

平成22年 5 月 25 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005 ～ 2009
 課題番号：17013039
 研究課題名（和文） DNA修復機構の、逆遺伝学的手法（ニワトリ細胞株とメダカ）による機能解析
 研究課題名（英文） Reverse Genetic Analysis of DNA Damage responses in the Avian DT40 Cell Line and the Medaka Fish
 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）：抗がん治療は、放射線のように、染色体 DNA を損傷し、細胞自殺を誘導するものが多い。この理由から、各修復因子の機能を解析することは、抗がん治療の効果を増大させることに役立つ。機能解析には、逆遺伝学的解析が有効である。我々は、ニワトリ DT40 細胞とメダカというユニークな逆遺伝学的実験手法を開発した。DT40 の解析から、我々は、ユビキチン化、DNA ポリメラーゼ、BRCA1/2 の機能解析に貢献した。

研究成果の概要（英文）：A number of anti-cancer agents, including radiotherapy, induce DNA damage, arrest DNA replication, and thereby induce apoptosis. Therefore, functional analysis of DNA repair factors may contribute to improvement of anti-cancer treatments. For this functional analysis, we have developed unique reverse genetic model systems, the avian somatic cell line (DT40) and the Medaka fish. We have revealed the role of ubiquitylation, some DNA polymerases, and BRCA1/2 in DNA damage responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	24,000,000	0	24,000,000
2006年度	24,000,000	0	24,000,000
2007年度	24,000,000	0	24,000,000
2008年度	24,000,000	0	24,000,000
2009年度	24,000,000	0	24,000,000
総計	120,000,000	0	120,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：癌、ゲノム、細胞・組織、バイオテクノロジー、放射線

1. 研究開始当初の背景

(1) DT40 細胞

抗がん治療のうち、染色体 DNA を損傷するタイプのもは、DNA 複製が第一の標的である。DT40 細胞株は、DNA 複製にリンクした DNA 修復経路（複製後修復機構）を逆遺伝学的手法で解析するときに、以下の優位

性から、動物細胞のなかでは、最も優れた実験系である。

①遺伝子ノックアウトが行いやすい

(Buerstedde JM, and Takeda S; Cell. (1991) 67(1):179-88)。

②表現型が安定である。

③S 期が相対的に長く、抗がん治療の、DNA 複製への影響が解析しやすい。

④ DT40 細胞は、培養中に、複製後修復機構を使って抗体遺伝子可変領域を継続的に多様化する。以上の優位性から、我々は DT40 細胞株を使って、複製後修復機構の機能を精密に解析ができる。そして、抗がん治療の作用機序を解析できる。

(2) 学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義 (DT40 細胞)

複製後修復機構は、おもに相同組み換え (HR) と損傷乗り越え DNA 合成 (translesion DNA synthesis = TLS) からなる。複製ブロックの時に、HR は、ブロック鎖がブロックしていない方の姉妹染色分体を鋳型にして DNA 合成することを補助し、最終的に複製ブロックを解除する。一方、TLS は、約 9 種類のポリメラーゼが、複製ポリメラーゼ (TLS ポリメラーゼ) に代わって、損傷鎖を鋳型にして数ベース以下 DNA 合成する。TLS ポリメラーゼは、フレキシブルな反面、高頻度にエラーをおこす。DT40 細胞 (B リンパ細胞株) は、TLS と HR とを別々に使って培養中に抗体遺伝子可変領域を連続的に多様化する。よって、DT40 細胞は、抗体遺伝子可変領域の塩基配列を決定することによって、HR と TLS との機能を正確に評価できるユニークな実験系である (論文 13)

(3) メダカ

①メダカはゲノムがゼブラフィッシュの 1/2 のサイズである。

②ゼブラフィッシュは、3N のゲノムを持つのに対して、メダカは 2N に近い。

③身体が透明に近く臓器癌の検出に有利である。

④任意の時期に受精卵の発生を開始でき、透明な胚を経時的に観察できる。

⑤日本で放射線生物学のモデル生物に利用されてきた。

以上 5 点の理由から、発がんの研究に、メダカは、ゼブラフィッシュやマウスと比べても、遜色ないモデル生物である。我々は世界で初めて、メダカの遺伝子破壊実験系を樹立した (論文 26)。

2. 研究の目的

(1) DT40 細胞

DNA 複製にリンクした DNA 修復経路 (複製後修復機構) に関与する全分子の遺伝子破壊 DT40 細胞株を作る。

(2) メダカ

メダカの遺伝子破壊実験系を樹立し、さらにその効率を上昇する。

p53 遺伝子破壊メダカを表現型解析する。

3. 研究の方法

(1) DT40 細胞

DT40 からの遺伝子ノックアウト株を樹立し、その表現型を解析する。

複数種類のタンパク分子の機能的相互作用を解析する目的で、多重遺伝子破壊を実施する。多重遺伝子破壊が確実にできる動物細胞株は、今のところ DT40 細胞だけである。

(2) メダカ

メダカの遺伝子破壊実験系を樹立する。メダカやゼブラフィッシュでは、ES 細胞がない。そこで、遺伝子破壊には以下の方法を使う。

①♂を飽和変異

②飽和変異した♂と健康な♀とを交配

③5800 匹の F1 の DNA と精子とを凍結 (飽和変異メダカバンク)

④5800 匹の F1 の中から、破壊したい遺伝子に変異した個体を捜す。

⑤見つければ、その精子を使って人工授精する。

⑥交配により破壊したい遺伝子がホモの状態の個体を選ぶ。

我々が開発した手法だと、④のステップにおいて遺伝子破壊には 100 万円/遺伝子ものコストがかかる。そのコストを下げるために、④のステップに次世代シーケンサー (SOLiD) を使う。

4. 研究成果

(1) DT40 細胞

我々は、現在のところ以下の 5 点に焦点を絞って相同組み換え機構を解析している。

①・乳がん抑制遺伝子、Brca1 と Brca2
酵母と動物細胞とは、HR の分子機構が似ている。ただし、酵母と異なり、動物細胞では Rad51 組換えタンパク分子が相同組み換えの中心である (酵母では Rad52 が最も重要)。それゆえ動物細胞では酵母に存在しない Rad51 制御因子が多種類存在する。家族性乳がん抑制遺伝子 Brca1、Brca2 にコードされたタンパク分子も、酵母にない Rad51 制御因子である。我々は、Brca1、Brca2 の各欠損細胞を製作し、それを基に、多重遺伝子破壊を行っている (論文: 1, 18, 34)。さらに、新たな Rad51 制御因子、Gemin2 を同定した。 (論文: 1)

② DNA ポリメラーゼ

1999 年に阪大・益谷博士と花岡教授らが新規 DNA ポリメラーゼ (pol η) を発見してから、新たに 8 種類 (合計 14 種類) もの DNA ポリメラーゼ様遺伝子がヒトゲノム上で見つかった。すべての DNA 組換え・修復は、DNA 合成を伴うが、どの DNA ポリメラーゼがどの修復に関与するかは不明のままである。

我々は、DNA ポリメラーゼの欠損細胞を網羅的に作製・解析した。 (論文: 2, 27, 28, 30, 35)

③ DNA 損傷の初期に損傷部位にリクルートされる分子の網羅的機能解析

Poly[ADP ribose]polymerase-I (PARP)、53BP1、Brcal、CtIP (DNA 切断酵素)、Nbs1 (DNA 切断酵素)、Single-strand binding protein 1 (SSB1) が、2 重鎖切断の数分以内にリクルートされる。これらの分子が、後期の様々な生化学反応を決定する。これらの分子の欠損細胞を全部作製する。これらの分子の機能解析による業績は、以下のとおりである。PARP (論文: 1、12、22、23)、53BP1 (論文: 1、31)、Brcal (論文: 3)、CtIP (論文: 3、17)、Nbs1 (論文: 9)、SSB (論文: 14)

④ Cell cycle dependent kinase (CDK)

による相同組換えの制御

相同組換え (HR) は、S/G2 期でのみ機能するが、このフェーズ特異的活性化は、CDK によって制御されている。CDK は、細胞分裂周期の各フェーズにおいて刻々と異なる働きをするので、従来遺伝学的解析が困難であった。我々は、ケミカルジェネティックスの手法を使い、CDK を 10 分以内に ON→OFF→ON できる実験系を作製した。(論文: 11、21)

⑤ ユビキチン化による相同組換えの制御
我々は、世界で初めて、損傷部位で大量におこるユビキチン化が、相同組換え (HR) の開始に必須であることを発見した (論文: 25)。この知見に基づき、プロテオソーム阻害剤の抗がん作用機序の 1 つは、HR の抑制であることを証明した。(論文: 20)。また、ユビキチン化は、HR と競合する 2 重鎖切断修復経路 (非相同末端結合) を抑制することによって間接的に HR を促進することもある。(論文: 23)。

(2) メダカ

① 我々は世界で初めて、メダカの遺伝子破壊実験系を樹立した。(論文 26)

② p53 欠損メダカの表現型解析放射線照射後に、アポトーシスが大きく遅れ、p21 遺伝子の発現誘導がかからなかった。野生型メダカでは 6 カ月齢まで腫瘍の発生は極めて稀であるのに対し、p53 欠損メダカでは 3 カ月齢までに 50 匹中 2 匹でリンパ系の腫瘍が発生した。飽和変異法は、P53 遺伝子以外の遺伝子 (約 20 種類) も破壊されている。P53 遺伝子以外の破壊遺伝子を除去するために、P53 遺伝子破壊メダカを野生型メダカに 10 回戻し交配した。

③ メダカの遺伝子破壊の効率化 1 遺伝子破壊に 100 万円の費用がかかる。基生研と共同して、次世代シーケンサー (SOLiD) を使い、遺伝子破壊の費用を 30 万円に低下させた。

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 35 件)

1. 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.* (in press) 査読有

2. 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.* (in press) 査読有

3. 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. 査読有

4. Wang X, Takenaka K, Takeda S. (2010) PTIP promotes DNA double-strand break repair through homologous recombination. *Genes Cells* (in press) 査読有

5. Ji K, Kogame T, Choi K, Wang X, Lee J, Taniguchi Y, Takeda S. (2010) 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. 査読有

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 Biochem.* 284: 26360-7. 査読有

7. Suzuki J, Yamaguchi K, Kajikawa M, Ichiyangi K, Adachi N, Koyama H, Takeda S, Okada N. (2009) Genetic evidence that the non-homologous end-joining repair pathway is involved in LINE retrotransposition. *PLoS Genet.* 5: e1000461. 査読有

8. Smith E, Dejsuphong D, Balestrini A, Hampel M, Lenz C, Vindigni A, Takeda S, Costanzo V. (2009) An ATM and ATR dependent checkpoint inactivates spindle assembly by targeting CEP63. *Nat Cell Biol*. 11: 278-85. 査読有
9. 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. 査読有
10. Kong X, Ball AR, Jr., Sonoda E, Feng J, Takeda S, Fukagawa T, Yen TJ, Yokomori K. (2009) Cohesin associates with spindle poles in a mitosis-specific manner and functions in spindle assembly in vertebrate cells. *Mol Biol Cell*. 20: 1289-301.
11. Hochegger 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) 査読有
12. Sugimura K, Takebayashi S, Taguchi H, Takeda S, Okumura K. (2008) PARP-1 ensures the modulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged DNA. *J Cell Biol*. 183: 1203-12. 査読有
13. 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. 査読有
14. Richard D, Bolderson E, Cubeddu L, Wadsworth RIM, Savage K, Sharma GG, Nicolette ML, Tsvetanov S, McIlwraith MJ, Pandita R, Takeda S, Hay TT, Gautier J, West SC, Paull TT, Pandital TK, White MF, Khanna KK. (2008) Single stranded DNA binding protein hSSB1 is critical for genomic stability. *Nature* 453: 677-81. 査読有
15. 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. 査読有
16. Takeda S, Nakamura K, Taniguchi Y, Paull TT. (2007) Ctp1/CtIP and the MRN complex collaborate in the initial steps of homologous recombination. *Mol Cell*. 28: 351-2. (Review) 査読有
17. Kinoshita M, Takeda S. (2007) Connecting the Dots between Septins and the DNA Damage Checkpoint. *Cell* 130: 777-9. (Review) 査読有
18. Martin RW, Orelli BJ, Yamazoe M, Minn AJ, Takeda S, Bishop DK. (2007) RAD51 up-regulation bypasses BRCA1 function and is a common feature of BRCA1-deficient breast tumors. *Cancer Res*. 67: 9658-65. 査読有
19. Otsuki M, Seki M, Inoue E, Yoshimura A, Kato G, Yamanouchi S, Kawabe Y, Tada S, Shinohara A, Komura J, Ono T, Takeda S, Ishii Y, and Enomoto T. (2007) Functional interactions between BLM and XRCC3 in the cell. *J Cell Biol*. 179: 53-63.
20. Murakawa Y, Sonoda E, Barber LJ, Zeng W, Yokomori K, Kimura H, Niimi A, Lehmann AR, Zhao GY, Hochegger H, Boulton SJ and Takeda S. (2007) Inhibitors of the proteasome suppress homologous DNA recombination in mammalian cells. *Cancer Res*. 67: 8536-8543. 査読有
21. Hochegger H, Dejsuphong D, Sonoda E, Saberi A, Rajendra E, Kirk J, Hunt T, Takeda S. (2007) An essential role for Cdk1 in S phase control, revealed by chemical genetics in vertebrate cells. *J Cell Biol*. 178: 257-68. 査読有
22. Fisher A, Hochegger H, Takeda S, Caldecott KW. (2007) Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 Accelerates Single-Strand Break Repair in Concert with Poly (ADP-ribose) Glycohydrolase. *Mol Cell Biol*. 27: 5597-5605. 査読有

23. Saberi A, Hohegger H, Szuts D, Lan L, Yasui A, Sale JE, Taniguchi Y, Murakawa Y, Hua W, Yokomori K, Helleday T, Teraoka H, Arakawa H, Buerstedde JM, Takeda S. (2007) RAD18 and poly[ADPribose]polymerase independently suppress the access of nonhomologous end joining to double strand breaks and facilitate homologous recombination mediated repair. *M o l C e l l B i o l*. 27:2562-2571. 査読有
24. Kohzaki M, Hatanaka A, Sonoda E, Yamazoe M, Kikuchi K, Trung NV, Szuts D, Sale JE, Shinagawa H, Watanabe M, Takeda S. (2007) Cooperative Roles of Vertebrate Fbh1 and Blm DNA Helicases in Avoidance of Crossovers during Recombination Initiated by Replication Fork Collapse. *M o l C e l l B i o l*. 27:2812-2820. 査読有
25. Zhao GY, Sonoda E, Barber LJ, Oka H, Murakawa Y, Yamada K, Ikura T, Wang X, Kobayashi M, Yamamoto K, Boulton SJ, Takeda S. (2007) A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *M o l C e l l*. 25: 663-675. 査読有
26. Taniguchi Y, Takeda S, Furutani-Seiki M, Kamei Y, Todo T, Sasado T, Deguchi T, Kondoh H, Mudde J, Yamazoe M, Hidaka M, Mitani H, Toyoda A, Sakaki Y, Plasterk RH, Cuppen E. (2006) Generation of medaka gene knockout models by target-selected mutagenesis. *G e n o m e B i o l*. 7(12):R116. 査読有
27. Yoshimura A, Kohzaki M, Nakamura J, Asagoshi K, Sonoda E, Hou E, Prasad R, Wilson SH, Tano K, Yasui A, Lan L, Seki M, Wood RD, Arakawa H, Buerstedde JM, Hohegger H, Okada T, Hiraoka M, Takeda S. (2006) Vertebrate POLQ and POL β cooperate in Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage. *M o l C e l l*. 24:115-25. 査読有
28. Guo C, Tang TS, Bienko M, Parker JL, Bielen AB, Sonoda E, Takeda S, Ulrich HD, Dikic I, Friedberg EC. (2006) Ubiquitin-Binding Motifs in REV1 Protein Are Required For Its Role in the Tolerance of DNA Damage. *M o l C e l l B i o l*. 26: 8892-900. 査読有
29. Sonoda E, Hohegger H, Saberi A, Taniguchi Y, Takeda S. (2006) Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *D N A R e p a i r (A m s t)* 5: 1021-9. (Review) 査読有
30. Guo C, Sonoda E, Tang TS, Parker JL, Bielen AB, Takeda S, Ulrich HD, Friedberg EC. (2006) REV1 Protein Interacts with PCNA: Significance of the REV1 BRCT Domain In Vitro and In Vivo. *M o l C e l l*. 23: 265-71. 査読有
31. Nakamura K, Sakai W, Kawamoto T, Bree RT, Lowndes NF, Takeda S, Taniguchi Y. (2006) Genetic dissection of vertebrate 53BP1: a major role in non-homologous end joining of DNA double strand breaks. *D N A R e p a i r (A m s t)* 5: 741-749. 査読有
32. Xiaohua W, Takenaka K, Sonoda E, Hohegger H, Kawanishi S, Kawamoto T, Takeda S, Yamazoe M. (2006) Critical roles for Pol ζ in Cellular Tolerance to Nitric Oxide induced DNA Damage. *C a n c e r R e s*. 66: 748-54. 査読有
33. Nojima K, Hohegger H, Saberi A, Fukushima T, Kikuchi K, Yoshimura M, Orelli BJ, Bishop DK, Hirano S, Ohzeki M, Ishiai M, Yamamoto K, Takata M, Arakawa H, Buerstedde JM, Yamazoe M, Kawamoto T, Araki K, Takahashi JA, Hashimoto N, Takeda S, Sonoda E. (2005) Multiple repair pathways mediate tolerance to chemotherapeutic cross-linking agents in vertebrate cells. *C a n c e r R e s*. 65: 11704-11. 査読有
34. Hatanaka A, Yamazoe M, Sale J.E., Takata M, Yamamoto K, Kitao H, Sonoda E, Kikuchi K, Yonetani Y, Takeda S. (2005) 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. *M o l C e l l B i o l*. 25: 1124-34. 査読有
35. 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. (2005) Dual Roles for DNA Polymerase η in Homologous DNA Recombination and Translesion DNA Synthesis. *M o l C e l l*. 20: 793-9. 査読有

〔学会発表〕(計 7件)

1. Takeda S: “ Differential Functional Interactions between the RNF8 and RAD18 E3 ubiquitin ligases in Translesion DNA Synthesis and DSB Repair ”
EMBO-Recombination Mechanism, Il Ciocco, Italy, 5/17-20, 2010. (発表予定だったが、直前に家族の事情によりキャンセル)
2. 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.
3. 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.
4. Takeda S: “Reverse Genetic Study of RAD51 mediators, BRCA1, BRCA2, RAD51 paralogs, RAD52, Srs1, and Sfr1” FASEB Genetic Recombination and Genome Rerangements, Snowmass Village, Colorado, USA, Aug 2-7, 2009.
5. 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.
6. Takeda S: “Regulation of DNA damage response by ubiquitin ligases ” DNA Repair, Crete, Greece, April 20-23, 2009.
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.

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：60188191

(2) 研究分担者

谷口 善仁 (TANIGUCHI YOSHIHITO)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：00342840