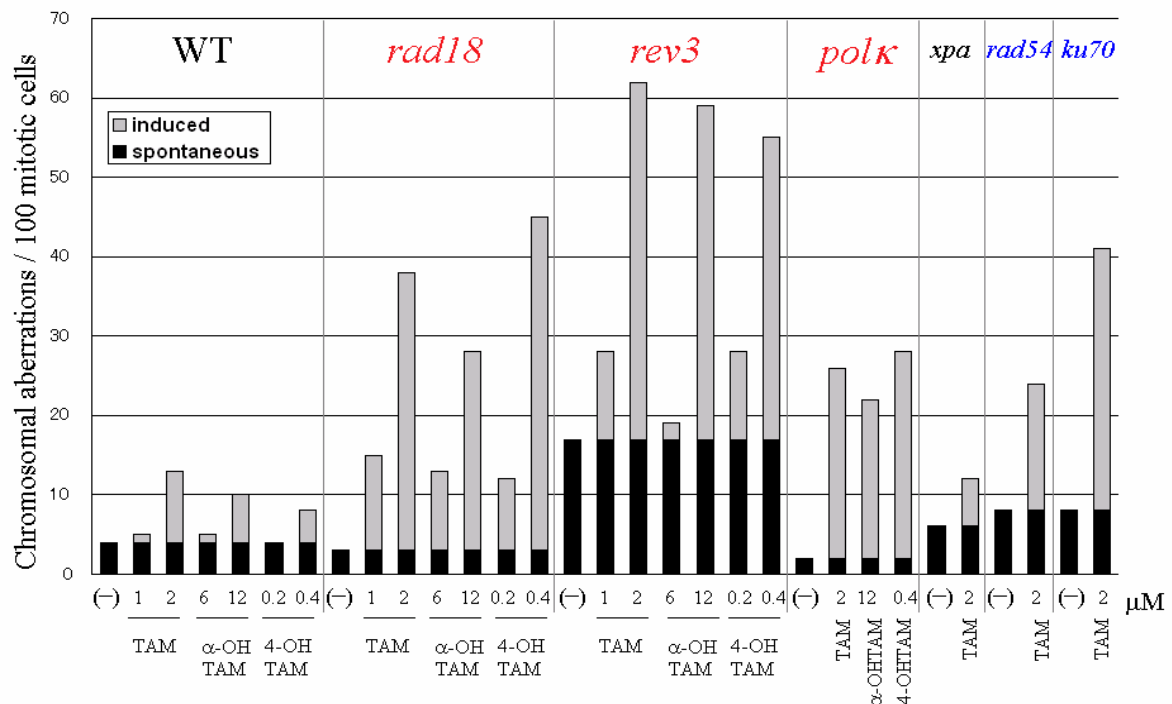


図 37 野生型細胞、各ミュータント細胞を TAM 及びその代謝誘導体に曝露後の染色体分析。*rad18*、*rev3*、*pol κ* 細胞では野生型細胞に比べ曝露した薬剤の濃度依存性に染色体断裂が誘導される。実験は治療に用いる濃度のタモキシフェンで行った。

(5) 結論

薬剤や紫外線によって DNA の塩基に損傷が入ると、損傷部位で DNA の複製進行が停止してしまう。複製進行の停止は DNA 鎖の切断を引き起こし細胞は死滅する。これを回避するために、損傷誘導型 DNA も複製できる特殊な DNA ポリメラーゼ (例: Pol ζ <rev3 は catalytic subunit>、Pol κ)、や様々な制御因子 (例: Rad18) からなる TLS 機構が細胞には備わっている。TLS は、その DNA 合成時に点突然変異 (エラー) を多く起こすことから、この機構が女性の細胞で活発に働くことによって突然変異を誘導し、ガン発

症の原因になりうるということが明らかになった。

(6) 論文 H16-2: 図 37 のデータ

20) Nitric Oxide (NO)によって損傷を受けた DNA は、損傷乗り越え DNA ポリメラーゼ Pol ζ で複製される。

(1) 目的

一酸化窒素 (Nitric Oxide=NO) による DNA 損傷、それに引き続く突然変異誘導性の分子メカニズムを、DNA 修復関連遺伝子のノックアウト DT40 細胞パネルを用いて明らかにする。

(2) バックグラウンド

NO は神経伝達物質、血管拡張因子として細胞間の情報伝達に関与する一方で、炎症、虚血などによって過剰に生成される NO は組織障害のメディエーターでもある。慢性炎症等で、NO の長期にわたる曝露が DNA 損傷を生じ、それによる突然変異の蓄積が発癌のイニシエーターとして働くと予想されていたが、詳細なメカニズムはほとんどわかっていなかった。生体内で NO は酸素やスーパーオキシドと反応して、DNA 傷害性を持つ物質に変化する。起こりうる DNA 傷害は、塩基損傷、鎖切断、クロスリンク、DNA 修復酵素の活性阻害まで多岐にわたる。この中で、塩基損傷と鎖切断が最もメジャーな損傷であると考えられている。しかし塩基損傷は除去修復機構によって速やかに取り除かれ、また NO の大量投与によってシグナル伝達を始めとする様々な生体反応が引き起こされるので、NO の DNA 毒性のみを特異的に評価することは困難であった。そのため NO によって誘導される突然変異のメカニズムはほとんど知られていなかった。そこで我々は様々な DNA 修復機構が欠損した細胞株を使って、細胞の生存や染色体 DNA に対する NO の影響を解析した。

(3) 方法

研究室が保有する様々な DNA 修復機能欠損 DT40 細胞株の、NO 発生薬剤である spermine NONOate (SPER/NO) や S-nitroso-N-Acetyl-penicillamine (SNAP) に対する感受性をコロニー形成法で網羅的にスクリーニングした。細胞周期の進行に対する NO の影響を、BrdU のパルスラベル法で解析した。また細胞を NO に 1 時間曝露した後の染色体異常を NO 高感受性株と野生型株で調べた。

(4) 結果

我々は NO 発生薬剤 SPER/NO、SNAP の両者に対して、損傷乗り越え DNA 合成 (Translesion DNA synthesis=TLS) に関与する遺伝子 *rev3*、*rev1* (両方とも損傷乗り越え DNA ポリメラーゼ) の欠損株が高感受性を示すことを発見した。NO に曝露後の細胞周期を解析したところ、野生型細胞、*rev3* 細胞ともに G2 期で停止した細胞が増加した。*rev3* 細胞は G2 期を脱出しても大部分の細胞が死滅した。*rev3* 細胞の NO に対する感受性の原因を調べる為に細胞を SPER/NO で 1 時間処理した後、染色体分析を経時的に行った。*rev3* 細胞では 9 時間後 (S 期初期に NO に曝露され、それから 9 時間かかって M 期に入ったと予想される) の染色体断裂が野生型と比べて非常に増加していた。また野生型、*rev3* 欠損株とも、G2 期に NO に曝露された細胞は染色体断裂が増加していたので、NO が直接染色体断裂を誘導することもわかった。

(5) 結論

TLS 欠損株である *rev3* (Rev3 は損傷乗り越え DNA ポリメラーゼ Pol ζ の catalytic subunit) や *rev1* 細胞は NO に高感受性を示し、染色体断裂を多数生じた。慢性炎症時にマクロファージから持続的に放出される NO は周りの細胞に DNA 損傷を生じ、S 期に DNA 複製フォークの停止を引き起こす。このような複製フォークの停止が Pol ζ によって乗り越えられる時に誤った塩基が蓄積されて行き、発ガンの原因になると考えられる (図 38 参照)。

(6) 論文

H17-16: Pol ζ 欠損細胞は NO により染色体断裂を多発

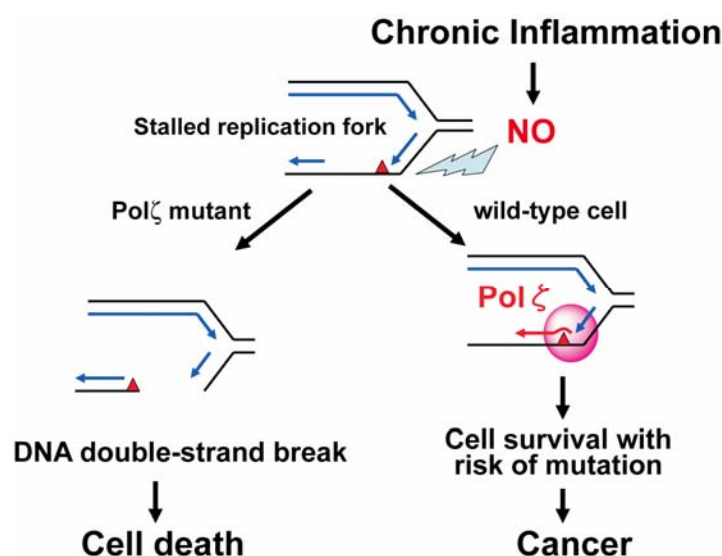


図 38 慢性炎症から癌が発生するメカニズムのモデル

慢性炎症時にはマクロファージ等から持続的に NO が放出され、周りの細胞の DNA に損傷を引き起こす。DNA が複製される時に損傷誘型鎖は通常の DNA ポリメラーゼでは複製できないが、Pol ζ のような特殊なポリメラーゼは損傷を乗り越えて DNA 合成を行う。Pol ζ 欠損細胞はこの反応が起こらないので、DNA 二本鎖切断が生じて細胞は死ぬ (左矢印)。野生型細胞では Pol ζ によって DNA は複製されるが、塩基のエラーが入るので突然変異によって細胞が癌化することがある (右矢印)。

21) Cyclin dependent Kinase (CDK) 条件変異株の作製

(1) 目的

酵母では、2 重鎖切断が発生すると、いかなる細胞周期フェーズであっても相同組み換え修復機構が活性化される。ところが、動物細胞では相同組み換えは S/G2 期でしか機能しない。そこで CDK が Rad51 の活性を制御する可能性を、CDK の条件変異 DT40 細胞を作製することによって、解析できるようにする。

(2) バックグラウンド

様々なキナーゼの活性中心近くのアミノ酸に点変異(Shokat変異、Nature 407, 395, 2000)を入れると、ATP アナログ (PPi) によって、そのミュータントキナーゼが可逆的に抑制できるようになる (図 39)。酵母では、CDK に Shokat 変異を導入すると PPi 添加によって CDK が完全に抑制できるようになる。しかも意外なことには、CDK 活性と DNA2 重鎖切断修復に相同組み換えが選択される確率とが正に相関することがわかった。

動物細胞では、放射線照射によって誘導された 2 重鎖切断は、姉妹染色分体が存在する時にしか相同組み換えによって修復されない。しかも G1 期では相同組み換えは抑制されているようであり、Rad51 組み換えタンパクが存在してもそれが損傷部位へ集合することが観察されない。そして G2 期であっても CDK 阻害剤 (ルスコビチン) 処理によって Rad51 機能が抑制されることを、我々は確認した。

ヒトやマウスでは、CDK は複数種類存在し、CDK1 と CDK2 とが細胞周期に重要な働きをする (図 40)。CDK1 欠損は致死であるが、CDK2 欠損マウスは正常に発生する。これらの CDK の、各細胞周期フェーズ毎の機能は、酵母のような温度感受性 CDK ミュータントがないのでよくわかっていない。特定の CDK をすばやく ON/OFF できる細胞があれば、CDK の機能解析にとってブレークスルーになる。

(3) 方法

CDK1^{-/-} Shokat mutant CDK1 transgene 細胞を作製する。

PPi 添加時の CDK1 欠損細胞の表現型を観察する。

CDK1^{-/-} CDK2^{-/-} Shokat mutant CDK1 transgene 細胞を作製する。

(4) 結果

PPi 添加時に CDK1 欠損細胞は G2 期で細胞分裂を停止する。この停止は可逆的である。

PPi により G2 期で停止した時には、4N→8N の細胞分裂を伴わない複製はおこらない。ところが、ノコダゾールブロック (Prometaphase での分裂周期停止) の場合には、PPi で CDK を抑制すると細胞分裂を経ずに複製が開始される。

CDK1^{-/-} CDK2^{-/-} Shokat mutant CDK1 transgene 細胞は未だ、未完成である。

(5) 結論

酵母と同様、Shokat 変異が動物細胞で期待通り機能することがわかった。

ライセンスング (いったん複製された DNA の複製オリジンが再度活性化されること) は G2 期から Prometaphase のあいだに起こっている。

CDK 条件変異は、G2→M 移行、CDK1 と CDK2 の機能重複の 2 点の問題を解明するのに役立つ。

図 39

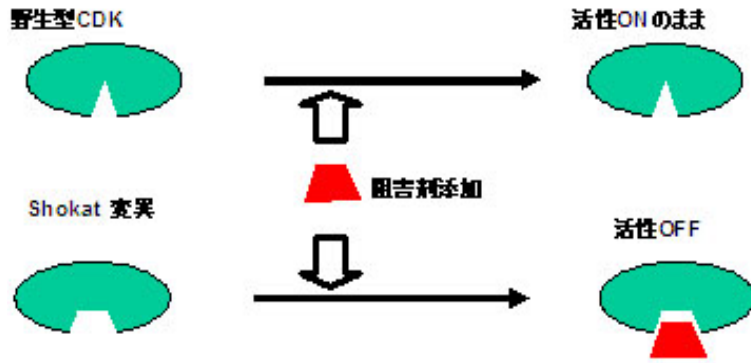
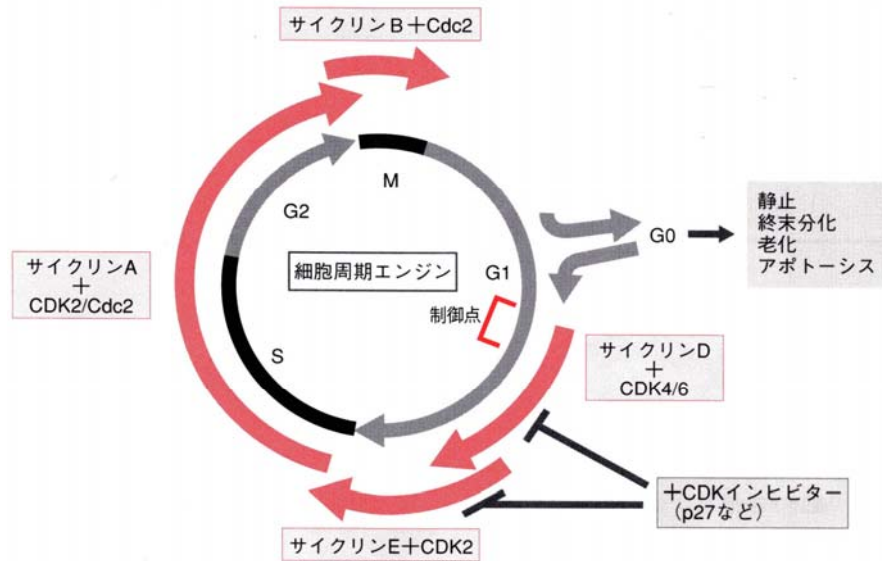


図 40



22) ENU mutagenesis によるノックアウトメダカの作成

(1) 目的

我々は高等真核生物での標的組み換え機構を解明するために、DT40 ニワトリ B リンパ細胞株を用いて多数の知見を得た。本研究課題はそれらの知見を個体レベルに発展させるために、ノックアウトメダカを作成することを目的とする。

(2) バックグラウンド

脊椎動物で遺伝子操作を行うことができるのは、実質的に相同組み換えのできる胚性幹細胞が存在するマウスのみである。しかし、ノックアウトマウスは作製、維持コストがかさみ、多数のジェノタイプを解析することは難しい。一方、小型魚類は近年になってノックアウトの手法が開発され、比較的低コストでミュータントを取得できるようになった。これらノックアウトメダカを解析することにより、休止期での DNA 修復タンパクの機能解析、臓器特異的な役割など、DT40 では行えない表現型解析が可能となる。

(3) 方法

オスのメダカ 100 匹を、変異原であるエチルニトロソウレア (ENU) で処理する。3

mM ENU 一時間処理を週一で三回繰り返すことにより、ENU による毒性を最小限に抑えつつ、精母細胞への変異導入効率を最大限にすることができる。変異導入した魚を野生型のメスとかけ合わせ、その子孫 5000 匹の F1 を生殖可能年齢（3 ヶ月以上）まで育てた後、精子と染色体 DNA とを抽出し、変異メダカバンクとして凍結保存する。変異導入効率は、アルビノ変異体を用いて検定する。

このバンクの有用性を確認するために、p53、SIRT1、Bloom helicase の三つの遺伝子座について変異のスクリーニングを行う。スクリーニングは、5000 匹の染色体 DNA を上記三遺伝子について PCR 増幅し、得られた産物を直接シークエンスすることにより行う。専用の解析ソフトにより変異を同定した後は、ヌル変異を持った個体を人工授精により獲得する。

(4) 結果

ENU で処理したオスのうち、生殖能力を保持した 87 匹から採卵を行った。26226 個の卵を回収し、うち約半数が成体にまで育った。5771 匹のオスから精巣を摘出し精子を凍結保存するとともに、尾部より染色体 DNA を抽出し冷凍保存した。色素ミュータントを使った変異率検定では、1360 個の卵を調査して、272 分の 1 の確率でヌル変異が見つかった（表 2）。

このメダカ変異バンクをスクリーニングするために、ゲノム上に 5 つの解析領域を設定し PCR 増幅を行った。得られた PCR 産物を直接シークエンスした結果、p53 と Bloom helicase には premature stop codon、SIRT1 には splice donor site の変異が見つかった。これらに相当する凍結精子を融解し、F2 を得た。ヒレから DNA を抽出してジェノタイピングした結果、これらの個体の体細胞変異を確認した。

前半の変異導入は京都大学放射線生物総合研究センターの藤堂教授、ERATO の近藤プロジェクトとの共同で、後半のスクリーニングはオランダユトレヒトの Ronald Plasterk、Edwin Cuppen 博士との共同で行った。

(5) 結論

p53、SIRT1、Bloom helicase を欠損したメダカを作成した。逆遺伝学的手法が使えないと思われていた小型魚類でもノックアウトが可能となり、この方法の有用性が確認された。

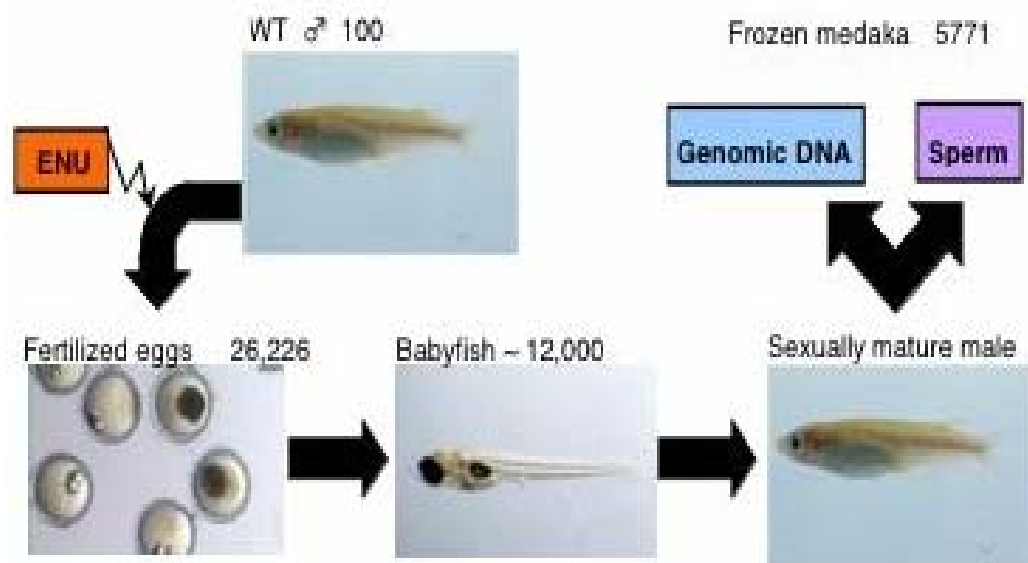


図 41 ENU による変異導入法 オスのメダカ 100 匹に変異導入したのち、5000 匹の F1 の精子と染色体を保存する。

Medaka screening summary

all mutations in this overview were reconfirmed in an independent assay

	total ampl*	total mut	stop/splice mutations	exon mut	intron mut	HQ bases** exonic	HQ bases** intronic	HQ bases** total	total mut rate	exonic mut rate	intronic mut rate
BLM	2	6	1 stop	5	1	2,716,704	412,302	3,129,006	521,501	543,341	412,302
Dicer	5	29	0	22	7	5,898,701	1,980,589	7,879,290	271,700	268,123	282,941
P53	1	5	1 stop	4	1	1,143,921	710,682	1,854,603	370,921	285,980	710,682
Sirt1	2	17	2 splice	14	3	3,895,820	1,871,676	5,767,496	339,264	278,273	623,892
total	10	57		45	12	13,655,146	4,975,249	18,630,395	326,849	303,448	414,604

* Library consists of 15 x 384-well plates. In total 170 x 384-wells were successfully analyzed

** HQ = high quality bases, phred score > 20

表 2 メダカのスクリーニング結果一覧

(2) 研究成果の今後期待される効果

我々は、DT40 を使って以下の相同組み換え関連遺伝子の破壊株作製・表現型解析を継続している。

ASCIZ	一本鎖 DNA に結合して相同組み換えに関与することが示唆されていた。オーストリアの研究グループとの共同研究。ASCIZ 欠損 DT40 細胞は、相同組み換えがむしろ上昇した。Rad51 のシャペロンとして機能している可能性がある。
Mnd1	減数分裂の時、相同染色体の対合に必須の働きをする。一部の体細胞でも発現している。
Fbh1	阪大品川研によって分裂酵母から単離された、相同組み換えに関与する遺伝子のニワトリホモログ。Rad51 をユビキチン化している可能性がある。
Smc5/6	阪大品川研によって分裂酵母から単離された、相同組み換えにも関与する遺伝子。遺伝子破壊が酵母でも致死なので、研究が進んでいない。
Smc1	M 期中期まで姉妹染色分体を繋ぎ止めておく糊タンパク（コヒーシン）の 1 つ。動物細胞では、休止期でも発現しており、二本鎖 DNA 切断部位に集合する。
Ubc13	E2 ユビキチン化酵素。DT40 で遺伝子破壊株を作った。酵母ホモログは、相同組み換えに機能しないが、DT40 では相同組み換えに重要である。
Pol η	機能が不明な DNA ポリメラーゼ。
XPF	紫外線などの損傷を修復する機構（ヌクレオチド除去修復）に関与。xpf 欠損 DT40 細胞は予想外に致死であった。相同組み換えにも関与すると予想される。
XPG like nuclease	ヌクレオチド除去修復に関与する XPG と一次構造が類似している nuclease。
Exo1	ヌクレオチド除去修復に関与する Xpg と一次構造が類似している nuclease。
Sae2	酵母の Sae2 nuclease のニワトリホモログの候補
DNA polymerase d 末端欠失	酵母では C 末端は、DNA 修復のみに関与している。
Atr	DNA 損傷を見つけて、細胞分裂を一時停止するチェックポイントに働くキナーゼ。ヌル欠損は細胞レベルで致死だが、点変異の患者（Seckel cell anemia）が見つかった。

この 5 年間でスタッフ、院生ともに大きく成長し、単に遺伝子破壊、標準的な表現型解析を繰り返すだけでなく、遺伝子破壊株を使った生化学的解析や、プロテオミクスによる新規タンパク分子の同定ができるようになった。遺伝学は、ラボ全体で実験材料と研究方法を共有しながら、各研究者が違う遺伝子を研究できるので、非常に教育的なラボの運営ができる。このような環境で若手が順調に育ち、彼等は、多種類の遺伝子破壊株を使いこなして、動物細胞で酵母のような遺伝学的手法を駆使した新しい研究分野を開拓しつつある。

相同組み換えは、それに参加する分子については半分以上同定済みと考えられる。標的組み換えも簡単に定量できるようになったので、ヒト細胞で DT40 なみに高効率に遺伝子破壊できる日が近々来ることは確実である。

3.2 相同組み換えに関与するタンパク質の構造解析

(首都大学東京/理化学研究所 伊藤 隆グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

1) 相同 DNA 組み換え現象に関与するタンパク質の構造・機能解析

本グループは、1997 年、1998 年に大腸菌 RecA およびその真核生物ホモログである Rad51 タンパク質に結合した状態の単鎖 DNA の高次構造を世界で初めて報告し、また 1999 年に Rad51 タンパク質の N 末端ドメインの高次構造を報告して以来、相同 DNA 組み換え現象に関与する種々のタンパク質の構造・機能解析を行ってきた。

本 CREST 研究では、これまでの本グループのタンパク質の単離・精製、NMR 法や X 線結晶解析法などの手法を用いた高次構造解析の経験の蓄積を基に、相同 DNA 組み換え現象に関与するタンパク質の構造・機能相関、および他のタンパク質因子や DNA 分子との相互作用について、上記手法を用いた原子分解能での解析を行った。

まず、大腸菌 RecA と DinI の相互作用に注目し、NMR を用いた解析を行った。DinI は、大腸菌の SOS 応答に働くタンパク質のひとつである。SOS 応答は DNA の損傷によって誘導されるが、単鎖 DNA に結合した RecA が LexA リプレッサーの自己切断反応を促進することにより誘起されると考えられている。DinI はこの自己切断反応を抑えることにより SOS 応答を抑制的に制御する働きを持つと考えられている。本研究では、NMR を用いて DinI の高次構造を決定し (図 42a)、RecA のいくつかのフラグメントとの相互作用を NMR タイトレーション法で観測することによって、RecA 上の DinI 結合領域の同定を行った (図 42b)。また、RecA に結合した状態の単鎖 DNA の TRNOE シグナルを指標にして、DinI による RecA 活性制御メカニズムの考察を行った (図 42c)。本研究により、DinI は RecA と単鎖 DNA との相互作用を阻害するのではなく、むしろ RecA と LexA の相互作用を競合的に阻害することによって RecA の機能調節を行っている可能性を示した (論文: H14-4)。

酵母ミトコンドリア Mhr1 タンパク質は、ATP 非依存的な相同鎖対合活性を有し、ホモプラスミーの維持について中心的な役割を果たしていることが知られている。本研究では、TRNOE 法を用いることによって、Mhr1 タンパク質に結合した状態の単鎖 DNA の高次構造を解析した (図 43a)。その結果、Mhr1 結合型単鎖 DNA の高次構造は、当グループが以前報告した RecA および Rad51 結合型単鎖 DNA の高次構造と非常に良く似ていることが明らかになった (図 43b)。このことから、相同 DNA 組み換え反応は、ATP 依存的、非依存的に関わらず、特徴的な DNA 構造を基盤とした共通のメカニズムで行われている可能性が強く示唆された。

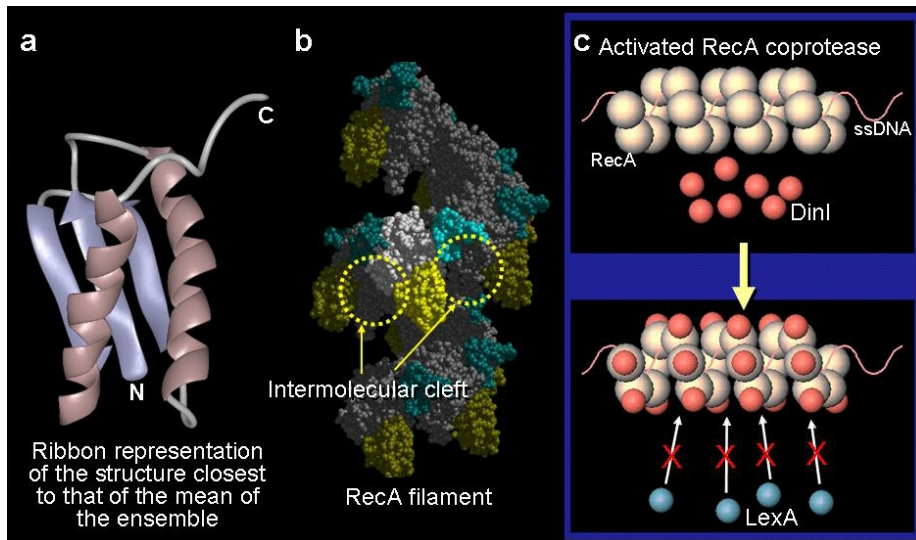


図 42 (a) NMR によって決定した大腸菌 DinI タンパク質の溶液構造。
 (b) NMR タイトレーションによって推定された RecA フィラメント上の DinI 結合領域 (分子間のクレフト)。
 (c) TRNOE 解析から示唆された DinI による RecA の活性制御のメカニズム。

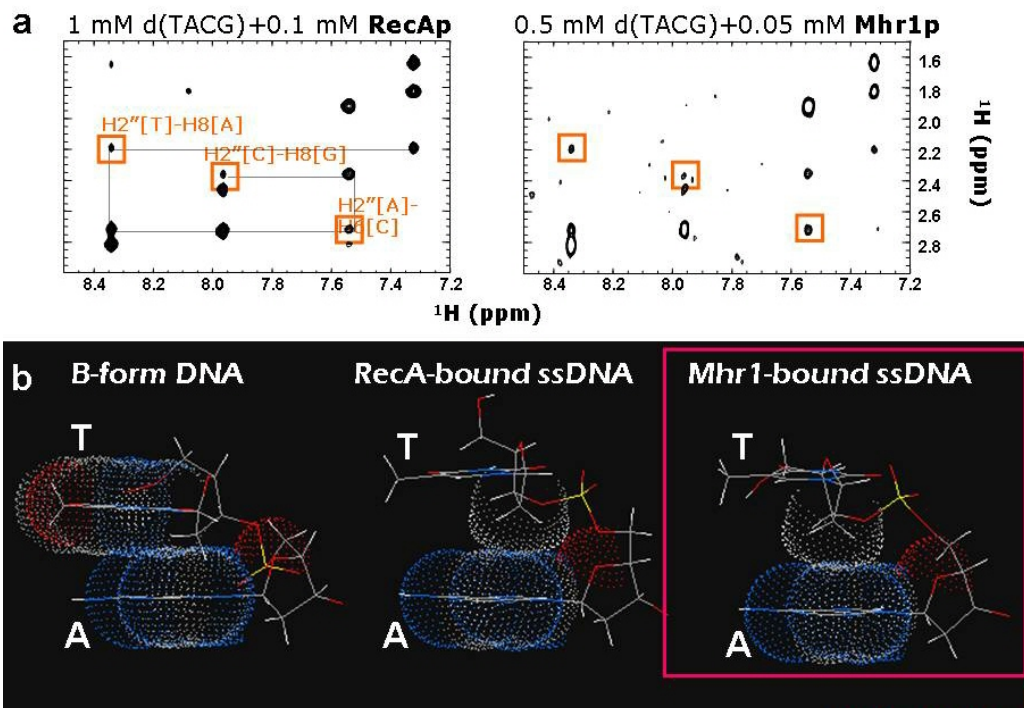


図 43 (a)大腸菌 RecA および酵母 Mhr1 タンパク質に結合した単鎖 DNA[d(TACG)]の TRNOE スペクトル。
 (b) TRNOE 解析から算出された Mhr1 結合型単鎖 DNA の高次構造のモデル。高次構造上の特徴が RecA 結合型単鎖 DNA とよく合っている。

外来の損傷因子によって生じるDNAギャップや塩基の欠落はDNA複製等に重大な悪影響を及ぼすが、このようなダメージに対する組み換え修復は生命の維持にとってきわめて重要である。真核生物における組み換え修復のメカニズムは未だ不明であるが、原核生物ではRecFとRecBCDのいずれかの経路によってなされるということが明らかになっており、RecF経路に関してはRecF、RecO、RecRがRecAの活性を制御していることが示唆されている。また、RecFR複合体がDNA5'端を認識し、RecOR複合体がRecAによる相同組換えを誘導するという、大まかな修復機構のスキームも提案されている。しかしRecFORの機能発現に関する生化学的知見は少なく、また、最近の当グループによるNMR解析と海外のグループによるRecRおよびRecOのX線結晶解析を除いては、十分な構造生物学的解析もなされていなかった。本研究では、真核生物の相同組み換え修復系のモデルとして、真正細菌の相同組み換え修復系をとりあげ、高度好熱菌から相同組み換え修復に関与するほとんど全てのタンパク質を大量に調製した。そして、これらタンパク質の高次構造と相互作用の詳細について主としてNMRを用いて解析を行った。高度好熱菌RecRについてはまず溶液中で同種2量体として存在することを確認し、主鎖シグナルの帰属を行った。また、最近報告された放射線耐性菌RecRの結晶構造を基にホモロジーモデリングを行うことによって高度好熱菌RecRの立体構造を得た(図44a)。さらに、種々のDNAとのNMR滴定実験によって、N末端側のhelix-hairpin-helix領域が主なDNA結合領域であり、同時に2量体形成にも寄与していることを見出した(図44a)。これに加えて、RecOとのNMRタイトレーション実験から、RecOとの相互作用に関与する領域も同定した(図44b)。RecOについては、溶液中で単量体であることを確認し、主鎖シグナルの帰属と2次構造予測を行った。またNMRタイトレーション実験を行うことによりssDNAとの相互作用、SSBとの相互作用、およびRecRとの相互作用についての解析を行った。RecFについては、単体では非常に不安定であるが、RecRとの複合体形成によって安定化されることを見出した(論文: H15-7)。

上記の結果に加えて、NMRによる酵母Mre11C末端領域の構造・機能解析、NMRによる高度好熱菌RecA中央ドメインの構造・機能解析、NMRによる高度好熱菌RecXタンパク質の解析なども平行して行った。

2) 高分子量タンパク質のNMR解析、及びNMRを用いた生体内タンパク質動態解析のための方法論的研究

NMR法はタンパク質とタンパク質、タンパク質と基質の相互作用を、より生理的な条件に近い状態で、詳細に解析できるという優れた特色を持つ。しかし、測定試料の分子量の増大に伴って、様々な理由から解析が著しく困難になるという問題を持っている。本研究のターゲットである相同組み換え系のタンパク質は、本質的に重合して生物活性を発揮するものや、様々なタンパク質間相互作用によって生物活性が制御されているものが多いため、これらの試料について従来法を用いてNMRを用いた解析を行っていくことは困難であった。これを受けて、本研究では高分子量タンパク質のNMRシグナル帰属や立体構造解析の問題点の分析を行い、NMRの新しい方法論的研究を平行して進めることにした。

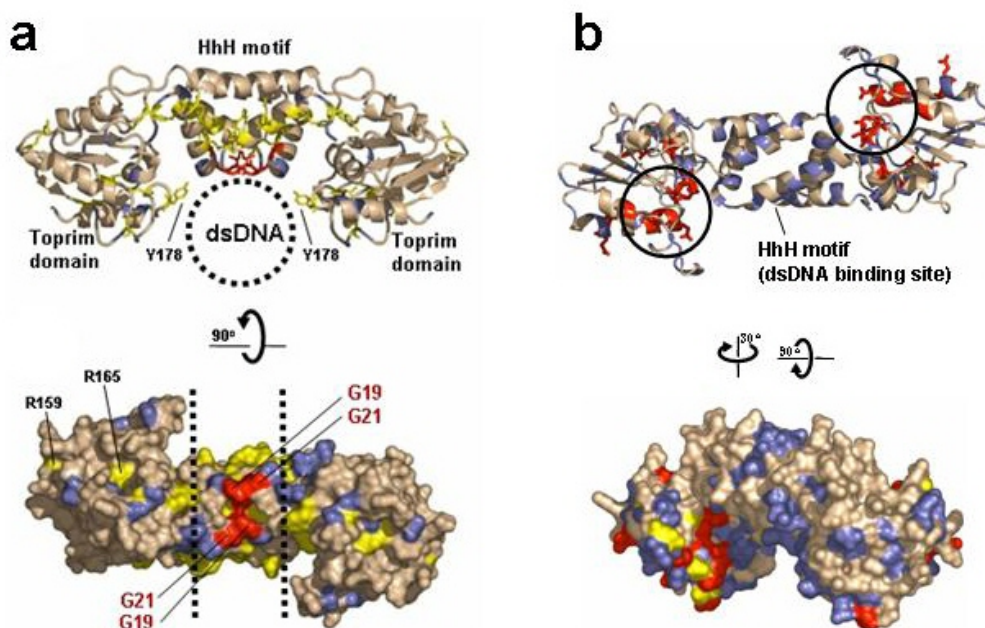


図 44 (a) NMR タイトレーション実験によって同定された高度好熱菌 RecR 上の 2 重鎖 DNA 結合領域。ホモロジーモデリングによって作成した RecR 同種 2 量体構造上にマッピングしてある。
 (b) RecO との NMR タイトレーション実験によって同定された、RecR 上の RecO 結合領域。

まず、高分子量タンパク質の NMR シグナル帰属を効率的に行うための、新規 NMR 測定法の研究を行った。NMR を用いたタンパク質の高次構造解析における一連のプロセスの中で、主鎖 NMR シグナルの帰属は非常に重要である。主鎖 NMR シグナルの帰属は、通常は相補的な化学シフト情報（残基内の化学シフト情報と、1 残基前の化学シフト情報）を得る triple-resonance NMR 測定法のペアを用いて解析する。本研究では、高分子タンパク質試料のための新たな相補的な実験法として Intra-HNCA と DQ-HNCA を開発した。シミュレーションといくつかのモデルタンパク質試料を用いた実験の結果、高分子量タンパク質の高磁場での測定においては、従来の方法に比べて、Intra-HNCA と DQ-HNCA の組み合わせが有用であることが明らかになった。

高分子量複合体試料の迅速な高次構造解析には選択的プロトン標識法が有効であることが知られている。本研究では、特にタンパク質の疎水的コアの形成に重要な役割を果たすと考えられる芳香族アミノ酸の選択的標識について方法論的な開発研究を行った。具体的には、Phe、Tyr、Trp の共通の前駆体であるシキミ酸を用い、タンパク質中の芳香族アミノ酸側鎖 6 員環部のみを高い効率でプロトン標識することに成功した。この方法を用いることで、芳香族アミノ酸側鎖選択的プロトン標識を安価に簡便に行うことが可能になり、高分子量タンパク質の大まかな構造を迅速に高い信頼度で決定できるようになった。

In-Cell NMR 法は、安定同位体標識したタンパク質の異種核多次元 NMR による選択的測定を、生細胞内タンパク質に適用するものである。ターゲットタンパク質の選択的標識と多次元 NMR 化によって、従来の *in vivo* NMR では得られなかった選択性と高分解能（少なくともアミノ酸残基レベル以上）が達成されると期待される。In-Cell NMR

が威力を発揮する生命現象としては、翻訳後修飾、基質結合やタンパク質間相互作用、およびこれらに伴う立体構造変化が考えられる。一方で、In-Cell NMR 法を様々な系で簡便に使える手法にしていくためには、タンパク質の大量発現と、高感度 NMR 測定がカギとなる。本研究では、特に NMR シグナルを高感度で効率よく観測する方法の開発を行った。非線形サンプリング法で異種核多次元 NMR データを観測し、2次元最大エントロピー法を用いてデータ処理を行うことによって、従来の数分の一の時間で同等の感度・分解能をもつデータを得ることに成功し、この方法を用いて、生きた大腸菌中のタンパク質の主鎖 NMR シグナルの帰属にも成功した。

(2) 研究成果の今後期待される効果

1) 相同 DNA 組み換え現象に関与するタンパク質の構造・機能解析

本研究によって、相同 DNA 組み換え反応に関与する一連のタンパク質の高次構造・機能相関、また複合体形成について詳細なメカニズムが解明されつつある。これらの知見を、先行している大腸菌 RecA や真核生物の Rad51 などのタンパク質の構造生物学的解析と併せて議論することによって、相同 DNA 組み換え反応全体の理解に大きく迫ることができる。このことは、生物学的に非常に重要な成果となるであろう。また、相同 DNA 組換えやこれを用いた組み換え修復は生命維持に必須なメカニズムであり、特にヒトにおいては、老化やガン化などと密接な関連があると考えられている。本研究で解析された、相同組換えや組み換え修復に関与するタンパク質群の相互作用の詳細なメカニズムは、将来の老化の抑制やガン化の治療のための研究の貴重な礎になる可能性がある。

2) 高分子量タンパク質の NMR 解析、および NMR を用いた生体内タンパク質動態解析のための方法論的研究

本研究において開発研究を行う技術が確立すれば、溶液 NMR によって解析可能となるタンパク質やタンパク質の相互作用の系の総数が飛躍的に増加すると考えられる。この結果、非常に多くの系で、細胞内に近い溶液条件の構造情報を用いて、機能発現のメカニズムの理解が可能になる。これは生物学的に非常に大きな意味がある。それと同時に、創薬科学などの応用研究や産業にも大きなインパクトを与えるはずである。

また、In-Cell NMR によって生細胞中のタンパク質間相互作用が詳細に直接観測されるようになれば非常に画期的であり、多くのタンパク質-タンパク質相互作用の系に応用可能であるという意味で生物学全般に対するインパクトは大きい。In-Cell NMR は同時に、あるタンパク質と相互作用するタンパク質を迅速にスクリーニングする手段ともなり得る。In-Cell NMR を用いたスクリーニングでは、相互作用因子を同定すると同時に相互作用部位についても情報を得ることができる。このようなスクリーニングが確立すれば、生物工学・創薬などの産業にとっても有意義な手法になる。

3.3 種々の DT40 遺伝子ノックアウト細胞のプロテオミックス的手法による比較解析 (宮崎大学 中山グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

本グループは、クロマチン構造の構築・変化に基づく細胞機能の制御機構を理解するため、ヒストン、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) やヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) などのヒストン修飾酵素、ヒストンシャペロン (クロマチンアセンブリーファクターなど) や転写コレプレッサーなどの欠損 DT40 変異株を系統的に作成し、これらの機能解析を行った。

1) H2AX の機能解析

放射線等で生じた 2 本鎖切断 (DSB) はチェックポイントの発動・修復のトリガーとなり、その最も早い反応として DSB 近傍のクロマチン中で H2AX のリン酸化が起り、修復チェックポイント関連因子群の DSB 部位へのリクルートが促進されると考えられている。H2AX リン酸化能を欠いた DT40 変異株では相同組み換え能及び Rad51 foci 形成能が減少していた。また、相同組換えの初期過程に関与する Xrcc3 との 2 重変異株は致死であり、放射線誘導 Rad51 foci が消失し、DNA 複製阻害剤による染色体断裂が著しく亢進した。これらの結果は両者が異なる経路で相同組換えにおける Rad51 のアセンブリーを促進してゲノムの安定性に寄与することを示唆する。

2) HDAC3 の機能解析

HDAC3 のテトラサイクリン (tet) 誘導性条件変異株は tet 添加後 24 時間で FLAG-tagged HDAC3 が消失し、しばらくは正常に増殖するが、以後増殖速度が遅れ、死細胞が増加することから、HDAC3 は細胞増殖に必須であることが明らかになった。

3) GCN5, PCAF の機能解析

GCN5 欠損株では PCAF 欠損株と異なり、増殖速度が顕著に遅延し、G1→S 移行期に障害があることが判明した。RT-PCR を網羅的行った結果、調べた 50 種以上の遺伝子のうち、発現が増加した遺伝子はサイクリン (D2, G1)、cdk インヒビター p27、転写因子 c-myc、HDAC4、アポトーシス抑制遺伝子 bc1-2、PCAF など 7 種であった。一方、サイクリン (A, D3)、プロテインホスファターゼ cdc25B、転写因子 E2F ファミリー (E2F1, 3, 4, 6, DP2)、RB ファミリー p107、スライディングクランプ PCNA、アポトーシス抑制遺伝子 bc1-xL など 11 種の遺伝子の発現は減少していた。DT40 野生株では PCAF の発現量は低く、PCAF 欠損株では明確な発現形質の変化は認められないため、GCN5 欠損株で増加した PCAF が GCN5 機能の一部を補償していることが示唆された。GCN5 は E2F ファミリーなどの細胞周期関連遺伝子の発現を統括的に制御しており、これは高等真核細胞における 2 種の GCN5 ファミリーの生理機能を細胞レベルで解析した最初の例である (図 45)。また、アポトーシス制御因子である bc1-2 や bc1-xL の発現を GCN5 ファミリーがコントロールしていることから、これらがアポトーシス制御にも深く関与していることが示唆された。

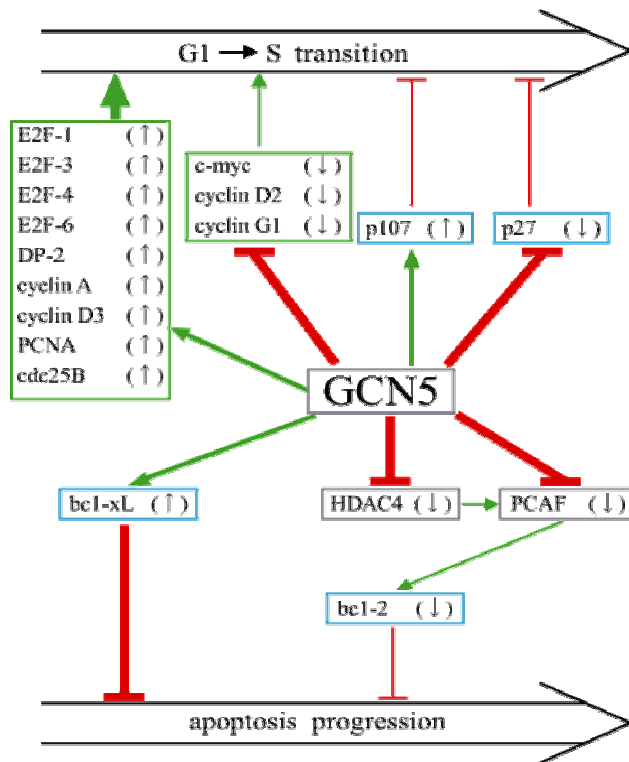


図 45 GCN5 は細胞周期関連遺伝子群の発現を統括的に制御する。

4) HAT1 の機能解析

新規合成ヒストン H3 と H4 の翻訳後修飾は真核生物を通じて保存された現象であるが、その生理的役割については未だ不明である。新規合成ヒストンをアセチル化しているのは HAT1 のみであり、*in vitro* で H4 の 5 番と 12 番目の Lys をアセチル化する (ac-Lys-5, 12)。HAT1 欠損株では、細胞質ヒストン H4 の Lys-5, 12 のアセチル化が消失し、HAT1 が新規合成ヒストン H4 ac-Lys-5, 12 を触媒することを明らかにした。しかし、本変異株の細胞抽出液では *in vitro* 複製依存的ヌクレオソーム形成活性は減少せず、*in vivo* 新規 DNA 合成鎖のヌクレオソーム形成能も変化しないことから、H4 の ac-Lys-5, 12 は複製依存的ヌクレオソーム形成には必要ではないことが示唆されたが、細胞増殖能は若干減少していた。本変異株の細胞質に存在する H3, H4 を含む幾つかの複合体の分子量に変化が認められ、HAT1 は新規合成ヒストン H4 を細胞質にとどめ、核への移行をコントロールしている可能性が示された。さらに、本変異株は複製停止に伴う 2 重鎖切断 (DSB) を引き起す camptothecin, MMS などの DNA 複製阻害剤に対する感受性が亢進しており、HAT1 もしくは H4ac-Lys5, 12 が DSB 修復経路にクロマチン構造を介して関与している可能性がある。

5) CAF-1, ASF1 の機能解析

Chromatin assembly factor-1 (CAF-1) はヒストン H3, H4 シャペロンであり、p150, p60, p48 サブユニットからなる複合体で、複製とカップルしたヌクレオソームアセンブリーで中心的役割を果し、p48 は CAF-1 以外の様々な複合体にも含まれ、多様なクロマチン代謝に重要な役割を担うと考えられている。各サブユニットのテトラサイクリン (tet) 誘導性条件変異株の解析結果から、いずれも細胞増殖に必須であった。CAF-1 の消失に伴い、DNA 合成能が低下し、S 期進行阻害が起り、最終的に死滅した。これらの変異株では新規合成 DNA 鎖で特異的にクロマチン構造が弛緩し、CAF-1 が新

規合成 DNA 鎖上のヌクレオソーム形成に必須の因子であることが明らかとなった。この間に H2AX はリン酸化されるが、S 期チェックポイントキナーゼ Chk1 は活性化されず、複製後の速やかなクロマチン構築が DNA 複製チェックポイント応答に必要であり、CAF-1 欠損による S 期進行阻害には Chk1 非依存的な S 期もしくは DNA 複製チェックポイントが機能していると考えられた。種々の CAF-1p150 変異蛋白質を条件変異株に導入した再構成実験で、p60、p48 及び PCNA 結合能を有する 293-714 アミノ酸領域のみで細胞増殖及び DNA 複製に十分であり、どれか 1 つの結合能を欠いても致死であることから、CAF-1 複合体が PCNA を介した DNA 複製伸長装置と密接に関連していることが示唆された。これらの変異株では multiple spindle pole の出現やクロモソームアライメントに異常を示す M 期の細胞が増加した。p48 変異株では染色体の不均等分配、micro nuclei の出現、p150 及び p60 変異株ではセントロメア蛋白質や HP-1 蛋白質の顕著な脆弱性は認められないが、p48 欠損によりヒストン H3 Lys-9 のアセチル化が亢進しており、セントロメア蛋白質や HP-1 蛋白質のセントロメア領域での脆弱性が観察された。したがって、p48 は CAF-1 機能とは別の機能を有し、セントロメアの構築・維持に関与していることが示唆された。

Anti silencing function 1 (ASF1) は *in vitro* で CAF-1 に依存した新規 DNA 合成依存性ヌクレオソーム形成を促進する因子として知られる。ASF1 欠損条件変異株は ASF1 の消失に伴い、DNA 合成能の低下、新規合成 DNA 鎖上のヌクレオソーム形成能の低下、S 期進行阻害が起り、致死であった。したがって、ASF1 も CAF-1 同様、新規合成 DNA 鎖上のヌクレオソーム形成に必須の因子であることが示された。ASF1 はヒストン H3-H4 及び CAF-1p60 との結合能を有するため、ヒストンを CAF-1 に渡すヒストンドナーとしての機能が想定されている。しかし、p60 や H3-H4 との結合能を欠いた点変異 ASF1 を ASF1 欠損条件変異株に導入した再構成実験を行った結果、何れの変異 ASF1 も正常な細胞増殖能を有することが明らかとなり、ヒストンシャペロンとしての機能とは別に、CAF-1 非依存性の ASF1 機能が細胞増殖おそらく DNA 複製に寄与していることが示唆された。

6) HIRA の機能解析 (論文: H15-8、H16-5)

出芽酵母の転写コリプレッサー Hir1p, Hir2p の高等真核生物ホモログ HIRA の欠損株は弱い増殖抑制を示し、この増殖能低下は HIRA の N-末端領域の導入で回復し、C-末端領域の導入では回復しなかった。RT-PCR の結果、ヒストン遺伝子や細胞周期関連遺伝子 (cdk インヒビター p19、サイクリン A) の発現は亢進し、他の細胞周期制御遺伝子 (cdk インヒビター p18、cdc25B、bc1-2) の発現は顕著に低下していた。さらに、前者の遺伝子群の発現は C-末端領域、後者のそれは N-末端領域の導入で、それぞれ野生株のレベルに戻った。これらの結果から、HIRA はその N-末端領域と C-末端領域でそれぞれ異なる遺伝子の発現制御に寄与 (N-末端領域は促進、C-末端領域は抑制) しており、N-末端領域で支配される遺伝子発現は細胞増殖に重要な役割を担っていることが示唆された。特に発現変化の大きかった p18 について、クロマチン免疫沈降法を用いてそのプロモーター領域と HIRA との結合を解析した結果、HIRA の N-末端領域が p18 のプロモーター領域と直接相互作用しており、HIRA の N-末端領域が p18 の遺伝子発現を制御していることを明らかにした (図 46)。

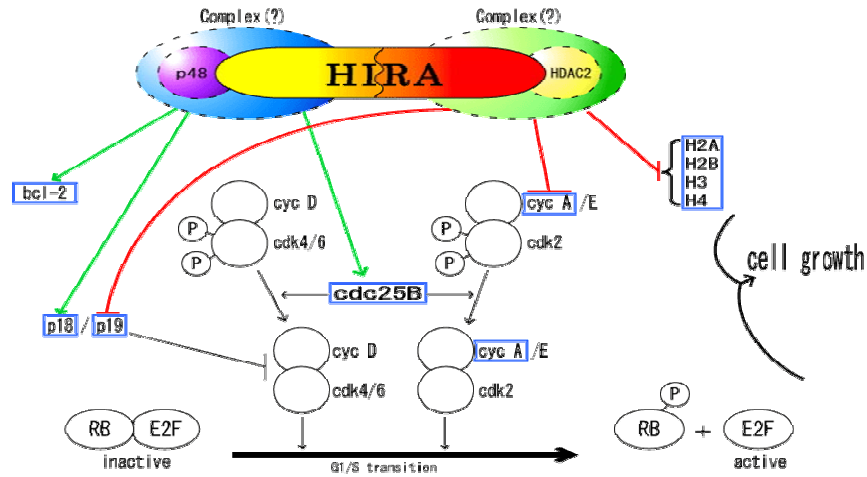


図 46 HIRA のN-末端領域とC-末端領域は各々異なる細胞周期関連遺伝子群の発現を制御する。

(2) 研究成果の今後期待される効果

遺伝子ノックアウト法を駆使して、クロマチン構造の構築・変化に関与する様々な因子の欠損 DT40 変異株を系統的に作成して網羅的に解析することによって、各因子の個々の役割分担を明らかにすることができる。さらに、各因子間のクロストークを解析することによって、今だブラックボックスである高等真核細胞におけるクロマチン構造の変化を介した生体システムの制御機構の分子的基盤を理解することができると期待される。また、細胞周期のS期のクロマチンアセンブリーは細胞増殖に必要不可欠な段階であり、がん細胞はS期に集積するため、ヌクレオソームアセンブリーに関与する因子群はがんの診断や治療の魅力的なターゲットとして考えられ始めており、本研究の今後の展開はこれらの基盤的研究に成り得るものと期待される。

3.4 ゲノムの安定維持に関わる分裂酵母の新規遺伝子の同定とその機能解析

(横浜市立大学 岩崎グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

ゲノム安定性の維持機構に関与する遺伝子の機能は、主に出芽酵母を実験系として研究されており、得られた情報はパラダイムとして、ヒトを含む高等真核生物のゲノムの安定維持機構のモデルとして採用されている。しかしながら、出芽酵母から得られた情報は、必ずしも、普遍的な情報ではない。実際、我々のグループは、分裂酵母において組み換え修復やゲノム安定性維持の変異株の分離を試みたところ、これまでに10数個以上の新規遺伝子（もしくは変異株）の同定に成功した。これらのなかには、出芽酵母には存在せず、脊椎動物にホモログが存在するものが複数あった。この事実をふまえ、本研究課題では、組み換え修復やゲノム安定性維持機構にかかわる分裂酵母遺伝子を新しく同定し、その遺伝子の機能解析を行なった。加えて、これら新規遺伝子をプローブとし、脊椎動物ホモログを同定し、ニワトリ DT40 細胞における遺伝学的解析に供することを目指した。

(1) 新規遺伝子の同定

本研究が実施される以前に、Okazaki 断片のプロセッシングヌクレアーゼ Fen-1 をコードする rad2 との合成致死変異を分離することによって、組み換え修復の変異株が濃縮されることを示していた。この、遺伝学的な選択法によって、rad60, rad62, fbh1, nbs1, slr9 などの遺伝子を同定した。また、別の選択方法によって（下記参照されたい）、sfr1 遺伝子を同定した。これらは、全て、ヒトを含めた高等真核生物にホモログが存在した。（論文 H13-17、H14-8、H15-10、H16-6）

(2) 新規組み換え修復経路の発見とその解析（論文：H15-9）

真核生物において、Rad51 タンパク質は、相同組換えや組み換え修復において重要な働きをしている。分裂酵母のカウンターパートは、Rhp51 と呼ばれ、他の生物種と同様に、Rhp51 依存的修復経路が、分裂酵母における主要な組み換え修復経路である。Rad51 (Rhp51) は単鎖 DNA の上でフィラメント状に結合して、相同鎖を認識し鎖交換反応を行うエンジマンパク質であると考えられているが、この反応には、メディエーターと呼ばれるタンパク質の補助が必要である。ヒトのメディエーターは、Rad51B, Rad51C, Rad51D, Xrcc3, Xrcc2、出芽酵母と分裂酵母では、それぞれ、Rad55, Rad57、及び、Rhp55, Rhp57 などが知られている。これらは、Rad51 タンパク質と1次構造上相同性を有することから、Rad51 パラログと呼ばれている。酵母の場合、それぞれ2種類の Rad51 パラログがヘテロ二量体を形成し、Rad51 フィラメントを活性化することによって、鎖交換反応を促進するものと考えられている。我々は、これまでの遺伝学的解析から、分裂酵母の Rhp51 依存的経路にも、Rhp55/Rhp57 ヘテロダイマーがメディエーターとして関与することを示していた。

分裂酵母の接合型変換に欠損を示す変異株として、swi5 変異株が同定され、その後、相同組換えや組み換え修復にも欠損があることが示されていた。そこで、swi5 遺伝子の相同組換えにおける役割を明らかにする目的で、我々は、swi5 遺伝子をクローニングし、分子遺伝学的な解析を開始した。その結果、swi5 は、真核生物に保存された新規タンパク質をコードすることを見出した。Swi5 欠損株を作成し、エピ

スタンス解析の結果、Rhp51 依存的且つ Rhp55/57 非依存的組み換え経路で機能することを見出した。このことは、すなわち、Rhp51 依存的組み換え修復経路には、Rhp55/Rhp57 依存的副経路と Swi5 依存的副経路の、2つの独立した経路が存在することを示唆する。

Swi5 依存的経路に関与するタンパク質として Sfr1 を新しく同定した。Sfr1 は、Swi5 と Rhp51 の相互作用を仲介すること (Swi5-Sfr1-Rhp51 の相互作用) を明らかにした。一方、接合型変換には、Swi5-Swi2-Rhp51 タンパク質複合体が関与することを明らかにした。Swi2 と sfr1 は C 末端側で一次配列上の相同性を有し、この相同領域で Swi5 や Rhp51 と結合することが判明した。さらに、Swi2 はヘテロクロマチン構成タンパク質である Swi6 と結合し (Sfr1 は Swi6 とは結合しなかった)、接合型変換におけるドナーの選択に重要な働きをしていることを示した。また、Swi5 は、核内に局在するが、Sfr1 と Swi2 に依存して、異なった核内局在と機能的差異を観察した。Sfr1 は、DNA 損傷に応答して、Swi5 や Rhp51 と共局在する focus (集合体) を形成することを示した。さらに、Rhp51 の focus 形成に、Rhp55/57 及び Swi5/Sfr1 が必要なことがわかった。以上の結果から Swi5/Sfr1 と Swi5/Swi2 は、Rad51 とは相同性を持たない新しい Rhp51 メディエーターであると結論づけた。

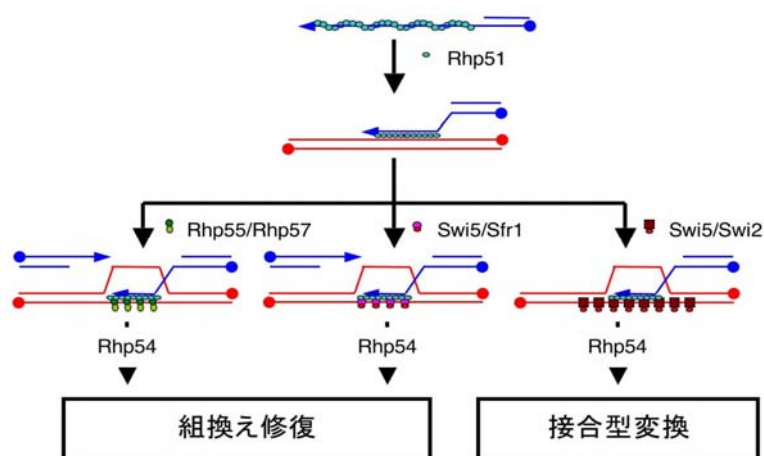


図 47 3 種類のメディエーター Rhp55/57、Swi5/Sfr1 及び Swi5/Swi2 のモデル図

(2) 研究成果の今後期待される効果

以上の結果は、Swi5 は、Sfr1 もしくは Swi2 と複合体を形成して、Rhp51 の機能を促進する、新しいメディエーターであることを示唆している。今後は、これらのメディエーターが、Rhp51 による鎖交換反応を実際にどのように促進するのか、生化学的解析を行う必要がある。また、これらの真核高等生物における機能を明らかにするために、DT40 細胞の KO 株の解析も必要であろう。また、2 種類のメディエーター Rhp55/57 と Swi5/Sfr1 間での、組み換え修復における機能的な差異を明らかにすることも、重要な課題の一つである。このような解析を通して、より詳細な組み換え修復やゲノム安定維持機構の分子機構が明らかとなると考えられる。

3.5 相同 DNA 組換えに関与する分子の生化学的解析 (大阪大学 篠原グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

減数分裂期特異的な RecA ホモログ Dmc1 と一緒に働く因子を探すために、酵母の減数分裂期特異的な発現のデータベースあるいは、機能ゲノミックスのデータベースを使い、減数分裂期特異的な RecA ホモログ Dmc1 と発現パターンが同じで、かつ変異株の表現型が似ているものを選び出した。検索の結果、減数分裂期特異的に発現する 2 つの遺伝子、MEI5、SAE3 が候補として残り、その変異株の詳細な解析を行った。その結果、これらの変異株は減数分裂期に特異的に染色体の特定部位に導入される DNA2 重鎖切断(double-strand breaks; DSB)の修復に欠損を持つ事から、組換えに関与することが明らかになった。さらに、これらの変異株では Rad51 の染色体への結合は正常であるが、Dmc1 の染色体への結合に欠損を持つ事が分かった (図 48)。

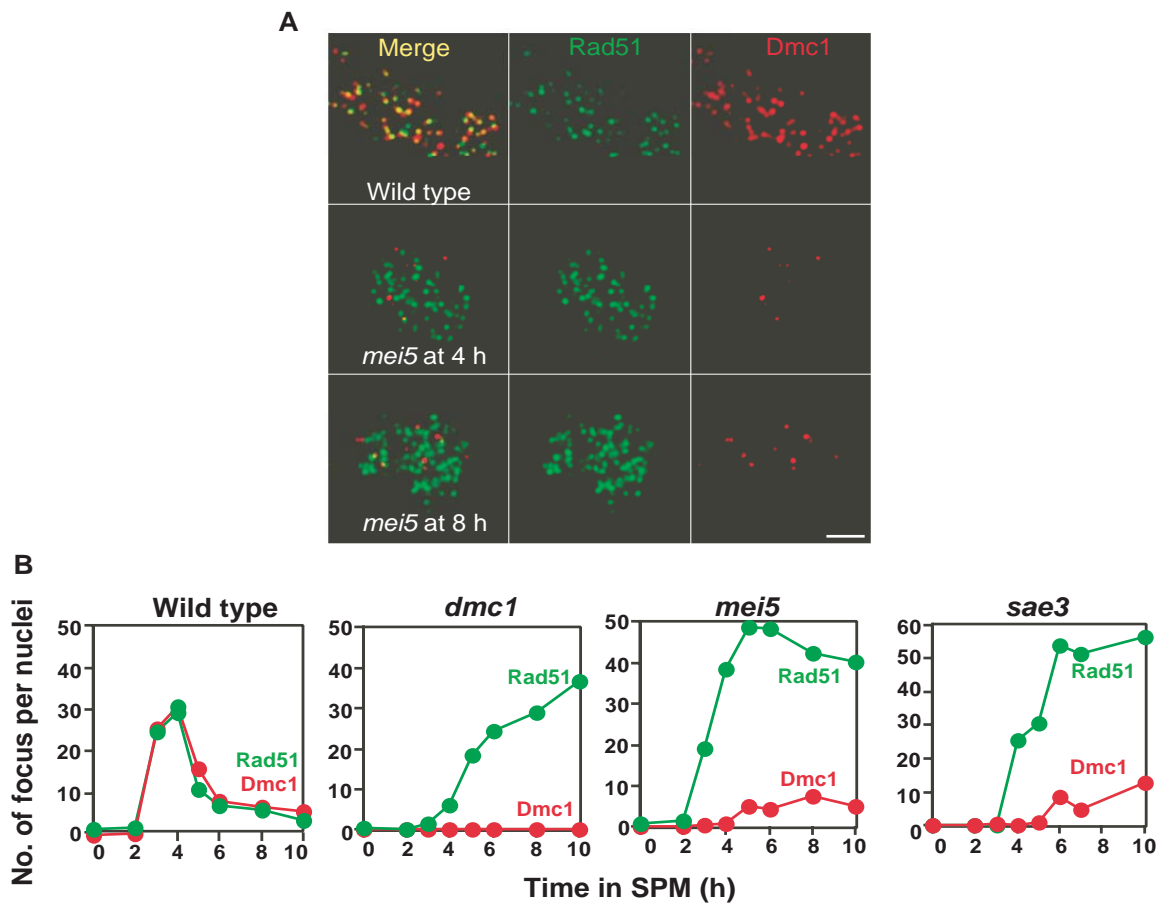


図 48 *mei5*, *sae3* 変異株での Rad51 と Dmc1 の染色体への局在
 (A) 間接蛍光抗体法により野生型、*mei5* 変異株における Rad51, Dmc1 の染色体上の局在を調べた。
 (B) 野生型、各変異株における Rad51, Dmc1 foci 形成のキネテックス

クロマチン免疫沈降法により、組換えのホットスポットへの Dmc1 の結合が低下していることも確認できた。つまり、Mei5, Sae3 蛋白質は減数分裂期特異的 RecA ホモログ Dmc1 を DSB 部位に呼び込む働きを持つと考えられる。 Mei5, Sae3 蛋白質共、

染色体上で Rad51 や Dmc1 と組換えが起こる時期に共局在する。

興味深い事に Dmc1 が欠損した変異株では Mei5, Sae3 の染色体の結合が見られない。つまり、Dmc1, Mei5, Sae3 は相互依存的に染色体に結合することが分かり、この 3 者が複合体として機能する事を強く示唆している。実際に、Dmc1-Mei5, Mei5-Sae3 の間での相互作用が免疫沈降あるいは 2-ハイブリッド法で確認できた。Mei5-Sae3 複合体を精製した所、安定な複合体として精製でき、DNA に強く結合する活性を有している事が分かった (論文 : H16-7)。また、ヒトやマウスにおいて、Mei5, Sae3 の相同遺伝子も同定できた。

(2) 研究成果の今後期待される効果

上記の結果から、減数分裂期の組換えは Dmc1 単独で行うのではなく、Dmc1-Mei5-Sae3 複合体が DNA 上に大きな超分子マシナリーを形成し、相同鎖検索反応を行うと考えられる (論文 H16-7)。減数分裂期の組換えの大きな特徴は空間的に“遠く”離れている相同染色体間で起こる事であり、この蛋白質複合体が体細胞分裂型の Rad51 複合体より、効率よく“遠い”DNA 間の相同鎖検索反応を行う能力に優れていると考えられる。このような複合体を強制発現させる事で、ヒト細胞等でのジーンターゲットイングの効率を上昇することが可能かもしれない。また、Mei5, Sae3 のヒトホモログは不妊の原因遺伝子の候補になるとも考えられ、高等真核生物でのさらなる解析が期待できる。

4. 研究参加者

①武田 俊一グループ(DT40 細胞の遺伝学的解析の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
武田 俊一	京都大学大学院 医学研究科	教授	研究の総括/DT40 の相同 DNA 組み換え機構の解析	H12.11~H18.3
園田 英一朗	京都大学大学院 医学研究科	助教授	相同 DNA 組換えに関与する DNA ポリメラーゼ	H12.11~H18.3
川本 卓男	京都大学大学院 医学研究科	助教授	DNA ポリメラーゼをリクルートする分子 XRCC1, RFC 様分子	H14.6~H18.3
山添 光芳	京都大学大学院 医学研究科	助手	Rad51 補助因子群 (Rad51 パラログ、Brcal/2、Swi5)	H12.11~H18.3
谷口 善仁	京都大学大学院 医学研究科	助手	メダカ変異体の単離	H15.6~H18.3
竹中 克也	京都大学大学院 医学研究科	CREST 研究員/特任助手	損傷乗越修復に関与する DNA ホリメラーゼ	H13.4~H18.3
菊池 浩二	京都大学大学院 医学研究科	大学院博士課程/研究員	Endonucleas(XPF,XPG,XPG like gene, Fen1, Exol)	H13.4~H17.12
Donniphat Dejsuphong	京都大学大学院 医学研究科	大学院博士課程	研究データの収集・解析	H17.5~H18.3
西川 まゆみ	京都大学大学院 医学研究科	CREST 研究補助員	実験器具の洗浄	H14.4~H18.3

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
佐藤 有美	京都大学大学院 医学研究科	CREST 研究補助員	分子生物学の実験補助	H15.12～H18.3
永尾 命子	京都大学大学院 医学研究科	CREST 研究補助員	分子生物学の実験補助	H15.12～H18.3
金澤 雅美	京都大学大学院 医学研究科	CREST チーム事務員	研究チーム事務全般	H17.4～H18.3
四方 美穂	京都大学大学院 医学研究科	CREST チーム事務員	研究チーム事務全般	H14.1～H14.12 H16.1～H17.3
宮本 弘之	京都大学大学院 医学研究科	CREST 研究補助員	分子生物学の実験補助	H16.1～H17.12
福島 徹	京都大学大学院 医学研究科	CREST 研究補助員	Poly[ADPribose]polymerase	H14.1～H17.12
川崎 富美子	京都大学大学院 医学研究科	CREST チーム事務員	研究チーム事務全般	H13.1～H13.12 H15.1～H15.12
北脇 容子	京都大学大学院 医学研究科	CREST 研究補助員	分子生物学の実験補助	H14.4～H15.3
岡嶋 幸子	京都大学大学院 医学研究科	CREST 研究補助員	分子生物学の実験補助	H14.4～H15.3
Paula May Clements	京都大学大学院 医学研究科	CREST 研究補助員	ニワトリ apraxia 1 遺伝子のクローニグとノックアウトコンストラクトの構築	H14.4～H15.3
藤森 亮	京都大学大学院 医学研究科	助手	遺伝子の発現の解析、他のタンパクとの相互作用の解析	H12.1～H13.6
伊藤 孝一	京都大学大学院 医学研究科	CREST 研究員	標的組換えに関与する新規分子のスクリーニング	H12.11～H13.8

②伊藤 隆グループ(相同 DNA 組換えに関与するタンパク質の構造解析の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
伊藤 隆	理化学研究所 (中央研究所) (横浜研究所)	前任研究員 前任研究員	新規タンパク質分子の構造生物学的解析	H12.11～H18.3
美川 務	理化学研究所 (中央研究所) (横浜研究所)	研究員 研究員	新規タンパク質分子の構造生物学的・生化学的解析	H16.4～H18.3
小林 涼子	理化学研究所 (中央研究所)	CREST 研究補助員	分子生物学の実験補助	H16.1～H18.3
吉益 雅俊	理化学研究所	CREST 研究補助員 基礎科学 特別研究員	実験補助 新規タンパク質分子の構造生物学的解析	H14.6～H15.3 H16.4～H18.3
伊藤 かおり	理化学研究所	大学院博士 課程	新規タンパク質分子の大量精製と構造生物学的解析	H16.4～H18.3
本多 賢吉	理化学研究所	大学院博士 課程	新規タンパク質分子の大量精製と構造生物学・生化学的解析	H16.4～H18.3
佐藤 友美	理化学研究所	CREST 技術員	新規タンパク分子の大量精製	H12.12～H15.3
村上 聡子	理化学研究所	CREST 技術員	新規タンパク分子の大量精製	H15.4～H16.3

③中山 建男グループ(DT40 細胞の変異株の作製とその表現型解析の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
中山 建男	宮崎大学 (医学部) (フロンティア科学 実験総合センター)	教授	ヒストン H2AX, ヒストン修飾酵素 群、クロマチンアセンブリーファクター	H12.11~H17.3
高見 恭成	宮崎大学 (医学部)	助教授	ヒストン H2AX, ヒストン修飾酵素 群、クロマチンアセンブリーファクター	H12.11~H17.3

④岩崎 博史グループ(相同DNA組換えに関わる新規遺伝子の同定とその機能解析の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
岩崎 博史	横浜市立大学	助教授	相同 DNA 組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	H14.4~H17.3
赤松 由布子	横浜市立大学	博士 研究員	新規遺伝子の分子遺伝学的機能解析	H14.4~H17.3
黒川 裕美子	横浜市立大学	大学院生	新規遺伝子の生化学的機能解析	H16.4~H17.3
中崎 智文	横浜市立大学	大学院生	新規遺伝子の分子遺伝学的機能解析	H14.4~H17.3
池口 満徳	横浜市立大学	助教授	新規遺伝子のバイオインフォマティクス	H14.4~H16.3
川浪 真範	横浜市立大学	大学院生	新規遺伝子の分子遺伝学的機能解析	H14.4~H15.3
山下 真史	横浜市立大学	大学院生	新規遺伝子の分子遺伝学的機能解析	H14.4~H15.3
金子 敦	横浜市立大学	大学院生	新規遺伝子の分子遺伝学的機能解析	H15.4~H16.3
武田 元樹	横浜市立大学	大学院生	新規遺伝子の分子遺伝学的機能解析	H15.4~H16.3

⑤篠原 彰グループ(相同DNA組換えに関与する分子の生化学的解析の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
篠原 彰	大阪大学	助手	DNA 組換えの生化学的解析	H12.12~H15.3
篠原 美紀	大阪大学	ポストドクトラ ルフェロー	免疫細胞染色による組換えの解析	H12.12~H15.3

5. 成果発表等

(1)論文発表 (国内 4 件、海外 72 件)

【H13 年度】

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Takata, M., Tachiiri, S., Fujimori, A., Thompson, L. H., Miki, Y., Hiraoka, M., Takeda, S., and Yamazoe, M.: Conserved domains in the chicken homologue of *BRCA2*. *Oncogene*, **21**:1130-1134, 2002.
7. 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.
8. Fujimori, S. Tachiiri, E. Sonoda, L. H. Thompson, P. K. Dhar, M. Hiraoka, S. Takeda, Y. Zhang, M. Reth, and M. Takata: Rad52 partially substitutes for the Rad51 paralog XRCC3 in maintaining chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.*, **20**, 5513-20, 2001.
9. T. Tanaka, F. Hosoi, Y. Yamaguchi-Iwai, H. Nakamura, H. Masutani, S. Ueda, A. Nishiyama, S. Takeda, H. Wada, G. Spyrou, and J. Yodoi.: Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *EMBO J.*, **21**:1695-1703, 2002.
10. 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.
11. P.K.Dhar, E.Sonoda, A.Fujimori, Y.M.Yamashita, and S.Takeda: Experimental evidence in support of chicken DT40 cell line as a unique model for DNA repair studies. *The Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, **20(4)**: 273-283, 2001.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Hong, E. L., Shinohara, A., and D. K. Bishop.: *S. cerevisiae* Dmcl1 protein promotes

renaturation of ssDNA and assimilation of ssDNA into homologous super-coiled duplex DNA. *J. Biol. Chem.* **276**, 41906–41912, 2001.

17. Tsutsui Y, Khasanov FK, Shinagawa H, Iwasaki H and Bashkirov VI: Multiple interactions among the components of the recombinational DNA repair system in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, **159**:91–105, 2001.
18. E. Sonoda, M. Takata, Y. M. Yamashita, C. Morrison, and S. Takeda: Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**: 8388–8394., 2001. (Review)

【H14 年度】

1. 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.
2. Takashi Okada, Eiichiro Sonoda, Yukiko M. Yamashita, Shogo Koyoshi, Satoshi Tateishi, Masaru Yamaizumi, Minoru Takata, Osamu Ogawa and Shunichi Takeda. Involvement of Vertebrate Polkin Rad18-independent Postreplication Repair of UV Damage. *J. of Biol. Chem.*, **Vol. 277**, No. 50, 48690–48695, 2002.
3. 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 J.*, **Vol.21 No.20 pp.5558–5566**, 2002.
4. 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” *Nucl. Acids Res.*, **Vol.31, No. 6**, 1735–1743, 2003.
5. 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.
6. Miki Shinohara, Kazuko Sakai, Akira Shinohara and Douglas K. Bishop: Crossover interference in *Saccharomyces cerevisiae* requires a *TID1/RDH54*- and *DMC1*-dependent pathway. *Genetics*, **163**, 1273–1286. 2003.
7. Miki Shinohara, Kazuko Sakai, Tomoko Ogawa and Akira Shinohara: The mitotic DNA damage checkpoint proteins Rad17 and Rad24 promote repair of double-strand breaks during meiosis. *Genetics*, **164**, 855–865. 2003.
8. Morishita T, Tsutsui Y, Iwasaki H and Shinagawa H.: The *Schizosaccharomyces pombe rad60* gene is essential for repairing double-strand DNA breaks spontaneously occurring during replication and induced by DNA-damaging agents. *Mol. Cell. Biol.* ,**22**:3537–3548, 2002.
9. Imamura, O., Fujita, K., Itoh, C., Takeda, S., Furuichi, Y., and Matsumoto, T.: Werner and Bloom helicases are involved in DNA repair in a complementary fashion. *Oncogene*, **21**: 954–963, 2002.
10. S. J. Cumbers, G. T. Williams, S. L. Davies, R. L. Grenfell, S. Takeda, F. D. Batista, J. E. Sale, M. and S. Neuberger: Generation and iterative affinity maturation of antibodies in vitro using hypermutating B-cell lines. *Nature Biotechnology* **Vol.20**: 1129 – 1134., 2002.
11. Tauchi, H., Kobayashi, J., Morishima, K., van Gent, D. C. , Shiraishi, T., Verkaik, N. S., van Heemst, D., Ito, E., Nakamura, A., Sonoda, E., Takata, M., Takeda, S., Matsuura, S., and Komatsu, K.: Nbs1 is essential for DNA repair via homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* **Vol.420**: 93–8, 2002.
12. Wei, C., Skopp, R., Takata, M., Takeda, S., and Price, C. M.: Effects of double-strand break repair proteins on vertebrate telomere structure. *Nucleic Acids Res.*, **Vol.30**: 2862–70., 2002.

(和文)

1. 篠原 彰、篠原美紀、染色体上での DNA 鎖交換反応-相同組換えの分子メカニズムと細胞機能、*細胞工学 Vol. 22, 278-282, 2003.*
2. 山添 光芳、“DNA 複製と DNA 修復に関する DNA ポリメラーゼ遺伝子群”、*細胞工学、Vol.22, No.3, 283-291. 2003.*

【H15 年度】

1. 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. *J. of Radiation Res., 44:151-159, 2003*
2. 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. *Mol. Cell, Vol.11:1109-1117, 2003*
3. 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 J. 22: 3188-3197, 2003*
4. 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. *Mol. Cell 12(4):1029-1041, 2003*
5. 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*
6. Hohegger, H., Sonoda, E., and Takeda,S.: post-replication repair in DT40 cells: translesion polymerases versus recombinases (Review) *Bio Essays 26(2):151-158, 2004*
7. 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*
8. 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*
9. 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*
10. Ueno M, Nakazaki T, Akamatsu Y, Watanabe K, Tomita K, Lindsay HD, Shinagawa H, and Iwasaki H: Molecular Characterization of the *Schizosaccharomyces pombe nbs1⁺* Gene Involved in DNA Repair and Telomere Maintenance. *Mol. Cell. Biol. 23:6553-6563, 2003.*
11. Akamatsu Y, Dziadkowiec D, Ikeguchi M, Shinagawa H, and Iwasaki H: 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. 100: 15770-15775, 2003.*
12. Tsukamoto, M., Yamashita, K., Miyazaki, T., Shinohara, M. and A. Shinohara. The N-terminal DNA binding domain of Rad52 promotes *RAD51*-independent recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics, 165: 1703-1715, 2003.*
13. Miyazaki T., Bressan, D.A., Shinohara, M., Haber, J.E. and A. Shinohara: *In vivo* assembly and disassembly of Rad51 and Rad52 complexes during double-strand break repair. *EMBO. J., 23. 939-949, 2004.*

(和文)

1. 園田英一朗, 武田俊一、「2重鎖DNA切断修復とDNA組み換え」第6章 わかる実験医学シリーズ DNA複製・修復がわかる 羊土社、2004
2. 篠原 彰、「場”を可視化して相同組換えを見る」生産と技術、56、10-13、2004.

【H16年度】

1. Mitsuyoshi Yamazoe, Eiichiro Sonoda, Helfrid Hocegger, Shunichi Takeda: Reverse genetic studies of the DNA damage response in the chicken B lymphocyte line DT40 *DNA Repair* **3**, 1175-1185, 2004
2. Aki Mizutani, Takashi Okada, Shinya Shibutani, Eiichiro Sonoda, Helfrid Hocegger, Chikako Nishigori, Yoshika Miyachi, Shunichi Takeda, and Mitsuyoshi Yamazoe: Extensive Chromosomal Breaks Are Induced by Tamoxifen and Estrogen in DNA Repair-Deficient Cells. *Cancer Research* **64**, 3144-3147, 2004
3. Helen Dodson, Emer Bourke, Liam J. Jeffers, Paola Vagnarelli, Eiichiro Sonoda, Shunichi Takeda, William C. Earnshaw, Andreas Merdes and Ciaran Morrison: Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G2 phase and involves ATM *The EMBO J.*, **23**: 3864-3873, 2004
4. Sasaki, MS., Takata, M., Sonoda, E., Tachibana, A., and Takeda, S.: Recombination repair pathway in the maintenance of chromosomal integrity against DNA interstrand crosslinks. *Cytogenet Genome Res.*, Vol.104:28-34., 2004.
5. Ahyar Ahmad, Yasunari Takami, and Tatsuo Nakayama: 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**, 125-136, 2004
6. Morikawa H, Morishita T, Kawane S, Iwasaki H, Carr AM, and Shinagawa H: Rad62 protein functionally and physically associates with the Smc5/Smc6 protein complex and is required for chromosome integrity and recombination repair in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 9401-9413, 2004.
7. Hayase, A., Takagi, M., Miyazaki, T., Oshiumi, H., Shinohara, M. and A. Shinohara: A Protein complex containing Mei5 and Sae3 promotes the assembly of the meiosis-specific homolog Dmc1. *Cell*, **119**: 927-940, 2004.
8. Yamashita, K., Shinohara, M. and A. Shinohara: Rad6-Bre1-mediated histone H2B ubiquitylation modulates the formation of double-strand breaks during meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**: 11380-11385, 2004.
9. Zierhut, C., Berlinger, M., Rupp, C. Shinohara, A. and F. Klein: Mnd1 is required for meiotic inter-homolog repair. *Current Biology*, **14**: 752-762, 2004.
10. Shinohara, A. and M. Shinohara. Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination. *Cytogenetics and Genome Research*, **107**, 201-207. 2004 (review).
11. Dodson, H., Bourke, E., Jeffers, L. J., Vagnarelli, P., Sonoda, E., Takeda, S., Earnshaw, W. C., Merdes, A., and Morrison, C.: Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during prolonged G2 phase and involves ATM., *EMBO J.*, **23**: 3864-73, 2004.

【H17年度】

1. Hocegger, H., Sonoda, E. and Takeda, S.: Post Replication Repair in DT40 cells: Translesion Polymerases versus Recombinases. *BioEssay* **26(2)**:151-158, 2004 (review)
2. Yamazoe, M., Sonoda, E., Hocegger, H., and Takeda, S.: Reverse genetic studies of the DNA damage response in the chicken B lymphocyte line DT40. *DNA Repair Vol.3*: 1175-1186, 2004 (review)
3. 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 Report*, **5(2)**:167-171, 2004

4. Mizutani, A., Okada, T., Shibutani, S., Sonoda, E., Hohegger, H., Nishigori, C., Miyachi, Y., Takeda, S., and Yamazoe, M.: Extensive chromosomal breaks are induced by tamoxifen and estrogen in DNA repair deficient cells. *Cancer Res.* **64**: 3144–3147, 2004
5. Dodson, H., Bourke, E., Jeffers, L. J., Vagnarelli, P., Sonoda, E., Takeda, S., Earnshaw, W. C., Merdes, A., and Morrison, C.: Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during prolonged G2 phase and involves ATM. *EMBO J.*, **23**: 3864–3873, 2004
6. Sasaki, MS., Takata, M., Sonoda, E., Tachibana, A., and Takeda, S.: Recombination repair pathway in the maintenance of chromosomal integrity against DNA interstrand crosslinks. *Cytogenet Genome Res.* **Vol.104**:28–34, 2004
7. A., Hatanaka, M., Yamazoe, J. E. Sale, M. Takata, K. Yamamoto, H. Kitao, E. Sonoda, K. Kikuchi, Y. Yonetani, and S. Takeda.: 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. *Mol. Cell. Biol.* **Vol.25**:1124–1134, 2005
8. Hirano, S., Yamamoto, K., Ishiai, M., Yamazoe, M., Seki, M., Matsushita, N., Ohzeki, M., Yamashita, Y.M., Arakawa, H., Buerstedde, J.-M., Enomoto, T., Takeda, S., Thompson, L.H., and Takata, M.: Fanconi anemia pathway regulate redistribution of BLM in response to cross-link DNA damage. *EMBO J.* **Vol.24**:418–427, 2005
9. Ishiai, M., Kimura, M., Namikoshi, K., Yamazoe, M., Yamamoto, K., Arakawa, H., Agematsu, K., Matsushita, N., Takeda, S., Buerstedde, J.-M., and Takata, M.: DNA crosslink repair protein SNM1A interacts with PIAS1 in nuclear focus formation. *Mol. Cell. Biol.* **Vol.25**:34–43, 2005
10. Seo, H., Masuoka, M., Murofushi, H., Takeda, S., Shibata, T. and Ohta, K.: Rapid generation of specific antibodies by enhanced homologous recombination. *Nature Biotech.* **Vol.23**(6):731–735, 2005
11. Okada, T., Sonoda, T., Yoshimura, M., Kawano, Y., Saya, H., Kozaki, M., and Takeda, S.: Multiple roles of vertebrate *REV* genes in DNA repair and recombination. *Mol. Cell. Biol.* **Vol.25**(14):6103–6111, 2005
12. Kikuchi, K., Taniguchi, Y., Hatanaka, A., Sonoda, E., Hohegger, H., Adachi, N., Matsuzaki, Y., Koyama, H., van Gent, D. C., Jasin, M., and Takeda, S. Fen-1 facilitates homologous recombination by removing divergent sequences at DNA break ends. *Mol. Cell. Biol.* **Vol.25**: 6948–6955, 2005
13. Yonetani, Y., Hohegger, H., Sonoda, E., Shinya, S., Yoshikawa, H., Takeda, S., and Yamazoe, M.: Differential and collaborative actions of Rad51 paralog proteins in cellular response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **Vol.33**: 4544–4552, 2005
14. K. Nojima, H. Hohegger, A. Saberi, T. Fukushima, K. Kikuchi, M. Yoshimura, B. Orelli, D. K. Bishop, S. Hirano, M. Ohzeki, M. Ishiai, K. Yamamoto, M. Takata, H. Arakawa, J.-M. Buerstedde, M. Yamazoe, T. Kawamoto, K. Araki, J. A. Takahashi, N. Hashimoto, S. Takeda, and E. Sonoda: Multiple repair pathways mediate tolerance to chemotherapeutic cross-linking agents in vertebrate cells. *Cancer Res.* **in press**
15. Kawamoto, T., Araki, K., Sonoda, E., Yamashita, Y.M., Harada, K.K., Kikuchi, K., Masutani, C., Hanaoka, F., Nozaki, K., Hashimoto, N., and Takeda, S. “Dual Roles for DNA Polymerase h in Homologous DNA Recombination and Translesion DNA Synthesis.” *Mol Cell.* **in press**
16. Xiaohua, W., Takenaka, K., Sonoda, E., Hohegger, H., Kawanishi, S., Kawamoto, T., Takeda, S., and Yamazoe, M. “Critical roles for Pol ζ in Cellular Tolerance to Nitric Oxide induced DNA Damage.” *Cancer Res.* **in press**
17. K. Takenaka, T. Ogi, T. Okada, E. Sonoda, C. Guo, E. C. Friedberg, and S. Takeda Involvement of vertebrate Polkappa in translesion DNA synthesis across DNA monoalkylation damage. *J.Biol.Chem.*, **in press**
18. Rajesh, S., Heddle, J. G., Kurashima-Ito, K., Nietlispach, D., Shirakawa, M., Tame, J. R. & Ito Y: Backbone 1H, 13C, and 15N assignments of a 56 kDa E. coli nickel binding protein NikA. *J. Biomol. NMR* **32**, 177, 2005.

(2)口頭発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

①招待、口頭講演 (国内 29 件、海外 25 件)

②ポスター発表 (国内 50 件、海外 12 件)

【H13 年度】

1. Shunich Takeda: “Eukaryotic Recombination II.” FASEB meeting: “Genetic recombination and chromosome arrangements” Snowmass, USA. July.25. 2001. (*Invited*)
2. Shunich Takeda: “Functional interactions between homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis.” 3R symposium, Miki, Hyogo, Japan. Nov.8. 2001.
3. Sunich Takeda: “DNA double strand break repair and DNA repair.” BBSRC Chicken Genomics and Biology Workshop: Manchester, UK. Dec.15.2001. (*Invited*)
4. Sunich Takeda: “Reverse genetics studies of higher eukaryotic cell.” University of Dundee, Scotland, UK. Dec.17.2001.
5. Akira Shinohara, Miki Shinohara, Kazuko Sakai and Douglas Bishop.: “The roles of Tid1/Rdh54 and Dmcl in crossover control during meiotic recombination” FASEB meeting “Genetic recombination and chromosome arrangements” Snowmass, USA, July 21-26, 2001.
6. 伊藤 隆, Sundaresan Rajesh, 倉島かおり, 吉益雅俊, 相原秀樹, 美川 務, 河野俊之, 横山茂之, 柴田武彦: “NMR を用いた蛋白質間相互作用の解析(YUH1-Ub および RecA-DinI の系)” 第 24 回日本分子生物学会年会 横浜, Dec. 9, 2001.
7. 伊藤 隆: “NMR を用いた蛋白質間相互作用の解析” 大阪大学蛋白質研究所セミナー「NMR による生体内ネットワーク解明の現状と展望」大阪, Jan. 11, 2002.
8. 高見恭成, 中山建男: “DT40 細胞を用いたヒストン修飾酵素群の機能解析.” 第 74 回日本生化学会大会, シンポジウム, ヒストンの化学修飾: クロマチン構造変化と細胞機能制御の分子的基盤, 京都, 2001.
9. 高見恭成, 深川竜郎, Ahmad Ahyar, 池村淑道, 中山建男: “DT40 細胞を用いた CAF-1p48 (RbAp48)の機能解析. 第 18 回染色体ワークショップ, 神奈川, 2001.
10. 篠原彰, 酒井賀津子, 篠原美紀.: “減数分裂期交叉型組み換え形成の制御機構.” 日本分子生物学会年会, 横浜 Dec. 9-12, 2001.

②ポスター発表

1. S. Rajeshu, T. Shibata, E. Laue & Y. Ito: “A simple and inexpensive method for aromatic ring selective protonation”, Second CCPN Weekend Meeting, Homerton College, Cambridge, UK, March 22, 2002.
2. Shinohara M., Bishop, D., and A. Shinohara.: “The roles of Tid1/Rdh54 and Dmcl in crossover control during meiotic recombination” 5th European Meiosis meeting, University of Kent, UK. April 6, 2001.
3. Y. Ito, T. Nishimura, T. Ikeya, B. Smith, R. Fogh, E. Laue and T. Shibata.: “Improvements of an NMR analysis software, ANSIG” 第 1 回日本蛋白質科学会年会, 大阪大学, June 1, 2001.
4. 高見恭成, 永松菜穂子, 中山建男: “DT40 細胞を用いたニワトリ MOZ 及び MORF の機能解析.” 第 74 回日本生化学会大会, 京都, 2001.
5. 高見恭成, 深川竜郎, 中山建男: “DT40 細胞を用いた CAF-1p150 の機能解析.” 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001.
6. Miki Shinohara, Kazuko Sakai, Douglas Bishop and Akira Shinohara.: “Crossover control during meiotic recombination in yeast.” 3R symposium, Miki, Hyogo, Japan. Nov. 6-9.2001.
7. 篠原美紀, 酒井賀津子, 篠原彰: “減数分裂期交叉型組み換え制御のメカニズム.” 日本分子生物学会年会. 横浜. Dec. 8, 2001.
8. 桑原優毅, 篠原美紀, 篠原彰.: “減数分裂期相同組換えにおける新規 DNA 鎖合成に関する複製因子の同定.” 日本分子生物学会年会, 横浜 Dec. 9-12, 2001.
9. 塚本真理子, 篠原美紀, 篠原彰.: “相同組換えによるテロメア長の維持における Rad52 蛋白質の機能.” 日本分子生物学会年会, 横浜 Dec. 9-12, 2001.

10. 宮崎敏子, 篠原美紀, 篠原彰.: “紫外線損傷に誘発される S 期特異的な組み換え蛋白質 Rad51 の局在の解析.” 日本分子生物学会年会, 横浜 Dec. 9-12, 2001.
11. 酒井賀津子, 篠原美紀, 篠原彰.: “RAD17, DDC1, MEC3 の減数分裂期における機能解析.” 日本分子生物学会年会, 横浜 Dec. 9-12, 2001.

【H14 年度】

(2)口頭発表

1. Shunichi Takeda: “Genetic recombination and the maintenance of genome stability”, EMBO Workshop, France, May 30, 2002. (*Invited*)
2. Shunichi Takeda: “Phenotypic Analysis of Pol ζ - Deficient Chick Cell Lines”, DNA Replication and Genome Integrity, Salk Institute, California, Aug 17-21, 2002. (*Invited*)
3. Shunichi Takeda: “Functional interactions between homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis in postreplicative repair”, Mammalian DNA Repair, Four Points Sheraton Ventura, CA January 19-24, 2003. (*Invited*)
4. 伊藤 隆, Nietlispach, D., Laue, E. D., Rajesh, S., 美川 務, 柴田 武彦, “高分子量蛋白質の解析に向けた新しい NMR 測定法の開発”, 第 41 回 NMR 討論会, 東京, 2002 年 11 月
5. 小沼 万里子, 美川 務, 伊藤 隆, 柴田 武彦, “DNA 相同組み換え開始に関与する蛋白質 Mre11 の構造ドメイン解析と各ドメインの機能解析”, ワークショップ DNA Repair, Recombination and Mutagenesis 2003, 兵庫, 2003 年 2 月
6. 本多 賢吉, 石田 麻優子, 伊藤 隆, 美川 務, 柴田 武彦, “高度好熱菌 RecR 蛋白質の機能解析”, ワークショップ DNA Repair, Recombination and Mutagenesis 2003, 兵庫, 2003 年 2 月

②ポスター発表

1. 福島 徹(京都大学・CREST/JST) “DNA 依存性に蛋白質をリン酸化するキナーゼの構成、蛋白質 Ku が後期 S-G2 期における DNA 二本鎖切断修復において制御的に働く役割に関する研究”, DNA Replication and Genome Integrity, California, Aug 17-21, 2002.
2. 園田英一郎: “DNA postreplication repair is essential for maintaining genome stability in vertebrates” 2002 2nd International Symposium on Cancer Research, U.S.A. Oct 12-14, 2002.
3. Kurashima, K., Ito, Y., Shibata, T., Tamura, K., Nakamura, H. and Shiro, Y. “The structure determination of the C-terminal domain of FixJ”, XXth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Toronto, CANADA, Aug. 2002.
4. Honda, M., nishida, K., Mikawa, T., Ito, Y., Waelchili, M. and Shibata, T.: “¹H/¹⁹F-NMR studies of RecA-DNA interactions” XXth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Toronto, CANADA, Aug. 2002.
5. Rajesh, S., Kurashima, K., Kohno, T., Shibata, T., Laue, E. D. and Ito, Y.: “Improved global fold determination of larger proteins using selectively aromatic and methyl protonated samples”, ISGO International Conference on Structural Genomics, Berlin, GERMANY, Oct. 2002.
6. 佐藤 友美, 美川 務, 伊藤 隆, 柴田 武彦 “高度好熱菌 MutM 蛋白質の機能に関する生化学的解析”, 第 75 回日本生化学会大会, 京都, 2002 年 10 月
7. 倉島 かおり, 伊藤 隆, 柴田 武彦, 田村 浩二, 中村 寛夫, 城 宣嗣 “Solution structure of the FixJ C-terminal domain and its interaction with DNA”, 第 41 回 NMR 討論会, 東京, 2002 年 11 月
8. 吉益 雅俊, 伊藤 隆, 本多 賢吉, 石部 聡子, 美川 務, 柴田 武彦, “NMR analysis of the regulation of RecA activity by DinI protein”, 第 41 回 NMR 討論会, 東京, 2002 年 11 月
9. Rajesh, S., 柴田 武彦, 伊藤 隆, “Selective protonation of aromatic rings of Phe, Tyr and

- Trp using shikimic acids, for the improved global fold determination of larger proteins”, 第41回 NMR 討論会, 東京, 2002年11月
10. 菊池秀彦、高見恭成、中山建男:DT40細胞を用いた遺伝子ノックアウト法によるGCN5の機能解析～細胞周期制御異常を中心として～. 第25回日本分子生物学会年会. 2002年12月11日、横浜.
 11. Ahmad, A., Takami, Y. and Nakayama, T.: Generation and analysis of the chicken HIRA-deficient DT40 mutant using the gene targeting technique. 第25回日本分子生物学会年会.2002年12月11日、横浜.
 12. 高見恭成、深川竜郎、実松史幸、中山建男:DT40細胞を用いたCAF-1の機能解析. 第25回日本分子生物学会年会.2002年12月11日、横浜.

【H15年度】

①招待、口頭講演

1. Shunichi Takeda: “Phenotypic analysis of Chick cell lines deficient in Postreplicational repair pathways” The XIX International Congress of Genetics, Melbourne Australia, July 6-11, 2003. (*Invited*)
2. Shunichi Takeda: “PHENOTYPIC ANALYSIS OF CHICK CELL LINES DEFICIENT IN POSTREPLICATIONAL REPAIR PATHWAYS” Genetic Recombination and genome rearrangements 2003 FASEB Summer Research Conference, Snowmass CO USA, July 26-31, 2003. (*Invited*)
3. Shunichi Takeda: “Repair pathway of DSBs induced by ionizing radiation is distinctly different from that of DSBs that arise during DNA replication” 12th International Congress of radiation Research (ICRR 2003), Brisbane Australia, August 17-22, 2003. (*Invited*)
4. Shunichi Takeda: “Repair of Damaged DNA in Vertebrates” HUPO2nd Annual & IUBMB XIX World Congress, Montreal Canada, October 8-11, 2003. (*Invited*)
5. Shunichi Takeda: “The role of DNA repair pathways that are associated with DNA replication in vertebrate cells” Madrid-Juan March Foundation Workshop on Molecular Cross Talk Among Chromosome Fragility Syndrome, Madrid Spain, February 2-4, 2004. (*Invited*)
6. Tomofumi Nakazaki, Yufuko Akamatsu, Hideo Shinagawa, Masaru Ueno, Hiroshi Iwasaki: “Identification of the fission yeast *nbs1*⁺ gene involved in DNA doublestrand break repair” The 21 international conference on yeast genetics and molecular biology, Sweden, July 7-12, 2003.
7. Masayoshi Honda, Mayuko Ishida, Sundaresan Rajesh, Satoko Ishibe, Yutaka Ito, Tsutomu Mikawa, Takehiko Shibata: “Structural and functional analyses of RecR protein” 理研セミナー, 播磨, 2003年8月1日
8. Jin Inoue, Masayoshi Honda, Sundaresan Rajesh, Yutaka Ito, Tsutomu Mikawa, Tsutomu Mikawa, Takehiko Shibata: “NMR analysis of the interactions of thermophilus RecO with RecF pathway proteins” 理研セミナー, 播磨, 2003年8月1日
9. 伊藤隆, Sundaresan Rajesh, 倉島かおり, Daniel Nietlispach, Jonathan Heddlec, Jeremy tame, 白川昌宏: “56kDa 大腸菌 NiKA 蛋白質の NMR 解析” 第42回 NMR 討論会 大阪, 2003年11月27日
10. Fumiya Sanematsu, Yasunari Takami, Tatsuo Nakayama: “Analysis of the chicken Asf1-deficient DT40 cell using the gene targeting technique” 第76回日本生化学会大会, 横浜, 2003年10月18日

②ポスター発表

1. 本多賢吉, 石田麻優子, 井上仁, Sundaresan Rajesh, 美川務, 伊藤 隆, 柴田武彦: “高度好熱菌 RecA 蛋白質の機能解析” 第3回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 2003年6月24日

2. Kaori Kurashima, Yuichi Kasai, Yutaka Ito, Takehiko Shibata, Koji Tamura, Hiro Nakamura, Yoshitsugu Shiro: "NMR studies of the sequence-specific recognition mechanism of C-terminal transcriptional activator domain of FixJ from *Sinorhizobium meliloti*" 第76回日本生化学会大会, 2003年10月16日
3. Yoshitomo Kataoka, Keiko Ohtsubo, Tsutomu Mikawa, Yutaka Ito, Takehiko Shibata: "Analysis of interactions of Mre11 C-terminal domain with its related proteins" 第76回日本生化学会大会, 2003年10月16日
4. Jin Inoue, Masayoshi Honda, Rajesh Sundaresan, Yutaka Ito, Tsutomu Mikawa, Takehiko Shibata: "NMR analysis of interactions of *Thermus thermophilus* RecO with RecF pathway protein" 第76回日本生化学会大会, 2003年10月16日
5. 本多賢吉, 井上仁, Sundaresan Rajesh, 美川務, 伊藤隆, 柴田武彦: "NMRを用いた高度好熱菌 RecR 蛋白質の機能解析" 第42回 NMR 討論会 大阪, 2003年11月27日
6. 倉島かおり, 葛西祐一, 伊藤隆, 柴田武彦, 田村浩二, 中村寛夫, 城宣嗣: "根粒菌 FixJ 蛋白質 C 末端ドメインの DNA との相互作用の解析" 第42回 NMR 討論会 大阪, 2003年11月27日
7. 美川務, 本多賢吉, 伊藤隆, 柴田武彦: "NMR 分光法を用いた RecA による DNA 相同組み換え機構の解析" 第21回染色体ワークショップ 湯河原, 2004年1月30日
8. 本多賢吉, 井上仁, Sundaresan Rajesh, 石部聡子, 美川務, 伊藤隆, 柴田武彦: "相同組み換え活性を調整する RecF, RecO, RecR 蛋白質の構造生物学的解析" 第21回染色体ワークショップ 湯河原, 2004年1月30日
9. 吉益雅俊, 伊藤隆, 石部聡子, 美川務, 伊藤隆, 柴田武彦: "大腸菌の SOS 応答の制御における DinI と ssDNA-RecA 複合体の相互作用解析" 第21回染色体ワークショップ 湯河原, 2004年1月30日
10. Hidehiko Kikuchi, Yasunari Takami and Tatsuo Nakayama: "Functional analysis of the chicken GCN5 family using gene targeting techniques in DT40 cells" 第76回日本生化学会大会, 横浜, 2003年10月18日
11. Yasunari Takami, Tatsuo Fukagawa, Tatsuo Nakayama: "Essential role of the chromatin assembly factor-1 for cell cycle progression in vertebrate cells" 第76回日本生化学会大会, 横浜, 2003年10月18日
12. 高見恭成, 深川竜朗, 中山建男: "高等動物細胞におけるクロマチンアセンブリーファクター1(CAF-1)の機能解析" 第26回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003年12月10日
13. Hirak Kumar Barman, Yasunari Takami and Tatsuo Nakayama: "Vertebrate cells lacking Hat1 are hypersensitive to camptothecin and sensitive to methyl methanesulfonate" 第26回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003年12月10日
14. 実松史幸, 高見恭成, 中山建男: "ジーンノックアウト法を用いたニワトリ Asf1 欠損株の作成と機能解析" 第26回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003年12月10日
15. 菊池秀彦, 高見恭成, 中山建男: "DT40 細胞を用いた遺伝子ノックアウト法による GCN5 の機能解析" 第26回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003年12月10日

【H16 年度】

①招待、口頭講演

1. Koji Kikuchi, Hideki Koyama, Eiichiro Sonoda and Shunichi Takeda: "Involvement of the Fen-1 endonuclease in homologous recombination" EMBO/ SFI Workshop on Mechanisms of Genomic Integrity, Galway, Ireland June 22, 2004.
2. Shunichi Takeda, Mitsuyoshi Yamazoe, Atsushi Hatanaka and Eiichiro Sonoda: "Parallels between Brca2 truncation and Rad51 paralog deficiency in DT40 support an early role for the Rad51 paralogs in homologous recombination" EMBO/ SFI Workshop on Mechanisms of Genomic Integrity, Galway, Ireland June 24, 2004. (*Invited*)
3. G..Zhao, E.Sonoda, S.Takeda: "A Role for Vertebrate Gemma-H2AX in DNA Repair" DNA Repair and Mutagenesis: from molecular Structure to biological Consequence, EMBO Workshop, November 16, 2004. Southampton, Bermuda

4. H. Hochegger and S. Takeda: "A Role for PARP1 in the Control of Double Strand Break Repair" DNA Repair and Mutagenesis: from molecular Structure to biological Consequence, November 16, 2004. Southampton, Bermuda
5. Shunichi Takeda, Mitsuyoshi Yamazoe, Atsushi Hatanaka and Eiichiro Sonoda: "Parallels between BRCA2 truncation and Rad51 paralogs in homologous recombination" DNA Repair and Mutagenesis: from molecular Structure to biological Consequence, Mammalian DNA Repair Meeting, November 17, 2004. (*Invited*) Southampton, Bermuda
6. Tokiha Masuda, Tsutomu Mikawa, Masatoshi Yoshimasu, Feng Ling, Takehiko Shibata and Yutaka Ito: "TRNOE analysis of the single-stranded DNA structure induced by binding of the yeast mitochondrial DNA recombination protein Mhr1p" XXI International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (XXI ICMRBS), Hyderabad, India, January, 2005.
7. Masatoshi Yoshimasu, Tsutomu Mikawa, Nobuhiro Hayashi, Takehiko Shibata, Yutaka Ito: "In-Cell NMR studies of various proteins expressed in E. coli" XXI International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (XXI ICMRBS), Hyderabad, India, January, 2005.
8. Yufuko Akamatsu and Hiroshi Iwasaki: "SWI5-Mediated Recombination Repair in Fission Yeast." 第3回国際分裂酵母会議, 2004年8月24日~29日
9. 園田英一朗, 趙光宇, 香崎正宙, 武田俊一, 高見恭介: "H2AX のリン酸化は相同組換えを介して染色体の安定性を維持する" 組み換えワークショップ, 2004年12月6日
10. 中原真, 竹中克也, 園田英一朗, 武田俊一: "NBS1 遺伝子は細胞レベルの生存に必要である" 組み換えワークショップ, 2004年12月6日
11. 竹中克也, 岡田崇, 園田英一朗, 武田俊一: "誤りがち損傷乗り越え修復酵素 Rev3 と Pol κ の2重破壊株の解析" 組み換えワークショップ, 2004年12月7日
12. 菊池浩二, 武田俊一: "エンドヌクレアーゼ Xpf の相同組換えにおける役割" 組み換えワークショップ, 2004年12月7日
13. 山添光芳, 酒井亘, 畑中敦詞, 米谷泰一, 北尾洋之, 高田穰, 武田俊一: "BRCA2 欠損細胞における相同組み換え能" 第27回日本分子生物学会年会, 2004年12月9日
14. 園田英一朗, 趙光宇, 香崎正宙, 高見恭介, 武田俊一: "動物細胞における染色体維持機構の解析" 第27回日本分子生物学会年会, 2004年12月10日
15. 井上仁, 本多賢吉, 伊藤 隆, 美川務, 柴田武彦: "NMR structural and functional analyses of *Thermus thermophilus* RecO" 高度高熱菌丸ごと一匹プロジェクト第3回連携研究会, Spring-8 普及棟, 播磨, 日本, 2004年8月1日
16. Jin Inoue, Masayoshi Honda, Yutaka Ito, Tsutomu Mikawa, Takehiko Shibata: "Structural and functional analyses of *Thermus thermophilus* RecO" 第77回日本生化学会大会, パシフィコ横浜, 日本, 2004年10月14日
17. 増田ときは, 美川務, 吉益雅俊, 伊藤 隆, 凌楓, 柴田武彦: "酵母ミトコンドリア DNA 相同組換えに関わる Mhr1 タンパク質の機能解析" 第77回日本生化学会大会, パシフィコ横浜, 日本, 2004年10月14日
18. Masayoshi Honda, Jin Inoue, Sundaresan Rajesh, Tsutomu Mikawa, Yutaka Ito, and Takehiko Shibata: "The NMR studies of RecR-DNA interactions" 第77回日本生化学会大会, パシフィコ横浜, 日本, 2004年10月14日
19. Kaori Kurashima, Hiroshi Senbongi, Takehiko Shibata, Yutaka Ito: "NMR analysis of human mitochondrial ABC transporter, ABCB6." 第77回日本生化学会大会, パシフィコ横浜, 日本, 2004年10月14日
20. 吉益雅俊, 美川 務, 片岡義朝, 林 宣宏, 柴田武彦, 伊藤 隆: "In-Cell NMR を用いた細胞内蛋白質動態の直接解析法" 第43回 NMR 討論会, こまばエミナース, 2004年11月10日
21. 吉益雅俊, 美川 務, 林 宣宏, 柴田武彦, 伊藤 隆: "In-Cell NMR 法を用いた細胞内における蛋白質間相互作用の直接観測" 第27回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, 日本, 2004年12月10日

22. 井上 仁, 本多賢吉, 伊藤 隆, 美川 務, 柴田武彦: “相同組換えによる損傷 DNA の修復機構” Workshop: “DNA Repair, Recombination and Mutagenesis 2005” Coop-Inn Kyoto, Japan, 2005 年 1 月 25 日

②ポスター発表

1. Tsutomu Mikawa, Takehiko Shibata and Yutaka Ito: “Analysis of DNA and ATP binding sites in the central domain of RecA using multidimensional NMR spectroscopy” XXI International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (XXI ICMRBS), Hyderabad, India, January 20, 2005.
2. Jin Inoue, Masayoshi Honda, Takehiko Shibata, Yutaka Ito and Tsutomu Mikawa: “Analysis of DNA and ATP binding sites in the central domain of RecA using multidimensional NMR spectroscopy” XXI International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (XXI ICMRBS), Hyderabad, India, January, 2005.
3. Masayoshi Honda, Jin Inoue, Masatoshi Yoshimasu, Tsutomu Mikawa, Takehiko Shibata, Yutaka Ito: “Molecular mechanism of RecR-DNA interactions” XXI International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (XXI ICMRBS), Hyderabad, India, January, 2005.
4. 米谷泰一, 山添光芳, 武田俊一 “Rad51 パラログ分子の遺伝的相互作用の解析” 第 27 回日本分子生物学会年会, 2004 年 12 月 9 日
5. 橋本秀春, 高見恭介, 園田英一朗, 武田俊一, 中山建男, 立花誠, 眞貝洋一 “リンカーヒストン H1 バリエーション間の DNA 損傷に対する感受性の差異” 第 27 回日本分子生物学会年会, 2004 年 12 月 9 日
6. 谷口善仁, 川本卓男, 武田俊一 “53BP1 チェックポイント遺伝子欠損 DT40 ニワトリ B リンパ細胞の作製” 第 27 回日本分子生物学会年会, 2004 年 12 月 9 日
7. 吉益雅俊 “In-Cell NMR を用いた細胞内蛋白質動態の直接解析法” モレキュラー・アンサンブル 2004, 2004 年 11 月 30 日
8. 本多 賢吉, 吉益雅俊, 井上仁, 美川 務, 伊藤 隆, 柴田 武彦: “NMR を用いた RecR と DNA 間の相互作用解” 第 43 回 NMR 討論会, こまばエミナース, 2004 年 11 月 10 日
9. 増田ときは, 美川 務, 吉益雅俊, 凌楓, 柴田武彦, 伊藤 隆 “NMR を用いた RecR と DNA 間の相互作用解析” 第 43 回 NMR 討論会, こまばエミナース, 2004 年 11 月 10 日
10. 井上 仁, 本多 賢吉, 伊藤 隆, 美川 務, 柴田 武彦: “NMR による高度好熱菌 RecO の構造・機能解析” 第 43 回 NMR 討論会, こまばエミナース, 2004 年 11 月 10 日
11. 倉島かおり, 千本木裕, 柴田武彦, 伊藤 隆: “ヒト・ミトコンドリア ABC トランスポーター ABCB6 の NMR 解析” 第 43 回 NMR 討論会, こまばエミナース, 2004 年 11 月 11 日
12. 増田ときは, 吉益雅俊, 美川 務, 伊藤 隆, 凌楓, 柴田武彦: “酵母ミトコンドリア DNA の相同組み換え・複製に働く Mhr1 蛋白質の DNA に対する作用機構の解析” 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, 日本, 2004 年 12 月 9 日
13. Jin Inoue, Masayoshi Honda, Tsutomu Mikawa, Yutaka Ito, Takehiko Shibata: “Functional analyses of *Thermus thermophilus* RecO” 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, 日本, 2004 年 12 月 9 日
14. 神保公大郎, 伊藤 隆, 美川 務, 柴田武彦: “高度好熱菌 RecX の構造機能解析” 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, 日本, 2004 年 12 月 9 日
15. 神保 公大郎, 伊藤 隆, 美川 務, 柴田武彦: “高度好熱菌 RecX の構造機能解析” Workshop: “DNA Repair, Recombination and Mutagenesis 2005” Coop-Inn Kyoto, Japan, 2005 年 1 月 25 日
16. Yasunari Takami, Tatsuo Fukagawa and Tatsuo Nakayama: “Chromatin assembly factor 1-mediated nucleosome assembly, coupled with DNA replication, is essential for cell proliferation in vertebrate cells” 第 77 回日本生化学会大会, 2004 年 10 月 15 日
17. Hidehiko Kikuchi, Yasunari Takami and Tatsuo Nakayama: “Analysis of gene-acetylated histone interactions in the GCN5-deficient DT40 cells by CHIP assay” 第 77 回日本生化学会大会, 2004 年 10 月 15 日

18. Fumiyuki Sanematsu, Yasunari Takami and Tatsuo Nakayama: "Asf1 is essential during S and M phases of cell cycle in DT40 cell" 第 77 回日本生化学会大会, 2004 年 10 月 15 日
19. 高見恭成、柴原慶一、深川竜朗、中山建男: "高等動物細胞におけるクロマチンアセンブリファクター-1(CAF-1)の機能解析" 第 27 回日本分子生物学会年会, 2004 年 12 月 8 日
20. 菊池秀彦、高見恭成、中山建男: "GCN5による細胞周期関連遺伝子発現調節機構の解析" 第 27 回日本分子生物学会年会, 2004 年 12 月 8 日
21. 実松史幸、高見恭成、中山建男: "Asf1 は高等真核細胞の増殖に必須であり、S 期の進行に影響を与える" 第 27 回日本分子生物学会年会, 2004 年 12 月 8 日
22. Hirak Kumar Barman, Yasunari Takami and Tatsuo Nakayama: "The functional linkage between HAT1 and newly synthesized histone H4 in DNA damage repairs in vertebrate cells" 第 27 回日本分子生物学会年会, 2004 年 12 月 8 日

【H17年度】

①招待、口頭講演

1. Shunichi Takeda, Mitsuyoshi Yamazoe, Helfrid Hochegger and Eiichiro Sonoda: "Reverse genetic study of the DNA damage response in the chicken B lymphocyte line DT40" 2005 AACR for Cancer Research 96th Annual Meeting Ahaheim, California, USA, April 20, 2005. (*Invited*)
2. Eiichiro Sonoda, Guang Yu Zhao, Masaoki Kohzaki, Pawan Kumar Dhar, Christophe Redon, Duane R Pilch, William M. Bonner, Atsushi Nakano, Masami Watanabe, Tatsuo Nakayama, Shunichi Takeda and Yasunari Takami: "Phosphorylation of H2AX is indispensable for maintaining genome stability by homologous recombination" The 2005 International Workshop on Ataxia-Telangiectasia, ATM and the Damage Response", Milan, Italy, June 9, 2005. (*Invited*)
3. Shunichi Takeda, Eiichiro Sonoda, Kasumi Araki, Fumio Hanaoka and Takuo Kawamoto: "Rad30 polymerase is involved in homologous recombination mediated Ig V diversification as well as in Ig V hypermutation in chicken B lymphocytes" 2005 FASEB Summer Research Conference, Denver, USA, July 24, 2005. (*Invited*)
4. Helfrid Hochegger, Donniphat Desjuphong, Toru Fukushima, Ciaran Morrison, Eiichiro Sonoda, Valerie Schreiber, Guang Yu Zhao, Alihossein Saberi, Mitsuko Masutani, Gilbert de Murcia and Shunichi Takeda: "Ku interferes with homologous recombination in DT40 cells lacking PARP-1" PARP 2005 Workshop, New Castle Upon Tyne, UK, October 6, 2005. (*Invited*)
5. 井上 仁, 本多賢吉, 伊藤 隆, 柴田武彦, 美川務: "高度好熱菌RecOの機能解析" 理研シンポジウム 高度好熱菌 丸ごと一匹 プロジェクト 第4回 連携研究会 2005年8月5日(金) ~ 8月7日(日)
6. 本多賢吉, 井上 仁, 伊藤 隆, 柴田武彦, 美川 務: "高度好熱菌RecR蛋白質の構造機能解析" 理研シンポジウム 高度好熱菌 丸ごと一匹 プロジェクト 第4回 連携研究会 2005年8月5日(金) ~ 8月7日(日)

②ポスター発表

1. Kaori Kurashima-Ito, Teppei Ikeya, Hiroshi Senbongi, Tsutomu Mikawa, Takehiko Shibata & Yutaka Ito "Characterisation of the Nucleotide-Binding Domain of the Human Mitochondrial ABC Transporter ABCB6 by Heteronuclear Multidimensional NMR" EUROMAR 2005 / EENC 2005, Veldhoven, The Netherland, 3-8 July 2005.
2. Masatoshi Yoshimasu, Tsutomu Mikawa, Nobuhiro Hayashi, Takehiko Shibata & Yutaka Ito "In-Cell NMR studies of calmodulin protein expressed in E. coli" EUROMAR 2005 / EENC 2005, Veldhoven, The Netherland, 3-8 July 2005.

(3)特許出願 (海外1件)

発明の名称：Msthod for Generating Diversity

発明者：Neuberger MS., Sale JE., Cumbers SJ., Takeda S.

出願番号：PCT/GB02/02688

出願日：2002年5月15日（米国）

出願人：Neuberger MS.

(4)受賞等

①受賞 日本遺伝学会奨励賞 (岩崎 博史) 平成13年9月

②新聞報道等

1. プレス発表

1) 武田 俊一, “ケンブリッジ大学の Michael S. Neuberger 教授と共同研究し nature 誌に掲載 (Ablation of XRCC2/3 transforms immunoglobulin V gene conversion into somatic hypermutation) に関するプレス会見を行う。記者会見・文部科学省 東京, Aug. 28. 2001.

2. 新聞報道

1) 平成16年5月14日発行の科学新聞で「乳ガン治療薬タモキシフェン：ガン誘発機構を解明」と題して。武田グループのタモキシフェンと損傷乗り越え DNA ポリメラーゼに関する Cancer Research 誌の論文を紹介する記事が掲載された。

2) 平成16年5月2日発行の読売新聞朝刊で「乳がん治療薬タモキシフェン：DNAを損傷」と題して。武田グループのタモキシフェンと損傷乗り越え DNA ポリメラーゼに関する Cancer Research 誌の論文を紹介する記事が掲載された。

3) 平成16年5月14日発行の毎日新聞朝刊で「乳がん治療薬がガン誘発の仕組み：DNA損傷修復で変異」と題して。武田グループのタモキシフェンと損傷乗り越え DNA ポリメラーゼに関する Cancer Research 誌の論文を紹介する記事が掲載された。

4) 平成16年5月14日発行の京都新聞朝刊で「乳がん治療薬が子宮がん誘発：副作用の過程解明」と題して。武田グループのタモキシフェンと損傷乗り越え DNA ポリメラーゼに関する Cancer Research 誌の論文を紹介する記事が掲載された。

6 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等 なし

(2) 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Helfrid Hohegger (ICRFClare Hall Laboratories, Researcher)	DT40細胞に関する 研究	京都大学大学院・医学研究 科・放射線遺伝学教室	H13. 6. 13. ～6. 18.
Martin Gellert (NIH, Professor)	研究打合わせ及び 学会での講演	京都大学大学院・医学研究 科・放射線遺伝学教室／兵 庫県三木市	H13. 12. 12. ～12. 14.
Benoit Arcangioli (Pasteur Institute, Professor)	研究打合わせ及び 学会での講演	京都大学大学院・医学研究 科・放射線遺伝学教室／兵 庫県三木市	H13. 12. 12. ～12. 14.
Rodney Rothstein (Columbia University, Professor)	研究打合わせ	京都大学大学院・医学研究 科・放射線遺伝学教室	H13. 12. 12. ～12. 14.
Patrick Alexis Christian Danoy (Centre National de Genotypage, Researcher)	DT40細胞の解析に 関する研究	京都大学大学院・医学研究 科・放射線遺伝学教室	H14. 5. 12. ～6. 8.

7. 結び

我々が開始した DT40 を使ったゲノム研究は、イギリスでも発展している。彼等は、小さいコミュニティーであるので互いに顔見知りであり、他の実験系よりも試料や情報をオープンに交換することで短期間のうちに研究レベルを劇的に向上させた。その結果、多数の論文をトップクラスの雑誌に発表できるようになった。研究分野を決めた後、その分野の遺伝子破壊株全部を作製する研究方法がいかに有効であるかを、DT40 細胞の研究者は実感することができた。今後、この動物細胞を使った遺伝学的研究は酵母の研究レベルにも到達できるであろう。

DT40 を使った遺伝学的手法を駆使した実験法は、今後、2つの方向で DT40 の枠を超えて発展するであろう。1つは、ヒト細胞株の遺伝子破壊系であり、もう1つはメダカの実験系である。メダカを利用して、我々が扱えなかった臓器特異的な DNA 組み換え機構を研究することができる。この研究は安全な遺伝子治療法開発に貢献できるであろう。我々は世界に先駆けてメダカで遺伝子破壊に本年度に成功した。一方ヒト細胞株の遺伝子破壊系の有効性は議論するまでもない。我々も DT40 の実験結果の再現性をチェックするために、使うようになった。以上のように、DT40 から開始された網羅的な遺伝学的手法による研究は、多くの国際共同研究として展開しつつあり、かつ網羅的な遺伝学的手法のコンセプトは他のモデル実験系にも応用されつつある。

「戦略的創造研究推進事業チーム型研究」の「ゲノムの構造と機能」領域の運営は、円滑かつ効果的で優れた組織であった。人件費について自由度が大きく、様々な職種のスタッフを、必要に応じて適宜雇用でき、大いに戦力となった。とくに実験補助員が非常に質の高い仕事ぶりでスタッフを助けた。また、我々も5年間のプロジェクト研究の運営方法について学ぶことができた。「戦略的創造研究推進事業チーム型研究」は、今後も40歳前後の若手に時限付きの大きなチャンスを与えることで、彼等を責任ある研究グループリーダーとして育てることができるであろう。最後に、研究を総括されている大石道夫(財)かずさDNA研究所所長および牧口技術参事をはじめとするゲノム事務所の皆様、そして(独)科学技術振興機構に、心より感謝の意を表する次第である。



写真：ラボのメンバー（武田グループ）の集合写真