

Title	相同DNA組換えにかかわるRad51遺伝子のコンディショナルノックアウト細胞を使ったRad51タンパクの機能解析
Author(s)	武田, 俊一
Citation	癌と人. 26 P.18-P.20
Issue Date	1999-03-31
Text Version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/11094/23785
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

相同DNA組換えにかかわるRad51遺伝子のコンディショナル ノックアウト細胞を使ったRad51タンパクの機能解析

武田 俊一*

◆要約

我々は高頻度でターゲットインテグレーションを起すニワトリBリンパ細胞株, DT40を使ってDNA修復機構の欠損細胞を系統的に作成している。そして欠損細胞の表現型を解析することにより種々のDNA修復機構の役割を調べている。我々は, DNA修復機構のうちの相同組み換え機構がDNA複製中に生じた致死的損傷(ゲノム2本鎖切断)を修復するのに必須であることを解明した。

◆イントロダクション

ゲノムDNAの構造を維持する機能の破綻により発癌の原因になる

ヒトの体細胞中には 6×10^9 bpのゲノムDNAが核内に折りたたまれて存在する。ゲノムDNAは, 細胞内でたえず, 加水分解, 酸素ラジカル等の代謝産物による化学修飾を受けてい

る。また, 環境中に存在する環境変異源や医療におけるX線や自然放射能は, ゲノムDNAに損傷を与えうる。以上のような内のおよび外的要因によってゲノムDNAの損傷に対応するため細胞は, 多種類のDNA修復経路を持っている。修復機構に異常が起こると, ゲノムに変異が蓄積し発癌の原因になる。

相同DNA組み換えについて

DNA組み換えとは, 2本のDNAが切断された後に, 元と違う組み合わせで再結合する(すなわち, re-combination) 生化学反応を呼ぶ(図1)。DNA組み換えの1種の相同DNA組み換え(homologous recombination)とは, 同一の塩基配列を持つ2本のDNA同士が組み換えを起す反応を呼ぶ。卵子もしくは精子が発生する時に相同染色体間で起るDNA組み換えも, この相同DNA組み換えの1種である(図2)。相同組み換え反応に関与する酵素群の遺伝子が酵母

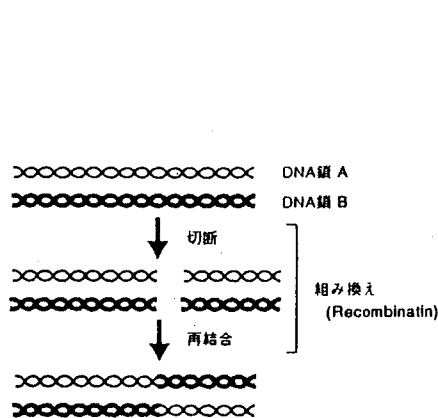


図1

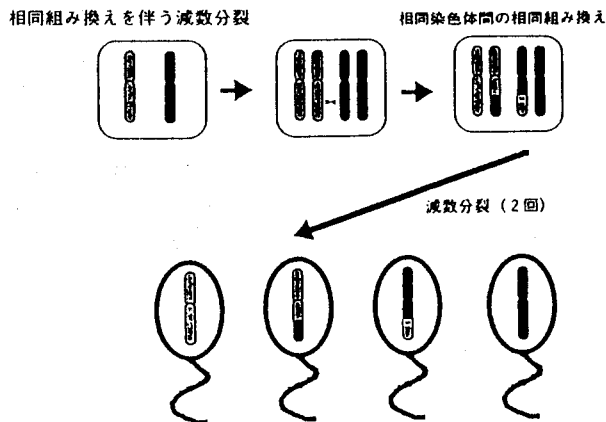


図2

* 京大医学研究科 放射線遺伝学講座 平成9年度研究助成金交付者

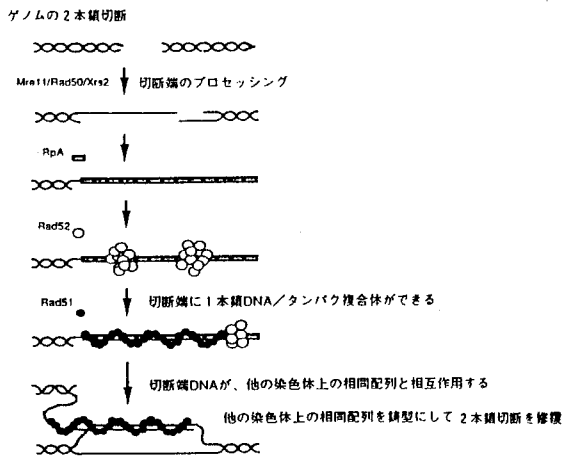


図 3

で十数種類 (RAD52 エピスタシスグループ) も同定され、各分子の作用機構が明らかになりつつある (図 3)。これらの酵素群は、減数分裂の時の相同組み換えに参与するだけでなく、体細胞に放射線照射した時にできるゲノムDNAの2本鎖切断の修復や、さらに標的組み換え (図 4) にも関与することが明らかになった。

ゲノムDNAの2本鎖切断は、1コでも修復されずに残ると細胞にとって致命的である。実際、放射線照射によって生じたDNA2本鎖切断が細胞死の原因になる。したがって種々のDNA修復機構のうち、2本鎖切断修復機構は生物にとって最も基本的な生命維持機構である。2本鎖切断修復機構には、相同DNA組み換えとend-joiningと呼ばれる2種類の主要な経路がある。

動物細胞の相同DNA組み換え機構の研究の現状

動物細胞での相同組み換え機構の解析ためのブレークスルーは、阪大の小川、篠原らによってなされた。すなわち、彼等は6年前に酵母の

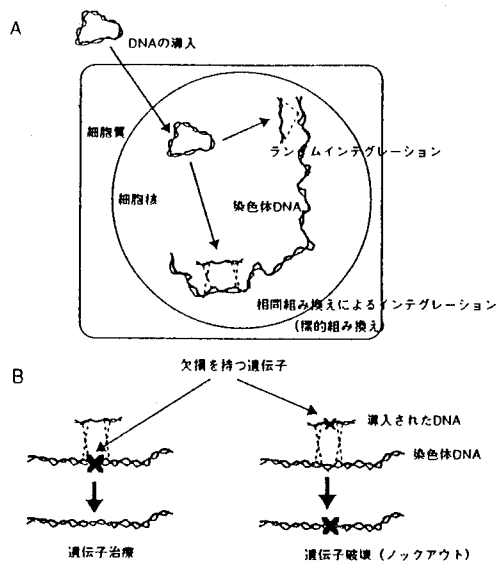


図 4

大腸菌RecAホモログであるRAD51とアミノ酸レベルで83%保存された遺伝子をヒト、マウスで見つけた。この発見により相同組み換え機構は酵母からヒトまで非常によく保存されていることが明らかになった。そして実際に酵母のRAD52 エピスタシスグループの各遺伝子とその一次構造が非常によく保持された相同遺伝子が、ヒト、ニワトリ、植物で場合によっては複数個、合計13個見つかった。

高頻度に標的組み換えを起こすニワトリBリンパ細胞株, DT40

染色体DNAを含むプラスミドをヒト、マウス、トリなど高等真核細胞に導入すると、核に到達したプラスミドのごく一部が染色体DNAに取り込まれその一部になる。この過程をインテグレーションと呼ぶ (integration) (図 4 A)。高等真核細胞 (ヒト、植物、昆虫など) では大部分のインテグレーションは染色体上のいろいろの位置にランダムに起る (ランダムインテグレーション: random integration)。そして、ごく稀に、プラスミドに含まれる染色体DNA断片とそれと相同な塩基配列をもつ染色体上の

DNAとが、相同組換えを起こして導入プラスミドが染色体に組み込まれることがある（ターゲットインテグレーション＝標的組換え）。我々は、高等真核細胞のなかで唯一の例外として、ニワトリBリンパ細胞株では標的組換えとランダムインテグレーションがほぼ同頻度で起こることを見出した。この性質を利用して、すべてのDT40細胞の遺伝子を容易に破壊することができる（図4B, 右）。

上記の、相同組換え機構解析の最近の進歩を考慮すると、5-10年後にはヒト細胞でも効率のよい遺伝子破壊実験が可能になるであろう。

◆研究成果、相同DNA組換えは高等真核細胞の細胞分裂に必須である

我々は、大腸菌のRecAホモログで*RAD52* エピスタシスグループの1つである、*RAD51* 遺伝子をDT40でノックアウトした。*RAD51* 遺伝子は、マウスES細胞のノックアウト実験の結果から高等真核細胞には必須であることが予想された。そこで、予めテトラサイクリン誘導プロモーターによって発現されるヒト*RAD51* 遺伝子トランスジーンをDT40に導入してから、DT40細胞の*RAD51* 遺伝子をノックアウトした。そして、培地へのテトラサイクリン添加によってヒト*RAD51* 遺伝子トランスジーンが発現を停止すると、細胞はG2/M境界に蓄積し、さらに分裂細胞にはランダムな染色体の断裂（1細胞あたり平均約1.5コ）が観察された。多くの細胞は2周目のS期に入ることなく細胞死を起していた。酵母ではRad51がDNA修復に機能していることを考慮すると、この知見は、

高等真核細胞では増殖中に少数のランダムに分布する2本鎖DNA切断が自然に起っていることを示している。

では、なぜ高等真核細胞では相同組換えが必須であるにもかかわらず、なぜ酵母では*RAD51* 遺伝子欠損クローンが増殖可能なのであろうか。その理由は、酵母のゲノムが高等真核細胞と比べて100倍以上短く、1回の分裂あたりに起るゲノムの断裂の可能性が、高等真核細胞よりはるかに少ないためと考えられる。詳細は省くが、増殖中の動物細胞で起っているDNA損傷は、DNA複製時に生成されたと考えられる。我々の研究によって相同組換えは生物にとって2種類の重要な機能を持つことが解明された。1つ目は生殖細胞発生中の組換えであり、2つ目は体細胞がゲノムDNA複製中に起す損傷の、組換えによる修復である。

◆考察

相同DNA組換えの解析はガン研究に将来に以下のような貢献をなしうる。

- (1) 相同DNA組換え機構の異常が染色体構造を不安定にし発ガンの原因になりうる。
- (2) 一部のloss of heterozygosityは相同DNA組換えによって起こっている。
- (3) 化学療法や放射線治療の作用機構と、これらの治療への抵抗性獲得機構の解析。
- (4) 相同DNA組換えは分裂細胞でのみ機能しているので、化学療法の新しいターゲット分子になりうる。
- (5) 酵母では相同DNA組換えがテロメアの維持機構に重要な働きをすることが解明されている。