

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「組換えを介したゲノム動態制御」
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）
研究代表者 柴田 武彦 （独立行政法人理化学研究所 主任研究員）
主たる研究参加者
小川 英行 （岩手看護短期大学 学長）
武田 俊一 （京都大学大学院医学研究科 教授）

3. 研究内容及び成果：

相同 DNA 組換えはゲノムのプログラムに従って制御されている機能の一つである。本プロジェクトの目的は、相同 DNA 組換えによるゲノム構成の動態を制御する機構を解明すること、及び、この機構の解明より特定の遺伝子座の組換えを人為的に制御する効率の良い条件を見出し、それを品種改良や遺伝子治療に応用することである。

二本鎖が切断された DNA は、従来修復され難いとされてきたが、最近の研究によって効率よく修復されることが明らかになってきた。この二本鎖切断を正確に修復する機能を担っているのは相同組換えであり、相同組換えは損傷を受け DNA 合成が停止した場合の一本鎖ギャップの修復にも関与していることも判明している。

本プロジェクトにおける柴田グループの大きな研究目的は、出芽酵母、分裂酵母、ニワトリ B リンパ細胞株などで組換えに関与する一連の遺伝子の組換えでの機能解析である。特に、プログラムされた二本鎖切断とその制御に働くクロマチン構造動態に焦点を当てて相同 DNA 組換え開始制御機構の解明を目指した。柴田グループは、蛋白質や DNA の生化学的解析手法の他に高分解能立体構造解析の手法を組み合わせる多角的な手法を用い、組換え開始とその制御に働くいろいろな分子反応やそれを触媒する蛋白質群の機能を明らかにしたが、これらの幅広い研究手法の採用によって、分子反応の総体として相同 DNA 組換えとその制御機構の理解と、その理解を基礎にしたゲノム動態制御技術の創出に目度がついたことでその成果は十分に評価できよう。

具体的には、特に酵母を使った遺伝学的手法によって相同 DNA 組換えに働く遺伝子群の機能と情報伝達、諸反応のカスケードの研究から Mre11 蛋白質を中心とする相同 DNA 組換え開始制御に働く遺伝子系と、その上流、下流で働く細胞内情報伝達系の大枠を明らかにした。

一方、遺伝学的手法と細胞生物学的手法という異なる *in vivo* 解析に *in vitro* の生化学的解析を合わせ、減数分裂期相同 DNA 組換え開始に働く DNA 二本鎖切断導入制御について独自の研究を進展させ、2つの階層のクロマチン構造変化（クロマチン再編成とクロマチン DNA 遷移）による DNA 二本鎖切断の位置とタイミング制御機構の存在を明らかにした。また、それぞれの階層で働く蛋白質群についての研究を進め、特に、クロマチン DNA 遷移と DNA 二本鎖切断修復に働く Mre11 蛋白質は、それぞれの機能に対応する2つの独立した機能ドメインをもつことを明らかにした。更に、クロマチン再編成に働くヒストンアセチ

ル化や、ATP 依存的クロマチン・リモデリング因子の相同 DNA 組換え開始制御での機能、その上流で働く細胞内情報伝達系ネットワークを明らかにした。これらの研究により、多段階の過程で制御されている相同 DNA 組換えを誘導する DNA 二本鎖切断の概要がかなり明らかになったと言えよう。

これらの成果を基礎に、柴田らはかなり限られた条件ではあるが、高等動物細胞と出芽酵母で、それぞれ相同 DNA 組換えをタイミング制御とゲノム上の部位制御により、細胞集団の数 10%のレベルで誘導することに成功し、これは相同 DNA 組換えの応用、実用化へ繋がる可能性がある。

一方、柴田グループは RecA/Rad51 属蛋白質の相同 DNA 対合反応の解析結果より相同的 DNA 対合の分子機構モデルを提唱している。すなわち、相同的 DNA 対合は、RecA/Rad51 蛋白質等特定の蛋白質群の特異機能ではなく、DNA 自身が内在する機能であり、これより更に RecA/Rad51 蛋白質とは、ATP 要求性や立体構造を全く異にし、互いにも構造的共通性があまりない Rad52 蛋白質等一群の ATP を必要としない相同的 DNA 対合蛋白質群の存在を明らかにした。

この成果の一つがミトコンドリア DNA の相同組換えに必要な Mhr1 蛋白質である。ミトコンドリアゲノムでの相同組換えは、これまであまり注目されてこなかったが、柴田グループはミトコンドリア相同 DNA 組換え機能の解明を目指した研究から、これまで遺伝的多様化に働くと考えられてきた相同組換えが、多様化したゲノム情報の均質化に働くという機能をも担っていることと、相同的 DNA 対合蛋白質が中心的働きをするゲノム情報均質化の機構の存在を明らかにした。

ニワトリ B リンパ細胞株を使って高等動物での組換え機構については、Rad51 蛋白質の高等動物で多数あるパラログ分子 (Rad51B、Rad51C、Rad51D、XRCC2、XRCC3) について多重変異解析を進め、それぞれの機能分担について重要な知見を得た。例えば、その機能が明らかではなかった Rad52 蛋白質もまた、相同 DNA 組換え修復で XRCC2 や XRCC3 と並行した経路で働いていることを明らかにした。更に、乳ガンの原因遺伝子である Brca2 について逆遺伝学的解析を進め、Brca2 や Rad51 パラログと Rad52 が、それぞれ組み換え部位での Rad51 の重合反応にどのように関与しているかについて、モデルを導いた。また、高等動物細胞では、DNA 二本鎖切断に対して相同組換え修復とは別に働くエラープロンな修復である非相同性 DNA 切断端結合についても研究を進め、これらの二本鎖切断修復経路は、互いに相補的であると同時に競合的關係でもあることを明らかにした。即ち、poly [ADP ribose]polymerase-I の研究から、それが、非相同性 DNA 切断端結合に働く ku70 を DNA 切断端より剥がすことによって相同 DNA 組み換えによる DNA 二本鎖切断修復を促進すると結論づけた。

このように柴田グループは酵母とニワトリ培養細胞で順・逆遺伝学で遺伝子の機能を同定する研究からクロマチンレベルで働く相同 DNA 組換え開始制御の概要を明らかにし、二本鎖切断修復初期に働く高等動物での多重経路の存在と制御の一端を明らかにした。また、DNA 組換え反応の現場で働く蛋白質、DNA の機能と構造相関の解析から、それまで知られていなかった一群の組換え蛋白質群の存在を明らかにし、ゲノム情報の均質化という相同 DNA 組換えの新機能を見つけた。また、組換え開始制御機構についての理解を酵母とニワトリ培養細胞に戻って当てはめ、実際に人為的制御でそれらの相同 DNA 組換えを高頻度で誘導

することができるようになった。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表は海外で49件掲載された。柴田グループは、組換えを介したゲノム動態制御というテーマのもとに幾つかの関連グループと共同で組換えのメカニズムに関する基礎的、且つ興味深い成果を挙げてきた。特に酵母からニワトリ細胞による多種類の相同組換え系における幅広い研究成果を基に多くの研究成果を得、クロマチンレベルにおける相同組換え制御について、概要とは言え、その大まかなメカニズムについてのコンセプトを提唱した。より具体的成果としても二重鎖切断修復初期に働く高等動物での組換えの多重の経路の存在とその制御について重要な知見を得、さらにDNA組換え反応に働く、従来知られていなかった一群のタンパク質群の存在を明らかにしたことも評価されよう。また、将来の応用に繋がる成果として人為的に相同組換えを高頻度で誘導する条件を見つけるなど、組換え研究において多岐に亘る貢献が見られた。

このような成果について、当然のことながらアドバイザーは高い評価を与えたが、一方幾つかの問題点が指摘された。最も多く指摘されたのは柴田グループに属する3つのグループの研究活動の間の連携が明確でなく、相乗的な成果が認められないという指摘である。また、これと関係して多くのアドバイザーが一致して指摘したのは全体の組換えに関する研究の焦点が決まらなかったという点である。結論としては、柴田グループの個々の研究グループのレベルは高いし、国際的評価も高いことは認められるが、本グループの最初における3つのサブグループ形成が妥当であったかどうかについての疑問が提起される。なお、柴田グループは国内7件、海外5件の特許出願をしており、このような基礎的分野にも関わらず知的所有権を確立しようとする努力は評価される。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

柴田グループの研究課題は、「組換えを介したゲノム動態制御」であるが、柴田グループの戦略目標は、組換えという重要な生命現象に関する、かなり広範な研究課題を含むものであった。この戦略目標に対して柴田グループは、他の2つのグループと共同して幅広い立場からこの重要な生命現象に対して多くの新しい知見を得、本分野において世界的なリーダーの一つとしてその立場を確立したと言えよう。本分野はまた、今後極めて基礎的研究の色彩が強いが、今後におけるバイオテクノロジーの発展に応じて、その応用化、実用化が期待されるものであり、その分野への貢献も大いに期待される。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

平成15年度日本生化学会奨励賞 凌 楓 “ミトコンドリア遺伝の基本分子機構”