

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20241012
 研究課題名（和文） ニワトリ細胞株 DT40 の遺伝子破壊による、DNA 損傷への応答機構の網羅的解析
 研究課題名（英文） Analysis of DNA damage response using gene-disrupted DT40 clones.

研究代表者
 武田 俊一（TAKEDA SHUNICHI）
 京都大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：60188191

研究成果の概要（和文）：相同組換えは、抗がん剤（シスプラチン、カンプトテシン）によって生じた DNA 損傷を修復する機構の 1 つであり、50 種類以上の分子が関与する。我々は、ニワトリ DT40 細胞で遺伝子破壊を実施することにより、以下のタンパク分子の、相同組換えにおける役割を解明した。解析した分子とは、RAD51 補助因子（BRCA1, BRCA2, Palb-2, RAD51 paralogs (5 種類), Rad52, Sfr1, Sws1)、DNA 合成酵素、DNA 切断酵素（CtIP, Fan1, RAP80, Slx4）である。

研究成果の概要（英文）：Homologous recombination (HR) plays a major role in repairing DNA damage caused by chemotherapeutic agents, such as camptothecin and cisplatin. HR is carried out by coordinate actions of more than 50 different proteins. We have analyzed the role of the individual HR proteins by disrupting genes encoding the HR proteins in the chicken DT40 cells. We have revealed the function of the following HR proteins, including CtIP, DNA polymerases θ and ν , Fan1, Palb-2, Sfr1, Slx4, and Sws1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	14,900,000	4,470,000	19,370,000
2009年度	13,600,000	4,080,000	17,680,000
2010年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
年度			
年度			
総計	38,400,000	11,520,000	49,920,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：DNA 組換え、標的組換え、遺伝子治療、DT40、ニワトリ B リンパ細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) ニワトリ B リンパ細胞株 DT40

高等真核細胞（昆虫、植物、ヒト）に導入されたゲノム DNA コンストラクトは、稀に染色体に組み込まれる。この組み込みは通常ランダムに起る。そして、導入 DNA コンストラクトと染色体上の遺伝子との相同 DNA 組み換えによって起こる標的組換え（targeted integration）は非常に稀である。その唯一の

例外として私は、1991 年にニワトリ B リンパ細胞株 DT40 が標的組換えとランダムな組み込みとを同頻度で起こすことを見出した（J.M. Buerstedde and S. Takeda: Cell 1991）。この実験系は、高等真核細胞で唯一、高度な遺伝学的手法（コンディショナルミュートアウト、多重遺伝子破壊）を使って複雑な生化学反応を解析できる。

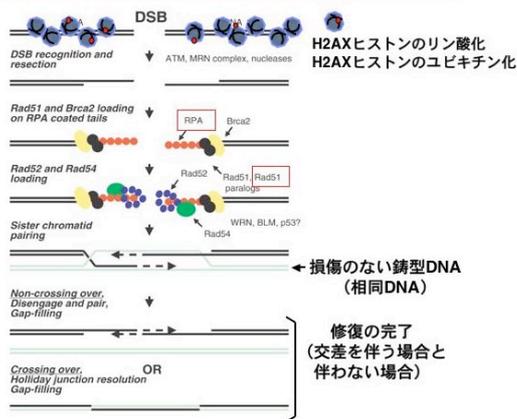
(2) 二重鎖 DNA 切断に対する応答には、100種類以上の分子が関与する
電離放射線は、染色体 DNA を断裂する。2重鎖 DNA 切断は、1つでも修復されないと、損傷チェックポイント経路が活性化して、最終的にはアポトーシスを誘導する。切断の修復には、少なくとも2種類の経路が関与する（相同組換えと非相同末端結合）。

(3) 相同組換えの反応様式

相同組換えは、DNA 損傷に対する修復機構の1つであり、50種類以上の分子が関与する。生化学的解析が可能になった他の DNA 修復経路と対照的に、相同組換えはその一部でも、生化学的に試験管内で再現することは不可能である。ゆえに、各タンパク分子の機能は、それをコードする遺伝子の破壊細胞を作って解析する必要がある。

図1に相同組換えの反応様式のモデルを示した。相同組換えは、まずDNA切断端に1本鎖が形成されることで開始される（図1の2段目）。1本鎖部分は、初めRPA（1本鎖結合分子、図1の3段目に朱で表示）で被われ、次にRPAがRad51で置換される（図1の4段目に朱で表示）。このRad51が主役になって相同配列を捜し、見つけると、その相同配列を鋳型にしてDNA合成がおこる（図1の5段目矢印で表示）。合成されたDNAが鋳型鎖から離れ、互いにハイブリダイズしあう（図1の6段目の2本の矢印）ことによって修復が完了する。一方、減数分裂時の相同組換えでは、2本の相同配列が複雑に絡み合い、Holliday junctionを作る。2本の相同配列はDNA分解酵素によって分離される。

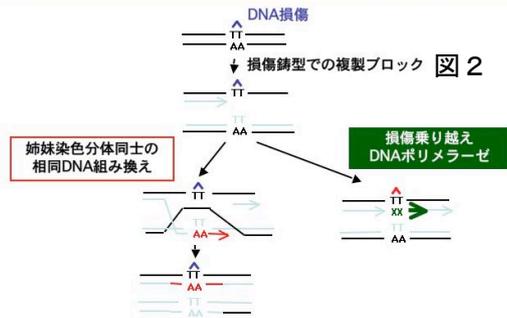
2重鎖DNA切断 (DSB) の相同組み換えによる修復のモデル図 図1



(4) 相同組換えの役割

2重鎖DNA切断は、放射線照射のみならず、生理的なDNA複製中にも多発する(Sonoda, E. et al., EMBO J. 1998)。染色体DNAには大量の塩基損傷が生じ、その各損傷は、複製までに修復されないと、複製を止める(図2)。この複製ブロック時に致命的な2重鎖DNA切断が一方の姉妹染色分体に発生する。これを修復するのに、正常な姉妹染色分体との相同組換えが必須の役割をはたす。

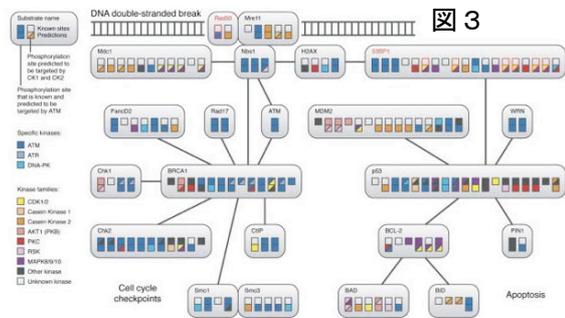
複製時に複製ブロックが頻発し、それが相同組み換えで解除される



(5) 2重鎖DNA切断修復で未解明な問題

① 2重鎖DNA切断に対する応答は、リン酸化により制御される(図3、Cell 129:1415-1426, 2007)。相同組換えも、チェックポイントに機能するキナーゼとCyclin-dependent kinase (CDK)とによって制御されている。CDKの基質の1つはCtIPである。そのリン酸化の意義は不明であった。

染色体断裂のあと、様々なキナーゼが多種類の分子をリン酸化する



② 損傷部位にあるクロマチンの修飾(リン酸化、ユビキチン化、図1の1段目)が相同組換えの最初のステップに重要であることがわかった(Zhao et al., Mol Cell 2007)。この修飾の基質は、一部同定されただけである。
③ 2重鎖DNA切断部位に1本鎖が形成されると、非相同末端結合を阻害するはずである。どのように非相同末端結合と相同組換えとが互いに相補的に働きうるのか不明である。
④ 酵母の相同組換えと異なり、脊椎動物細胞では、Rad51(図1の4段目に朱で表示)が中心的役割を持ち、その活性は多種類の分

子によって制御されている。この Rad51 補助因子の役割分担が不明である。

⑤ 相同組換えは、DNA 合成 (図 1 の 5 段目矢印で表示) を伴う。このステップに関与する DNA ポリメラーゼが不明である。

⑥ Holliday junction を分離する DNA 分解酵素 (Resolvase) が同定されていない。

2. 研究の目的

高等真核細胞 (昆虫、植物、ヒト) に導入されたゲノム DNA コンストラクトは、稀に染色体に組込まれる。この組込みは通常ランダムに起る。そして、導入 DNA コンストラクトと染色体上の遺伝子との相同 DNA 組換えによって起こる標的組換え (targeted integration) は非常に稀である。その唯一の例外として私は、1991 年にニワトリ B リンパ細胞株 DT40 が標的組換えとランダムな組込みとを同頻度で起こすことを見出した。この実験系を使って、電離放射線によって生じた DNA 損傷を修復する機構の全貌を解明する。

電離放射線は、染色体 DNA を断裂する。2 重鎖 DNA 切断は、1 つでも修復されずに残ると、損傷チェックポイント経路が活性化して、最終的にはアポトーシスを誘導する。切断の修復には、少なくとも 2 種類の主要な経路が関与する (相同組換えと非同末端結合)。これらの経路に関与する分子は、既に 50 種類以上も同定され、さらにその倍以上の分子種が未同定である。

我々は、DT40 細胞の遺伝子破壊実験によって、2 重鎖 DNA 切断に対して細胞側が応答する機構を網羅的に解析する。我々の研究の意義は次の 3 点にまとめられる：

(1) 抗がん剤 (シスプラチン、カンプトテシン) や放射線療法が有効であるか否かは、相同組換えがどれだけ効率よく働くかにかかっている。我々の研究成果は以下に説明する治療効果の予測に貢献できる。すなわち、悪性腫瘍における各相同組換え因子の発現から、その腫瘍への治療効果を予測できるようになる。

(2) 標的組換え効率を上昇できるようにする。

(3) 複製中には、様々なトラブルが原因で、2 重鎖 DNA 切断が発生し、それを相同 DNA 組換えが修復する。我々の研究は、DNA 複製に貢献する。

3. 研究の方法

(1) CtIP の機能解析

酵母の CtIP ホモログ、Sae2 は、MRE11、RAD50、NBS1 と共同して働く。酵母と異なり動物細胞では、CtIP は、腫瘍抑制遺伝子、BRCA1 と CtIP のリン酸化された Ser332 を介して直接に結合する。この結合の生理的意義は不明である。

この意義を Ser332Ala ミュータント発現細胞を使って解明する。

(2) SSB1 と SSB2 の機能解析

SSB1 と SSB2 は、一重鎖 DNA (DNA 損傷が存在することを意味する) に結合する分子として、オーストラリアの Khanna 博士によって同定された。彼女らによって SSB1 は、2 重鎖 DNA 切断修復を促進することも証明された。しかし、SSB1 欠損は、細胞にとって致死であるので、機能の詳細は不明である。さらに B リンパ細胞特異的に発現する SSB2 の機能は未解明である。これらの課題を、SSB1 と SSB2 の遺伝子欠損細胞を作ることによって明らかにする。

(3) 新規の Rad51 活性の制御因子の機能解析 Rad51 は、大腸菌の RecA ホモログであり、すべての相同組み換えに必須である。Rad51 活性は様々な方法で制御されているようであり、ヒト・ニワトリでは 8 種類の Rad51 制御因子 (Rad51B、Rad51C、Rad51D、XRCC2、XRCC3、Sws1、BRCA1、BRCA2) が報告されている。最近に見つかった 2 種類の Rad51 制御因子の候補 (Gemin2、Sfr1、Sws1) を機能解析する。さらに、この候補因子と既知の Rad51 制御因子との機能的相互作用を、遺伝学的手法を用いて明らかにする。

(4) 相同組換えに関与する DNA ポリメラーゼの同定

相同組換えは、DNA 合成のステップを伴うと考えられている。どの DNA ポリメラーゼが関与するかを、各ポリメラーゼの欠損細胞を表現型解析して明らかにする。

(5) 相同組換えに関与する DNA 切断酵素の同定

相同組換えは、必ず DNA 合成のステップを伴う。どの DNA ポリメラーゼが関与するかを明らかにする。

以上の機能解析は、遺伝子破壊 DT40 細胞の表現型解析による。もしポジティブの結果が出れば、siRNA によりヒト細胞での、実験の再現性を調べる。

4. 研究成果

(1) RAP80 の機能解析

RAP80 は、腫瘍抑制遺伝子、BRCA1 と直接に結合する。この BRCA1-RAP80 複合体の機能は不明であった。この機能を RAP80 遺伝子破壊細胞を作出することにより解析した。そして BRCA1-RAP80 複合体は、DNA 切断 5' 端から化学修飾を除去するのに必要なことを証明した。成果は、我々の教室の院生と准教授とが論文発表した (論文 10)。

(2) 相同組換えに関与する DNA ポリメラーゼの同定-1

相同組換えは、必ず DNA 合成のステップを伴う。このステップに、どの DNA ポリメラーゼ

が関与するかは必ずしも明らかでなかった。我々は、Pol η / Pol ν / Pol θ の3重欠損株をニワトリBリンパ細胞株 (DT40) から作製し、相同組換えによる抗体V遺伝子の多様化を解析した。そして、この3種類のDNAポリメラーゼが相同組換えに関与することを証明した (論文 11, 12)。

(3) 新規のRad51 活性の制御因子の機能解析 Rad51 は、大腸菌のRecA ホモログであり、すべての相同組換えに必須である。Rad51 活性は様々な方法で制御されている。ヒト・ニワトリでは8種類のRad51 制御因子 (Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2, XRCC3, Srs1, BRCA1, BRCA2) が報告されている。最近に見つかったRad51 制御因子の候補 (Gemin2) を機能解析した。その結果、Gemin2 もRad51 制御因子であることが証明できた (論文 13)。

(4) 相同組換えに関与するDNA切断酵素の同定

相同組換えでは、2本の相同DNAがホリデイ組換え中間体をいったん形成した後、それがDNA切断酵素によって分離される。我々は、分離に関与する切断酵素を検索し、FAN1とSLX4複合体に含まれる切断酵素とが分離に関与することを証明した。成果は、我々の教室の院生が論文発表した (論文 14, 15)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Oka H, Sakai W, Sonoda E, Nakamura J, Asagoshi K, Wilson SH, Kobayashi M, Yamamoto K, Heierhorst J, Takeda S, Taniguchi Y. (2008) DNA damage response protein ASCIZ links base excision repair with immunoglobulin gene conversion. *Biochem Biophys Res Commun.* 371: 225-9.
2. Saberi A, Nakahara M, Sale JE, Kikuchi K, Arakawa H, Buerstedde J-M, Takeda S, Sonoda E. (2008) The 9-1-1 DNA clamp is required for immunoglobulin gene conversion. *Mol Cell Biol.* 28: 6113-22.
3. Nakahara M, Sonoda E, Nojima K, Sale JE, Takenaka K, Kikuchi K, Taniguchi Y, Nakamura K, Sumitomo Y, Bree RT, Lowndes NF, Takeda S. (2009) Genetic evidence for single-strand lesions initiating Nbs1-dependent homologous recombination in diversification of Ig V in chicken B lymphocytes. *PLoS Genet.* 5: e1000356.
4. Hohegger H, Takeda S, Hunt T. (2008) Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 910-6. (Review)
5. Motegi A, Murakawa Y, Takeda S. (2009) The vital link between the ubiquitin-proteasome pathway and DNA repair: Impact on cancer therapy. *Cancer Lett.* 283: 1-9. (Review)
6. Kikuchi K, Abdel-Aziz HI, Taniguchi Y, Yamazoe M, Takeda S, Hirota K. (2009) Bloom DNA helicase facilitates homologous recombination between diverged homologous sequences. *J Biol Chem.* 284: 26360-7.
7. Ji K, Kogame T, Choi K, Wang X, Lee J, Taniguchi Y, Takeda S. (2009) A novel approach using DNA-repair-deficient chicken DT40 cell lines for screening and characterizing the genotoxicity of environmental contaminants. *Environ Health Perspect.* 117: 1737-44.
8. Nakamura K, Kogame T, Oshiumi H, Shinohara A, Sumitomo Y, Agama K, Pommier Y, Tsutsui KM, Tsutsui K, Hartsuiker E, Ogi T, Takeda S, Taniguchi Y. (2010) Collaborative action of Brcal and CtIP in elimination of covalent modifications from double-strand breaks to facilitate subsequent break repair. *PLoS Genet.* 6: e1000828.
9. Wang X, Takenaka K, Takeda S. (2010) PTIP promotes DNA double-strand break repair through homologous recombination. *Genes Cells* 15: 243-54.
10. Iijima J, Zeng Z, Takeda S, Taniguchi Y. (2010) RAP80 acts independently of BRCA1 in repair of topoisomerase II poison-induced DNA damage. *Cancer Res.* 70: 8467-74.
11. Kohzaki M, Nishihara K, Hirota K, Sonoda E, Yoshimura M, Ekino S, Butler JE, Watanabe M, Halazonetis T, Takeda S. (2010) DNA polymerases ν and θ are required for efficient Immunoglobulin V gene diversification in chicken. *J Cell Biol.* 189: 1117-27.
12. Hirota K, Sonoda E, Kawamoto T, Motegi A, Masutani C, Hanaoka F, Szuts D, Iwai S, Sale JE, Lehmann A, Takeda S. (2010) Simultaneous disruption of two DNA polymerases, Pol η and Pol ζ , in avian DT40 cells unmasks the role of Pol η in cellular response to various DNA lesions. *PLoS Genet.* 6: e1001151.
13. Takizawa Y, Qing Y, Takaku M, Ishida T, Morozumi Y, Tsujita T, Kogame T, Hirota K, Takahashi M, Shibata T, Kurumizaka

- H, Takeda S. (2010) GEMIN2 promotes accumulation of RAD51 at double-strand breaks in homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* 38: 5059-74.
14. Yoshikiyo K, Kratz K, Hirota K, Nishihara K, Takata M, Kurumizaka H, Horimoto S, Takeda S., Jiricny J. (2010) KIAA1018/FAN1 nuclease protects cells against genomic instability induced by interstrand cross-linking agents. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107: 21553-7.
 15. Yamamoto KN, Kobayashi S, Tsuda M, Kurumizaka H, Takata M, Kono K, Jiricny J, Takeda S., Hirota K. Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* (in press).

[学会発表] (計 18 件)

1. Takeda S.: “Multiple functions of Mre11/Rad50/Nbs1 complex” 2008 EMBO Recombination Mechanisms, Il Ciocco, Italy, May 19-23, 2008. (Invited)
2. Takeda S.: “The role of anti-recombination in replication-fork collapse” Molecular and Clinical Mechanisms in Bloom’s Syndrome and Related Disorders, Chicago, USA, May 27-28, 2008. (Invited)
3. Takeda S.: “Collaboration of BRCA1 and CtIP in cellular tolerance to topoisomerase poisons” Gordon Research Conference, Oxford, UK, July 20-25, 2008. (Invited)
4. Takeda S.: “A critical role for the ubiquitin-conjugating enzymes Ubc13 and RNF8 in homologous recombination” Genome Stability in Health and Disease, Tel Aviv, Israel, September 21-25, 2008. (Invited)
5. 武田俊一: “A critical role for the ubiquitin-conjugating enzymes Ubc13 and RNF8 in homologous recombination” 3R Symposium 2008, つま恋, 静岡, 10月30日, 2008. (招待講演)
6. 武田俊一: “ニワトリBリンパ細胞を使ったDNA損傷応答機構の遺伝学的解析”放射線防護センターシンポジウム, 稲毛, 千葉, 12月16-17日, 2008. (招待講演)
7. Takeda S.: “A Critical Role for the Ubiquitin-Conjugating Enzymes Ubc13 and RNF8 in Homologous Recombination” Gordon Research Conference, Ventura, USA, February 8-13, 2009. (Invited)
8. 武田俊一: “Analysis of Genome Maintenance Using Chemical Genetics” International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2009 (金沢がん生物学国際シンポジウム 2009), 金沢, 石川, 2月19日, 2009. (招待講演)
9. Takeda S.: “Regulation of DNA damage response by ubiquitin ligases” DNA Repair, Crete, Greece, April 20-23, 2009. (Invited)
10. Takeda S.: “A novel approach using DNA repair-deficient chicken DT40 cell lines for screening and characterizing the genotoxicity of chemical compounds and environmental contaminants” Chromosome Dynamics and Genome Stability, Villars sur Ollon, Switzerland, May 14-16, 2009. (Invited)
11. Takeda S.: “Reverse Genetic Study of RAD51 mediators, BRCA1, BRCA2, RAD51 paralogs, RAD52, Srs1, and Sfr1” FASEB Genetic Recombination and Genome Rearrangements, Snowmass Village, Colorado, USA, Aug 2-7, 2009. (Invited)
12. Takeda S.: “Reverse Genetic Analysis of DNA polymerases in TLS” Gordon Research Conference, Colby-Sawyer College, New London, New Hampshire, USA, Aug 9-14, 2009. (Invited)
13. 武田俊一: “DNAを損傷するタイプの抗がん治療時に機能するDNA修復分子”第68回癌学会学術総会, パシフィコ横浜, 横浜, 神奈川, 10/1-3, 2009. (招待講演)
14. Takeda S.: “Systematic Reverse Genetic Study of DNA Damage Response, Using the Chicken DT40 Cells” Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, COEX Center, Seoul, Korea, Oct 15-16, 2009. (Invited)
15. Takeda S.: “Chemical Genetic Method to Detect Environmental Mutagens and to Screen Anti-Malignant Chemical Compounds” The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund, Hotel Grand Palace, Tokyo, Nov 10-12, 2009. (Invited)
16. Takeda S.: “Analysis of Immunoglobulin V Gene Diversification in the Chicken DT40 B Lymphocyte Line Reveals the Role of DNA Polymerases in Homologous Recombination and Translesion DNA Synthesis” International Conference on Radiation and Cancer Biology at Nagasaki 2010, Nagasaki University, Nagasaki, 2/17-20, 2010. (招待講演)
17. Takeda S.: “Differential Functional

interactions between the RNF8 and RAD18 E3 ubiquitin ligases in Translesion DNA Synthesis and DSB Repair” EMBO Workshop, The Interface between the Ubiquitin Family and the DNA Damage Response, Rovinj, Croatia, 9/1-5, 2010.

18. Takeda S: “SLX4 Links Fanconi Anemia Pathway to Structure Specific Endonucleases, MUS81, SLX1 and XPF in Interstrand Crosslink Repair ” Keystone Symposia, Genomic Instability and DNA Repair, Keystone, Colorado, USA, 1/30-2/4, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 俊一 (TAKEDA SHUNICHI)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：6 0 1 8 8 1 9 1

(2) 研究分担者

茂木 章 (MOTEGI AKIRA)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：8 0 4 5 2 3 3 2