

「ゲノムの構造と機能」
平成10年度採択研究代表者

柴田 武彦

(理化学研究所 主任研究員)

「組換えを介したゲノム動態制御」

1. 研究実施の概要

詳細な解析が進んだ結果、ゲノムは動的な存在であることが明らかになった。この事実は、老化、ガン化、遺伝疾患にも深く関わる。更に、遺伝の基本的な機構そのものについても再検討が必要になった。組換えを介したゲノム動態の機構と制御の理解は、新ゲノム制御技術の素材と結果予測・安全評価の理論基盤を提供すると期待できる。本研究では、組換えを介したゲノム動態制御について、遺伝子・分子機能から染色体・細胞の挙動までの総合的な理解と、高等動物での普遍性の検証、新技術の基盤構築を目指す。提案者らが明らかにした酵母からヒトまで保存されている組換え蛋白質群・染色体の挙動・分子反応・酵母変異体の表現型を手がかりに、また、例外的な高頻度で標的組換えをする鳥類DT40細胞を検証系として、(1)DNA鎖切断導入・修復、ゲノム流動化制御遺伝子、(2)染色体レベルのゲノム流動性・恒常性制御、(3)動物細胞株でのゲノム改変技術の研究を行う。平成11年度の研究により、組換えの制御で重要な機能をもつMre11蛋白の分子機能と細胞期のいずれについても理解が一步進んだ。更に、高等動物では通常の増殖においても組換え修復への依存度が酵母よりも大きいことも明らかになってきた。また、ヒトRad51 (RecA蛋白) 関連蛋白質の解析、ヒトRad52蛋白の研究から、高等動物では、相同的対合活性をもつ蛋白質(蛋白質複合体)が複数存在し、しかも正常な生命活動のためには全てが必要であることが明らかになってきた(酵母では、相同的対合活性はRad51蛋白についてしか確認されていない)。更に、組換えの開始制御が、ストレス応答MAPキナーゼ経路、環状AMP依存性キナーゼ経路、接合型フェロモン応答シグナル伝達経路の下流で、クロマチン構造を開閉する形で制御されていることを明らかにした。

2. 研究実施内容

【背景】

詳細な解析が進んだ結果、ゲノムは動的な存在であることが明らかになった。酸素呼吸の副作用であるDNA酸化損傷、DNA複製の異常等が原因で、生命活動の過程でDNA鎖切断は避けられない。特に二本鎖切断の修復(組換え修復)

でおこる誤りがゲノムの流動化を招くと考えられている。そこで、進化のレベルでしか変化が見えない遺伝の基本機構について再検討が必要になった。一方、発ガン、遺伝疾患 (Nijmegen breakage syndrome、ataxia telangiectasia、Bloom's syndrome、Werner's syndrome 等)、加齢に伴うゲノムDNAへの変性の蓄積はゲノムの動的性質が深く関わりと考えられるが、これらに対する予防と治療には、ゲノムの動的性質とそれを支配する機構についての理解が必要である。更に、ゲノム制御技術における課題として、標的組換え効率、組込みコピー数制御、導入遺伝子の安定性、高等動物細胞の株化に伴うゲノムの再編成といった問題への対策が待たれている。結果予測・制御可能なゲノム改変技術の開発や、遺伝子の未知機能を明らかにする最も有効な手段である普遍的な逆遺伝学手法の開発も待たれている。組換えは、DNA鎖切断により誘導され、切断の修復でも重要な位置を占めると考えられている。組換えは、DNAの再編成でゲノム流動化に、また、非自己DNA・変異の排除の機構としてゲノムの恒常性維持にも働く。こうした課題に対してゲノム動的性質を支配する二本鎖切断、組換えの制御機構の解明が必要であり、また有効である。近年、核染色体の組換え制御についての理解の急速な進展があり、生体が持つ二本鎖切断、組換えの制御機構を利用した技術が現実の目標になり、それを巡る国際競争の兆しも見えてきた。

一方、組換えシステムは、生物種間で高度に保存されており (図1)、その機能構造、挙動の解析は真核生物のゲノム動態制御解明の大きな突破口である。提案者らは、組換えの制御で染色体構造の挙動が大きな機能を果たすこと、及び、酵母からヒトまで組換え蛋白質群・染色体の挙動・分子反応が保存されていることを明らかにしている他、高等動物での普遍性の検証、新技術の基盤構築に有効な例外的な高頻度で標的組換えをする鳥類DT40細胞を用いた検証系を開発したという実績をもつ。

【研究の概要】

本研究では、ゲノムを変化させる一方逆に変異を取り除く組換えを介したゲノム動態制御について、遺伝子・分子機能から染色体・細胞の挙動までの総合的な理解と、高等動物での普遍性の検証、新技術の基盤構築を目指す。そこで、以下の課題について研究を行う。

- (1) DNA鎖切断導入・修復、ゲノム流動化制御遺伝子の研究：酵母で遺伝子の単離を行い、それを手がかりにヒトホモログの同定する。
- (2) 染色体レベルのゲノム流動性・恒常性制御の研究：組換えを特にクロマチンレベルを中心に解析する。
- (3) 動物細胞株でのゲノム改変技術の研究：組換え関連因子・酵素のヒトホモログを鳥の高頻度標的組換えDT40細胞へ導入し、その解析から高等動物ゲノム改

変技術の構築を目指す。

【本研究課題の特徴】

本研究課題の特徴として以下の諸点があげられる。(1) クロマチンレベルでの制御を中心に置く、(2) 生体が普遍的に持つ相同組換え機能を利用した高等動物のゲノム改変新技術の開拓を目指す、(3) ヒト組換え関連蛋白・因子の機能を高等動物細胞DT40を用いてin vivoで検証する、(4) 本課題のかぎとなるRecA蛋白による相同的対合反応(柴田)、真核生物のRecAホモログ(Rad51蛋白(小川))、減数分裂期相同組換え開始と体細胞増殖期の二本鎖切断修復の要に働くMRE11遺伝子(小川)、組換え頻発部位(ホットスポット)における染色体構造の挙動(太田)、高頻度標的組換えDT40細胞(武田)は全て提案者グループのオリジナルである、(5) 蛋白立体構造解析の専門家を内部に持ち、変異体取得=>遺伝子解析=>蛋白構造・分子機能=>細胞内部構造・生理の一貫した解析による分子構造を基礎にした展開と理解を図る。

【平成11年度の成果】

ゲノム動態に働く遺伝子、蛋白質

- (1) Exo1遺伝子はDNA二本鎖切断修復と減数分裂期組換えに必須機能を果たす(小川 他) Mre11遺伝子はDNA二本鎖切断修復と、減数分裂期組換えに必須である。それがコードするMre11蛋白はDNA二本鎖切断修復に働くヌクレアーゼ活性(一本鎖DNAへ働くエンドヌクレアーゼ活性、二本鎖DNAに働く5'→3'エキソヌクレアーゼ活性)を持つ。出芽酵母mre11変異体のDNA二本鎖切断修復欠損は、二本鎖DNAによりよく働き、5'→3'の方向にDNA鎖を削るExonuclease IをコードするExo1遺伝子を多コピー持たせると相補されることを見出した。このことは、DNA二本鎖切断修復には、Mre11蛋白のエキソヌクレアーゼ活性が働いていることを示す。更に、exo1欠損体は減数分裂において、交叉型の組換え体の出現頻度のみ下げることから、遺伝子変換型組換え体、交叉型組換え体の出現は単にHolliday中間体の解離の仕方のみによって決まるのではなく、中間体形成時に既に決められている可能性を示唆する。
- (2) Mre11蛋白に対する細胞周期チェックポイント制御(小川 他) 体細胞分裂時に二本鎖DNA切断が起こると、Mre11蛋白は、Tel1によってリン酸化されること、このリン酸化が起こらないとDNA二本鎖切断修復能が低下することが明らかになった。

【組換え制御に働く染色体構造動態】

- (1) Mre11蛋白によるテロメア長の制御
Mre11蛋白の野生型蛋白質、ヌクレアーゼドメインやC末端DNA結合ドメインに欠損を有する変異型蛋白質を、野生型の酵母株で過剰発現することにより、

テロメア長の長さを人為的に制御する方法を見出した (図 2; 特許出願中)。すなわち、野生型蛋白質、ヌクレアーゼドメインに変異をもつ蛋白質を過剰発現したときには、テロメア長の短縮が起こる。また、テロメア長への効果を別にする、過剰発現した野生型Mre11蛋白質の組換えやDNA修復に対する阻害効果は減数分裂期にのみ認められることを示した。この結果は、Mre11蛋白質が染色体の標的部位に相互作用する様式に、有糸分裂型と減数分裂期型の少なくとも2種類が存在することを意味する。また、Mre11蛋白質の一部の活性を人為的に制御することにより、染色体組換えや修復に影響を与えずにテロメア長のみを短縮・伸長させることが可能であることが初めて示された。現在ヒトMre11でも同様な現象が見られるかについて検討を進めている。

(2) 分裂酵母で減数分裂期組換え開始制御

分裂酵母の減数分裂に特異的に活性化される組換えホットスポットade6M26において、分裂酵母の性分化に関わるCREB/ATF型転写因子が直接的にクロマチン再編成を誘導することを示した。また、このクロマチン再編成が性分化を誘起するシグナル伝達経路(ストレス応答MAPキナーゼ経路、環状AMP依存性キナーゼ経路、接合型フェロモン応答シグナル伝達経路)によって複合的に制御されていることを示した (図 3)。これらの結果は、転写因子による組換えホットスポットの活性化メカニズムに重要な知見を与えると共に、クロマチン再編成のシグナル伝達経路による制御の可能性を初めて示したものである。

【組換えとその制御に働く分子機構】

(1) ヒトXrcc3蛋白質とRad51C蛋白質との複合体の機能

動物では、Rad51蛋白質は細胞増殖、個体発生に必須であるが、脳ではRad51遺伝子の発現が検出されない。一方、Xrcc3蛋白質は、Rad51関連蛋白質間の相互作用解析でRad51蛋白質ともRad51C蛋白質とも相互作用することが示されている(図 4)。そこで、脳のcDNAライブラリーを対象にXrcc3蛋白質と相互作用する蛋白質を検索したところ、Rad51関連蛋白質では、特異的にRad51C蛋白質が検出された。Xrcc3蛋白質とRad51C蛋白質とを共発現させたところ、両者が1:1の極めて安定な複合体となって回収された (図 5)。この複合体は、一本鎖DNA、二本鎖DNAのいずれにも結合した。更に、Xrcc3蛋白質・Rad51C蛋白質複合体は、ATPに非依存的に、二本鎖DNAと一本鎖DNAとからヘテロ二本鎖を作る反応、相同的対合反応を行う活性を持つことが明らかになった (図 5)。ヘテロ二本鎖は相同DNA組換えで普遍的な組換え中間体である。このことは、脳では、Xrcc3蛋白質・Rad51C蛋白質複合体が、Rad51蛋白質に代わって相同的対合活性を発現して相同DNA組換えを行っているという興味深い可能性を示す。

【高等動物細胞ゲノム動態に働く組換え機能】

(1) 組換え修復は高等真核生物細胞の増殖に必須である

DT40細胞でMre11遺伝子の発現を強制的に停止すると細胞は増殖を主にG2期で、一部はM期に入って停止し、最終的に死亡することを見出した。M期細胞では、Rad51遺伝子の強制発現停止の場合と同様に、一对の姉妹染色体が同じ部位で切断されていた。このことは、酵母とは異なり、高等動物細胞では通常の細胞増殖にも組換え修復機能が欠かせないことを示す(図6)。

(2) 細胞周期チェックポイント/DNA修復の二重変異株の挙動

動物細胞ではチェックポイント機能が欠損するとゲノム不安定化、それに伴う細胞死が起こることが知られている。DT40細胞から、AT(この遺伝子欠損は毛細血管拡張性小脳失調を起こす)欠損と相同DNA組換え遺伝子(Rad54)欠損又は非相同的DNA切断端結合欠損の二重変異株を作成し、解析したところ、ATキナーゼが、相同DNA組換えを活性化することを見出した。

(3) Rad51関連遺伝子群の機能解析

酵母ではRad51遺伝子以外に減数分裂期特異的発現をするDmc1を除き、関連遺伝子は2つしか存在しないのに対して、高等動物では、5種(Rad51B, 51C, 51D, XRCC2, 3)も存在する(図1)。これら全てについてDT40から欠損変異株を作成した。Rad51の場合と異なり欠損変異細胞は生存可能であったが、染色体切断蓄積とそれによる細胞死が観察された。また、全てのRad51関連遺伝子の欠損株は、DNAクロスリンカーに対する感受性が電離放射線感受性よりも顕著に増加し、DNA損傷後におこるRad51蛋白の集合(foci formation)が遅れた。いずれの変異においても外来DNAの標的組み込み効率が低下した。更にいずれの変異もRad51の過剰発現で表現型の一部が抑制された。以上のことはこれら全ての関連遺伝子がいずれも相同DNA組換えを効率よく行うために必要であり、Rad51と複合体をつくり共同作業を行っている可能性を支持する(図4)。

以上述べたように、本年度の研究により、組換えの制御で重要な機能をもつMre11蛋白の分子機能と細胞期のいずれについても理解が一步進んだ。更に、高等動物では通常の増殖においても組換え修復への依存度が酵母よりも大きいことも明らかになってきた。また、ヒトRad51(RecA蛋白)関連蛋白質の解析、ヒトRad52蛋白の研究から、高等動物では、相同的対合活性をもつ蛋白質(蛋白質複合体)が複数存在し、しかも正常な生命活動のためには全て必要であること、器官によってはその要求性が異なることが明らかになってきた(酵母では、相同的対合活性はRad51蛋白についてしか確認されていない)。更に、組換えの開始制御が、ストレス応答MAPキナーゼ経路、環状AMP依存性キナーゼ経路、接合型フェロモン応答シグナル伝達経路の下流で、クロマチン構造を開閉する形で制御されていることを明らかにした。分裂酵母以上の真核生物では、

Mre11蛋白に依存した組換え開始制御と合わせて少なくとも2段階の質が異なるクロマチン構造レベルの組換え開始制御系が存在することも合わせて明らかになった(図7)。先に、RecA蛋白、Rad51蛋白に結合したDNAの立体構造解析結果をもとに、二本鎖DNA自身の分子特性として、相同DNA組換えを行う能力を持っており、それが生物の進化において重要であることを指摘した。クロマチン構造、染色体構造はDNAをコンパクトにまとめ、限られた空間の中で細胞分裂を容易にするなどの機能が知られているが、更にこの構造がDNAを損傷から保護する機能をもつことも指摘されている。今年度の結果は、栄養飢餓、環境の変化などで自身の生存が脅かされる状況で、ゲノムを2組もつ真核生物二倍体細胞においては、遺伝子部分でクロマチン構造を緩めることで相同DNA組換えが活性化されることを示す。このことは、正常な遺伝子を保存することで致死的な影響を逃れながら、一方、相同的組換えと同じ機構で起こるHomoeologous組換えにより、2つの機能を持つ遺伝子の間で部分をシャッフルすることで新たな機能をもつ遺伝子の出現を促進し、そのような環境の変化に耐える子孫を残す可能性を高めることも意味すると考えられる。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

Senbongi, H., Ling, F., and Shibata, T. "A mutation in a mitochondrial ABC transporter results in mitochondrial dysfunction through oxidative damage of mitochondrial DNA," *Molecular and General Genetics*.,(1999) 262:426-436

Kurumizaka, H., Ikawa, S., Sarai, A. and Shibata, T. (1999) "Mutant RecA proteins, RecAR243Q and RecAK245N, that exhibit defective DNA binding in homologous pairing," *Arch. Biochem. Biophys.* , 365, 83-91.

Rajesh, S., Ito, Y., Sakamoto, T., Iwamoto-Sugai, M., Shibata, T. and Kohno, T. (1999) "Ubiquitin binding interface mapping on yeast ubiquitin hydrolase by NMR chemical shift perturbation," *Biochemistry*, 38, 9242-9253.

Aihara, H., Ito, Y., Kurumizaka, H., Yokoyama, S. and Shibata, T. (1999) "The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA: Structure and a DNA binding surface as revealed by NMR," *J. Mol. Biol.*, 290, 495-504.

Kurumizaka, H., Aihara, H., Kagawa, W., Shibata, T. and Yokoyama, S. (1999) "Human Rad51 amino acid residues required for Rad52 binding," *J. Mol. Biol.*, 291, 537-548.

Yamada, T., Okuhara, K., Iwamatsu, A., Seo, H., Ohta, K., Shibata, T. and Murofushi, H. (2000) "p97 ATPase, an ATPase involved in membrane fusion, interacts with DNA unwinding factor (DUF) that functions in DNA replication," *FEBS Lett.*, 466, 287-291.

Jeong, S.-M., Kawasaki, K., Juni, N. and Shibata, T. (2000) "Identification of *Drosophila melanogaster* RECQE as a member of a new family of RecQ homologues preferentially

expressed in early embryos," *Mol. Gen. Genet.*, 263, 183-193.

Nakagawa, T. and Ogawa, H. (1999) "The *Saccharomyces cerevisiae* MER3 gene, encoding a novel helicase-like protein, is required for crossover control in meiosis." *EMBO J.*, 18, 5714-5723.

Morrison, C., Shinohara, A., Sonoda, E., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M., Weichselbaum, R. R. and Takeda, S. (1999) "The essential functions of human Rad51 are independent of ATP hydrolysis." *Mol. Cell. Biol.* 19: 6891-6897

Yamaguchi-Iwai, Y., Sonoda, E., Sasaki, M. S., Morrison, C., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Yamashita, Y. M., Yagi, T., Takata, M., Price, C., Kakazu, N. and Takeda S. (1999) "Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells." *EMBO J.* 18: 6619-6629

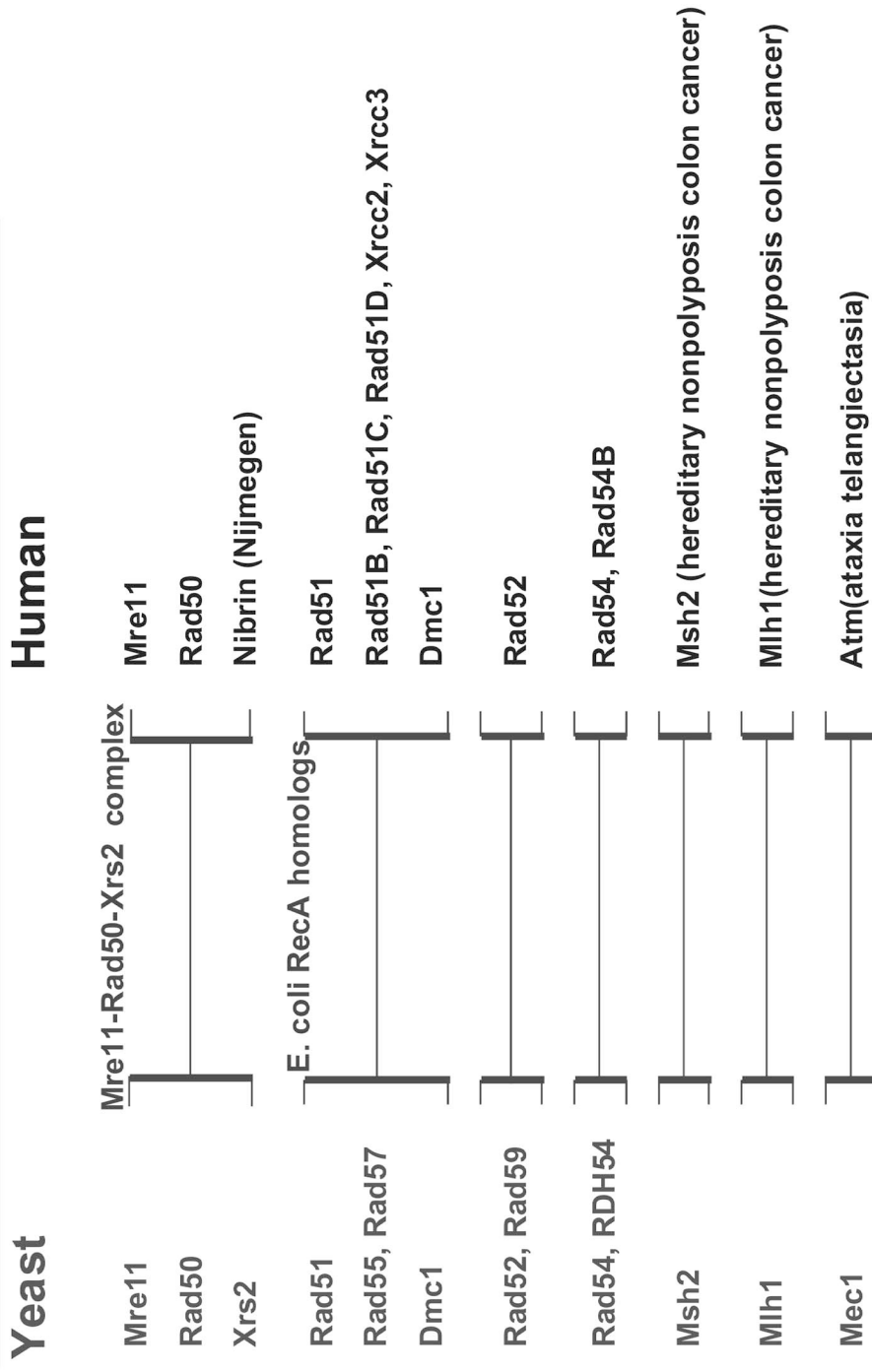
Takao, N., Kato, H., Mori, R., Morrison, C., Sonoda, E., Sun, X., Shimizu, H., Yoshioka, K., Takeda S. and Yamamoto, K. (1999) "Disruption of *Atm* in p53-null cells causes multiple functional abnormalities in cellular response to ionizing radiation." *Oncogene* 18: 7002-7009

Morrison, C., Sonoda, E., Takao, N., Shinohara, A., Yamamoto, K. and Takeda, S. (2000) The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *EMBO J.* 19: 463-471.

西中太郎, 柴田武彦 (1999) "DNAはどのようにして相同部位を認識し、鎖を交換するか? - 相同探索、鎖交換反応のDNA分子構造模型-" 蛋白質核酸酵素, 44, 631-642.

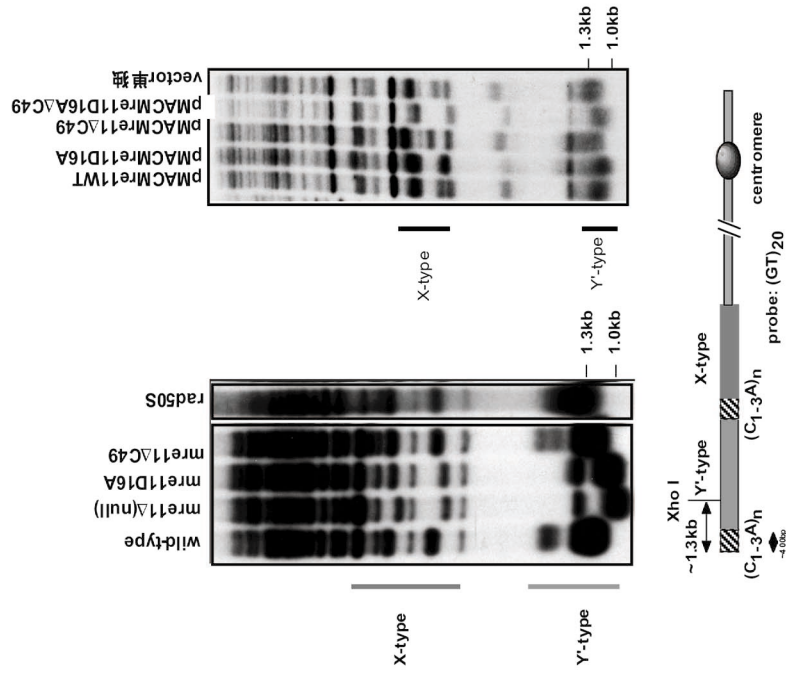
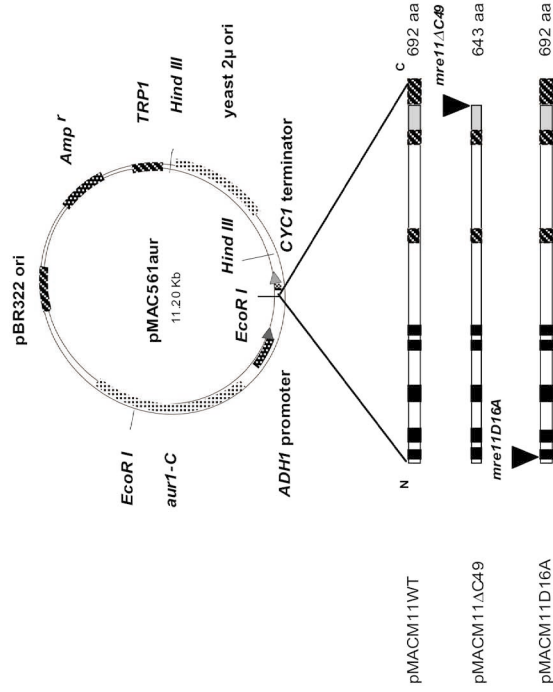
柴田武彦 (1999) "相同組換えに特異的なDNA-タンパク質複合体の立体構造," バイオサイエンスとインダストリー, 57, 810-813.

Homologous recombination proteins are conserved from yeast to human



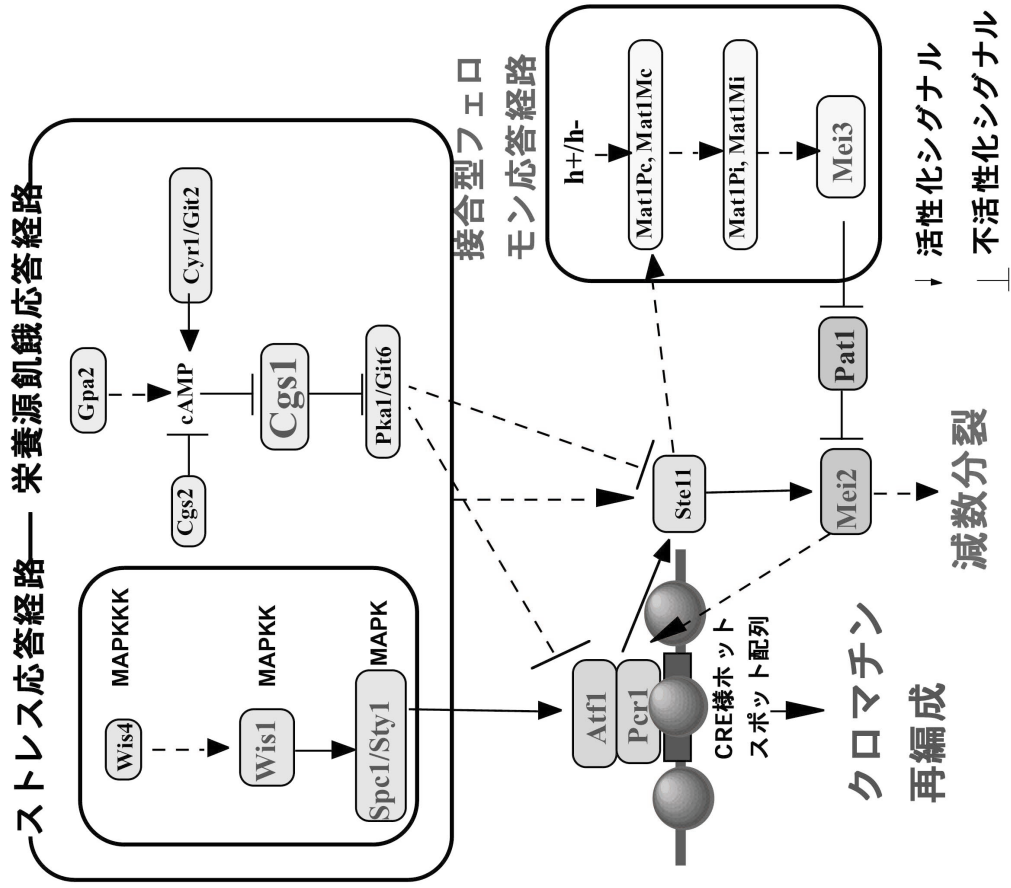
Mre11のテロメア維持における役割と変異型 Mre11の大量発現によるテロメア長制御法の開発

テロメア長制御用プラスミドベクター



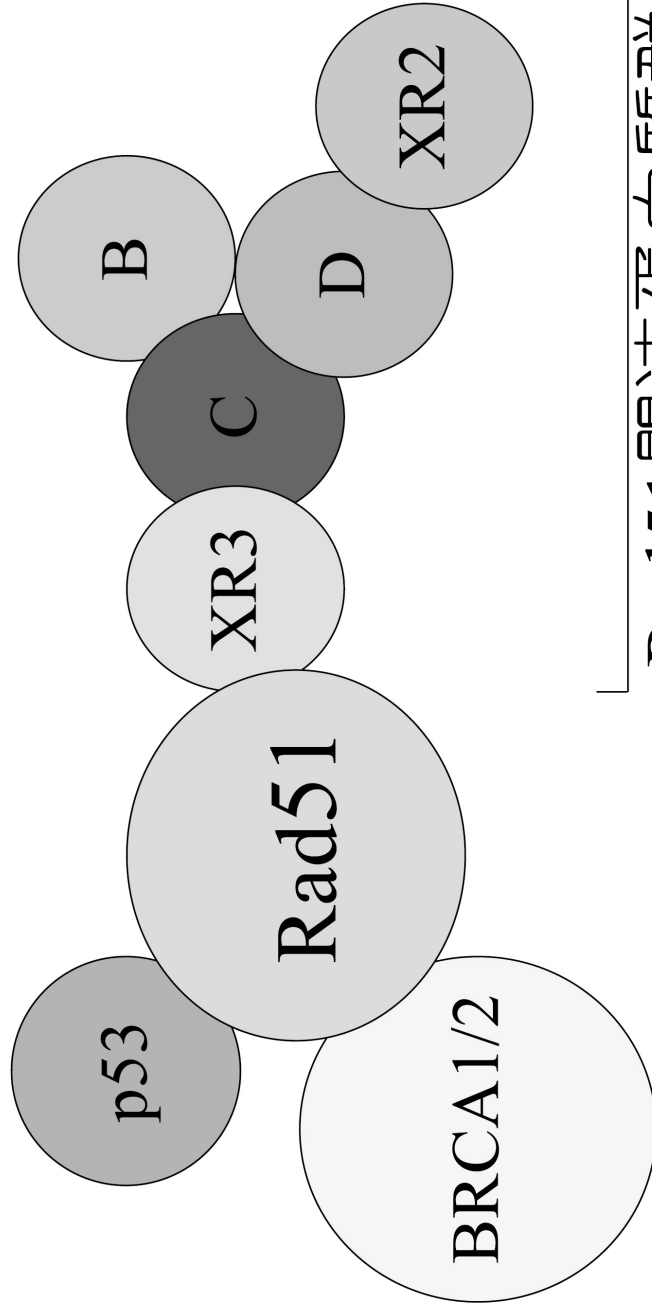
テロメア：真核生物の線状染色体末端部で、分裂毎に短くなり、細胞老化を誘導すると考えられている
 ・ガン細胞・生殖細胞では逆転写酵素テロメラーゼにより伸長するが、これ以外の経路としてMre11に依存した組換え経路がある
 ・変異型Mre11を細胞内で過剰発現することにより、テロメア長を長くしたり短くできる事を見つけた。

M26クロマチン再編成にかかわる細胞内情報伝達経路



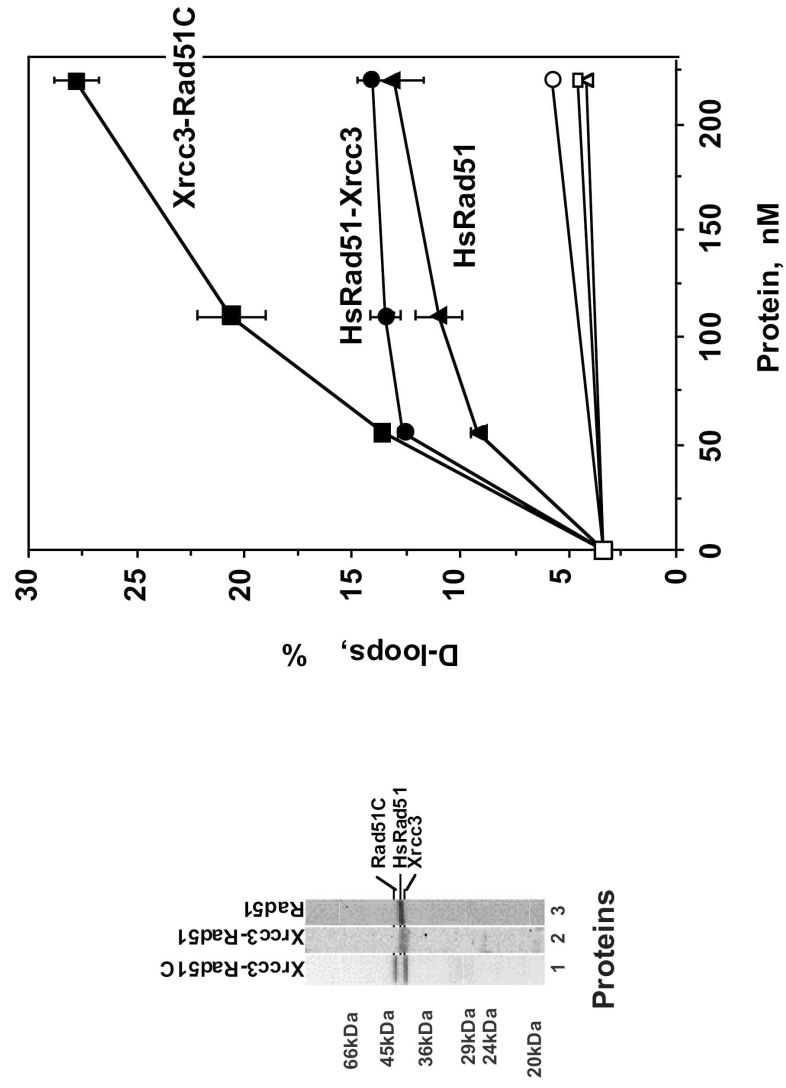
- ストレス応答MAPキナーゼ経路
- 飢餓応答cAMPシグナル伝達経路
- 接合フェロモンシグナル伝達経路
- 減数分裂誘起因子

図 3



Rad51 関連蛋白質群

Homologous pairing by Xrcc3-Rad51C complex



相同組み換えによる、電離放射線照射で生じたDNA損傷の修復
とDNA複製時に自然発生したDNA損傷の修復

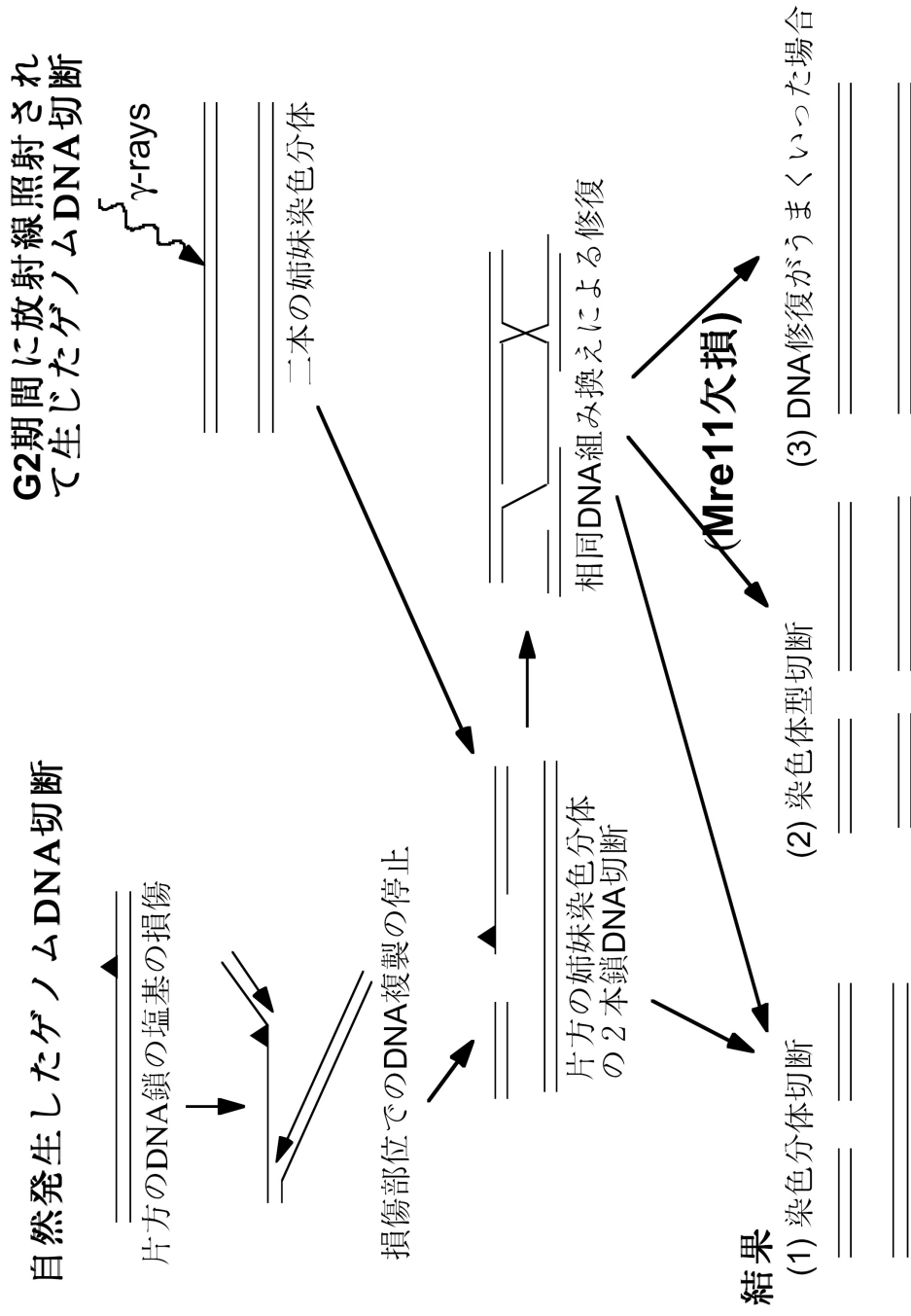


図 6

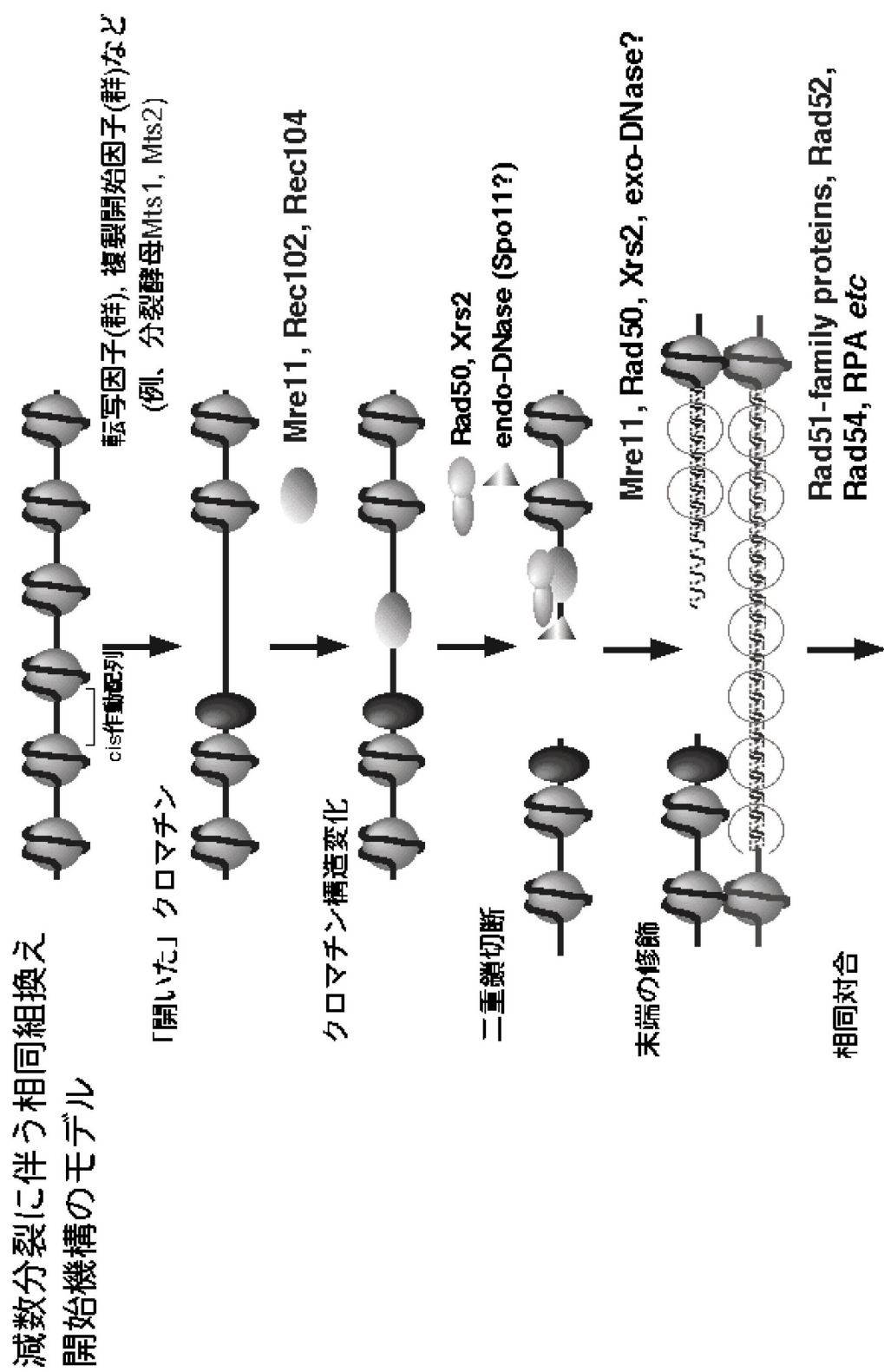


図 7