

動物細胞で標的組み換え効率を上昇させる
方法の開発

(課題番号 13557010)

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金

[(基盤研究B2)] 研究成果報告書

京都大学図書



9810058513

附属図書館

平成15年3月

研究代表者 武田俊一

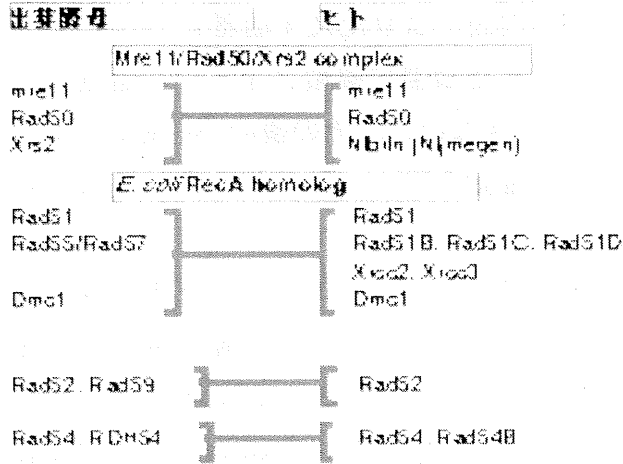
(京都大学大学院医学研究科 教授)

は し が き

生体内では、種々の内的および外的要因によりたえず塩基レベルの DNA 損傷が大量に発生する。未修復のまま残った損傷に複製フォークが遭遇すると、複製が停止しうる。DNA 複製が完了できないと、その後の M 期での染色体の凝縮と分配が正常に起こらないので、細胞にとって致死である。複製が停止した場合におこるトラブルは、複製後修復経路によってプロセスされ、複製が再開される。複製後修復経路に関与する遺伝子は、酵母からヒトまで保存されている(図1、相同組み換えの例)。酵母のミュータントの解析から、主要な複製後修復には、(A)損傷乗り越え DNA 合成 (Translesion DNA synthesis = TLS) と(B)相同 DNA 組換え (Homologous DNA recombination = HR、複製が停止した姉妹染色分体が複製を継続している姉妹染色分体と組み換えすることによって複製停止から回復)とがあることがわかっている(図2)。(A)TLS に関与すると考えられる DNA ポリメラーゼ (TLS DNA ポリメラーゼ) のヒトホモログ遺伝子が最近4年間に8種類も見つかった。高等真核細胞における複製後修復の役割は、これらに関与する遺伝子の多くがその欠損によりマウスで胎生致死になるので、よくわかっていない。

我々は、動物細胞で唯一、標的組み換えがランダムインテグレーションと同効率で起るニワトリ B リンパ細胞株 DT40 を使って、(A)TLS と(B)HR の欠損株を系統的に作製、解析してきた。そして、HR と TLS は、互いにオーバーラップしながら、大量に発生している複製ブロックから回復するのに必須の働きをすることを解明した。そして HR と TLS は、各細胞で1サイクル毎に少なくとも数十回は修復反応に参加しているらしい。我々は、このように恒常的に機能している HR による修復反応が、標的組み換えに関与すると考え、現在さらに研究を進めている。

図1

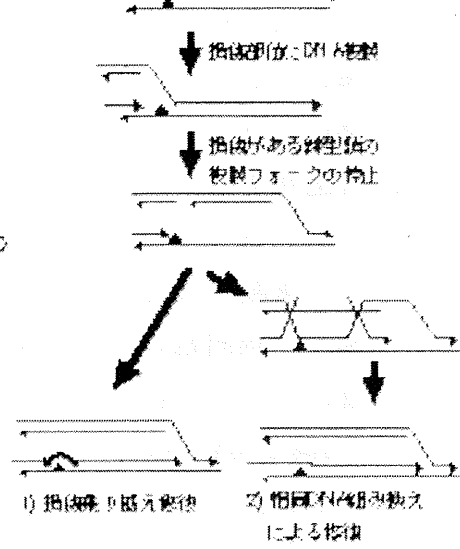


相同組み換えに際する遺伝子の一次構造は、酵母からヒトまで保存されている。

酵母では存在しない遺伝子

Bica1, Bica2
Fanc genes

図2 複製の損傷



目 次

は し が き

1.	研究課題	4
2.	研究組織	4
3.	研究経費	4
4.	研究発表	4
4-1.	成果の概要	5
4-2.	研究成果の発表【論文発表】	9
4-3.	研究成果の発表【学会発表】	11
4-4.	研究成果の発表【国際学会での口頭発表】	11
5.	主要論文	13

1. 研究課題名

動物細胞で標的組み換え効率を上昇させる方法の開発

研究課題番号 13557010

研究期間 平成13年度 ~ 平成14年度

領域又細目 605

整理番号 9003

2. 研究組織

研究代表者 武田 俊一 (京都大学・医学研究科・教授)

研究分担者 園田 英一朗 (京都大学・医学研究科・助教授)

研究分担者 山添 光芳 (京都大学・医学研究科・助手)

研究分担者 藤原 大介 (キリンビール株式会社・

基盤技術研究所)

3. 研究経費

平成13年度 8,000千円

平成14年度 5,800千円

合計 13,800千円

4. 研究成果

4-1. 成果の概要

◆目的

① 本申請書の研究目的は、動物細胞で増殖中に起こる多数のゲノム DNA 損傷とその修復システムについて様々な DNA 修復経路の変異クローンを作成することによって解明することにある。この目的のために、標的組み換え効率が高いため動物細胞で唯一系統的な遺伝学的解析が可能なニワトリ B リンパ細胞株、DT40 を使い、系統的に遺伝子ノックアウト細胞を作製する。

② 相同 DNA 組み換えは、DNA 損傷修復システムの1つの経路である。この相同 DNA 組み換えを特に重点的に解析することにより、ニワトリ B リンパ細胞株でなぜ高効率に標的組み換えが起こるかを解明する。

◆方法

- (1) DNA 修復経路に關与する遺伝子の欠損クローンを作製する。
- (2) DNA 修復経路の2重/3重欠損株の作成
- (3) 温度感受性株の作製

◆実験結果

- (1), (2) DNA 修復経路に關与する遺伝子の欠損クローンを作製

これまで作製もしくは収集(*)した遺伝子ノックアウトクローンは以下の通りである。

- (A) 相同 DNA 組み換え : Rad51、Rad52、Rad52/XRCC3 2重欠損、Rad54、Rad54B、Rad54/Rad54B 2重欠損、Rad51B、rad51C、rad51D、XRCC2、XRCC3、Mre11、Rad50
- (B) 相同 DNA 組み換えに間接的に關与するファンconi遺伝子群:FANCD2*、FANCC*、FANCG*
- (C) RecQ ヘリカーゼ : Blm*、Wer*、Blm/Wer 2重欠損*
- (D) 非相同末端結合 : Ku70、DNA-Pkcs、Ku70/DNA-Pkcs 2重欠損、Ligase IV*
- (E) 2重鎖 DNA 切断の修復経路 (非相同末端結合および相同 DNA 組み換え)

を制御 : Poly [ADP ribose]polymerase

- (F) DNA 修復に関与する DNA ポリメラーゼとその制御因子 : pol λ^* 、pol β^* 、pol κ 、pol ζ 、pol κ /pol ζ 2 重欠損、Rad18、Rad18/Rad54 2 重欠損
- (G) ヌクレオチド除去修復 : XPA、XPG
- (H) 損傷チェックポイント : Atm * 、Nbs1 * (相同 DNA 組み換えにも関与)
- (I) クロマチン構成タンパク : ヒストン H2AX、コヘーシン (Rad21、2 本の姉妹染色分体を M 期アナフェーズの直前まで合着する

(3) 温度感受性株の作製

ニワトリは体温が高く、DT40 細胞も至適培養温度が、40 ° C と哺乳動物細胞に比べて相当高い。しかも 44 ° C まで長期間に生存率を下げることも無く培養可能であるので、DT40 は温度感受性株の作製に有利なはずである。我々は、その作用機序が明確な温度感受性遺伝子を人工的にデザインすることを目標に実験を行った。

構造解析が終了したタンパクのなかで Mre11/Rad50/Nbs1 コンプレックスについて、サンジエゴの J. Tainer 博士と共同して温度感受性遺伝子のデザインを試みた。コンプレックスを構成する各タンパク (Mre11/Rad50/Nbs1) のタンパク相互作用インターフェースに変異を導入した。しかし現在のところ、温度感受性を示す変異を Mre11 と Rad50 の遺伝子から作製することができなかった。

◆研究成果

(1) 遺伝子欠損株の致死性

以下のミュータントは細胞レベルで致死であった。

Rad51、Mre11、Rad50

(2) 遺伝子 2 重欠損株の致死性

以下のミュータントは、2 重欠損株にしたときのみ細胞レベルで致死であった。ゆえに、2 重欠損にした各遺伝子にコードされたタンパクが互いに相補しながら染色体の構造維持に重要な働きをすると結論できる。

Rad52/XRCC3 2 重欠損 (論文 2)、Rad18/Rad54 2 重欠損 (論文

16)、pol ζ /Rad54 2重欠損 (論文17)

Rad18 と pol ζ は、損傷乗り越え DNA 合成 (TLS) に関与するのに対して、Rad54 は相同組み換え (HR) に関与する。Rad18 と Rad54 の単独欠損は個体レベル (ノックアウトマウス) で生存可能であるのに対して、その2重欠損では細胞レベルで致死であることから、TLS と HR とは、DNA 複製時に生じた損傷の修復に対して互いに相補でき、単独欠損ではほとんど異常が出現しないと結論できる。

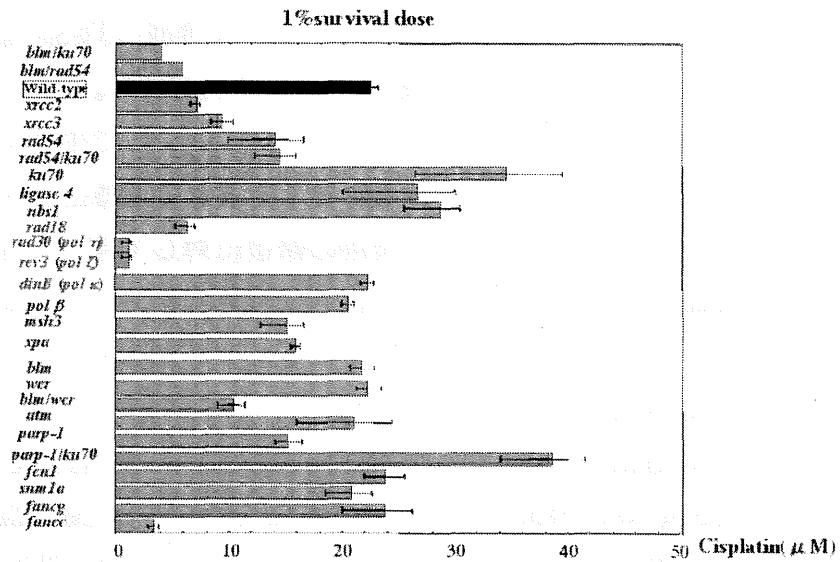
(3) 標的組み換えに関与する遺伝子

以下の遺伝子欠損株が、標的組み換え効率を低下させることがわかった。Rad54、Rad54B、Rad51B、rad51C、rad51D、XRCC2、XRCC3、FANCG pol ζ 、Rad18、Poly [ADP ribose]polymerase
ただし、これらのタンパク分子は、DT40 と標的組み換え効率の高くない他のニワトリ細胞株とのあいだで差違が認められない。

(4) シスプラチン感受性の比較

DT40 は、きわめて安定な表現型を示す。したがって、遺伝子ノックアウトをするときに親株として適している。我々は、抗癌剤 (シスプラチン) に対する感受性をコロニー形成率で比較した。下のグラフは、シスプラチン無処理の場合 (100%) に比べてコロニー形成率を1%にまで低下させるシスプラチン1時間処理の濃度をヒストグラムで示した (図3)。このように薬剤の作用機序を網羅的に解析できるのは、現在のところ、DT40 のみであり、DT40 が遺伝薬理的解析に有用な系であることがわかる。

図 3



◆将来の研究方針

- (1) 新たに遺伝子ノックアウト細胞を作製すべき、相同組み換えに直接もしくは間接的に関与する可能性のある遺伝子

相同 DNA 組み換えに直接に関与する : Brca1 (家族性乳癌の原因になる癌抑制遺伝子の1つ、相同組み換え、損傷チェックポイント、染色体ポジション効果などの様々な機能をもつ)、 Brca2 (家族性乳癌の原因になる癌抑制抑制遺伝子の1つ)

相同 DNA 組み換えに関与する可能性のある酵母遺伝子のニワトリホモログ : Swi5、Fbh1

DNA ポリメラーゼ : polθ

染色体 DNA 損傷が発生後、数分以内に活性化されるチェックポイント分子 : 53BP1、Mre11 結合タンパク

- (2) プロテオノミックスによる新規遺伝子の同定

ニワトリゲノムの解析が今年中に終了する。また、ニワトリ EST データベースも充実してきたので、ニワトリ細胞でもプロテオノミックスが可能になった。我々が解析した分子のなかには、遺伝子ノックアウトしたときに、DT40 とマウス細胞とで定量的に必ずしも同じ表現型を示さない場合がある。そのような遺伝子にコードされたタンパクと

結合する分子（共沈する分子）を同定して、その遺伝子をソックアウトした細胞を作製することによって、ニワトリ B リンパ細胞に特異的に機能している相同組み換え因子を同定する。

4-2. 研究成果の発表 【 論文発表 】

1. M. Takata, M. S. Sasaki, S. Tachiiri, T. Fukushima, E. Sonoda, D. Schild, L. H. Thompson, and S. Takeda. “Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs.” *Mol. Cell. Biol.* **21**: 2858-2866 (2001).
2. A. Fujimori, S. Tachiiri, E. Sonoda, L. H. Thompson, P. K. Dhar, M. Hiraoka, S. Takeda, Y. Zhang, M. Reth, and M. Takata. “Rad2 partially substitutes for the Rad51 paralog XRCC3 in maintaining chromosomal integrity in vertebrate cells.” *EMBO J.* **20**: 5513-5520 (2001).
3. Sale, J. E., Calandrini, D. M., Takata, M., Takeda, S., and Neuberger, M. S. “Ablation of XRCC2/3 transforms immunoglobulin V gene conversion into somatic hypermutation.” *Nature* **412**: 921-926 (2001).
4. 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 (2001).
5. Sonoda E, Morrison C, Yamashita Y M, Takata M, Takeda S. “Reverse genetic studies of homologous DNA recombination using the chicken B-lymphocyte line, DT40.” *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **356**: 111-117 (2001).
6. Kurumizaka H, Ikawa S, Nakada M, Eda K, Kagawa W, Takata M, Takeda S, Yokoyama S, Shibata T. “Homologous-pairing activity of the human DNA-repair proteins, Xrcc3/Rad51C.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 5538-5543 (2001).
7. Utsumi H, Tano K, Takata M, Takeda S, Elkind MM. “Requirement for repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination in split-dose recovery.” *Radiation Research* **155**: 680-686 (2001).
8. Wang H, Zeng ZC, Bui TA, Sonoda E, Takata M, Takeda S, Iliakis G. “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).
9. Fukushima T, Takata M, Morrison C, Araki R, Fujimori A, Abe M, Tatsumi K, Jasin M, Dhar PK, Sonoda E, Chiba T, Takeda S. “Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair.” *J. Biol. Chem.* **276**: 44413-44418 (2001).
 10. 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).
 11. S. J. Cumbers, G. T. Williams, S. L. Davies, R. L. Grenfell, S. Takeda, F. D. Batista, J. E. Sale, M. S. Neuberger. “Generation and iterative affinity maturation of antibodies in vitro using hypermutating B-cell lines.” *Nature Biotechnology* **20**: 1129-1134 (2002).
 12. Wei C, Skopp R, Takata M, Takeda S, Price CM. “Effects of double-strand break repair proteins on vertebrate telomere structure.” *Nucleic Acids Res.* **30**: 2862-2870 (2002).
 13. Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, van Gent DC, Shiraishi T, Verkaik NS, vanHeems D, Ito E, Nakamura A, Sonoda E, Takata M, Takeda S, Matsuura S, Komatsu K. “Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells.” *Nature* **420**: 93-98 (2002).
 14. Okada T, Sonoda E, Yamashita YM, Koyoshi S, Tateishi S, Yamaizumi M, Takata M, Ogawa O, Takeda S. “Involvement of vertebrate polkappa in Rad18-independent postreplication repair of UV damage.” *J. Biol. Chem.* **277**: 48690-48695 (2002).
 15. Osamu Imamura, kumiko fujita, Chie Itoh, Shunichi Takeda, Yasuhiro Furuichi and Takehisa Matsumoto. “Werner and Bloom helicases are involved in DNA repair in a complementary fashion” *Oncogene* **21**: 954-963 (2002).
 16. Yamashita, Y. M., Okada, T., Matsusaka, T, Sonoda, E., Cho, Z., Araki, K., Tateishi, S., Yamaizumi, M., and Takeda, S. “RAD18 and RAD54 cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells.” *EMBO J. Vol.21*: 5558-5566 (2002)
 17. 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* 11:1109-1117(2003)

18. 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 polz in maintaining genome stability in vertebrate ” *EMBO J. in press*(2003).

4-3. 研究成果の発表 【 学会発表 】

武田俊一、園田英一郎、高田 穰、藤森 亮：ニワトリDT40細胞を使った損傷乗り越え修復に關与する新規DNAポリメラーゼ群の機能解析。第60回日本癌学会総会 ～シンポジウム～「ゲノム不安定化の分子機構」, 2001年9月26日～28日, 横浜。(招待講演)

高田 穰、立入誠司、藤森 亮、三木義男、武田俊一：ニワトリ BRCA2の全長クローニング種を越えて保存された領域/モチーフの解析。第60回日本癌学会総会, 2001年9月26日～28日, 横浜。

武田俊一：動物細胞株を使った逆遺傳的アプローチ。日本分子生物学会 第2回シンポジウム, 2002年5月27日～31日, 広島。

武田俊一：致死的變異の表現型解析の方法。哺乳類動物遺傳学研究会, 2002年6月27日, 北海道。

武田俊一、園田英一郎、山添光芳、高田穰：DNA複製時に生じた損傷を修復する2種類の経路：相同DNA組み換えと損傷乗り越え修復の、ニワトリBリンパ細胞株による機能解析。第61回日本癌学会総会, 2002年10月1日～3日, 東京。

4-4. 研究成果の発表 【 国際会議 (予定をふくむ)】

Shunich Takeda : EMBO WORKSHOP ON GENETIC RECOMBINATION.

Domaine de Seillac, France, May 27–31, 2002 .

Shunich Takeda : THE WORKSHOP ON EXPERIMENTAL MODELS FROM THE BURSA OF FABRICIUS. The Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA , October 4–6, 2002 .

Shunich Takeda : DNA RECOMBINATION AND REPAIR. The Banbury Center, Cold spring Harbor Laboratory, New York, USA, October 20–23, 2002 .

Shunich Takeda : GORDON CONFERENCE, MAMMALIAN DNA REPAIR, Ventura, Canada, January 19–24, 2003 .

Shunich Takeda : FASEB MEETING, GENETIC RECOMBINATION AND CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS, Colorado ,USA, July 26–31, 2003 .

Shunich Takeda : INTERNATIONAL CONGRESS OF BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, Toronto, Canada, July 20–24, 2003 . (招待講演)

Shunich Takeda : THE XIX INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICS. Melbourne, Australia, July 6–11, 2003 . (招待講演)

Shunich Takeda : THE INTERNATIONAL CONGRESS FOR RADIATION RESEARCH (ICRR 2003). Brisbane, Australia, August 17–22, 2003 . (招待講演)

Shunich Takeda : THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY CONFERENCE, DNA REPAIR AND MUTAGENESIS. Bermuda Island, December 7–13, 2003 .