

独立行政法人理化学研究所
遺伝生化学研究室 主任研究員

柴田 武彦

「組換えを介したゲノム動態制御」

研究期間：平成10年12月1日～平成15年11月30日

1. 研究実施の概要

本研究の目的は、2点に括れる。第1が、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。第2に、この機構の解明により特定の遺伝子座の組換えを人為的に制御することで初めて実現できる効率の良い合理的品種改良や安全な遺伝子治療を行うための基盤技術を提供することである。現在でも「相同DNA組換えは、確率現象であって人為的制御はできない」、あるいは、「特に高等動植物の細胞では、原理的に相同DNA組換えはほとんど起きない」という考え方が一般に流布している。ところが、1960年代後半以後カビや出芽酵母の減数分裂期相同DNA組換えや組換え修復に働く遺伝子群の研究や、1978, 9年の小川らや柴田らのRecA蛋白質のDNA依存性ATP分解活性や相同的DNA対合活性の発見等がきっかけで盛んになった相同DNA組換えに働く蛋白質群の分子機能研究から、相同DNA組換えもまた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ことが明らかになっている。

二本鎖DNAは、損傷や複製エラーを相手の鎖の塩基配列を鋳型して修復することで膨大な遺伝情報を子孫へ正確に伝えることができる。しかし、二本鎖DNAの二本鎖切断はこの方法では修復できないので修復され難いと考えられていたが、二本鎖切断は通常のDNA複製の間でもしばしば起こり、極めて効率よく正確に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うのが相同DNA組換えである。また、減数分裂期等での相同DNA組換えの開始制御は知られる限りプログラムされたDNA二本鎖切断導入である。DNA二本鎖切断の他に、DNAの傷のところでDNA合成が停止しその下流から合成が回復した場合に傷の向かい側に残される一本鎖ギャップも相同DNA組換えによって極めて効果的に修復されることも知られている。すなわち、DNA二本鎖切断導入や一本鎖DNAギャップ生成が相同DNA組換えの頻度を決めていると理解できる。

相同DNA組換えの実行と制御に関わっている蛋白質は数十を越えるが、細菌からヒトまで、進化を通してかなりの程度保存されている。そこで、出芽酵母や分裂酵母という順・逆遺伝学を駆使できるモデル実験系や容易に大量調製ができる細菌の蛋白質での研究が先導し、それらのホモログの研究から、高等動物での相同DNA組換えの機構が次第に明らかになるという形で研究が進展している。我々は、まず、出芽酵母と分裂酵母に加えて、高等真核細胞で唯一逆遺伝学ができるニワトリBリンパ細胞株で各遺伝子の組換えでの機能解析という先導研究を行った。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すことにした。次に、蛋白質やDNAの生化学的解析に、高分解能立体構造解析の手法を組み合わせることで組換え開始とそ

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、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を目指した。その結果、相同DNA組換え開始制御機構の概要が明らかになり、それを基に出芽酵母とニワトリ細胞において、数10%レベルで相同DNA組換えを遺伝子地図上での部位を指定して、または、タイミングを指定して誘導することができるようになった。

具体的には、小川らと、柴田らは、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、さらに、これまで知られていなかった相同DNA組換えの機能を求めて研究を進めた。特に、小川らが同定した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。例えば、Mre11-Rad50-Xrs2/Nbs1 複合体が、センサーとして二本鎖切断を感知して活性化される2種の損傷チェックポイント経路を活性化することが、小川らによって発見された。それらの内、Tel1に依存する経路はMre11蛋白質のリン酸化を通して、二本鎖切断端での一本鎖域形成開始制御に働いている。また、柴田らは、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発展させ、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。また、DNA二本鎖切断活性を担うといわれていたSpo11蛋白質もまたそれに先立つクロマチンDNA遷移にも働く。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二本鎖切断の概要を明らかにした。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初めて成功し、相同DNA組換えの利用技術への道を拓いた。

相同DNA組換え機構の内、最も興味深い点は、数kbのDNAが、長大な染色体DNAの中から自己と同一の配列をもつ部位を検索できることにある。この能力ゆえに指定遺伝子ロックアウトも可能になる。柴田らは、蛋白質やDNAの生化学的解析と

高分解能立体構造解析によって組換えの分子機構を解析してきた。特に、同一の配列をもつ部位を検索するとき中心的役割をもつRecA/Rad51属蛋白質が行う相同DNA対合反応の解析結果を基礎にした相同的DNA対合の分子機構モデルから、「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る」という仮説を導き、その仮説を出発点に、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。そ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DNA組換えは、これまであまり注目されてこなかった。柴田らは、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DNA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を初めて明らかにした。更に、明らかにされた機構の検証の一つとして、相同的DNA対合蛋白質の活性の度を調節することで、ゲノム情報均質化の速度を人為的に制御できることを実演した。相同的DNA対合蛋白質に依存するゲノム情報均質化は核ゲノム中の繰り返し配列でも知られており、柴田らが明らかにした相同的DNA対合蛋白質に依存するゲノム情報均質化機構の普遍性も注目される。

武田らは、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を解析してきた。特に、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、これまで、単独の変異では機能欠損が顕著でなく、その高等動物で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。

武田らは、更に、高等動物細胞では、DNA二本鎖切断に対して相同DNA組換え修復とは別に働く誤りがち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。

以上述べたように、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先導研究から入り、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。

2. 研究構想

I. 提案課題の背景

5年前は、ヒト、高等植物のゲノムについても全一次構造解析の完成が視野に入ってきた時代である。そこで、次世代のゲノム研究・技術では、高等動植物を対象にした遺伝子機能の総合的解明と、遺伝子治療も含むゲノム改変技術の開拓が標的になるであろうと考え、本研究を、この双方向の流れに対して相同DNA組換えを切り口に、新規技術の素材と予測・安全評価に必要な理論の基盤を提供しようという目的で提案した。

ゲノムは、従来の通念と異なり動的存在である。ゲノムの動的挙動には組換えが深く関わっている。組換えはDNAの切断・再結合によって遺伝子配列・遺伝情報が再編成する現象である。中でも、塩基配列が同じDNA領域同士の間で起こる組換えを相同DNA組換えという。機能はまだ十分に分かっていないものが多いが、酵母で存在が分かっているだけで30以上の遺伝子が関与している。そのかなりの遺伝子が、酵母から高等動物までホモログがあり、酵母の研究結果が高等動物での理解につながる。相同DNA組換えはヘテロ二本鎖という、二本のDNA鎖のそれぞれが両親DNAに由来する中間体を介して起こる。これによりヒトの場合 3×10^9 bpsもあるゲノムDNA中で、塩基配列が同じ領域同士で1塩基のずれもなく正確につき換えることを保証できる。

相同DNA組換えには「確率的過程である」と「染色体のどこでも同じ確率で起こる」という2つの誤った通念がある。これは、20世紀初め、Morganが、ショウジョウバエで交叉を発見したことを受けて始まった遺伝子同定のための遺伝子地図（連鎖地図）作製での仮定である。しかし、実際には相同DNA組換えは単なる確率現象ではない。例えば、真核生物では普遍的である減数分裂の第一分裂周期で千倍も活性化される相同DNA組換えのように、遺伝的プログラムで制御された現象である。従って、この組換え制御に人為的に介入できれば、理論的には標的組換え（相同DNA組換えを利用して任意の遺伝子座にDNA断片を組み込むこと）効率を1,000倍以上上げることも可能である。また、相同DNA組換えについては、染色体上に特に組換えがよく起こる領域（ホットスポット）と起こらないサイレント領域があり、染色体構造が制御に重要な働きをしている。体細胞分裂周期の細胞では染色体の組換えを積極的に抑制する機構もあり、その欠陥は早老症等の原因であると考えられている。

相同DNA組換えの代表的なクラスは交叉といい、互いに共通な塩基配列の両側でDNA部分を交換する型の組換えである。交叉は有性生殖と深く関わっている。

減数分裂の初期にすべての相同染色体間で必ず1回は起こる。交叉の異常は、減数分裂での相同染色体不分離という、不正確な染色体の分配となる。同じ遺伝子以外の組み合わせで交叉が起こると当然染色体異常となる。相同DNA組換えのもう一つのクラスが、一方の遺伝子のコピーで同じまたは似た塩基配列をもつ他方の遺伝子を置き換える「ジーンコンバージョン(gene conversion; 本来の訳は「遺伝子変換」であるが、通常この語はより広範囲なゲノム情報の変化を表す目的で使われるようになっている)」がある。減数分裂期相同的組換えでは、交叉に比べ、ジーンコンバージョンが起こる頻度の方が高い。劣性変異の発現によりガン化等を引き起こすloss of heterozygosityはこの型の組換えの寄与が小さくないと考えられる。ホットスポットを持つalleleとないalleleとのジーンコンバージョンでは必ず、ホットスポットが失われる方向に起こるという普遍的特性がある。この特性が、ホットスポットとなる非自己DNAを排除する機構となる。また、相同DNA組換えの機能の一つであるDNA二本鎖切断修復は、DNA二本鎖切断でとぎれたDNA配列を同じ、またはよく似た塩基配列を持つDNAを鋳型にジーンコンバージョンを行うことで回復することである。このクラスの相同DNA組換えは、鋳型が相同染色体や姉妹染色体上の同じ遺伝子でなくても染色体異常を起こさず、よく似た塩基配列を持つ異なる遺伝子同士のジーンコンバージョンは遺伝子部分のシャッフルとなり、新しい機能をもつ遺伝子を作る可能性が小さくなく、ゲノム情報の流動化の大きな原因となる。

以上述べたように相同DNA組換えは、ゲノム流動性に極めて大きな役割を果たしているが、本研究を提案した5年前には、相同DNA組換えによるゲノム流動性については十分な理解にはほど遠い段階であった。

ゲノムの人為的加工は必然的に生物の組換え能力に依存する。ところが、理解不十分の段階で組換えを利用してゲノムを加工しようすると、加工に伴うゲノムの過剰な流動性による問題、加工を排除しようとする恒常性維持による問題の両面にぶつかり、期待通りの結果が得られない。具体的には、(1) 目的としない組換えの方が桁違いに多く起こることと、極めて低い標的組換え(狙った場所での組換え)の率を引き上げる手だての不在により、標的組換えによるDNA導入が困難である。(2) 多数のコピーが直列に取り込まれた場合、組み込まれた遺伝子の発現抑制が起こることがある(多コピー抑制)。(3) 導入された遺伝子で組換えが誘導され、遺伝子導入実験の結果が安定しない。(4) 高等動植物で、細胞を株化するとゲノムの再編成が起こり、特に植物で細胞から個体を再生しようとするときの傷害となる。(5) 結果が予測できない技術は社会に不安を与える。また、(6) ヒトでは、加齢に伴うミトコンドリアゲノム等への変異の蓄積や、Bloom's syndrome、Werner's syndrome

等組換えを介したゲノム流動化が原因と考えられている遺伝疾病が知られている。これらの問題に対する対策・予防と治療技術の基盤としても組換え制御の理解が必要である。(7) 学術面においても組換え制御技術が必要である。遺伝子の未知機能を明らかにする最も有効で普遍的な方法は、細胞内の正常な遺伝子を試験管内加工で得た変異遺伝子で置き換え、その表現型を調べること(逆遺伝学)であるが、現在は、標的組換えの困難さのために適応範囲に限られる。これらの問題点は、ゲノムに侵入した非自己DNAを組換えの活性化によって排除しようとする機構の存在、組換え過程自身でもあるDNA鎖切断・修復での誤りに由来するゲノムの流動化、非自己DNAの組み込み自体を阻止しようとする組換え抑制機構の存在が原因であると考えられる。前述した遺伝性疾患や、Loss of heterozygosityによる劣性変異の発現が引き起こすガン化等は、不十分な組換えの抑制の結果とも考えられる。

DNA二本鎖切断は酸素呼吸の副作用であるDNAの酸化損傷によるDNA傷害が変換されて起こったり、あるいはDNA複製の異常等で起こったりして、生物の活動では避けられない事態である。DNA鎖切断の修復が、非相同性DNA切断端結合のようにDNAの相同性への依存が低い状態で起こると染色体異常や突然変異を招く。これらのDNA鎖切断は加齢や一部の遺伝病に伴う、個体レベルのゲノム流動化の引き金になっていると考えられる。

以上述べた問題の多くは、現在でも解決されていないが、本研究の成果として、相同DNA組換えについての理解がかなり深まり、相同DNA組換えの人為的誘導など、問題解決の糸口をつかむことはできた。

本研究提案を行ったグループのメンバーは、生物で普遍的に相同DNA組換えの要に働くRecA蛋白質の組換え活性(相同的DNA対合)の発見(柴田)、真核生物に普遍的にあるRecA蛋白質ホモログRad51蛋白質の発見(小川ら)という組換えの研究でブレークスルーを行った実績を持つ。これらの発見はいずれも相同DNA組換えの分子レベルでの理解の突破口となった。また、小川は相同DNA組換えと非相同性DNA切断端結合との両方に働くMRE11遺伝子を発見した。太田は組換えホットスポットにおける酵母クロマチンの局所的構造とその変化、ホットスポット消長にともなう染色体構造の動態を初めて明らかにした。凌は発芽酵母ミトコンドリアゲノムの系でゲノム動態への組換え遺伝子の直接支配を明らかにした。武田は、例外的に高い頻度で標的組換えを行う高等動物細胞、鳥類Bリンパ細胞由来のDT40細胞を分離し、方法の項で述べる高等動物では唯一といえる特別有用な細胞系を確立し、この系でなければできないRad51蛋白質等の細胞機能の研究を進めている。これらの研究の蓄積をもとに、組換え制御についての理解を深め、上にあげた問題を解き、人為的組換え制御によるゲノム加工、医療のために新技術基盤の構

築を目指した、「組換えを介したゲノム動態制御」を提案した。

II. 提案した研究方法

(1) シス・トランスに作動する因子の機能解析：個々の因子（蛋白質、RNA、DNA構造）の、組換え、クロマチン構造、染色体ドメイン決定等の細胞機能での働きを主に生化学的手法によって解析する。過去の情報の蓄積と変異体を広く利用するため発芽酵母と分裂酵母とを主材料にする。具体的には、因子それぞれの組換え等での働きを調べる一方、因子のドメイン、ドメイン間相互作用を、変異体解析・生化学的解析を通して明らかにする。更に、それらの因子（全体またはドメイン）、およびそれらのヒトホモログを調製し単体や複合体の細胞機能に働く立体構造と分子間相互作用を明らかにし、分子機能を基礎にした細胞機能の理解を図る。これらの部分は主に柴田 G（グループ）が担当する。ヒトホモログの解析結果は、別途述べるように高等動物でのゲノム改変技術、医療技術に関連する特許の対象として期待できる。

(2) 種間、細胞間の比較解析：染色体のドメイン構造・クロマチンの局所構造とそれらの動態を出芽酵母、分裂酵母、ニワトリBリンパ細胞株間で比較解析する。構造の解析は主に生化学的方法で、また、動態の解析はDNAの構造解析と細胞学的方法で行う。この部分は、柴田 G と武田 G の共同で進める。

(3) 遺伝子機能の解析：ゲノム動態及びゲノム恒常性維持の基本機構に関与する遺伝子機能を、分子生物学的に解析して明らかにする。この研究はその解析手法に最適の出芽酵母を材料に小川 G と柴田 G が担当する。

(4) 高等動物細胞での普遍的機能の検証：両酵母で同定した因子のヒトホモログ、およびその改変体を、対応する内在性因子を欠失させたニワトリBリンパ細胞株へ導入し、その際のゲノム動態、クロマチン構造、組換え能力への影響を解析する。これにより、酵母で得られた知見の高等動物細胞での普遍性を検証し、同時に高等動物での応用技術開発の基礎を築く。この部分は主に武田 G が担当する。ニワトリBリンパ細胞株DT40細胞は、(a) 特徴とする高頻度標的組換えにより比較的容易に目的の遺伝子を破壊できる。(b) 条件依存表現型を持つ変異を確実に作成できる唯一の高等動物細胞系である。細胞の生育に欠かせない遺伝子でも扱える。(c) ヒトの相同遺伝子が代わって完全に機能を再構成できるので、ヒトホモログを直接対象にできるという他では代え難い利点がある。

III. 提案した研究内容

(1) DNA鎖切断の導入・修復とゲノムの流動化制御

1) 酵母核ゲノム：DNA二本鎖切断の正確な修復は相同DNA組換えで行われる。

相同DNA組換えが働かないときには非相同性DNA切断端結合で修復されるが、染色体異常や突然変異を伴う。最近、Nijmegen Breakage Syndromeの研究から示唆されたMre11複合体とチェックポイント制御との関係、また修復が相同DNA組換えによるか（正確な修復）、非相同性DNA切断端結合によるかの選択（誤りがちな修復）をMre11蛋白質複合体がどのように制御しているかを明らかにする。この課題はゲノムの多様化機構とゲノムの恒常性維持機構の交叉点に当たり、この解明によって、ゲノム流動化・恒常性維持の方向決定の仕組みや進化の原動力が明らかになると考えられる。

2) 酵母ミトコンドリアゲノム：ミトコンドリアゲノムは多数のDNAコピーからなり、細胞の世代の間に何度も組換えが起こる。また、柴田Gの 凌は組換え遺伝子の欠損がミトコンドリアゲノムの流動化を促進することを見付けている。そこで、この系をモデルとして、組換え遺伝子のゲノム流動化・恒常性維持での役割を調べる。

(2) 染色体レベルでのゲノム流動性・恒常性制御：

先に挙げた太田らの染色体と組換えの研究の他、相同DNA組換えのホットスポットの分布、サイレント領域の制御に働く遺伝子群の研究から、ゲノムの流動性・恒常性の制御で中心的役割をしているのは、染色体構造・クロマチン構造にあると考え、その動態とそれにシス・トランスに働く因子群（DNA構造、蛋白質、RNA）の機能を追究する。

(1) 組換え抑制：染色体の組換え活性領域・不活性領域での染色体構造の違い、活性領域形成、サイレンシングにシスまたはトランスに働く因子群、その機構を研究する。既に、酵母について染色体構造の視点からの解析を始めている。酵母、ニワトリBリンパ細胞株の染色体構造の比較解析から高等動物細胞での相同DNA組換え抑制機構についての手掛かりをつかめないか検討する。

(2) 組換え誘導：相同DNA組換え誘発での染色体構造の動態、そこに働くDNA上のシス因子群、蛋白質等トランス因子群を取りあげる。シス因子として、非自己DNAのホットスポット形成機構解明を目指し、非自己DNAと自己DNAとの連結点に出現するホットスポットでの染色体構造の解析を進めている。また、染色体にホットスポットを誘導するヘプタマーDNA配列（M26変異；分裂酵母）と共同作用するシスに作動する因子、未知のシス因子群の同定も試みる。トランスに作動する因子としては、特に、Rad51, Mre11, Rad50, Xrs2, Rad54, Spo11, Mts1, Mts2等、酵母から高等動物までホモログが存在するもの、これらの蛋白質と共同作業をする因子を重点的に解析する。提案者グループでは、Rad51蛋白質、Mre11蛋白質の複

数の機能ドメインを明らかにしつつある。例えば酵母のMre11のC末端ドメインは強い二本鎖DNA結合能を持ち、それは染色体構造の変動を介して減数分裂期の組換え開始に働くDNA二本鎖切断に重要な役割を果たす。一方、N末端近くのドメインはDNase活性を担い、それは二本鎖切断の修復に必要であるといったことが分かりつつある(太田、小川G)。これらドメインの機能の解析も更に推進する。

(3) 動物細胞株でのゲノム改変技術の試み：前項での研究に並行して、*Rad51*, *Mre11*, *Rad50*, *Rad54*, *Spo11*等の発現の効果、因子の活性を促進する変異の標的組換え・非標的組換えに対する効果を、内在性遺伝子をヒトホモログ遺伝子で置き換えたDT40株を用いて調べる。既に*Rad51*, *Rad54*, *Mre11*について検討を進めている。また、武田が持っているニワトリBリンパ細胞株DT40細胞の組換え関連遺伝子の変異体クローンのライブラリー、HPRT遺伝子を利用した容易な標的組換え評価系は、この研究のための貴重な資産である。この成果は直接ヒト等高等動物での標的組換え技術開発の基礎となる。

IV. 本研究提案当時の将来展望

細胞が本来持つ組換え蛋白質等ゲノム動態を支配する因子の活性発現を人工的に制御したり、それら因子を活性化させる改変を加えて、標的組換えやゲノム動態を目的に合わせて制御することによって、「背景」で述べた問題点を解決できる可能性が組換え関連の研究の進展で、最近急速に増した。本研究で得られる知見は、この可能性を現実のものとするために大いに寄与すると考える。また、本研究で採り上げるゲノム動態を支配する可能性をもつ因子群、組換えを制御する因子群のなかで直接それらの制御に働くことが明らかになったものは、新ゲノム改変技術の素材、活性制御分子や抗ガン剤等治療薬のスクリーニングやドラッグデザインの手段、遺伝病診断のマーカーとして特許の対象となる。特に、制御の根幹に関わる因子が見つければ、新技術の基本特許ともなりえる。また、個々の因子の機能ドメインの知識は、それらの活性強化型改変因子をデザインしたり、低分子による活性制御系を構築するときの理論的基礎を与える。また、デザインされた因子そのものも新技術の素材として特許の対象となる。因子のもつ機能に直結する新しい分子の立体構造も、制御活性低分子や抗ガン剤等治療薬のスクリーニングの手段、遺伝病診断のマーカーとして特許の対象になると聞いている。

安全評価の基礎：ゲノム動態を正確に予測する理論は、ゲノム改変の効率やその産物の安定性を上げるばかりではなく、安全評価の基礎となる。客観性のある安全評価は社会的受容性がとかく問題になりそうなゲノム改変において特に重要な意味をもつ。

以上述べた構想で本研究を提案し、推進した。その結果、以下に述べるように提案した構想を大きく変えることなく研究を行い、相同DNA組換え開始とその制御機構について理解を深め、実際のその理解を基に限定的ではあるが、細胞集団の数10%レベルでの相同DNA組換え誘導制御を酵母と高等動物細胞で実行できるようになった。更に全く意外な成果として、ゲノム情報の多様化に働くといわれていた相同DNA組換えが、多様化したゲノム情報の均質化にも働くこと、ATPを必要としない相同的DNA対合蛋白質を中心とする均質化機構を明らかにした。特にこの部分は他に全く類似研究がない領域である。

3 . 研究成果

3 . 1 序：相同DNA組換えの機構

酵母での組換え欠損変異体の遺伝学的解析が先導し、哺乳類のホモログ遺伝子の同定が進んだ。更に、本研究の成果も加えて、真核生物の減数分裂では普遍的に図3.1-1に示したような経路によって相同的組換え初期過程が進むと考えられている。プログラムされたDNA二本鎖切断では、転写因子と重なる因子群による

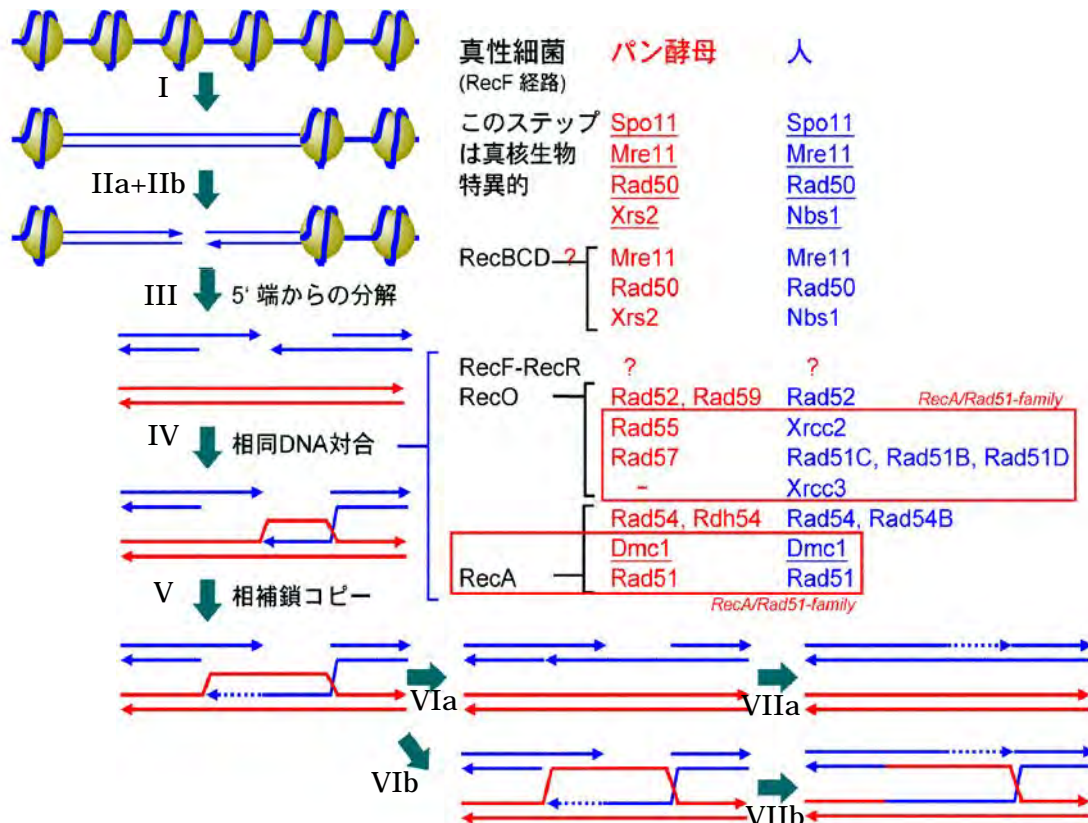


図 3.1-1 相同 DNA 組換え初期・中期過程

ジーンコンバージョンは最後まで、交叉はホリデー中間体形成までの過程を示す。これまでは、ホリデー中間体の分離の方向でジーンコンバージョンと交叉が起こると考えられていたが、小川 G 等の研究で、ジーンコンバージョンと交叉への方向付けは、ヘテロ二本鎖形成直後に行われると考えられるようになってきた。ローマ数字はステップを示す。ステップ II-IV の右側に示したのは、対応するステップに働く代表的な真生細菌、出芽酵母、ヒトの遺伝子名である。同じ行の名前は互いにホモログであることを示す。VIIb によってホリデー中間体ができる。ホリデー中間体で外側の DNA 鎖が切れるとジーンコンバージョンを起こした部位の両側で交叉になる。2 つの DNA をつないでいる部分が切れると、VIIa 同様に、ジーンコンバージョンだけになる。

クロマチン再編成 (I段階) で組換え開始点近傍のヌクレオソームが排除され作用蛋白質がDNAに働く環境ができる。次に、Spo11とMre11が働いて開始点で局所的クロマチン構造やDNA構造の変化が起こり (クロマチンDNA遷移; IIa段階)、さらに、Rad50, Xrs2 (Nbs1) が加わりSpo11が活性化されて開始点で二本鎖切断が起こる (IIb段階)。また、このようなプログラムされた二本鎖切断や傷としてできた

二本鎖切断に、Mre11, Rad50, Xrs2 (Nbs1) が働いて3' 突出一本鎖末端域ができる (III段階)。そこにRecA/Rad51族蛋白質群とRad54やRad52が働き傷がないDNAの中から同じ塩基配列 (相同DNA) を探し出し分子間二本鎖 (ヘテロ二本鎖) という普遍的中間体を作り2つのDNAを対合する (相同DNA対合反応、IV段階)。次に、ヘテロ二本鎖を作った一本鎖末端域の3' 端から、相同DNAを鋳型にDNA修復合成を行い切断で失われた塩基配列を回復する。相同DNAを鋳型に切断部位を越えて合成されたDNA部分が二本鎖切断の相手側とアニールするとジーンコンバージョン (VIa, VIIa) へ、そのDNA合成で置き換えられたDループへ切断端の相手がアニールすると交叉への中間体であるホリデー中間体ができる (VIb, VIIb)。二本鎖切断の正確な修復はほぼ全て相同DNA組換えで行われる。このことは、二本鎖切断の位置とタイミングで相同DNA組換えが制御されることを示す。

以上、現在広く受け入れられている相同DNA組換え経路のモデルを基に、本研究の成果を以下に述べる。

3.2 “DNA鎖切断導入・修復、ゲノム流動化制御遺伝子 (小川グループ)”

(1) 研究内容及び成果

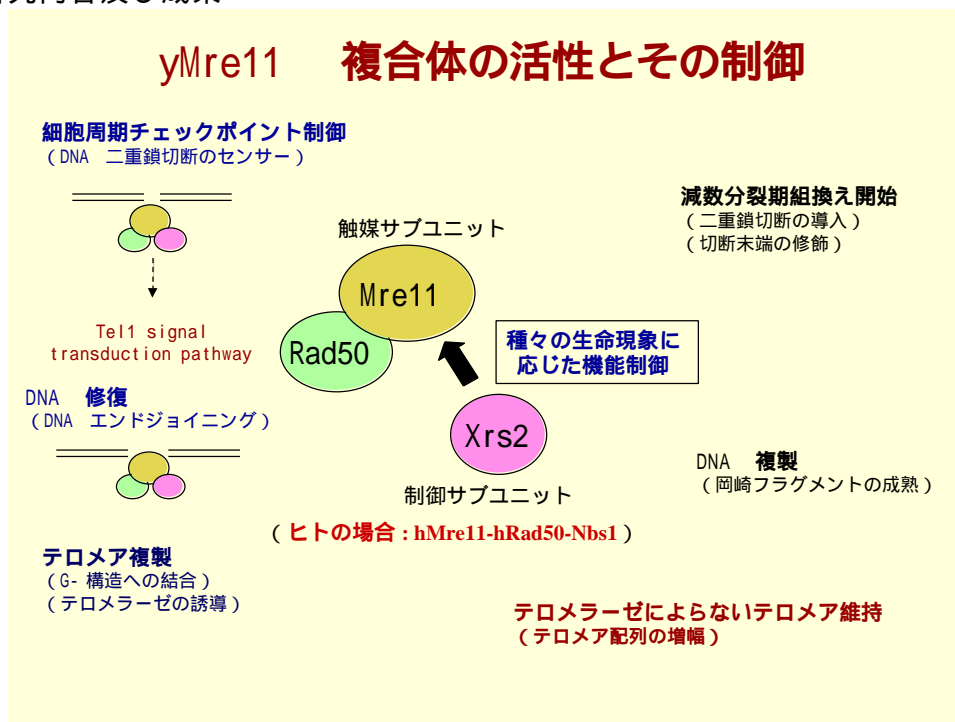


図 3.2-1 Mre11 蛋白質の活性とその制御

ゲノムの多様性を生み出し生物進化を促進する役割をしてきたのが、遺伝的組換えの機構である。この仕組みはあらゆる生物に備わっている。一方、ゲノムを構成

する遺伝情報の担い手であるDNA分子は、細胞内外の種々の要因で様々な傷害を受けている。同一分子は細胞当たり一ないし二分子しかないので、その傷害は細胞にとって致命的である。生物はこれらの傷害を修復する機構を生み出して遺伝情報の恒常性を維持してきた。この両機構の中心部を担うのが、組換えに關与する遺伝子群で、その中でもここで扱うMre11蛋白質複合体は、遺伝的組換えの開始を制御する一方、DNA傷害の中でも細胞にとっては最も致死性を導きやすい傷害、DNA二重鎖切断の修復にも關与する興味深い性質の蛋白質複合体である。しかもこの蛋白質は、図3.2-1に示したように、さらにもっと多様な生物現象にも関わっていることが明らかになった。我々は先ず、このような多様な機能を持つMRE11/RAD50/XRS2複合体（Mre11複合体）の中心的な機能であるヌクレアーゼ活性機能について、細胞内と試験管内の結果が一致しないことからもたらされた一つの混乱を解決した。

1) Mre11複合体がDNA二重鎖切断端に形成する一本鎖部分は、3'-端が突出した形である

組換え過程の開始は、Mre11複合体が關与してSpo11トポイソメラーゼが、組換えホットスポットと呼ばれる場所にDNA二重鎖切断を導入して始まる（図3.1-1 ステップIIaとIIb）。組換え過程が不可逆的となるその第一歩は、二重鎖切断後に、引き続きMre11複合体が直接關与して行われる、切断端の一本鎖化である。この反応によって、3'端が突出した一本鎖部分が作られ（図3.1-1 ステップIII）、それが以後の相同なDNA分子の検索と組換え中間体の形成に使われる。

Mre11複合体蛋白質を精製して、その活性を明らかにしたところ、この複合体の中核であるMre11はDNA二重鎖切断端を一本鎖化する活性を持つが、細胞内の活性とは全く反対に、5'端が突出した一本鎖を作ることが分かった。この矛盾は、細胞内におけるMre11複合体の働きに疑念を持たせることになった。我々は、MRE11遺伝子の欠損を補うことのできる遺伝子の探索をしていたが、EXO1遺伝子を多コピープラスミド乗せて細胞に導入し、その発現を増やすことで、MRE11遺伝子の欠損によるDNA二重鎖切断の修復能欠損が、大幅に回復することが分かった。

図3.2-2はメチルメタンスルホン酸各濃度に対する酵母株の生存曲線である。図からわかるように、mre11欠損株（*mre11*/Yeplac195）はEXO1遺伝子を載せた多コピープラスミド（YEplEXO1）を導入することによって（*mre11*/YEplEXO1）、生存曲線が改善している。

*Exo1*のコードするエキソヌクレアーゼは、5'から3'方向へ働く酵素で3'端の突出した一本鎖を作ることから、Mre11複合体の細胞内での働きは、従来考えられてい

たことが正しいことが確認された。*exo1*と*mre11*の二重変異株では、二つの欠損の効果が相乗的に表れることから、この二つのエキソヌクレアーゼ活性は、同じ経路ではなく独立の経路で働くことが明らかになった。

*EXO1*遺伝子が欠損すると、遺伝的組換え体形成に大きな変化が起きる。交叉型組換え体の頻度が約1/2に低下する。これに対して非交叉型組換え体の形成頻度は変わらない。このことは次ぎに述べる組換え特異的なヘリカーゼの遺伝子*MER3*と共に、組換え中間体の形成時あるいはそれ以前の過程の時に、2種類の型の組換え体が形成されることが決まっていることを示唆している。

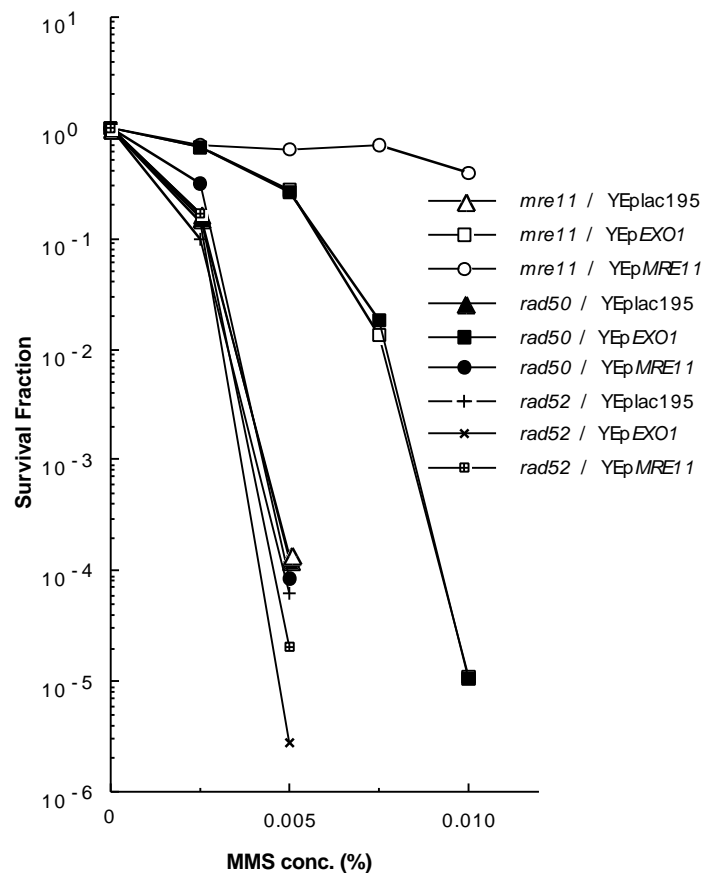


図3.2-2 メチルメタンスルホン酸に対する酵母変異株の感受性

2) 組換え中間体形成に必要な新ヘリカーゼ遺伝子*MER3*を発見した

組換えの開始であるDNA二重鎖切断に関与する遺伝子、*MER2*はイントロンを持つが、そのスプライシングに必要な配列は、共通配列から外れていて、そのスプライシングには、新たに我々の発見した*MRE2*遺伝子と先に他のグループによって見つけられていた*MER1*遺伝子が必要である。しかしこの*MRE2*と*MER1*は*MER2*だけではなく更に別の組換えに関与する遺伝子のpre-mRNAのスプライシングにも同時に関与していることを見つけ、その遺伝子*MER3*を今回我々は同定した。組換えに関与する一連の遺伝子の発現が、これらの遺伝子に共通の因子*MRE2*、*MER1*

によってスプライシングを介して共に調節されていることは、組換え過程の制御を考える上で大変に興味深い。

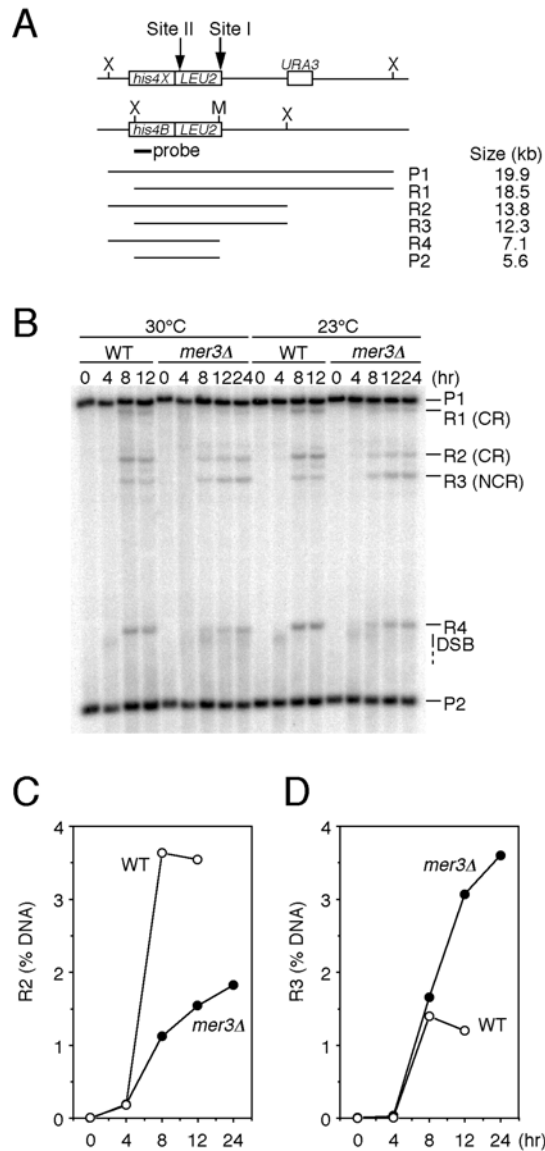


図 3.2-3 交叉型組換え体と非交叉型組換え体

A : 組換え体 DNA を検出する為の親 DNA 分子の構造。制限酵素 XhoI (X) と MluI (M) の切断部位が異なる。X と M で切断後に検出される DNA 断片で、P1, P2 は親分子から、R1 ~ R4 は組換え体分子から。B ; 各分子を分離したゲル電気泳動像。C : 交叉型組換え体分子 R2 の割合の野生型と *mer3Δ* での減数分裂の時間毎の比較。D ; 非交叉型組換え体分子 R3 の割合を C と同様に比較したもの

今回発見した *MER3* 遺伝子は、コード開始点から 59 塩基目から 210 塩基目までの領域がイントロンであり、スプライシングに必要な 5' スプライシング部位と分岐点にそれぞれ一塩基だけ標準の配列からの違いがあるために、そのスプライシングには *MRE2* と *MER1* を必要としている。 *MER3* の最大の特徴は、その蛋白質がヘリ

ケースに共通のアミノ酸配列を持つことで、組換えに参与するヘリカーズ重が見つかったのは、これが最初である。*MER3*遺伝子が欠損すると、DNA二本鎖の切断とその後の切断端の一本鎖化は起こるが、一本鎖化が過剰に進み組換え中間体の形成頻度が低下する。このことから*MER3*のヘリカーゼ活性が組換え中間体の形成に重要な働きをしていることが分かる。そしてこの遺伝子の欠損では、DNA分子のレベルで見ると、交叉型組換え体の形成の頻度が2.4分の一に低下し、逆に非交叉型組換え体の形成頻度がほぼ同じ倍率で増加することが分かった(図3.2-2)。このことは組換え中間体形成時という組換え過程の初期の段階で、組換え体の型が規定されていることを示唆している。これまで組換え体の型は、組換え過程の最終段階、即ち形成された組換え中間体から組換え体分子が形成される際の、切断されるDNA鎖の違いによるとされて説の再検討が必要ではないかと考える。

3) Mre11複合体がセンサーの新DNA傷害チェックポイント経路発見

組換え過程はDNA二重鎖切断の導入によって開始されるが、本来このDNA二重鎖切断は、細胞にとって遺伝情報の消失に繋がり致死にも至る傷害となるもので、減数分裂の過程で敢えてそのような危険を冒すからには、十分なバックアップの仕組みの備えがなければならない。我々は、DNA二重鎖切断に伴って誘導される細胞周期チェックポイント経路を新しく発見し解析することに成功した。

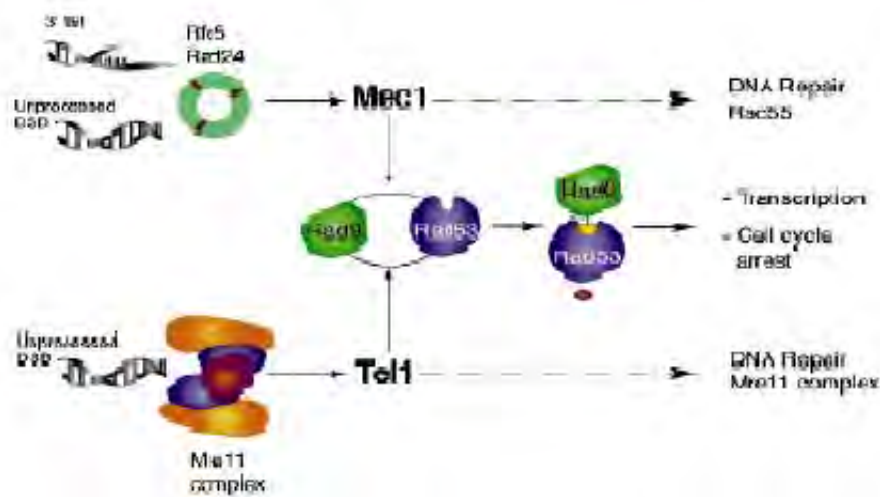


図3.2-4 Mre11複合体がセンサーの新DNA傷害チェックポイント経路とMec1に依存するチェックポイント経路

DNA傷害によって誘導されるチェックポイント機能で中心的な役割をする遺伝子に*MEC1*があるが、この遺伝子が欠損すると、DNA傷害、例えばメチルメタンスルホン酸に高感受性となる。ところがこれに更に*rad50S*変異か*sae2*変異を導

入すると、その高感受性は大幅に抑制され、DNA傷害に対して抵抗性となる。*rad50S*および*sae2* 変異の導入によって、新しいチェックポイント機能が活性化されたに違いない。DNA傷害の感受性を大幅に軽減させたチェックポイント機能は、*TEL1*と*Rad53*、*Rad9*が関与する経路であり、その経路のセンサーとしてはMre11複合体が関与していることが明らかになった(図3.2-4参照)。つまり、Mre11複合体の変化により、この複合体がDNA 傷害を検知するセンサーとなり、新しくTel1経路を活性化し、DNA傷害の修復を助けたのである。この経路は、減数分裂の際の組換えの開始反応であるDNA二重鎖切断の時にも働き、このときには組換え反応に特異的に関与するキナーゼ遺伝子*MRE4*も関与する。

4) Mre11複合体中のXrs2の役割が明らかになった。

DNA傷害の修復に関するかぎり、Xrs2はC-末端近くの32アミノ酸の領域だけで十分で、その領域はMre11 に結合してMre11を核内に移行させる役割をする。Mre11とRad50が核内にあれば、Xrs2が存在しなくてもDNA傷害の修復には十分であることが分かった。テロメアの維持には、その32アミノ酸領域の他にそのC-末側に隣接する104アミノ酸領域が、減数分裂期の孢子形成、孢子の生物活性、また組換えには、32アミノ酸領域の他にそのN-末端側に隣接する49アミノ酸領域が必要であることが分かった。

(2) 研究成果の今後期待される効果

研究内容及び成果の項の1)では、エキソヌクラーゼExo1が交叉型組換え体の形成に関わることを明らかにした。また同じ項の2)で、ヘリケースであるMer3が欠損すると、交叉型組換え体が減少し非交叉型組換え体が増加することも発見した。両酵素ともに組換え中間体の形成前あるいは途上で働くと考えられるので、交叉型組換え体の形成は少なくとも組換え中間体形成時に運命付けられる可能性が出てきた。このことは、従来両者の型の組換え体は、組換え中間体であるHolliday構造から、組換え体が分離する時に、どのDNA 鎖が切断されて分離するかによって両者の型が決まるとするモデルとは異なるものである。この問題は、組換え機構の中でも最も基本的なもので、大きな論議を呼ぶものである。今後、どちらであるか、徹底的に検証が行われなければならない。

研究成果の3)でDNA傷害をMre11複合体が認識して誘導する新しいチェックポイント経路を明かにした。この経路ではMre11 複合体は傷害検出のセンサーであると同時に、チェックポイント経路の指示をうけて、組換え過程の進行やDNA修復の実行を行うことが示唆されている。このようなMre11 複合体とDNA傷害チェックポイント系との相互情報交換がどのような機構で行われているかは、大変に興

味のある課題で今後の展開が特に期待されるものである。

研究成果4)では、多機能のMre11 複合体の機能を制御していると考えられた、構成要素の一つXrs2の役割が明確になった。驚くべきことにMre11 複合体が関与するDNA 傷害の修復には、Xrs2 はC-端近くの32アミノ酸領域だけで十分であることが分かった。その32アミノ酸領域はMre11 との結合部位で、Mre11を核内に移行させる役割を持つだけである。DNA 傷害の修復に関しては、Mre11 とRad50 が核内にありさえすれば十分で、Xrs 2 は必要がないことが判明した。テロメアの維持と減数分裂期の機能：組換え、胞子形成、胞子の生存には、32アミノ酸のほかにそれぞれ2あるいは3個の限られた領域が必要であることが明確になった。今後はそれらの領域はどのような働きをするのか、またそれらの領域と相互作用する因子は何か明かにされなければならない。

3.3 “染色体レベルのゲノム流動性・恒常性制御研究（柴田グループ）”

(1) 研究内容及び成果

1) クロマチン再編成

分裂酵母の*ade6*遺伝子座の1塩基置換変異でできたCRE様塩基配列が減数分裂期組換えホットスポットM26である。CRE (cyclic AMP-responsive element) とは、栄養飢餓状態でcAMPが減少すると活性化される遺伝子のプロモータ（転写調節・開始領域）によく見られる転写因子結合配列である。太田らは、この配列に特異的に結合するCREB/ATF 型転写因子Atf1-Pcr1が、栄養飢餓に反応する環状AMP依存性キナーゼ経路、ストレス応答に関わるMAPキナーゼ経路、接合型フェロモン応答で働く3種類の情報伝達系の複合支配下で活性化すること（図3.3-1）、活性化されるAtf1-Pcr1依存的に部位周辺に誘導されるGcn5等によるヒストンのアセチル化によってホットスポット周辺のヌクレオソームの大規模な再編成やそれに引き続く二本鎖切断・組換えが促進されることを明らかにした。

更に、アセチル化したヒストンに働きかけてクロマチン再編成を誘導するATP依存性クロマチン再編成因子Swi/Snf複合体の遺伝子*snf22*を突き止めた。*snf22*について遺伝子破壊実験を行ったところ、M26部位でのクロマチン再編成が完全に抑えられると同時に、相同的組換えホットスポット機能も失われた。以上より、栄養飢餓ストレス下で組換えホットスポットに結合したCREB/ATF 型転写因子が活性化して組換えホットスポット近傍のヒストンのアセチル化が促進され、Swi/Snfクロマチン再編成因子によりクロマチン再編成が誘導され、その結果開いたDNA部位に二本鎖切断因子群が働ける環境ができることが明らかになった。

一方、Tup11 Tup12という転写抑制因子が、このクロマチン再編成を抑制する因子として機能していることも示した。これらの因子の欠損により、常時CRE様配列でクロマチンが開いた状態になること、また各遺伝子座のクロマチン構造や転写活性に関する種々のストレスに対しての選択的応答性が完全に失われることなどを突き止めた。これに加え、天然のCRE様配列でも同様なクロマチン再編成やDNA切断の誘導が起きることを示し、上記の制御系が分裂酵母本来の組換え(またストレス応答時の転写)制御系の一つとして、極めて重要な役割を果たしていることを明らかにした(図3.1-1 ステップI-IIb)。

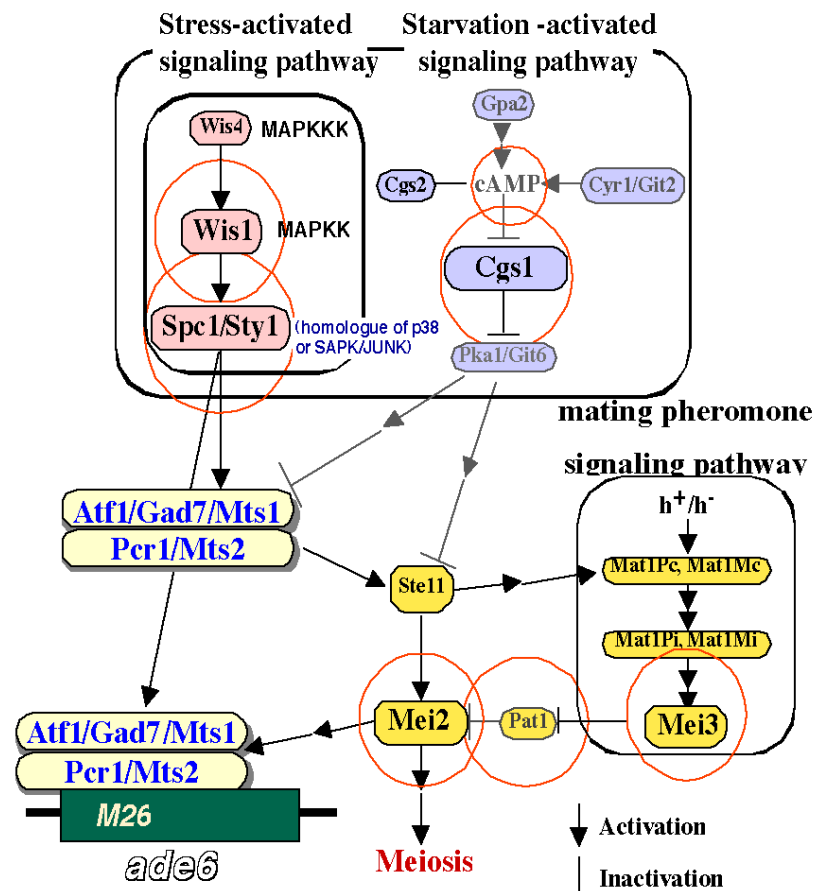


図 3.3-1 分裂酵母の減数分裂期相同的組換え開始制御に働く細胞内情報伝達系

2) クロマチンDNA遷移と二本鎖切断

太田らは提案に先立つ研究で、出芽酵母と分裂酵母で、減数分裂期相同DNA組換え開始は、クロマチン構造が開いた部位で起こること、ただし、クロマチン構造が開いた部位がすべて組換え開始部位として機能するわけではないことを見出していた (Ohta, et al. (1994) EMBO J. 13, 5754)。即ち、多数の開いたクロマチン構造を取る領域の中で、減数分裂特異的に認められる球菌ヌクレアーゼ感受性の増大として観察される局所的なクロマチンもしくはDNA構造の変化(クロマチンDNA遷

移；図3.1-1 ステップIIa) が起き、そのような特徴を有する箇所でDNA切断が誘導されることを明らかにしてきた。本研究で太田らは、クロマチンDNA遷移には、小川らが発見したMre11が必要なこと、その他にRec102、Rec104、Rec114やSki8等の因子も必要であることを明らかにした。Mre11蛋白質は2つの独立した機能ドメインからなっており、N末端側は二本鎖切断の修復に働くが、それに必要な活性中心は、減数分裂期二本鎖切断には必要ないこと、一方C末端は減数分裂期二本鎖切断に特異的に必要なことを明らかにした。更に減数分裂期開始を特徴づける前減数分裂期DNA複製も、クロマチンDNA遷移に必要なことを明らかにした。太田らは、また、二本鎖切断に必要と言われていたRad50、Xrs2/Nbs1は、クロマチンDNA遷移には不要であるが、Spo11の切断活性の活性化に必要であることを明らかにした。意外なことに、二本鎖切断活性を担うといわれているSpo11蛋白質もまた、クロマチンDNA遷移に必要なことである。このことは、Spo11蛋白質が二本鎖切断部位に結合するだけでは、Spo11蛋白質が担う二本鎖切断活性は発現せず、Rad50蛋白質などの協力により初めてDNA切断活性が生じることを示唆する。SPO11遺伝子は、減数分裂期に特異的に転写誘導されることが知られているが、それ以外の時期に転写させても減数分裂期特異的にした二本鎖切断は誘導されなかった。このことも、DNA結合後の活性化段階が必要なことを示す。この一連の研究でクロマチン構造が開くだけでなく、そのようなクロマチン環境でクロマチンDNA遷移が生じた後、二本鎖切断が導入されるという反応経路が明らかにされた (図3.3-2；図3.1-1 ステップIIa)。

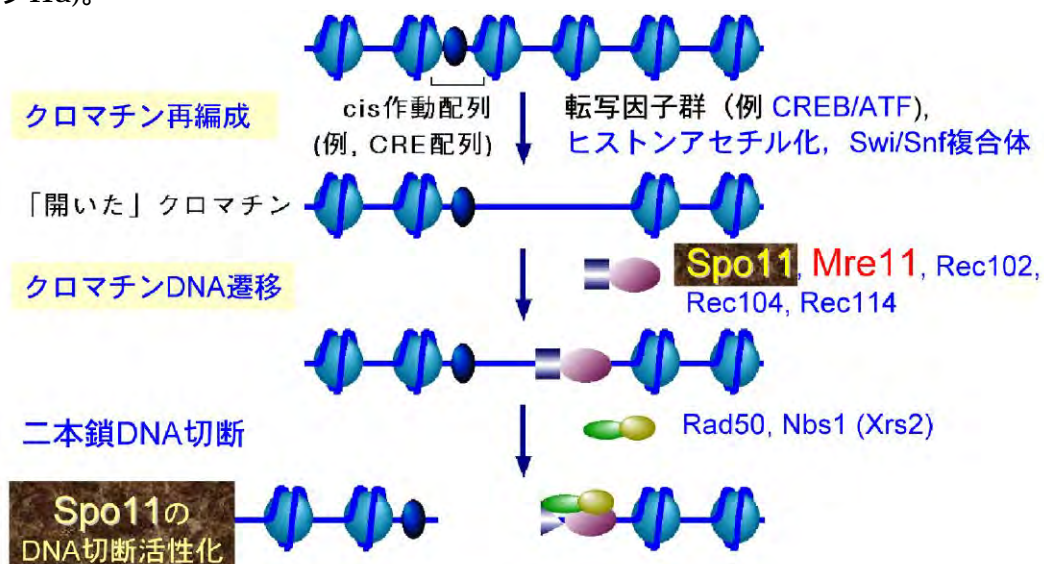


図 3.3-2 2階層のクロマチン構造変化による減数分裂期二本鎖切断導入制御とそれに働く遺伝子群 (出芽酵母での名称で代表)

3) Mre11蛋白質による減数分裂期転写制御の可能性

出芽酵母 *mre11* 遺伝子破壊株は減数分裂期にDNA二本鎖切断を起こすことができず、また孢子形成に欠損を示す。一方、同様に二本鎖切断を欠損する *spo11* 遺伝子変異株では、孢子形成に問題は生じない。したがって、*mre11* 遺伝子破壊株で見られる孢子形成異常は二本鎖切断の欠損にともなう結果ではなく、何らかの別の要因によってもたらされている可能性が高い。そこで、*mre11* 遺伝子破壊株における減数分裂期の全ゲノムの転写プロファイル、DNA マイクロアレイを用いて調べた。その結果、ほとんどの遺伝子では野生型同様の転写レベルの変動が見られたが、減数分裂中期遺伝子のうち、ごく一部の遺伝子群の発現活性化が特異的かつ強く阻害されていた。これら全ての遺伝子の制御領域には減数分裂中期遺伝子の発現に必要な Middle Sporulation Element (MSE) という配列が見出された。また、抗Mre11蛋白質抗体を用いたクロマチン免疫沈降法を行ったところ、減数分裂初期にMre11蛋白質が一群のMSE配列の周辺に顕著に集積していることが明らかになった。おそらく、MSEに結合する転写因子Ndt80の転写活性化にMre11蛋白質が何らかの形で寄与していること、言い換えると、Mre11蛋白質もまた広い意味での転写因子であることが示唆された。また、以上の結果は、組換えの制御と組換え以降に起きる配偶子形成のための遺伝子活性化が分子レベルでリンクしている可能性を示唆する。

4) 大腸菌DinIの構造とRecA蛋白不活性化機構

大腸菌のRecA蛋白質は、ATPとの結合、その分解で自身のDNAへの結合の強さを変えることによって、ヘテロ二本鎖形成、安定化の反応全過程を行う。一方、

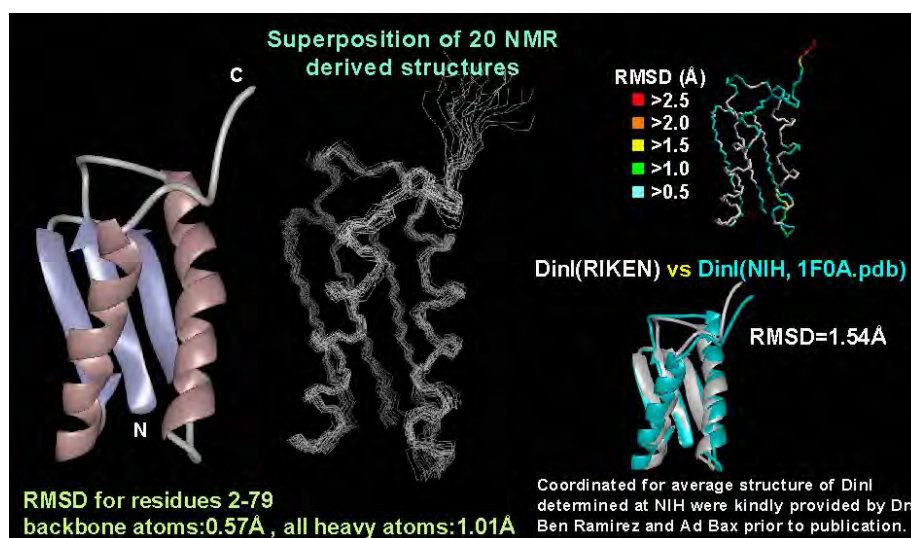


図3.3-3 NMRによって解かれたDinI蛋白質の立体構造

ヒトのRecA 蛋白質ホモログであるRad51蛋白質は、Rad51C蛋白質-Xrcc3蛋白質、Xrcc3-HsRad51 蛋白質、HsRad51蛋白質-Brca2 蛋白質などのようにRecA蛋白質ホモログ同士、他の蛋白質と、互いの直接作用のネットワークを持つ。一方、特にRad51C蛋白質の場合は、後述するようにヘテロ二本鎖形成にATPを必要とせず、DNAへの結合の強さは、Xrcc3との会合によって支配されている。そこで、蛋白質-蛋白質相互作用による活性調節について、RecA蛋白質をモデル系として分子構造の面から解析した。DinI蛋白質自身はDNAへの結合能を持たないが、DNA修復終了時に直接結合することでRecA蛋白質を不活性型に戻す。NMRで決定したDinI蛋白質の全構造を図3.3-3に示す。DinI蛋白質と複合体をつくったRecA蛋白質に結合する事によるオリゴ一本鎖DNAの伸長構造の誘導をNMRで確認し、DinIとの結合でRecA蛋白質がDNA結合能を失うという通説を排除し、むしろDinIのRecA蛋白質への結合がSOSレプレッサーなど基質とRecA蛋白質との結合と競合することによる活性調節であると考えた。

5) Rad51パラログ蛋白質の新規な機能

相同的組換えにおいて相同的DNA対合、修復DNA複製に続いてできる普遍的な中間体がホリデー中間体である。ホリデー中間体は交叉型相同的組換えでは必須な中間体である。真性細菌ではRuvC蛋白質のような、またミトコンドリアではCce1蛋白質のような1種類のポリペプチドからなるエンドヌクレアゼが、ホリデー中間体の分離・組換え体DNA成立に働いている。真核生物の核染色体の交叉で働くホリデー中間体解離エンドヌクレアゼは、多くの研究者が探す努力を払ったが明らかになっていない。胡桃坂らにより、Rad51パラログの一つ（それ自身では相同DNA対合反応活性を持たないRad51B蛋白質）が、相同DNA対合反応が起こった直後に形成されるホリデー中間体構造に結合する活性も持つことが示され、ホリデー中間体に機能する可能性が初めて示唆された。

6) 指定遺伝子座での相同的組換え高頻度誘導

既に述べたように、二本鎖切断の正確な修復のほぼすべてが、相同DNA組換えによって行われる。また、2つの階層のクロマチン構造変化で、相同的組換えを誘導する二本鎖切断の位置とタイミングが制御されている。更に、それらのクロマチン構造変化誘導に働く遺伝子群とそれらがコードする蛋白質の機能のあらましがわかってきた。それ故、クロマチン構造動態を制御し、二本鎖切断を人為的に誘導することで組換えの起こる染色体上の位置（遺伝子座）やタイミングを制御できるはずである。そこで、減数分裂期相同DNA組換えを誘導する二本鎖切断を触媒するエンドヌクレアゼであり、また、それに先だって相同的組換え開始部位の決定

にも関わるSpo11蛋白質を加工して、染色体の任意の箇所を相同DNA組換えを誘導する実験を行った。具体的には出芽酵母のGal4転写因子の配列特異的DNA結合ドメインをSpo11に融合した蛋白質を作製し、出芽酵母株で発現誘導を行った。この融合タンパク質を発現する酵母細胞を減数分裂に誘導したところ、GAL2遺伝子のプロモータ部位に存在するGal4蛋白質結合部位において、本来見られない人工的なDNA切断が誘導形成されることを見出した。この部位は、本来、DNA切断が全く観察されない組換えコールド領域に存在しており、プロモータ部位のクロマチン構造も減数分裂期に入ってもほとんど変化が見られなが、Spo11蛋白質を発現させた場合は、減数分裂期にクロマチンDNA遷移が誘導された (図3.3-4)。これらの結果、最終的には全細胞集団の1/4まで相同DNA組換えを部位特異的に活性化できることを明らかにした (太田；仏国 A. Nicolas博士との共同研究)。Spo11蛋白質は全ての真核生物で保存されていると考えられているので、融合させるDNA結合部位を適宜選ぶことで、原理的に種々の生物種の任意染色体部位で相同DNA組換えを人為的に誘導する技術の核になると期待できる。

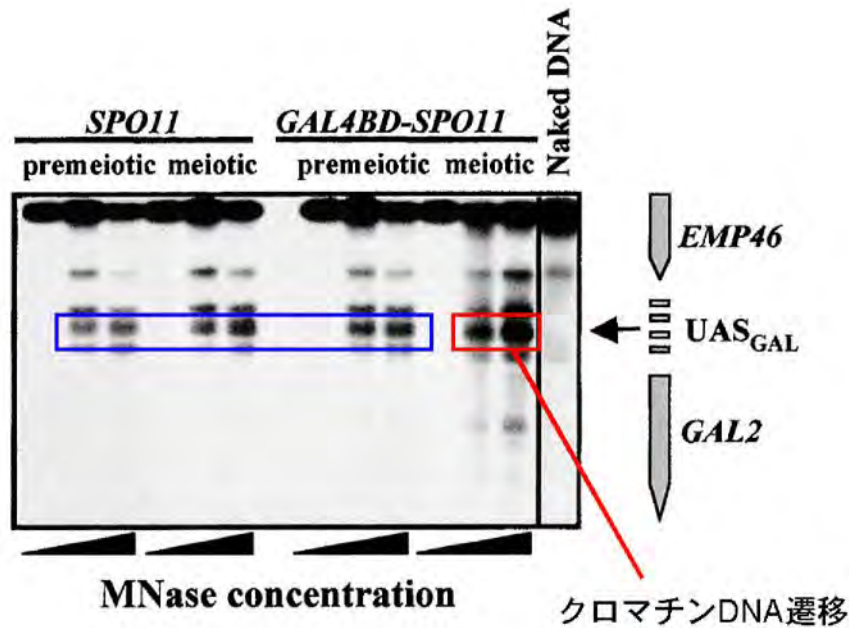


図 3.3-4 Gal4 結合部位を融合した Spo11 蛋白質を発現する減数分裂期細胞で起こる GAL2 プロモータ域特異的なクロマチン遷移 (シグナルが meiotic で、premeiotic に比べて著しく濃くなることで検出する。Pecina, et al. (2002) Cell 111, 173)。

一方、本来的に相同DNA組換え活性が高い唯一の高等動物株化細胞であるニワトリBリンパ細胞株についてクロマチン構造をゆるめる条件へ誘導したところ、特定遺伝子座で相同的組換えの頻度が2桁ほど増加し、細胞集団の半数で相同DNA組換えを誘導する事ができた。また、その細胞を通常の状態へ戻すと相同的組換えの頻度が誘導前のレベルに戻すことができた (太田)。以上述べたように、本課題

の基礎研究成果を発展させることで、起こる位置とタイミングの双方を制御し、しかも数10%レベルの頻度で相同DNA組換えを人為的に誘導する可能性を初めて示すことができた。

(2) 研究成果の今後期待される効果

1) 相同的組換え開始の制御機構

この研究成果は、相同的組換えの開始に働く、生物のおかれた環境とゲノムのプログラムによる精緻な制御機構に働く細胞情報伝達系の一端を明らかにしたこと、その情報伝達系の支配下で、相同的組換え開始のタイミングと遺伝子地図上の位置の制御は、クロマチン構造動態を介して行われていることを明らかにした。細菌から真核生物まで、いくつかの生物で、栄養飢餓にすると相同的組換えが誘導されることが知られている。特に、真核生物では減数分裂誘導を通して行われている。本研究で、減数分裂を誘導する経路に併せて、栄養飢餓によって活性化される情報伝達系とストレスによって活性化される情報伝達系の三者が複合的に相同的組換え開始制御にクロマチン再編成を通して働くことを実際に示すことができた。従来、相同的組換えにより遺伝的な多様性を増やすことが環境変動に適応するために必要であるとの議論がされてきたが、上記の成果は、生物にとって生存に関わる栄養の悪化を直接感知して相同的組換えを誘導するシステムが実在することを示したことになる。更に、この研究は、出芽酵母では体細胞分裂期にも相同的組換えにより外来DNAを相同的組換えにより染色体に組み込め得るのに対して、酵母をのぞくカビから高等動植物では何故それができないのかという疑問にも一つの回答を与えている。その鍵は、クロマチン構造である。出芽酵母では、知られる限り減数分裂期相同的組換え開始部位（組換えホットスポット）の位置は、元々クロマチンが開いているところ（DNA分解酵素高感受性部位）と一致している。それに対して、より高等生物に近いといわれている分裂酵母では、組換え開始部位で閉じているクロマチンを開くという過程が相同的組換え開始制御に加わっていることを明らかにした。クロマチンが開いている部位に組換え開始部位が重なっているという発見は、米国のDr. M. Lichtenのグループ（Wu & Lichten (1994) *Science* 263, 515）と同時期であったが、出芽酵母と分裂酵母両方で働くクロマチン遷移と分裂酵母で見つかるクロマチン再編成というクロマチン動態の相同的組換え開始制御での働きの発見は柴田Gの太田らが行い（Ohta, *et al.* (1994) *EMBO J.* 13, 5754; Mizuno, *et al.* (1997) *Genes Dev.* 11, 876）それを発展させたのが上記の成果である。以後、相同的組換え開始に働くクロマチン動態の研究は、太田らが世界の中心になっている。染色体のドメイン構造による相同的組換え開始制御の存在が知られているが、組換え

を抑制するヘテロクロマチン以外については、その実体は未だ明らかではなく、高等動植物での相長的組換え開始制御機構を理解するためには、更に高次の染色体構造の働きを研究する必要がある。更に、二本鎖切断に関する生化学では、役者はかなり明らかになったが、それらの活性発現機構についてはSpo11蛋白質の活性を持つ状態での単離が壁になって進んでいない。また、高等植物ではゲノムプロジェクトの成果としてや分裂酵母では太田らの研究で、Spo11蛋白質のヴァリエントが複数見つかったが、それらの機能分担についての研究はこれからである。以上述べたように、相長的組換え開始制御は、概要がとらえられ、そこに働く役者が明らかになり、これからの研究の方向が見えてきた状況といえる。

2) 相長的組換え開始の人為的制御技術の実現

一般に、ある現象の機構とそこに働く法則が明らかになれば、それを人為的に制御することが可能になる。成果で述べたように、太田らは、フランスキュリー研究所のDr. A. Nicolasのグループとの共同研究で出芽酵母で、特定遺伝子座をねらって集団の1/4の細胞で人為的の相長的組換えを誘導することに成功した。また、ニワトリBリンパ細胞株では、集団の半数の細胞で特別な遺伝子座ではあるが相長的組換えを人為的に誘導することに成功した。これにより似た塩基配列同士の間シャッフルを培養細胞内で高頻度に行わせることができ、新しい機能をもつ蛋白質の遺伝子を生きた細胞で直接創ることが可能になった。一般には、高等動物細胞の相長的組換えでは、「高頻度」を唱っているものでも組換えた細胞は集団の 10^{-5} 程度である。相長的組換え頻度が高いといわれる出芽酵母の減数分裂期組換えにおいて組換えホットスポットでの組換えでも組換えた細胞は集団の10%以下である。この手法は現在特許を申請中で、実用技術を目指した開発研究を進めている。更に研究を進めることで、高等動植物細胞で染色体上のねらった任意の遺伝子座で相長的組換えを誘導できるようになると機能未知の遺伝子の機能を解析する汎用的手段(ポイント変異導入による機能解析)として使えるようになる。一方、有性世代での掛け合わせを重ねることで行われている伝統的育種技術に取って代わる培養細胞での育種技術が原理的に可能になり、100年以上の技術の蓄積をもつ育種の速さを同じ原理を使って10-100倍加速できる。提案では、「本研究課題は、--- 染色体組換えを切り口に、新規技術の素材と予測・安全評価に必要な理論の基盤を提供しようという目的で提案する。」と書いたが、実際に高等動物と出芽酵母で、限られた条件とはいえ、実際に数10%レベルで相長的組換えを誘導することができたことは、5年前の予測を越えている。

3.4 “ミトコンドリアでの相長的組換えの機能：遺伝情報均質化（柴田グループ）”

(1) 研究内容及び成果

これまで、相長的組換えは遺伝的多様性を作り出す機構であると理解されてきた。「ゲノム動態制御」というには、遺伝的多様性を抑制する、あるいは、多様化したゲノム情報を均質化する機構を手に入れる必要もある。多様化したゲノム情報を均一化する機構の存在は、ミトコンドリアの「ホモプラスミー」と、核染色体の繰り返し配列が多くの場合同一の塩基配列からなる均質系であることから示唆されていたが、その実体はほとんど分かっていなかった。相長的組換えの要を担う、同じ塩基配列をもつ一本鎖DNAと二本鎖DNAとを対合させ、分子間二本鎖（ヘテロ二本鎖）を作る反応である相長的DNA対合の分子機構を明らかにしようという研究が、多様化したゲノム情報を均質化する相長的DNA対合を核とする機構の存在を明らかにした。

1) 相同DNA対合とヘテロ二本鎖接合形成

一本鎖DNAにRecA蛋白質やその酵母ホモログであるRad51蛋白質が働くと傷のない二本鎖DNA内部の同じ塩基配列部分を探し出してヘテロ二本鎖を作る。RecA蛋白質またはRad51蛋白質に一本鎖が結合すると全長が、同じ塩基配列を持つ二本鎖DNAの1.5倍に伸長することが電子顕微鏡観察による研究で知られていた。我々は、RecA蛋白質または、Rad51蛋白質に結合した一本鎖DNA（オリゴマー）の立体構造をNMRによって解いた。その結果、各ヌクレオチド残基のデオキシリボース環のデオキシ部位である2'メチレン基とその残基の3'側に隣接する残基の塩基との相互作用によって塩基間の距離がB型DNAの3.5 の1.5 倍に当た

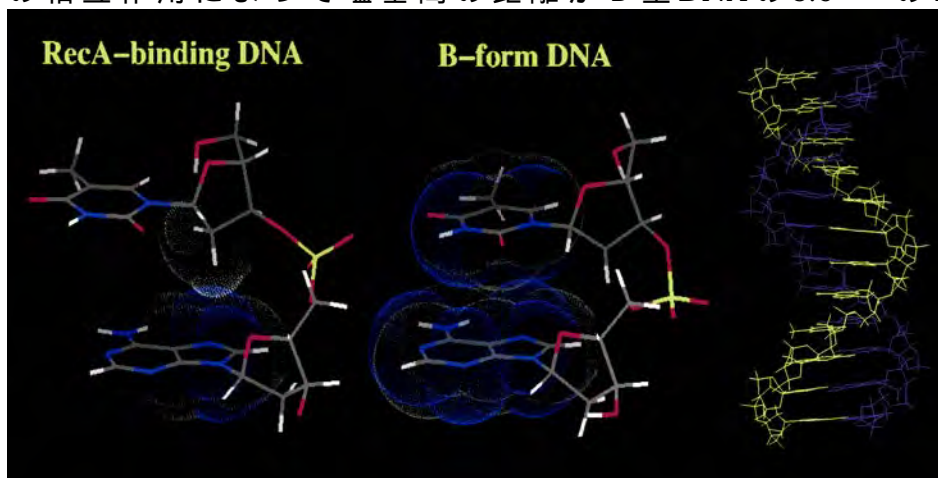


図 3.4-1 RecA/Rad51 蛋白質に結合して伸長した一本鎖 DNA の立体構造

左側に、NMR によって解かれた RecA/Rad51 蛋白質への結合で誘導された伸長構造を示した。中央は、比較のため示した B 型二本鎖 DNA（右側）の片側部分の 2 塩基分である (Nishinaka, et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 6623)。

る5 の間隔に引き延ばされたDNA立体構造が明らかになった (図3.4-1)。この伸長構造をとると、一本鎖でも二本鎖でも塩基はデオキシリボース環のパッカー(環の平面からの歪み)の転換で水平に大きく回転でき、塩基間のワトソン・クリック相互作用によって二本鎖DNAと一本鎖DNAとの間で塩基配列の相補性を認識するという機構モデルが導かれた。相同的組換えにおけるデオキシリボース環の2'メチレン基とその残基の3'側に隣接する残基の塩基との相互作用の重要さは、RNAをゲノム情報の単体とするRNAウイルスでは相同的組換えが比較的希な現象であること、および、知られる限りRNAウイルスで知られる相同的組換えの機構は相同的対合を伴わない、鋳型交換によって起こることから支持される。また、我々自身のNMRによる解析でも同じ塩基配列をもつ一本鎖RNAオリゴマーでは、上記のような立体構造が誘導されなかった。

我々がRecA蛋白質に結合したDNAのNMR構造から導いた相同的DNA対合機構のモデルでは、すべての反応段階が分子の熱運動だけで説明でき、ATP分解によるエネルギーの補充は必要ない。RecA蛋白質は強力に、酵母Rad51蛋白質は弱いながら、ATP存在下で相同DNA対合反応を行う。RecA蛋白質の場合、ATPは相同的DNA対合反応に必要なものであるが、その水解は必要ないことは知られている。上記のDNA立体構造と相同的DNA対合機構のモデルは、相同的DNA対合は、RecA蛋白質のような特定の蛋白質が行う特異的な反応ではなく、DNA分子に内在する機能であることを示唆する。もし、この示唆が正しいのならば、RecA蛋白質とは全く異なる相同的DNA対合蛋白質群があるはずである。

相同的DNA対合反応は、閉環状二本鎖DNAと相同な一本鎖DNA断片とからDループを形成する活性によって検出できる (Shibata, *et al.* (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1638)。文献的には、大腸菌のRecO蛋白質とRecT蛋白質がATPを加えない条件下でDループを形成する活性をもつことがそれぞれ1報ずつ報告されていたが (Luisideluca (1995) *J. Bacteriol.* 177, 566; Noirot & Kolodner (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 12274)、組換えでの機能についての研究はそれ以上発表されなかった。胡桃坂らは、ヒトのRad51蛋白質パラログがヘテロ複合体(XRCC3-Rad51C, XRCC2-Rad51D)で、また、RecA/Rad51蛋白質とはアミノ酸配列も、電子顕微鏡で観察できる構造でも共通性が認められないヒトRad52蛋白質が単独で、相同DNA対合反応を行うことを見つけた。これらの蛋白質による相同DNA対合反応にはATPは必要ではなく、促進効果もない。更に、柴田らは、ミトコンドリアDNA(mtDNA)の相同的組換えと修復に必要な遺伝子であり、やはりRecA蛋白質とは構造的な共通性がないMHR1がコードするMhr1蛋白質もまた、ATPを必要とせず相同的DNA対合を行う活性を持つことを見つけた (図3.4-2)。

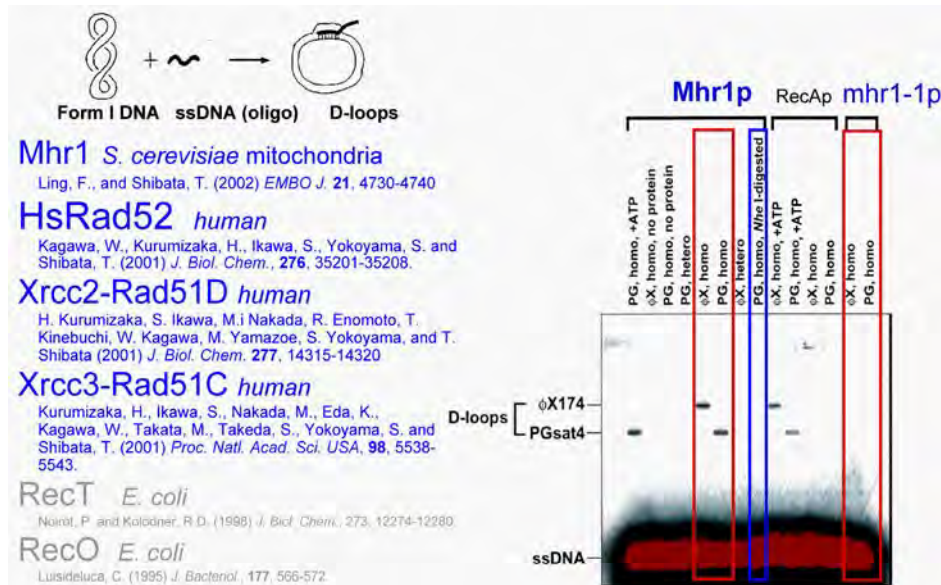


図 3.4-2 ATP を必要としない相長的 DNA 対合蛋白質

青字で示した蛋白質が、本研究で明らかになった蛋白質群である。左上は、Dループアッセーの概要を示している。一本鎖 DNA (oligo) を ^{32}P で標識した。右側は、一例として Mhr1 蛋白質でのアッセーの結果を示した。mhr1-1 変異蛋白質では Dループ形成反応が認められない。

Rad51蛋白質のパラログをのぞくと、上記のATPを必要とする相長的DNA対合蛋白質相互間でもアミノ酸配列で見ると共通性は認められない。胡桃坂らは、生物種間で共通性が保たれており、それ自身で相長的DNA対合活性をもつRad52蛋白質N末端ドメイン(ヒト由来)のX線結晶構造解析により、Rad52蛋白質はラセン構造をつくるRecA蛋白質とは異なり11量体のリングを作り、DNA結合部位はリングの下面に沿って配置されていることを明らかにした。これから分かるDNAの結合様式は、ラセン構造の内部にDNAが結合するRecA/Rad51蛋白質の場合と全く異なることが明らかになった。これらの結果は、相長的DNA対合が特定蛋白質による特異的な反応ではなく、DNA自身に内在する機能であるという仮説を支持する。

2) ミトコンドリアDNA遺伝での相長的組換えの機能

酵母やヒトなどで全ゲノム塩基配列が解かれた現在でも、これまでミトコンドリア由来のRecA蛋白質ホモログは見つかっていない。一方、出芽酵母でミトコンドリアDNA組換えを損なう1塩基置換変異であるmhr1-1変異体から分離したmhr1-1蛋白質は、相長的DNA対合活性を示さなかったことから、出芽酵母のミトコンドリアでは、RecA蛋白質とは別種の蛋白質であるMhr1蛋白質が相長的組換えを行っている結論できる。

ミトコンドリアでは母性遺伝のため高等動物で掛け合わせによる相同DNA組換えが観察されない。そのためか、これまでミトコンドリアDNA(mtDNA)の相同DNA組換えの機能は無視されてきた。凌は、全ての生物で最初のmtDNA組換え欠損変異mhr1-1を出芽酵母から分離した。mhr1-1変異体はmtDNA組換え欠損と

修復能欠損以外に、一見相同的組換えと無関係に見える、mtDNAの娘細胞への分配の欠損という表現型を持っている。*mhr1-1* 変異の効果と細胞増殖でのmtDNAの形態動態の解析から、これまで全く知られていなかった新規なmtDNA遺伝の機構のモデルを導いた(図3.4-3)。即ち、Mhr1蛋白質によって開始されるmtDNAのローリングサークル型(θ型) DNA複製によって直列にいくつものゲノム単位DNAが連なったコンカテマーができる。一方コンカテマーは、娘細胞へのmtDNA分配の必須中間体で、分配に伴って単位長に切断されるというモデルである。このモデルは、mtDNAの特異的標識とその行方を追う実験の結果等により強く支持された。このDNA複製・分配の機構は大腸菌に感染するファージの複製、ファージ粒子封入の機構に極めてよく似ている。ファージではローリングサークル型DNA複製開始は、相同的組換えに必要な蛋白質が行うことが知られている。

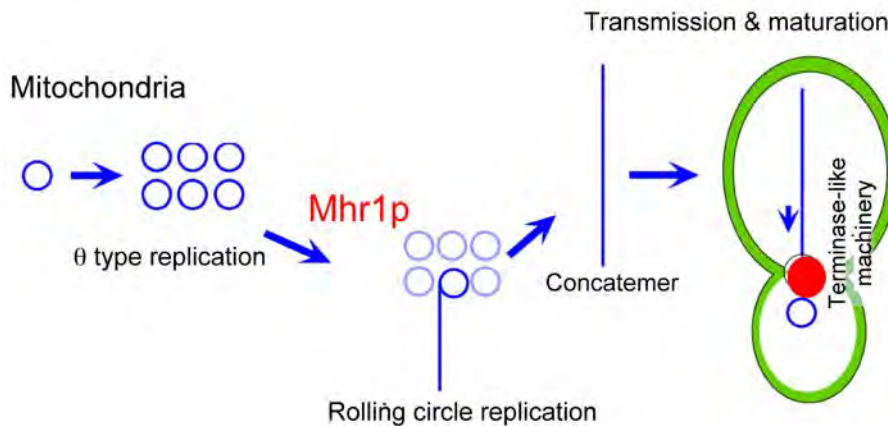


図3.4-3 出芽酵母mtDNAの複製と娘細胞への分配機構

型複製は、環状二本鎖DNAは単量体と増加する。ローリングサークル複製では、一つの単量体環状二本鎖DNAから、多数のコピーがコンカテマー(直列重合体)として複製する。娘細胞へコンカテマーが移ると同時に単量体環状DNAになる(Ling & Shibata (2002) EMBO J. 21, 4730)。コンカテマーができる経路としては、単量体が交叉によって重合体になり直鎖化する経路(Cce1蛋白質に依存する経路)も実際に存在するが、正常な細胞ではその機能は極めて限定的である。

本年になり、蛋白質が相同的DNA対合活性を持つことが米国のグループによって明らかにされた。Mhr1蛋白質と蛋白質はアミノ酸配列では全く異なる。ミトコンドリアは真性細菌が寄生した結果と言われているが、少なくとも出芽酵母では、そのDNA複製・分配機構は真性細菌に感染するウイルスと共通である。

3) ホモプラスミー成立過程での相同的DNA対合蛋白質の機能

図3.4-3に示したモデルは、ランダムに選ばれた親DNAを鋳型にして合成されたmtDNAのクローンが物理的に連結したコンカテマーとして選択的に娘細胞へ送り込まれることから、mtDNAが均質化する現象であるホモプラスミー化の機構を説明できる。一つの細胞にmtDNAは100から数千コピーも存在する。また一般的に

mtDNAは核染色体DNAに比べ10倍は高い頻度で変異するといわれている。そこで、mtDNAはそれぞれの細胞で極めて不均一な集団であることが推定されるが、実際には、出芽酵母でもヒトでも基本的にはそれぞれの細胞だけでなく、個体レベルですべてのmtDNAは同一の塩基配列を持っている。これをホモプラスミーという。ヒトでは、加齢とともに心筋や中枢神経など特定の細胞で不均一化する(ヘテロプラスミー化)が、正常な新生児は全身でホモプラスミーである。一方、生まれつきヘテロプラスミーである場合も知られているがほとんどの場合重い神経や筋肉の疾患(ミトコンドリア症)に深く結びついている。正常な場合は3世代程度でホモプラスミーになる。しかしこれまでは、ホモプラスミー化が細胞の機能による能動過程の結果であるかどうかさえが議論の対象になっており、それに働く遺伝子も蛋白質も全く知られていなかった。

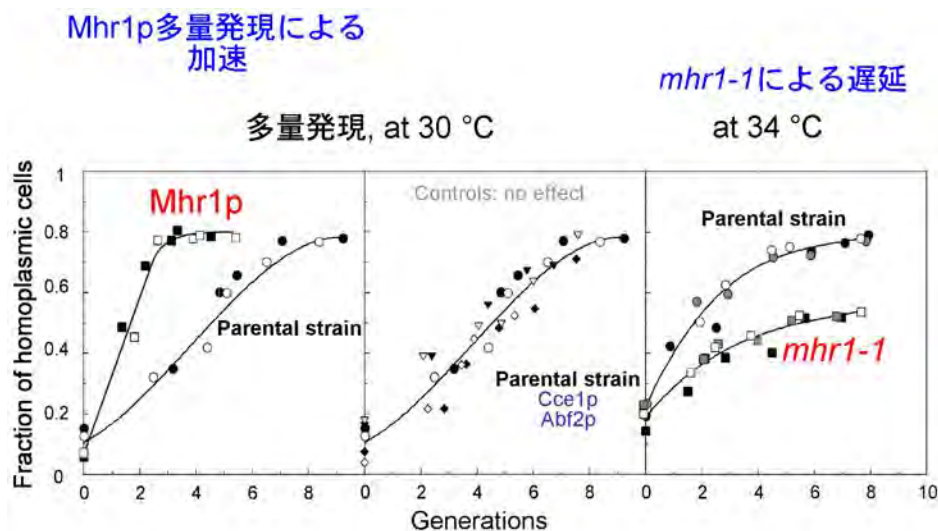


図 3.4-4. Mhr1 蛋白質の活性調節によるホモプラスミー細胞の分離速度の制御
 ヘテロプラスミー接合体からのホモプラスミー細胞の分離は、Mhr1 蛋白質を大量発現させると加速し、*mhr1-1* (温度感受性変異) 変異細胞を 34°C で培養すると遅くなる。他の DNA 結合蛋白質 (Abf2 蛋白質) や DNA 酵素 (Cce1 蛋白質) を大量発現した場合には効果が認められない。

上記のホモプラスミー化の説明が妥当かどうか、Mhr1蛋白質を大量発現したり、*mhr1-1*変異を導入するなど細胞内のMhr1蛋白質の活性を上下したときにヘテロプラスミー接合体(異なる対立遺伝子の組み合わせのmtDNAをもつa細胞と細胞を接合することで容易に作れる)からホモプラスミー細胞が分離する速さを観察したところ、Mhr1蛋白質の活性の程度とコンカテマーの量、ホモプラスミー細胞分離の速さが対応した(図3.4-4)。この結果は、確かにMhr1蛋白質がヘテロプラスミー細胞からホモプラスミー細胞が分離する過程に働いていることを示し、同時に、

図3.4-3に示したモデルを支持する。

出芽酵母のmtDNAには複製開始点（塩基配列）がある。細菌等の場合と異なり複製開始点がないmtDNAでも複製、保持は正常に行われるが、複製開始点をもつ特に小さなDNA（呼吸欠損変異の多くが「*ori*」と呼ばれる欠失変異による小さなゲノムサイズのmtDNAをもつ）は、正常mtDNAに比べても優先的に複製する。この複製開始点をもつmtDNAの複製開始点特異的な二本鎖切断を検出した。更に、*mhr1-1*変異では、この複製優先性が失われる。この結果は、Mhr1蛋白質が二本鎖切断に働いて複製優先性を引き起こすことを示し、相同的DNA対合蛋白質によるローリングサークル複製開始も相同的組換え開始同様、二本鎖切断によって起こることを強く支持する（図3.4-5）。

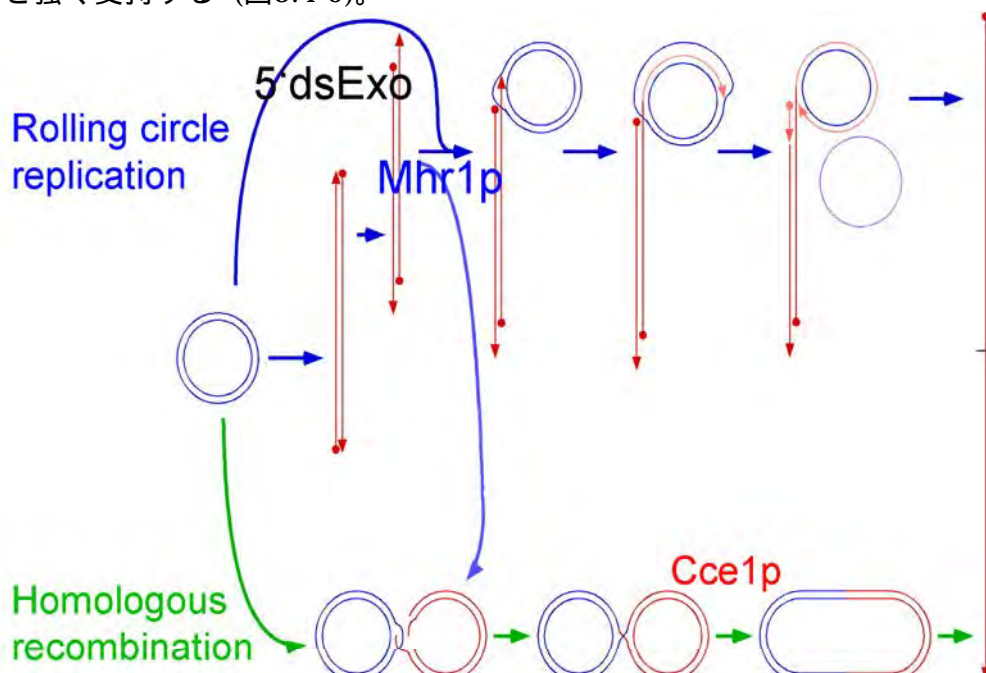


図 3.4-5 二本鎖切断によるローリングサークル型 DNA 複製開始と相同的組換え開始
環状二本鎖 DNA に二本鎖切断が入り、末端が加工されてできる2つの3' 突出一本鎖領域の一方だけが無傷の二本鎖 DNA とヘテロ二本鎖を作るとローリングサークル型 DNA 複製を開始し、また両方とも同じ無傷の二本鎖 DNA とヘテロ二本鎖を作ると交叉型相同的組換えへ進む。

(2) 研究成果の今後期待される効果

相同的組換えに特異的に働くDNAの立体構造の研究は現在でも我々のデータしか発表されていない。また、ATPを必要としない相同的DNA対合についての研究でも我々のグループが世界をリードした。更に、ミトコンドリアの相同的組換えの研究で成果を上げているのは、知る限り世界中で我々のグループだけである。現在、従来対策がなかったミトコンドリア症や、心筋や中枢神経系など細胞分化が終わっ

た細胞での老化への取り組みとしてmtDNAのヘテロプラスミー化の機構やホモプラスミー維持、回復機構への関心が高くなりつゝあり、ミトコンドリアの遺伝機構についての研究が盛んになる兆しがある。現時点では、ホモプラスミー成立に直接働く遺伝子を同定したのも、実験的裏付けをもつ機構モデルを提出したので、我々のグループだけである。また、ホモプラスミー成立機構モデル実証の試みで、遺伝学的操作で、ヘテロプラスミー細胞から、ホモプラスミー細胞が分離する速さを人為的に変えることができることを実証した。これまで、mtDNAの存在状態が、出芽酵母ではコンカテマーが主であるのに対して、ヒトなど哺乳動物では環状単量体が主であることから、出芽酵母とヒトでは、mtDNAの複製・分配機構は異なるのではないかとの議論がされてきた。しかし、mtDNAが担う遺伝現象は、ホモプラスミーが基本状態であるなど、出芽酵母とヒトの間で共通性が極めて高い。我々が導いた機構モデルは、ローリングサークル型DNA複製へ切り替わる時期と子孫細胞への分配の時期とが遠いか近いかでmtDNAの存在状態の違いが説明できる。Mhr1蛋白質など、要になる蛋白質のホモログの研究からヒトのヘテロプラスミー、ホモプラスミーを理解する手がかりがつかめる可能性は大きく、この方向の研究が発展しそうである。

ミトコンドリアのように塩基配列のコピーが多数存在し、それらがすべて同じ配列をもつ例が、核染色体でも知られている。それは、リボソームRNAを担うrDNAをはじめとする直列繰り返し配列である。それらの繰り返し数の増減と均質化は相同的組換えに依存しているが、興味深いことに、RecA/Rad51蛋白質型の蛋白質ではなく、mtDNAのホモプラスミー同様ATPを必要としない相同的DNA対合蛋白質であるRad52蛋白質を必要とすることが知られている。繰り返し配列の単位コピー数の増減は、従来、不等交叉またはジーンコンバージョンで説明されてきたが、mtDNAの場合と同様な機構が働いている可能性が大きい。このことが確認できると、mtDNAのホモプラスミーの研究で得た成果を適応できる分野が大きく広がる。従来、相同的組換えは遺伝的多様化に働くと考えられてきたが、相同的組換えの要に働く同じ蛋白質、相同的DNA対合蛋白質が、遺伝的均質化に働く局面があることを明らかにしたのは、小さくない成果といえる。この発見は、相同的組換えが遺伝現象で担う機能の範囲は更に広がりを持つことを示し、新しい研究分野を開く可能性がある。

3.5 “ニワトリBリンパ細胞株 (DT40) を用いた、ヒト組換え蛋白質群、その変異蛋白質の細胞機能解析 (武田グループ)”

(1) 研究内容及び成果

動物細胞株でのゲノム改変技術

我々は、標的組み換えが容易なニワトリBリンパ細胞株、DT40で系統的にDNA組み換えに関与する既知の様々な遺伝子をロックアウトすることにより、各DNA組み換えの機能を解析した。以下に我々の研究業績を3項目にわけて説明する：

1) Rad51パラログの機能解析 (武田 他)

Rad51パラログ分子 (Rad51B、Rad51C、Rad51D、XRCC2、XRCC3) の各ノックアウト細胞を作製し、これらがRad51の補助因子として機能することを示した。各ノックアウト細胞はきわめて似た表現型を示した。よって、各Rad51パラログ分子は互いに共同することによって初めて機能し、各Rad51パラログ分子はこの共同作業に必須である、と結論した。

ただし、この結論は、その後の、我々や他のグループの研究から少し変更する

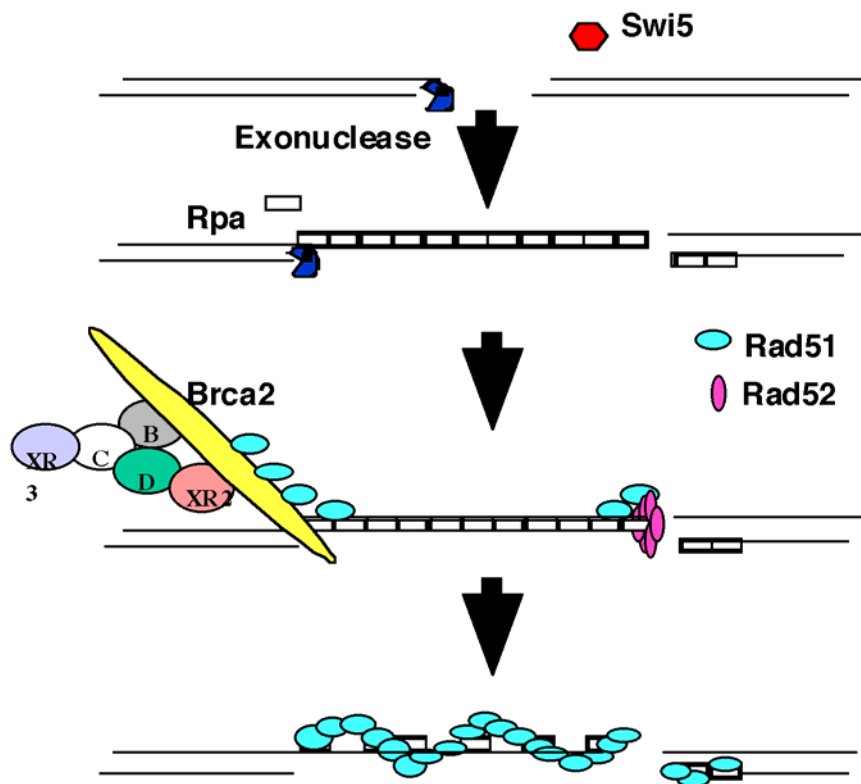


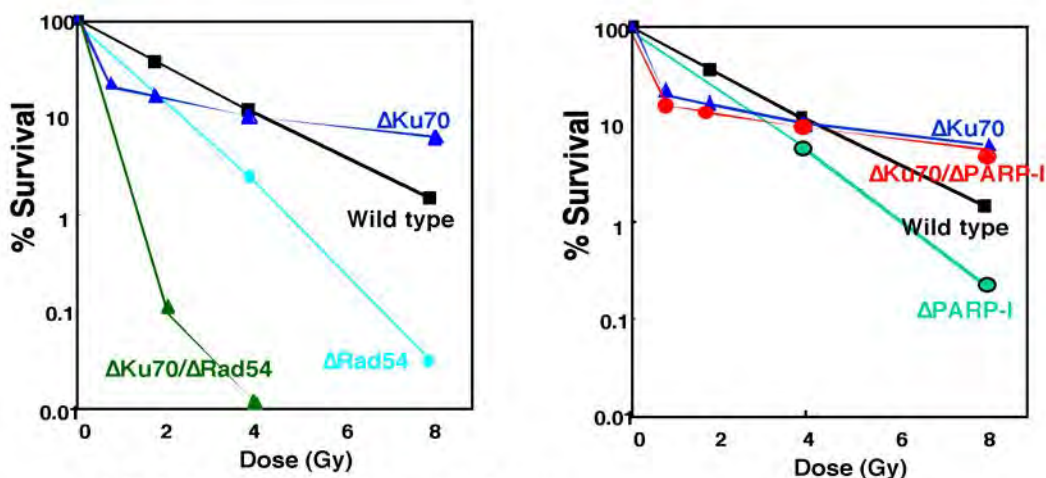
図 3.5-1 Brca2、Rad51 パラログと Rad52 による Rad51 の重合反応促進

必要がありそうである。我々は、Rad51B欠損細胞でRad51Dを高発現したり、XRCC2欠損細胞でXRCC3を高発現すると、もとの表現型が少し抑制されることを見出した。そして、XRCC2とXRCC3との二重欠損は、各単独欠損より少し表現型が重症化することも見出した。現在、5種類のRad51パラログ分子の相互の関係を系統的に解析している。

2) Brca2、Rad51パラログとRad52の機能的相互作用

Rad52は、酵母では相同DNA組み換えでもっとも重要な機能をもつが、マウスやニワトリではRad52欠損では異常な表現型がほとんど顕われない。我々は、XRCC3欠損細胞よりRad52/XRCC3 2重欠損細胞がはるかに強い異常(合成致死)が出現することから、(i) Rad52は高等真核細胞で重要な機能をもつこと、(ii) ただしRad52の機能はRad51パラログのそれとオーバーラップし、しかも互いに独立して機能するために、Rad52が欠損してもほとんど異常が出現しないこと、の2点を解明した。

我々は、家族性乳癌の原因遺伝子であるBrca2の部分欠損細胞を作製し、その表現型がRad51パラログ欠損細胞と類似していることを見出した。この知見は、Brca2とRad51パラログとが、同じ経路で機能していることを示唆する。この結論を確認するために、現在、Brca2とXRCC3の2重欠損細胞の作製を試みている。また、もしBrca2の機能とXRCC3の機能とが類似しているのであれば、Brca2欠損でもXRCC3欠損と同様に、Rad52欠損と合成致死のはずである。現在、この作業仮説を確認する実験を行っている。図3.5-1に我々のモデル(Brca2、Rad51パラ



J. Biol. Chem., Vol.276: 44413~44418, 2001

図 3.5-2 2種類のDNA二本鎖切断修復経路

相同DNA組換えと非同源性DNA切断端結合は放射線照射によって生じたDNA損傷を互いに競合しながら修復する。

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)を示した。

3) 相同DNA組み換えと非相同性DNA切断端結合との機能的相互作用

DNA二本鎖切断は1サイトでも修復されないままに残ると致死である。DNA二本鎖切断の修復経路には、相同DNA組み換えと非相同性DNA切断端結合との2種類がある。これらの経路の関係を解析するために、これら2種類の経路の2重欠損細胞を作製した結果、これらの経路は、互いに相補的であると同時に競合的な関係でもあることがわかった。非相同性DNA切断端結合が欠損すると標的組み換えの相対的な効率も上昇することも解明した。

我々は、以上の研究をさらに発展させ、以下に記述する結果を得た。我々は、DNA二本鎖切断発生後、1分以内に損傷部位にリクルートされる分子、poly [ADP ribose]polymerase-I (PARP-I)に注目した。そして、PARP-I欠損株とPARP-I/ku70 2重欠損株とを作製し、以下に示す電離放射線感受性のデータを得た。すなわち、PARP-I欠損株は野生型細胞に比べて放射線感受性であるのに対して、PARP-I/ku70 2重欠損株はku70欠損株と全く同じ放射線感受性パターンを示し高い線量では野生型細胞に比べて放射線に耐性であった(図3.5-2)。この知見は、PARP-I欠損株の放射線高感受性は、Ku70に依存した現象であることを示す。よって我々は、図3.5-3に示すように、PARP-Iが、ku70をDNA切断端より剥がすことによって相同組み換えによるDNA二本鎖切断修復を促進すると結論づけた。

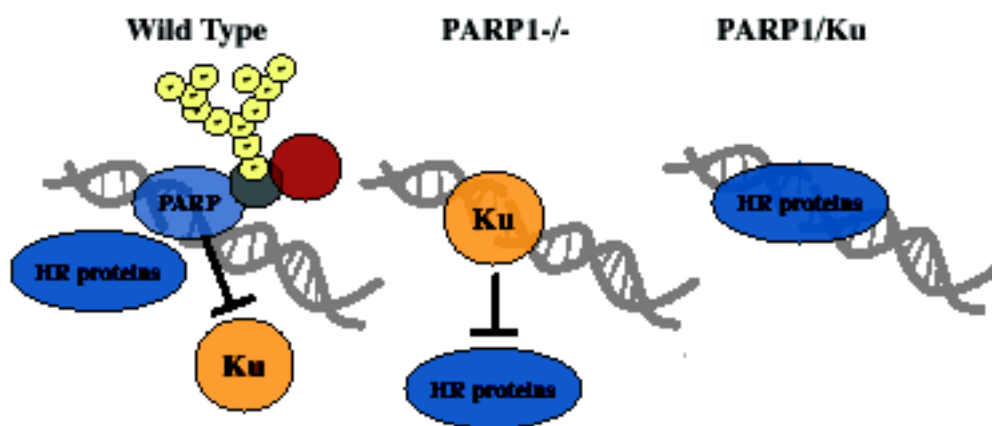


図 3.5-3 PARP-I が ku70 を DNA 切断端より剥がすことによる相同的組換え修復の促進

(2) 研究成果の今後期待される効果

1) 類似研究の国内外の動向

相同組み換えに関与する分子は、酵母から哺乳動物まで保存されている。各分子

の機能を解明するために、マウスES細胞を使った逆遺伝学的解析が他のグループによって行われてきた。しかし、相同組み換えの機能不全は、個体あるいは細胞レベルで致死になることが多いので、研究が進展していない。我々は、動物細胞株（DT40）を使って逆遺伝学的解析を系統的に行っている世界で唯一のグループである。

2) 成果の今後の展開見込

まず、主に酵母を使った研究から、現在も年間数個ずつ相同組み換えに直接もしくは間接的に関与する分子が同定されている。したがって、これらの遺伝子についてDT40細胞で遺伝子ノックアウトを行う。次に、相同組み換えはDNA複製のときに生じた損傷を修復しているため、その解析にはDNA複製の状態をモニターする必要がある。この目的を達成する為に、リボゾームRNA遺伝子座をモデルに複製に伴うDNA損傷を発生させる実験系をつくる。さらに複製に関与する分子の温度感受性ミュータントを作製することが重要である。

3) 科学技術や社会への考えられる波及効果

相同組み換えの産業応用で最も重要なものは、標的組み換えである。DT40細胞でなぜ高頻度に標的組み換えが発生するのかを解明し、それをヒトや植物細胞に応用できれば、その波及効果は莫大である。次に、我々の作製した遺伝子ノック

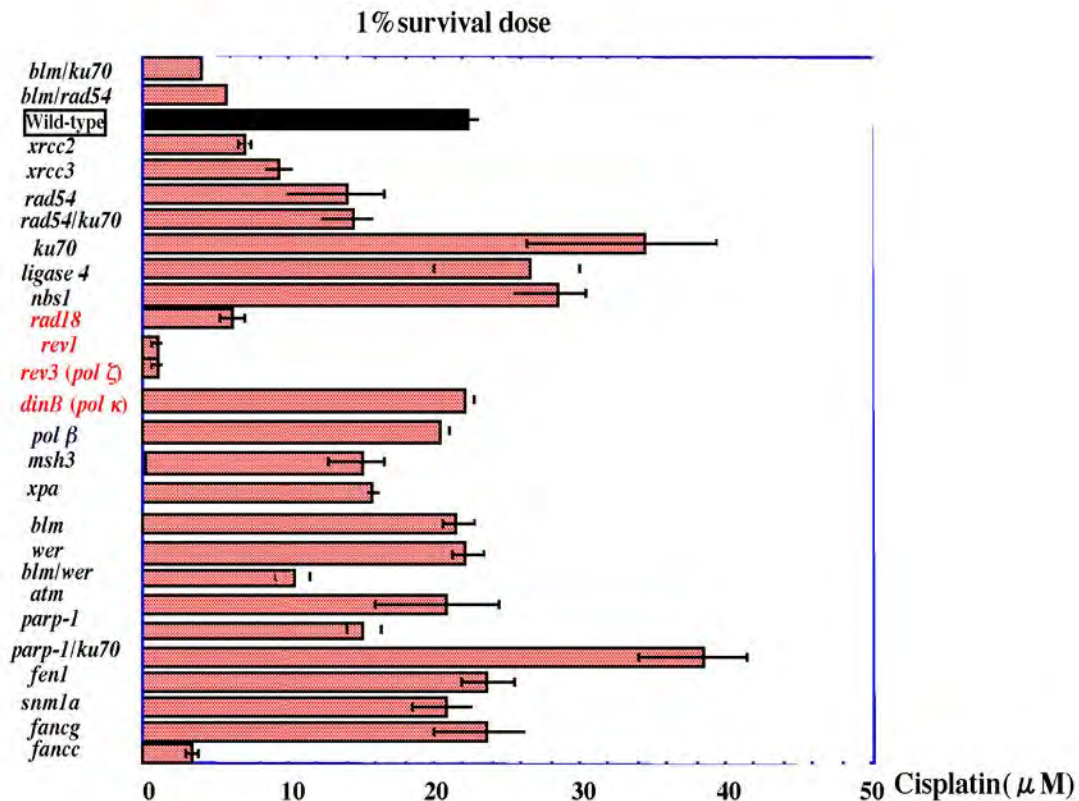
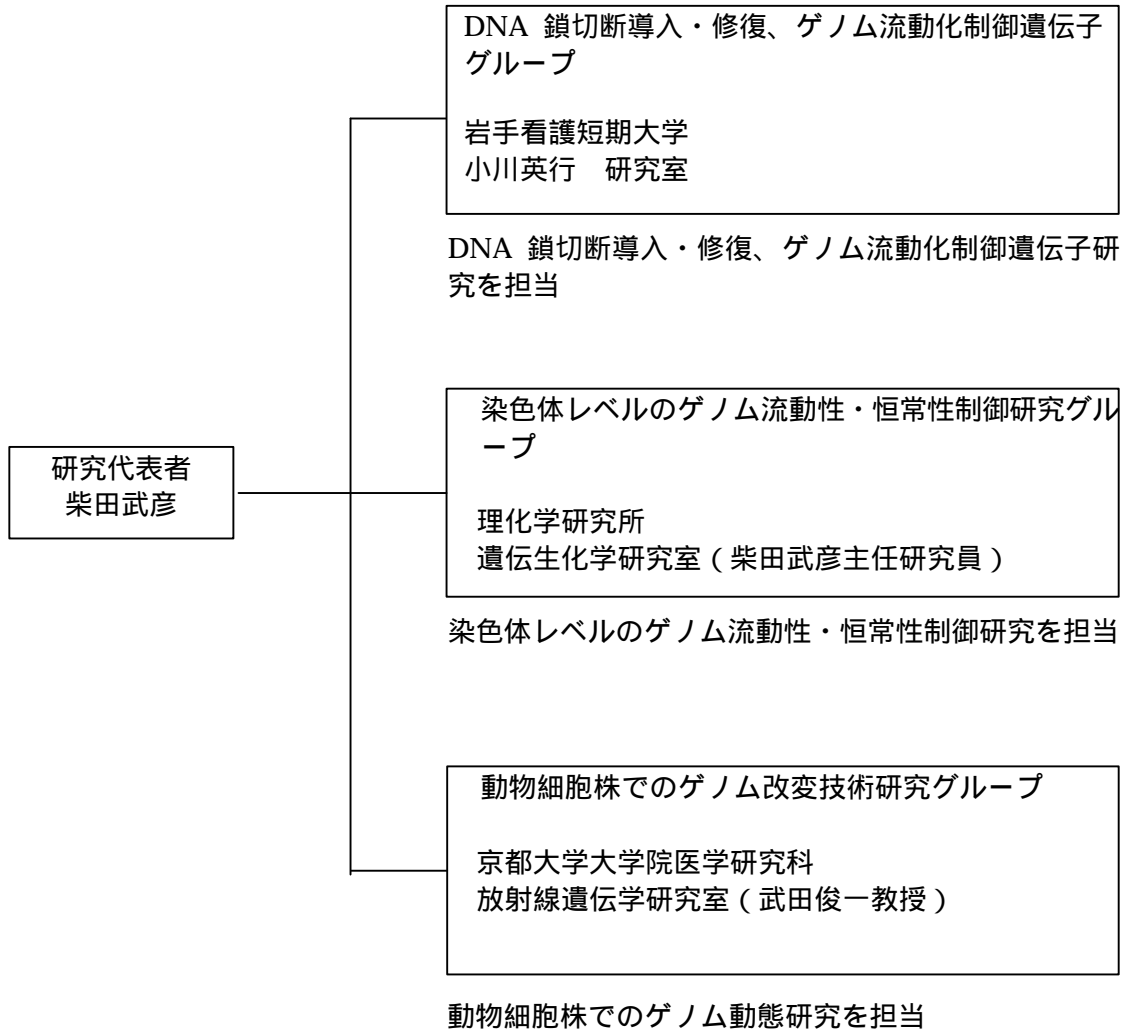


図3.5-4 Pol は、シスプラチン（クロスリンカー）に最も感受性である

アウトクローンは遺伝薬理学的な研究に応用できる。その1例を図3.5-4に示した。シスプラチンは、染色体DNAに直接クロスリンクしてDNA複製を妨げることによって癌細胞を含む増殖細胞を特異的に殺すことができる。我々は、損傷乗り越えやある種の相同組み換えに關与するDNAポリメラーゼ (pol ζ) の欠損細胞がシスプラチンにきわめて高感受性であることを見出した。この知見は、シスプラチンによる癌治療の効果をさらに別の薬剤によって高める時に、pol ζ が別の薬剤の、有効な標的になりうることを示す。また、我々が作製した相同組み換え・修復の欠損株は、薬剤がもつ変異源性を高感度に検出するアッセイにも利用できる。

4. 研究実施体制

(1)体制



(2)メンバー表

DNA鎖切断導入・修復、ゲノム流動化制御遺伝子研究グループ(小川英行)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
小川 英行	岩手看護短期大学	学長	変異体・遺伝子単離	平成10年12月～平成15年11月
臼井 雄彦	大阪大学理学研究科	大学院生	Mre11の機能制御機構	平成10年12月～平成12年3月
押海 裕之	大阪大学理学研究科	大学院生	変異体・遺伝子単離	平成10年12月～平成13年3月
塚本 恭正	岩手看護短期大学	助手	変異体・遺伝子単離	平成13年4月～平成15年11月
井上 春樹	岩手看護短期大学	CREST研究員	組換え開始複合体の機能解析	平成11年4月～平成14年9月
佐々木 貴子	岩手看護短期大学	CREST研究員	組換え開始複合体の機能解析	平成11年4月～平成12年3月
佐藤 寛	岩手看護短期大学	CREST研究員	組換え開始複合体の機能解析	平成12年4月～平成14年6月
菊地 美保	岩手看護短期大学	CREST研究員	組換え開始複合体の機能解析	平成14年9月～平成14年12月

染色体レベルのゲノム流動性・恒常性制御研究グループ(柴田武彦)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
太田 邦史	理化学研究所 遺伝生化学研究室	研究員	染色体構造制御因子	平成10年12月～平成15年11月
水野 健一	同上	CREST研究員	染色体構造制御因子、生理条件	平成10年12月～平成15年11月
古瀬 宗則	同上	基礎科学特別研究員	染色体構造制御因子	平成10年12月～平成15年3月
生方 寿治	同上	大学院生	染色体構造制御因子、生理条件	平成10年12月～平成12年3月
村上 創	同上	大学院生	染色体構造制御因子	平成10年12月～平成15年11月
伊藤 隆	同上	研究員	因子蛋白・DNA構造解析	平成10年12月～平成15年11月
胡桃坂 仁志	理化学研究所 細胞情報伝達研究室	研究員	変異ヒト蛋白の構造と機能	平成10年12月～平成15年11月
高杉 憲司	理化学研究所 遺伝生化学研究室	基礎科学特別研究員	因子蛋白・DNA構造解析	平成10年12月～平成13年3月
西中 太郎	同上	基礎科学特別研究員	因子蛋白・DNA構造解析	平成10年12月～平成12年3月
相原 秀樹	同上	大学院生	変異ヒト蛋白の構造と機能	平成10年12月～平成12年3月

凌 楓	同上	研究員	因子蛋白の機能	平成10年12月～平成15年11月
川崎 勝己	同上	研究員	因子蛋白の機能	平成10年12月～平成15年11月
美川 務	同上	研究員	因子蛋白・DNA構造解析	平成11年4月～平成15年11月
佐藤 友美	同上	CREST研究員	因子蛋白・DNA構造解析	平成11年4月～平成13年3月
瀬尾 秀宗	同上	大学院生	染色体構造制御因子	平成11年4月～平成15年11月
石部 聡子	同上	CREST研究員	染色体構造制御因子	平成11年4月～平成15年3月
井川 肅子	同上	研究員	因子蛋白・DNA構造解析	平成11年4月～平成15年11月
千本木 裕	同上	基礎科学特別研究員	因子蛋白の機能	平成11年4月～平成14年3月
Sundaresan Rajesh	同上	協力研究員	因子蛋白・DNA構造解析	平成11年4月～平成15年11月
細野 美子	同上	CREST研究員	染色体構造制御因子	平成11年5月～平成12年3月
細野 美子	同上	アルバイト	データの収集解析・器具洗淨	平成13年6月～平成15年11月
小林 憲子	同上	アルバイト	データの収集解析・器具洗淨	平成15年5月～平成15年11月
山田 貴富	同上	大学院生	染色体構造制御因子	平成12年4月～平成15年11月
吉益 雅俊	同上	CREST研究員	因子蛋白・DNA構造解析	平成15年4月～平成15年11月
中山 実	同上	大学院生	因子蛋白の機能	平成15年4月～平成15年11月
松本 初恵	同上	研究補助員	チーム事務	平成11年1月～平成15年11月

動物細胞株でのゲノム改変技術研究グループ（武田俊一）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
武田 俊一	京都大学医学系研究科	教授	トリDT40細胞での 蛋白の機能	平成10年12月～ 平成15年11月
高田 穰	同上	助手	トリDT40細胞での 蛋白の機能	平成10年12月～ 平成15年11月
福島 徹	同上	博士課程大学院 生	トリDT40細胞での 蛋白の機能	平成10年12月～ 平成15年11月
園田 英一郎	同上	CREST研究員	トリDT40細胞での 蛋白の機能	平成10年12月～ 平成15年11月
山添 光芳	同上	助手	トリDT40細胞での 蛋白の機能	平成10年12月～ 平成15年11月
藤森 亮	同上	助手	トリDT40細胞での 蛋白の機能	平成10年12月～ 平成14年3月
Pawan Kumar D har	同上	CREST研究員	トリDT40細胞での 蛋白の機能	平成12年6月～ 平成13年5月
山下 由紀子	同上	研究員	トリDT40細胞での 蛋白の機能	平成10年12月～ 平成13年3月
平尾 真樹子	同上	研究補助員	実験補助	平成11年4月～ 平成12年3月
橋新 真紀	同上	研究補助員	実験補助	平成11年4月～ 平成12年3月
堀口 喜久美	同上	研究補助員	実験補助	平成11年4月～ 平成12年3月
古賀 織絵	同上	研究補助員	チーム事務	平成11年4月～ 平成12年3月
佐藤 有美	同上	研究補助員	実験補助	平成12年4月～ 平成14年3月及び 平成15年4月～ 平成15年11月
永尾 命子	同上	研究補助員	実験補助	平成13年4月～ 平成14年3月及び 平成15年4月～ 平成15年11月
北脇 容子	同上	研究補助員	実験補助	平成14年4月～ 平成15年3月
岡嶋 幸子	同上	研究補助員	実験補助	平成14年4月～ 平成15年3月

5 . 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2000年12月11日 ~12日	第14回DNA組換え ワークショップ	神戸国際会 議場	本研究チ ーム参加者ほ ぼ全員を含 め	発表応募者全員が口頭 発表できるようにし、 1人10分程度で最新の データを公表し情報交 換を行った。

(2)招聘した研究者等

氏 名（所属、役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Stephen Charles Kowalczykowski （カリフォルニア大学教授）	共同研究打ち合わせ 及びセミナー講師	理化学研究所 遺伝生化学研究室	平成13年11月 3日～11月10日

6 . 主な研究成果物、発表等

(1)論文発表 (国内 6件、海外 49件)

平成10年度

1. Sonoda, E., Sasaki, M.S., Buerstedde, J-M., Bezzubova, O., Shinohara, A., Ogawa, H., Takada, M., Yamaguchi-Iwai, Y. and Takeda, S. (1998). Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J.* **17**, 598-608.
2. Furuse, M., Nagase, Y., Tsubouchi, H., Murakami-Murofushi, K., Shibata, T. and Ohta, K. (1998) Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *EMBO J.*, **17**, 6412-6425.
3. Ohta, K., Wu, T.-C., Lichten, M. and Shibata, T. (1999) Competitive inactivation of a double-strand DNA break site involves parallel suppression of meiosis-induced changes in chromatin configuration. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2175-2180.

平成11年度

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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
9. 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

10. 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
11. 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**: 463-461.
12. Senbongi, H., Ling, F. and Shibata, T. (1999) "A mutation in a mitochondrial ABC transporter results in mitochondrial dysfunction through oxidative damage of mitochondrial DNA" *Mol Gen Gene* **262**: 426-436
13. 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.
14. 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.

平成12年度

1. Tsubouchi, H. and Ogawa, H.: "Exo1 roles for repair of DNA double-strand breaks and meiotic crossing over in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Biol. Cell*, **11**, 2221-2233 (2000).
2. Kurumizaka, H., Aihara, H., Ikawa, S. and Shibata, T.: "Specific defects in double-stranded DNA unwinding and homologous pairing of a mutant RecA protein", *FEBS Lett.*, **477**, 129-134 (2000).
3. Fox, M. E., Yamada, T., Ohta, K. and Smith, G. R.: "A Family of CRE-related DNA sequences with meiotic recombination hotspot activity in *Schizosaccharomyces pombe*", *Genetics*, **156**, 59-68 (2000).
4. Miyajima, A., Seki, M., Onoda, F., Shiratori, M., Odagiri, N., Ohta, K., Kikuchi, Y., Ohno, Y. and Enomoto, T.: "Sgs1 helicase activity is required for mitotic but apparently not for meiotic functions", *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 6399-6409 (2000).
5. Ling, F., Morioka, H., Ohtsuka, E. and Shibata, T.: "A role for MHR1, a gene required for mitochondrial genetic recombination, in the repair of damage spontaneously introduced in yeast mtDNA", *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4956-4963 (2000).
6. Smith, K. N., Penkner, A., Ohta, K., Klein, F. and Nicolas, A.: "B-type cyclins CLB5 and CLB6 control the initiation of recombination and synaptonemal complex formation in yeast meiosis", *Current Biology* **11**, 88-97 (2001).
7. Takata, M., M. S. Sasaki, E. Sonoda, T. Fukushima, J. Albala, S. Swagemakers, R. Kanaar, L. H. Thompson and S. Takeda.: "Targeted disruption of the RAD51B, a member of RAD51-related gene family, impairs homologous recombination and repair of crosslink DNA damages." *Mol. Cell. Biol.* **20**: 6476-82 (2000).

平成13年度

1. Shibata, T., Nishinaka, T., Mikawa, T., Aihara, H., Kurumizaka, H.,

- Yokoyama, S., Ito, Y.: "Homologous genetic recombination as an intrinsic dynamic property of a DNA structure induced by recA/Rad51-family proteins: A possible advantage of DNA over RNA as genomic material." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 8425-8432 (2001).
2. Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ikawa, S., Yokoyama, S., and Shibata, T.: "Homologous pairing promoted by the human Rad52 protein." *J. Biol. Chem.*, 276: 35201-35208 (2001).
 3. Mizuno, K., Hasemi, T., Ubukata, T., Yamada, T., Lehman, E., Kohli, J., Watanabe, Y., Iino, Y., Yamamoto, M., Fox, M. E., Smith, G. R., Murofushi, H., Shibata, T. and Ohta, K.: "Counteracting regulation of chromatin remodeling at a fission yeast cAMP responsive element-related recombination hotspot by stress-activated protein kinase, cAMP-dependent kinase and meiosis regulations." *Genetics* 159: 1457-1478 (2001).
 4. Kurumizaka, H., Ikawa, S., Nakada, M., Eda, K., Kagawa, W., Takata, M., Takeda, S., Yokoyama, S. and Shibata, T.: "Homologous-pairing activity of the human DNA-repair proteins Xrcc3•Rad51C." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 5538-5543 (2001).
 5. Takata, M., Sasaki, M.S., Tachiiri, S., Fukushima, T., Sonoda, E., Schild, D., Thompson, L.H., and Takeda, S.: "Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs." *Mol. Cell Biol.*, 21: 2858-2866 (2001).
 6. Fujimori, A., Tachiiri, S., Sonoda, E., Thompson, L.H., Dhar, P.K., Hiraoka, M., Takeda, S., Zhang, Y., Reth, M., and Takata, M.: "Rad52 partially substitutes for the Rad51 paralog XRCC3 in maintaining chromosomal integrity in vertebrate cells." *EMBO J.*, 20: 5513-5520 (2001).
 7. Sale, J.E., Calandrini, D.M., Takata, M., Takeda, S., and Neuberger, M.S.: "Ablation of XRCC2/3 transforms immunoglobulin V gene conversion into somatic hypermutation." *Nature (London)*, 412: 921-926 (2001).
 8. Fukushima, T., Takata, M., Morrison, C., Araki, R., Fujimori, A., Abe, M., Tatsumi, K., Jasin, M., Dhar, P.K., Sonoda, E., Chiba, T., and Takeda, S.: "Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair." *J. Biol. Chem.*, 276: 44413-44418. (2001).
 9. Adachi, N., Ishino, T., Ishii, Y., Takeda, S., and Koyama, H.: "DNA ligase IV-deficient cells are more resistant to ionizing radiation in the absence of Ku70: implications for DNA double-strand break repair." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 12109-12113 (2001)
 10. Sonoda, E., Takata, M., Yamashita, Y.M., Morrison, C., and Takeda, S.: "Homologous DNA recombination in vertebrate cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 8388-8394. (2001).
 11. Usui, T., Ogawa, H. and Petrini, J. H. J.: "A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex." *Mol. Cell*, 7, 1255-1266 (2001).
 12. Tsukamoto, Y., Taggart, A.K., and Zakian, V.A.: "The role of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomerase-mediated lengthening of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres." *Curr. Biol.*, 11: 1328-1335. (2001).

平成14年度

1. Kurumizaka, H., Ikawa, S., Nakada, M., Enomoto, R., Kagawa, W.,

- Kinebuchi, T., Yamazoe, M., Yokoyama, S., and Shibata, T.: "Homologous-pairing, and ring- and filament-structure formation activities of the human Xrcc2-Rad51D complex." *J. Biol. Chem.* **277**, 14315-14320 (2002).
2. Kawasaki, K., Maruyama, S., Nakayama, M., Matsumoto, K., and Shibata, T.: "Drosophila melanogaster RECQ5/QE DNA helicase: Stimulation by GTP binding." *Nucleic Acids Res.* **30**, 3682-3691 (2002).
 3. Ling, F., and Shibata, T.: "Recombination-dependent mtDNA partitioning. In vivo role of Mhr1p to promote pairing of homologous DNA." *EMBO J.* **21**, 4730-4740 (2002).
 4. Pecina, A., Smith, K. N., Mezard, C., Murakami, H., Ohta, K., and Nicolas, A.: "Targeted stimulation of meiotic recombination." *Cell* **111**, 173-184 (2002).
 5. Yokoyama, H., Kurumizaka, H., Ikawa, S., Yokoyama, S., and Shibata, T.: "Holliday junction binding activity of the human Rad51B protein." *J. Biol. Chem.* **278**, 2767-72. (2003).
 6. Kagawa, W., Kurumizaka, H., ishitani, R., Fukai, S., Nureki, O., Shibata, T., and Yokoyama, S.: "Crystal structure of the homologous-pairing domain from the human Rad52 recombinase in the undecameric form" *Molecular Cell* **10**, 359-371 (2002)
 7. Seo, H., Okuhara, K., Kurumizaka, H., Yamada, T., Shibata, T., Ohta, K., Akiyama, T., and Murofushi, H. "Incorporation of DUF/FACT into chromatin enhances the accessibility of nucleosomal DNA" *Biochemical and Biophysical Research communications Biochem. Biophys. Res. Comm.* **303**, 8-13(2003)
 8. Tauchi, H., Kobayashi, J., Morishima, K., vanGent, D., Shiraishi, T., Verkaik, N. S., vanHeems, D., Ito, E., Nakamura, A., Sonoda, E., Takata, M., Takeda, S., Matsuura, S., and Komatsu, K.: "Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells" *Nature* **420**, 93-98. (2002).
 9. Tanaka, T., Hosoi, F., Yamaguchi-Iwai, Y., Nakamura, H., Masutani, H., Ueda, S., Nishiyama, A., Takeda, S., Wada, H., Spyrou, G. and Yodai, J. "Thioredoxin-2(TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis" *EMBO J.* **21**, 1695-1703. (2002).
 10. Shibata, T., Mizuno, K., and Ohta, K. "Mechanisms of regulation of eukaryotic homologous DNA recombination" in "Molecular anatomy of Cellular systems" (Progress in Biotechnology 22) ELSEVIER (2002)

平成15年度

1. Sonoda, E., Okada, T., Zhao, G-Y., Tateishi, S., Araki, K., Ymaizumi, M., Yagi, T., Verkaik, N. S., van Gent, D. C., Takata, M. and Takeda, S. "Multiple roles of Rev3, the catalytic subunit of pol in maintaining genome stability in vertebrates" *EMBO J.* **22**, 3188-3198. (2003).
2. Kurumizaka, H., Enomoto, R., Nakada, M., Eda, K., Yokoyama, S. and Shibata, T. "Region and amino acid residues required for Rad51C binding in the human Xrcc3 protein" *Nucleic Acids Res.* **31**, 4041-4050 (2003)
3. Murakami, H., Borde, V., Shibata, T., Lichten, M. and Ohta, K. "Correlation between premeiotic DNA replication and chromatin transition at yeast recombination initiation sites" *Nucleic Acids Res.* **31**, 4085-4090 (2003)

4. Hirota, K., Tanaka, K., Ohta, K. and Yamamoto, M. "Gef1p and Scd1p, the two GDP-GTP exchange factors for Cdc42p, for a ring structure that shrinks during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*" *Molecular Biology of the Cell* **14**, 3617-3627 (2003)
5. Hirota, K., Hoffman, C. S., Shibata, T. and Ohta, K. "Fission yeast tup1-like repressors repress chromatin remodeling at the *fbp1* promoter and the *ade6-M26* recombination hotspot" *Genetics* **165**, 505-515 (2003)
6. 柴田武彦 "相同 DNA 組換えと進化促進・進化抑制 DNA 二重らせんの 2 つの顔" 蛋白質核酸酵素 Vol.48, 704 (2003)
7. 柴田武彦 "分子機能研究によるアプローチ" ゲノムの修復と組換え (2003)
8. 小川英行 "DNA のしっぽ" 蛋白質核酸酵素 Vol.48, 678 (2003)
9. 小川英行 "DNA 組換え研究の歴史" ゲノムの修復と組換え (2003)

(2)口頭発表

招待、口頭講演 (国内 62 件、海外 49 件)

平成10年度

1. Ohta, K., Furuse, M., Mizuno, K., Nagase, Y., Yamada, T., Ubukata, T., Murakami, H., Hasemi, T., Baudat, F. and Shibata, T. "Regulation of recombination initiation at yeast recombination hot spots" Workshop on DNA repair, Recombination and Mutagenesis, Osaka, February 1999.

平成11年度

1. Shibata, T., Aihara, H., Ito, Y., Kurumizaka, H. and Yokoyama, S.: "Sites for interactions with DNA and proteins in human Rad51 protein." in FASEB Summer Conference on Genetic Recombination and Chromosome Rearrangements. Snowmass, USA, Aug. (1999).
2. Ohta, K., Nagase, Y., Ohsaki, S., Furuse, M., Murakami-Murofushi, K. and Shibata, T.: "Dominant negative effects in meiotic recombination by overproduced mre11 mutant proteins: mitotic and meiotic modes of Mre11 recruitment to DSB sites." in FASEB Summer Conference on Genetic Recombination and Chromosome Rearrangements. Snowmass, USA, Aug. (1999).
3. Kurumizaka, H., Kagawa, W., Aihara, H., Shibata, T. and Yokoyama, S.: "Analysis of the functional domains of the human Rad51 and Rad52 proteins." in FASEB Summer Conference on Genetic Recombination and Chromosome Rearrangements. Snowmass, USA, Aug. (1999).
4. Ling, F. and Shibata, T.: "A recombination protein, Mhr1 plays a role in the establishment of homoplasmic state of yeast mitochondria." in FASEB Summer Conference on Genetic Recombination and Chromosome Rearrangements. Snowmass, USA, Aug. (1999).
5. Ohta, K., Mizuno, K., Wahls, W. P., Ubukata, T., Hasemi, T., Watanabe, Y., Iino, Y., Yamamoto, M., Fox, M., Smith, G., Kohli, J. and Shibata, T.: "CREB/ATF transcription factor-mediated chromatin remodeling at a meiotic recombination hot spot *ade6M26* in fission yeast." in Joan March de Estudios e Investigaciones Workshop. Madrid, Spain, Oct. (1999).
6. Mizuno, K., Wahls, W. P., Ubukata, T., Hasemi, T., Watanabe, Y., Iino, Y.,

- Yamamoto, M., Fox, M., Smith, G., Kohli, J., Shibata, T. and Ohta, K.: "Genetic control of chromatin remodeling at a meiotic recombination hot spot ade6M26 in fission yeast." in The Swiss recombination and DNA repair workshop. Les Diablerets, Swiss, Oct. (1999).
7. Ohta, K., Nagase, Y., S., O., Furuse, M., Murakami-Murofushi, K. and Shibata, T.: "Dominant negative effects by overproduced mre11." in Swiss Workshop on Genetic Recombination and DNA Repair. Les Diablerets, Swiss, Oct. (1999).
 8. Shibata, T. and Ling, F.: "The establishment of yeast mitochondrial homoplasmy depends on a recombination gene." in 2nd 3R Symposium. 兵庫県三木市, Nov. (1999).
 9. Mizuno, K., Wahls, W. P., Ubukata, T., Hasemi, T., Watanabe, Y., Iino, Y., Yamamoto, M., Fox, M., Smith, G., Kohli, J., Shibata, T. and Ohta, K.: "A linkage between meiotic induction and chromatin remodelling at the M26 hot spot in fission yeast." in 2nd 3R Symposium. 兵庫県三木市, Nov. (1999).
 10. Shibata, T., Nishinaka, T., Aihara, H., Kurumizaka, H., Y., I. and Yokoyama, S.: "Molecular structures essential to homologous DNA recombination from bacteria to human." in 7th Swedish Japanese Symp. on Biotechnology. 和光市, Nov. (1999).
 11. Ohta, K., Nagase, Y., Ohsaki, S., Furuse, M., Murakami-Murofushi, K. and Shibata, T.: "Overproduction of wild-type and mutant MRE11 proteins confers dominant negative effects on meiotic recombination and progression of meiotic cycle." in 2nd 3R Symposium. 兵庫県三木市, Nov. (1999).
 12. Kawasaki, K. and Shibata, T.: "The domain structure of RECQE protein." in 41st Annual Drosophila Research Conference. Pittsburgh, USA, Mar. (2000).
 13. Takeda, S. (Kyoto Univ.): "Homologous DNA recombination is essential for the proliferation of vertebrate cells" An AACR Special Conference in Cancer Research, Sandiego, Janurary, 2000
 14. Takeda, S. (Kyoto Univ.): "Homologous DNA recombination is essential for the proliferation of vertebrate cells" FASEB Summer Conference, Genetic Recombination and Chromosomal Rearrangement, Colorado, August, 1999
 15. 水野健一, 生方寿治, 渡辺嘉典, 飯野雄一, 山本正幸, Kohli, J., 太田邦史, 柴田武彦: "減数分裂誘導シグナル伝達経路によるクロマチン再編成の制御," 第 32 回酵母遺伝学フォーラム. 岡崎, 7 月 (1999).
 16. 太田邦史, 長瀬裕子, 大崎志真, 古瀬宗則, 室伏きみ子, 柴田武彦: "組換え開始因子 Mre11 の過剰発現とそのドミナントネガティブ効果," 第 32 回酵母遺伝学フォーラム. 岡崎, 7 月 (1999).
 17. 川崎勝己, 鄭相民, D., N. Q., 柴田武彦: "初期胚での高い発現と染色体恒常性; ショウジョウバエ RECQ ホモログ," 日本ショウジョウバエ研究会第 4 回研究集会. 名古屋, 8 月 (1999).
 18. 太田邦史, 水野健一, 生方寿治, 長谷見倫子, 渡辺嘉典, 飯野雄一, 山本正幸, Fox, M., Smith, G., Kohli, J., 柴田武彦: "減数分裂誘起シグナル伝達経路による分裂酵母組換えホットスポットにおけるクロマチン再編成の制御," 第 52 回日本細胞生物学会大会. 東京, 8 月 (1999).
 19. 柴田武彦: "DNA recognition in recombination," 理研シンポジウム「構造生物学 1999 -シグナル伝達と DNA 認識-」. 東京, 10 月 (1999).

20. 柴田武彦, 西中太郎, 相原秀樹, 胡桃坂仁志, 横山茂之, 美川務, 西田幸治, 伊藤隆: "組換えにおける DNA 塩基配列相同性の認識," 第 72 回日本生化学会大会. 横浜, 10 月 (1999).
21. 川崎勝己, 鄭相民, Nguan, Q. D., 柴田武彦: "ショウジョウバエ RECQ ホモログの DNA 依存 ATPase 活性," 第 72 回日本生化学会大会. 横浜, 10 月 (1999).
22. 相原秀樹, 伊藤隆, 横山茂之, 柴田武彦: "大腸菌 DinI タンパク質の立体構造解析," 第 38 回 NMR 討論会. 札幌, 10 月 (1999).
23. 太田邦史, 水野健一, 生方寿治, 長谷見倫子, 山田貴富, Kon, N., Wahls, W. P., 渡辺嘉典, 飯野雄一, 山本正幸, Fox, M., Smith, G., Kohli, J., 柴田武彦: "分裂酵母における減数分裂期染色体組換えの活性化に関わる DNA 配列とその結合タンパク質を介したクロマチン再編成," 第 17 回染色体ワークショップ. 神戸, 1 月 (2000).
24. 瀬尾秀宗, 奥原康司, 胡桃坂仁志, 太田邦史, 柴田武彦, 室伏擴: "DNA Unwinding Factor(DUF)/FACT のクロマチン構造変化への影響," 第 17 回染色体ワークショップ. 神戸, 1 月 (2000).
25. 太田邦史, 長瀬裕子, 大崎志真, 古瀬宗則, 室伏きみ子, 柴田武彦: "出芽酵母組換え開始タンパク質 Mrell の大量発現によるドミナントネガティブ効果," 第 17 回染色体ワークショップ. 神戸, 1 月 (2000).
26. 伊藤隆, 相原秀樹, 美川務, 西田幸治, 胡桃坂仁志, 横山茂之, 柴田武彦 " NMR studies on genetic recombination " Tsukuba NMR 99, つくば, 1999 年 10 月
27. 柴田武彦, 凌 楓 " ミトコンドリアゲノムの組換えとその機能 " 第 22 回日本分子生物学会年会. 福岡, 12 月 (1999)
28. 凌 楓, 柴田武彦 " 組換え修復蛋白質のミトコンドリア対立遺伝子分離・分配における働き " 第 72 回日本生化学会. 横浜, 10 月 (1999)

平成12年度

1. Nakagawa, T., Tsubouchi, H., and Ogawa, H. " The MER3 gene, encoding a novel helicase-like protein, and the EXO1 gene are required for meiotic crossover in *Saccharomyces cerevisiae* " The Gordon Research Conference on Meiosis. New London, New Hampshire, USA, 2000, June 18-23,.
2. Ohta, K. " Mre11 is a well-conserved protein involved in both mitotic and meiotic recombination " The 4th UK-Japan Cell Cycle Workshop (Regulation of Cell Proliferation), Cambridge, UK, September 25, 2000.
3. Shibata, T., Nishinaka, T., Ito, Y., Mikawa, T., Aihara, H., Kurumizaka, H. and Yokoyama, S. " Molecular structures for heteroduplex joint-formation in homologous genetic recombination " International Conference on Structural Genomics 2000, Yokohama, JAPAN, October 2, 2000.
4. Ohta, K., Murakami, H., Molkova, A., Haber, J. E., Thesis, J. F., Newlon, C., Smith, K., Nicolas, A., Borde, V., Lichten, M. and Shibata, T. "Replication and recombination: a chromatin aspect " National Academy of Science Colloquium [Links Between Recombination and Replication : Vital Roles of Recombination], Orange Country, USA, October 11, 2000.
5. Shibata, T., Nishinaka, T., Mikawa, T., Aihara, H., Kurumizaka, H., Yokoyama, S. and Ito, Y. " Homologous genetic recombination as an intrinsic dynamic feature of DNA molecular: A suggestion from structural studies on

- RecA/Rad51-mediated heteroduplex joint-formation” National Academy of Science Colloquium [Links Between Recombination and Replication : Vital Roles of Recombination] Orange Country, USA, October 11, 2000.
6. Dhar, P. K., Sonoda, E., Yamashita, Y. M., Fujimori, A. and Takeda, T. ” Chicken B lymphocyte DT40 cell line: A unique in-vitro model to study DNA repair mechanisms in higher eukaryotes ” 第 26 回インド環境ミュータジェン協会年会議, New Delhi, INDIA, March 5, 2001.
 7. Ohta, K., Furuse, M., Ohsaki, S., Murofushi, H. and Shibata, T. ” Mre 11 and recombination repair in yeast cells ” International Workshop on Radiation Damage 2001 Repair, Mutagenesis and Visualization, Tokyo, JAPAN, March 15, 2001.
 8. Mizuno, K., Hasemi, T., Ubukata, T., Wahls, W. P., Lehman, E., Kohli, J., Shibata, T. and Ohta, L. “Early meiotic signal controls chromatin remodeling at a recombination hot spot in fission yeast” The 1st International Workshop on Dynamics and Algorithms of Chromosome Function, Hiroshima, November, 2000
 9. Ohta, K. “Collaboration between recombination and transcription in yeast” The 1st International Workshop on Dynamics and Algorithms of Chromosome Function, Hiroshima, November, 2000
 10. Murakami, H., Theis, J. F., Newlon, C., Malkova, A., Haber, J. E., Shibata, T. and Ohta, K. “A replication-dependent repair may require accessible chromatin on ARS” The 1st International Workshop on Dynamics and Algorithms of Chromosome Function, Hiroshima, November, 2000
 11. Takeda, S.” Homologous DNA recombination is essential for the proliferation of vertebrate cells” EMBO Workshop: Mechanisms and Consequences of Genetic Recombination, Domaine de Seillac, France May 22, 2000.
 12. Takeda, S.” Analysis of DNA recombination using the hyper-recombinogenic chicken B-lymphocyte line DT40” The Royal Society: Hypermutation in antibody genes, London, UK July 5, 2000.
 13. Takeda, S.” Homologous DNA recombination is essential for the proliferation of vertebrate cells” FASEB Summer Research Conference on Genetic Recombination and Genome Rearrangements, Snowmass, Colorado, USA July 21, 2000.
 14. Takeda, S. ”Genetics of homologous recombination in mammalian cells” National Academy of Sciences Colloquium[Links Between Recombination and Replication: Vital Roles of Recombination] Irvine, CA, USA November 10, 2000
 15. Takeda, S.”DNA repair: interplay with other cellular processes” Workshop on DNA Repair, Noordwijkerhout, the Netherlands February 25, 2001.
 16. 柴田武彦 “遺伝子組換えに働く分子機構とその機能” 第5回構造生物学シンポジウム、東京、6月(2000)
 17. 柴田武彦 “ゲノムはなぜDNAなのか: 相同DNA組換えに働く分子の形と機能の研究から” DNA研究会平成12年7月例会、東京、7月(2000)
 18. 柴田武彦、美川務、西中太郎、相原秀樹、胡桃坂仁志、横山茂之、伊藤隆 “Molecular structure for heteroduplex joint-formation by RecA/Rad51 family proteins” 第23回日本分子生物学会年会、神戸、12月(2000)
 19. 柴田武彦、美川務、西中太郎、相原秀樹、胡桃坂仁志、横山茂之、伊藤隆

“RecA/Rad51 蛋白による相同的組換え中間体、ヘテロ二本鎖形成における構造の生物学” 第 23 回日本分子生物学会年会サテライトシンポジウム、神戸、12 月 (2000)

20. 柴田武彦、美川務、西中太郎、相原秀樹、胡桃坂仁志、横山茂之、伊藤隆 “相同的 DNA 組換え研究における構造の生物学” 理研シンポジウム「構造生物学 VI」, 1 月 (2001)
21. 柴田武彦、美川務、井川肅子、胡桃坂仁志、横山茂之、伊藤隆 “染色体組換えにおける RecA/Rad51 属蛋白活性の調節機構” 第 18 回染色体ワークショップ、葉山、1 月 (2001)
22. Sundaresan Rajesh、坂本泰一、田中剛史、須貝真理子、小寺義男、柴田武彦、河野俊之、伊藤隆 “Interaction of yeast ubiwuitin hydrolase with ubiquitin: An NMR study of the 35 kDa covalent complex” 第 39 回 NMR 討論会、東京、11 月 (2000)
23. 伊藤隆、美川務、西中太郎、相原秀樹、胡桃坂仁志、横山茂之、柴田武彦 “NMR studies on genetic recombination” 4th Institute for chemical Reaction Science (ICRS) International Symposium、仙台、11 月 (2000)
24. 山下由起子、武田俊一 “ニワトリ RAD18 ホモログの機能解析” 第 14 回ワークショップ「遺伝的組換えとその制御」、神戸、12 月 (2000)
25. 園田英一朗 “高等真核細胞 RAD21 の相同組換えと姉妹染色体分離における役割” 第 14 回ワークショップ「遺伝的組換えとその制御」、神戸、12 月 (2000)
26. 伊藤隆 “NMR による構造計算の現状と展望” 第 14 回 NMR ワークショップ「よこはま NMR 構造生物学研究会」、横浜、3 月 (2001)
27. Sundaresan Rajesh “最近の NMR 方法論的研究” 第 14 回 NMR ワークショップ「よこはま NMR 構造生物学研究会」、横浜、3 月 (2001)
28. 太田邦史、大崎志真、白髭克彦、吉川寛、柴田武彦 “Mre11 の減数分裂期転写制御における機能: DNA チップによる解析” 第 18 回染色体、葉山、1 月 (2001)
29. 水野健一、長谷見倫子、生方寿治、Wayne P. Wahls、渡辺嘉典、飯野雄一、山本正幸、Mary Fox、Jurg Kohli、柴田武彦、太田邦史 “減数分裂シグナル伝達による組換え頻発部位のクロマチン制御” 第 18 回染色体、葉山、1 月 (2001)

平成13年度

1. Ling, F. and Shibata, T., “Simultaneous defects in homoplasmy and partitioning of mitochondrial DNA by a single-base mutation, mhr1-1, in *Saccharomyces cerevisiae*.” 2001 FASEB Summer Research Conference on “Genetic recombination and chromosome rearrangements,” Colorado, USA, July 22, 2001.
2. Kurumizaka, H., Kagawa, W., Ikawa, S., Shibata, T. and Yokoyama, S., “Activities of the human DNA repair proteins, Xrcc3 and Rad51C.” 2001 FASEB Summer Research Conference on “Genetic recombination and chromosome rearrangements,” Colorado, USA, July 22, 2001.
3. Shibata, T., Ling, F., Kurumizaka, H., Kagawa, W., Yokoyama, S. and Ikawa, S., “Functions of an ATP-independent homologous pairing protein”, 3rd 3R Symposium, Hyogo, Japan, November 6, 2001.
4. Ohta, K., Mizuno, K., Yamada, T., Hasemi, T., Ubukata, T., Lehman, E., Kohli, J., Watanabe, Y., Iino, Y., Yamamoto, N., Fox, M., Smith, J., Wahls, W.,

- Shibata, T., "CRE-mediated chromatin remodeling at fission yeast meiotic recombination hot spots", 3rd 3R Symposium, Hyogo, Japan, November 6, 2001.
5. Ohta, K., "Chromatin remodeling at pombe meiotic recombination hotspots", The 2nd International Fission Yeast Meeting, Kyoto, Japan, March 26, 2002.
 6. Tsukamoto, Y., Taggart, A. K. P., and Zakian, Y. A. "The role of the ATM homologue, Mec1 and Tel1, and the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomere replication in *Saccharomyces cerevisiae*." The 3rd Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair, Miki, Japan, November 8, 2001.
 7. Tsukamoto, Y., Taggart, A. K. P. and Zakian, Y. A. "The role of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomerase mediated lengthening of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres." 2001 FASEB Summer Research Conference on Genetic recombination and chromosome rearrangements, Colorado, USA, July 22, 2001.
 8. Tsukamoto, Y., Taggart, A. K. P. and Zakian, Y. A. "The Mre11p complex helps recruit telomerase to yeast telomeres. Telomeres & Telomerase" Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Cold Spring Harbor, New York, USA, March 30, 2001. Kawasaki, K. and Shibata, T., "The GTP binding stimulates Dm RECQE/Q5 DNA helicase." 2001 FASEB Summer Research Conferences, Vermont, USA, July 7, 2001.
 9. 凌 楓、柴田武彦 "A mtDNA recombination gene, MHR1 encodes a mitochondrial homologous pairing protein that promotes the establishment of homoplasmy" 第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 (2001)
 10. 太田邦史、白髭克彦、吉川寛、柴田武彦 "減数分裂組換えと配偶子形成遺伝子調節の共役 : DNA マイクロアレイによる解析" 第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 (2001)
 11. 伊藤隆、Sundaresan Rajesh、倉島かおり、吉益雅俊、相原秀樹、美川務、河野俊之、横山茂之、柴田武彦 "NMR を用いた蛋白質間相互作用の解析(YUH1-Ub 及び RecA-Din1 の系)" 第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 (2001)
 12. 美川務、齋藤雅子、本多賢吉、伊藤隆、井川肅子、柴田武彦 "RecA による DNA 相同組換えの分子機構の解析" 第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 (2001)
 13. 山田貴富、水野健一、室伏拓、柴田武彦、太田邦史 "組換えホットスポット周辺のクロマチン再編成へのヒストンアセチル化の関与" 第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 (2001)
 14. 水野健一、柴田武彦、太田邦史 "分裂酵母減数分裂期組換え頻発部位のクロマチン構造変化の制御機構" 第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 (2001)
 15. 太田邦史、白髭克彦、吉川寛、柴田武彦 "減数分裂における転写因子と組換え因子の共役 : DNA チップによる解析" 第 54 回日本細胞生物学会大会、岐阜、5 月 (2001)
 16. 山田貴富、水野健一、M. E. Fox、室伏拓、G. R. Smith、柴田武彦、太田邦史 "減数分裂期組換えホットスポットにみられる配列依存的クロマチン再編成の一般性" 第 34 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、京都、7 月 (2001)
 17. 太田邦史、久郷和人、柴田武彦 "酵母 Mre11 の減数分裂期組換え開始部位への結合" 第 19 回染色体ワークショップ、神戸、1 月 (2002)
 18. Sundaresan Rajesh、柴田武彦、伊藤隆 "An inexpensive method for

generating u-15N, ,2H aro-1H Phe, Tyr and Trp incorporated u-2H, 15N labelled proteins for NMR resonance assignment” 第 40 回 NMR 討論会、京都、11 月 (2001)

19. 塚本恭正、V. Zakian、小川智子、小川英行 “出芽酵母における組換えによるテロメア維持機構の解析” 第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 (2001)
20. 臼井雄彦、小川英行、J. Petrini “DNA 損傷応答における Mre11-Rad50-Xrs2 蛋白質複合体機能” 第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 (2001)

平成14年度

1. Senbongi, H., Ling, F., Seino, S. and Shibata, T.: "Analysis of yeast Atm1p function and its human ortholog, MTABC3The 1st JBS Biofrontier Symposium", Yufuin, Japan 6 月 (2002)
2. Kawasaki, K., Nakayama, M. and Shibata, T.: "The interaction between *RECQ5/QE* DNA helicase and retrotransposon *mdg3*" 44th Annual Drosophila Research Conference, Chicago, USA 3 月 (2003)
3. Ohta, K., Murakami, H., Kugo, Kazuto., Hirota, K., Shirahige, K., Nicolas, A. and Shibata, T.: "Interaction of Mre11 with DSB repair proteins and DSB sites in meiosis" EMBO Workshop on Genetic Recombination, Seillac, France 5 月 (2002)
4. Rajesh, S., Shibata, T., Laue. E. and Ito, Y.: "A simple inexpensive method to selectively protonate aromatic rings of Phe, Tyr and Trp for improved global fold determination in larger proteins" XXth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Toronto, Canada 8 月 (2002)
5. Rajesh, S., Kurashima, H., Kohno, T., Shibata, T., Laue, E. D. and Ito, Y.: "Improved global fold determination of larger proteins using selectively aromatic and methyl protonated samples" ISGO International Conference on Structural Genomics Berlin, Germany 10 月 (2002)
6. Shibata, T., and Ling, F.: "The essential functions of homologous pairing in mtDNA partitioning and homoplasmy EMBO Workshop on Genetic Recombination", Seillac, France 5 月 (2002)
7. Shibata, T., and Ling, F.: "Yeast mitochondrial DNA inheritance requires DNA recombination-dependent systems resemble to those of bacterial viruses" The First J-mit International Symposium on Frontier of Mitochondrial Genome Research, Tokyo, Japan 10 月 (2002)
8. Mikawa, T., Ito, Y., and Shibata, T.: "Lesion recognition by the Mutm protein: A multidimensional NMR study" XXth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Toronto, Canada 8 月 (2002)
9. Ito, Y., Rajesh, S., Kurashima, K., Sugai, M., Kohno, T., and Shibata, T.: "Improved global fold determination of 26 Kda yeast ubiquitin hydrolase1 using a combination of aromatic and methyl selectively protonated YUH1 in a u-2H/13C/15N background" XXth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Toronto, Canada 8 月 (2002)
10. Ohta, K.: "Chromatin regulation at fission yeast meiotic recombination hotspots" Human Frontier Science Program second annual Awardees' Meeting, Ottawa, Canada, 6 月 (2002)
11. 太田邦史: “染色体組換えとクロマチン再編成”, 第 55 回日本細胞生物学会大会,

横浜, 5月(2002)

12. 柴田武彦: “相同的組換えは DNA の分子機能か: 遺伝から進化まで”, 生化学若い研究者の会関東支部・初夏のシンポジウム, 東京, 6月(2002)
13. 柴田武彦: “相同的組換えの意外な機能: 分子機能からのアプローチ”, 生化学若い研究者の会京都支部・春のセミナー, 京都, 6月(2002)
14. 山田貴富, 水野健一, 室伏擴, 柴田武彦, 太田邦史: “組換えホットスポット周辺のクロマチン再編成とヒストンアセチル化”, 第35回酵母遺伝学フォーラム, 広島, 7月(2002)
15. 柴田武彦: “Why is DNA genetic material: Possible roles of homologous DNA recombination in creating new genes as revealed by its molecular mechanisms.” 日本進化学会第4回大会, 東京, 8月(2002)
16. 柴田武彦, 凌楓: “A new role of DNA recombination by an ATP-independent homologous pairing protein: Mitochondrial DNA-partitioning and homoplasmy”, 第75回日本生化学会大会, 京都, 10月(2002)
17. 川崎勝己, 横山純, 丸山沙弥子, 中山実, 松本幸次, 柴田武彦: “DmRECQ5/QEの細胞内局在と動態”, 第75回日本生化学会大会, 京都, 10月(2002)
18. 柴田武彦, 凌楓: “ミトコンドリア DNA 複製・分配過程の細菌ウイルス DNA 複製・成熟過程との共通性”, 第25回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2002)
19. 太田邦史, 柴田武彦: “減数分裂の組換え開始機構”, 第25回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2002)
20. 山田貴富, 水野健一, 室伏擴, 柴田武彦, 太田邦史: “減数分裂期相同組換えに先行するクロマチン構造修飾”, 第25回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2002)
21. 凌楓, 柴田武彦: “ミトコンドリアホモプラスミー成立分子機構: 相同 DNA 対合蛋白質の必須機能”, 第2回日本ミトコンドリア研究会年会, 東京, 12月(2002)
22. 凌楓, 柴田武彦: “相同 DNA 組換えに依存したミトコンドリア染色体の対立遺伝子の分離とミトコンドリア染色体ゲノムの構築”, 第20回染色体ワークショップ, 京都, 1月(2003)
23. 太田邦史, 久郷和人, 村上創, 柴田武彦: “Mre11 と Sae2/Com1・Rec102 の相互作用”, 第20回染色体ワークショップ, 京都, 1月(2003)
24. 武田俊一 “Critical roles of postreplicational repair in maintaining chromosomal DNA” 第75回日本生化学会大会, 2002年10月
25. 武田俊一 “ゲノム構造の維持機構とシスプラチン感受性の逆遺伝学による解析” 第61回日本癌学会総会, 2002年10月
26. 武田俊一 “Phenotypic analysis of chick cell lines deficient in postreplicational repair pathways” The 19th Radiation Biology Center International Symposium, 2002年11月
27. 寺澤匡博, 小川英行, 小川智子 “減数分裂期組換えに関与する DNA 修復合成解析” 第25回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2002)
28. 塚本恭正, 三岡周子, 小川英行, 小川智子 “出芽酵母の多機能 Mre11 蛋白質複合体の Xrs2 サブユニットによる活性制御” 第25回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2002)
29. 三岡周子, 小川智子, 小川英行, 塚本恭正 “テロメアー複製機能に欠損を持つ出芽酵母 Xrs2 変異株の解析” 第25回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月

平成15年度

1. Shibata, T. "Proteins promoting intermolecular base-pairing for homologous recombination: DNA and protein structures with novel functions" 10th Congress of the Federation of Asian and Oceanic Biochemists and Molecular Biologist, Bangalore, India, Dec. (2003)
2. 太田邦史 "遺伝的組換えの分子多様制御機構" 日本進化学会第5回大会、2003年8月、福岡
3. 凌 楓 "ミトコンドリア遺伝の基本分子機構" 第76回日本生化学会大会、2003年10月、横浜(平成15年度日本生化学会奨励賞受賞講演)
4. 太田邦史 "Roles of Mre11 in transcriptional regulation during yeast gametogenesis" 第76回日本生化学会大会、2003年10月、横浜

ポスター発表 (国内 34件、海外 22件)

平成11年度

1. 瀬尾秀宗, 奥原康司, 胡桃坂仁志, 太田邦史, 柴田武彦, 秋山徹, 室伏擴: "DNA Unwinding Factor (DUF)/FACT のクロマチン構造変化への影響," 第22回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月 (1999).
2. 長谷見倫子, 水野健一, 飯野雄一, 山本正幸, Fox, M., Smith, G., 太田邦史, 柴田武彦: "ストレス応答 MAPK 経路に制御されたクロマチン再編成," 第22回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月 (1999).
3. 古瀬宗則, 生方寿治, 太田邦史, 柴田武彦: "減数分裂時の二重鎖切断関連因子とクロマチン構造変化," 第22回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月 (1999).
4. 山田貴富, 水野健一, 室伏擴, 太田邦史, 柴田武彦: "分裂酵母の組換えホットスポットにおけるクロマチン構造変化へのヒストン脱アセチル化の寄与," 第22回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月 (1999).
5. 太田邦史, 長瀬裕子, 大崎志真, 古瀬宗則, 室伏きみ子, 柴田武彦: "組換え開始因子 Mre11 の過剰発現とそのドミナントネガティブ効果," 第22回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月 (1999).
6. 生方寿治, 水野健一, 渡辺嘉典, 飯野雄一, 山本正幸, Kohli, J., 太田邦史, 柴田武彦: "分裂酵母減数分裂誘導経路によるクロマチン構造変化の制御," 第22回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月 (1999).
7. 石部聡子, 西中太郎, 濡木理, 中迫雅由, 幾田まり, 馬青, 井川肅子, 牧野修, 神谷信夫, Vassilyev, D. G., 横山茂之, 柴田武彦: "相同組換えタンパク質 RecA とオリゴ DNA の複合体結晶の X 線結晶構造解析," 第22回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月 (1999).
8. 水野健一, Kohli, J., 太田邦史, 柴田武彦: "減数分裂期における相同染色体対合と組換え頻発部位のクロマチン構造との関係," 第22回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月 (1999).
9. 村上創, Haber, J. E., 牧野修, 太田邦史, 柴田武彦: "出芽酵母第三染色体 ARS310 領域における組換えとクロマチン構造の関係," 第22回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月 (1999).
10. 山田貴富, 水野健一, 室伏擴, 太田邦史, 柴田武彦: "分裂酵母の組換えホットスポットのクロマチン構造変化とヒストン脱アセチル化," 第17回染色体ワーク

ショップ. 神戸, 1月 (2000).

11. 長谷見倫子, 水野健一, 飯野雄一, 山本正幸, Fox, M., Smith, G., 太田邦史, 柴田武彦: "ストレスに応答するクロマチン再編成の制御機構の解析," 第 17 回染色体ワークショップ. 神戸, 1月 (2000).
12. 川崎勝己, 柴田武彦 "RECQE タンパクの機能ドメインおよび細胞内ネットワーク" 日本薬学会第 120 年会, 東京, 2000 年 3 月
13. 凌 楓, 柴田武彦 "組換え修復蛋白質のミトコンドリア対立遺伝子分離と DNA 分配における働き" 第 22 回日本分子生物学会年会. 福岡, 12 月 (1999)
14. 千本木裕, 凌 楓, 柴田武彦 "ミトコンドリア DNA の酸化的損傷によってミトコンドリア呼吸能の消失を引き起こす酵母 atm1-1 変異" 第 22 回日本分子生物学会年会. 福岡, 12 月 (1999)

平成12年度

1. Mikawa, T., Nishida, K., Ito, Y. and Shibata, T."Heteronuclear NMR based mapping of amino acid residues of RecA protein involved in DNA binding" The 41st Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, Santa Fe, USA, April 12, 2000.
2. Ito, Y., Rajesh, S., Sakamoto, T., Tanaka, T., Iwamoto, M., Shibata, T. and Kohno, T."NMR studies on the interaction of ubiquitin with yeast ubiquitin hydrolase" The 41st Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, Santa Fe, USA, April 12, 2000.
3. Takasugi, K., Rajesh, S., Iwamoto, M., Kohno, T., Shibata, T. and Ito, Y."Relaxation study of the backbone dynamics of yeast ubiquitin hydrolase by ¹H-¹⁵N NMR" The 41st Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, Santa Fe, USA, April 12, 2000.
4. Kawasaki, K., Jeong, S-M., Nguyen, Q. D. and Shibata, T. "Identification of *Drosophila melanogaster* RECQE as a member of new family of RecQ homologous preferentially expressed in early embryos" LXV Cold Spring Harbor Symposium, New York, USA, June 1, 2000.
5. Feng, L. and Shibata, T." A recombination protein, Mhr 1-dependent establishment of homoplasmy and mitochondrial DNA partitioning in yeast" New London, Connecticut, USA, June 25, 2000.
6. Mizuno, K., Wahls, W. P., Hasemi, T., Ubukata., Watanabe, Y., Iino, Y., Yamamoto, M., Fox, M., Smith, G., Kohli, J., Shibata, T. and Ohta, K." Signaling for meiosis induces chromatin remodeling to activate homologous recombination" 2000 Gordon Research Conference on Molecular Genetics, New London, CT, USA, July 23, 2000.
7. Murakami, H., Theis, J. F., Newlon, C., Malkova, A., Haber, J. E., Shibata, T. and Ohta, K."Chromatin structure defined by ARS310 on yeast chromosome" 1st Salk Institute Conference on Eukaryotic DNA Replication. San Diego, USA, September 6, 2000.
8. Seo, H., Okuhara, K., Yamada, T., Kurumizaka, H., Ohta, K., Shibata, T., Akiyama, T. and Murofushi, H."Involvement of DNA unwinding factor(DUF)/FACT in the modulation of chromatin structure" 1st Salk Institute Conference on Eukaryotic DNA Replication. San Diego, USA, September 6, 2000.
9. Rajesh, S., Sakamoto, T., Sugai, M., Shibata, T., Kohno, T. and Ito, Y."

Structural basis for ubiquitin binding by yeast ubiquitin hydrolase 1(YUH1): insights from NMR studies on YUH1 and YUH1-Ub complex” The 42nd Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, Orland, USA, March 11, 2001.

10. Mikawa, T., Ito, Y., Hachimori, Y., Saito, M., Honda, M., Kohno, T. and Shibata, T.” Analysis of DNA binding sites on RecA protein using multidimensional NMR” The 42nd Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, Orland, USA, March 11, 2001.
11. 相原秀樹、伊藤隆、美川務、横山茂之、柴田武彦 “大腸菌 DinI の高次構造と RecA との相互作用” 理研シンポジウム「構造生物学 VI」, 1月(2001)
12. Sundaresan Rajesh、坂本泰一、田中剛史、須貝真理子、小寺義男、柴田武彦、河野俊之、伊藤隆 “Interaction of yeast ubiquitin hydrolase with ubiquitin: An NMR study of the 35 kDa covalent complex” 理研シンポジウム「構造生物学 VI」, 1月(2001)
13. 美川務、伊藤隆、八森由貴子、齋藤雅子、柴田武彦 “RecA の DNA 結合部位の解析” 理研シンポジウム「構造生物学 VI」, 1月(2001)

平成13年度

1. Mizuno, K., Yamada, T., Hasemi, T., Lehman, E., Kohli, J., Watanabe, Y., Iino, Y., Yamamoto, M., Fox, M., Smith, G., Murofushi, H., Wahls, W., Shibata, T. and Ohta, K., “Genetic control of chromatin opening at meiotic recombination hotspots in fission yeast.” 2001 FASEB Summer Research Conference on “Genetic recombination and chromosome rearrangements,” Colorado, USA, July 22, 2001.
2. Ling, F. and Shibata, T., “A role of Mre 1 protein-mitochondrial DNA-networks in homoplasmy.” 2001 FASEB Summer Research Conference on “Genetic recombination and chromosome rearrangements,” Colorado, USA, July 22, 2001.
3. Kawasaki, K., Maruyama, S., Nakayama, M., Matsumoto, K. and Shibata, T., “Characterization of the large isoform of *Drosophila melanogaster* RECQ5/QE helicase: Effects of GTP on DNA helicase activity”, 3rd 3R Symposium, Hyogo, Japan, November 6, 2001.
4. Mizuno, K., Hasemi, T., Ubukata, T., Wahls, W., Watanabe, Y., Iino, Y., Yamamoto, M., Fox, M., Smith, G., Lehman, E., Kohli, J., Shibata, T. and Ohta, K. “Regulation of M26 chromatin remodeling by meiosis-inducing signaling pathways”, The 2nd International Fission Yeast Meeting, Kyoto, Japan, March 26, 2002.
5. Yamada, T., Mizuno, K., Murofushi, H., Shibata, T. and Ohta, K. “Histone acetylation is involved in chromatin remodeling around recombination hotspot”, The 2nd International Fission Yeast Meeting, Kyoto, Japan, March 26, 2002.
6. Kawasaki, K. and Shibata, T. “The GTP binding stimulates Dm RECQ5/Q5 DNA helicase” 2001 FASEB Summer Research Conference, Vermont, USA, July 2001
7. 川崎勝己、中山実、丸山沙弥子、松本幸次、柴田武彦 “DmRECQ5/QE における NTP 結合部位と DNA ヘリカーゼ活性化” 第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、12月(2001)

8. 千本木裕、凌 楓、清野進、柴田武彦 “酵母 Atm1 蛋白の機能とヒトオーソログ MTABC3 の解析” 第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 (2001)
9. 村上創、K. Smith、A. Nicolas、柴田武彦、太田邦史 “人工的組換えホットスポットにおけるクロマチン構造解析” 第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 (2001)
10. 瀬尾秀宗、武田俊一、室伏拓、柴田武彦、太田邦史 “抗体遺伝子の組換え及び発現におけるクロマチン構造の機能” 第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 (2001)
11. 美川務、齋藤雅子、伊藤隆、井川肅子、柴田武彦 “RecA 蛋白質の中央ドメインの機能解析” 第 1 回日本蛋白質科学会年会、大阪、6 月 (2001)
12. 伊藤隆、B. Smith, R. Fogh, E. Laue, 柴田武彦 “NMR 解析ソフトウェア ANSIG の改良” 第 1 回日本蛋白質科学会年会、大阪、6 月 (2001)
13. 佐藤寛、小川智子、小川英行 “減数分裂における DNA 二本鎖切断に特異的なチェックポイント経路の活性化と Mre11 蛋白質のリン酸化” 第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 (2001)

平成14年度

1. Ling, F. and Shibata, T.: "A role of Mhr 1 protein that promotes pairing of homologous DNA in recombination-dependent mtDNA partitioning" The 2002 Gordon Research Conference on Mitochondria and Chloroplasts, London, UK 8 月 (2002)
2. Yamada, T., Mizuno, K., Murofush, H., Shibata, T., and Ohta, K.: "Histone acetylation and chromatin remodeling around recombination hotspot in fission yeast" The 4th Asian-Pacific Organization for Cell Biology Congress Taipei, Taiwan 11 月 (2002)
3. 丸山沙弥子, 川崎勝己, 松本幸次, 柴田武彦: “RECQ5/QE の細胞内局在と機能解析”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002)
4. 中山実, 川崎勝己, 松本幸次, 柴田武彦: “RECQ5 ヘリカーゼの機能解析”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002)
5. 川崎勝己, 中山実, 丸山沙弥子, 柴田武彦, 松本幸次, 草野好司: “RECQ5 型ヘリカーゼはショウジョウバエでどのように働くか?” 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002)
6. 久郷和人, 白髭克彦, 廣田耕志, 柴田武彦, 太田邦史: “出芽酵母組換え酵素 Mre11 による減数分裂時遺伝子の発現制御”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002)
7. 瀬尾秀宗, 武田俊一, 室伏拓, 柴田武彦, 太田邦史: “抗体遺伝子の組換え及び発現におけるクロマチン構造の機能”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002)

平成15年度

1. Ling, F. and Shibata, T. “A role of Mhr1p-dependent DNA recombination for homoplasmy in yeast mitochondria” The 21st International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Goteborg, Sweden, July (2003)
2. Shibata, T. and Ling, F. “Homologous recombination-dependent mechanism

- of vegetative segregation of mitochondrial alleles and homoplasmy” 2003 FASEB Summer Research conference, Snowmass, USA, July (2003)
3. Ohta, K., Kugo, K., Mori, S., Sasanuma, H., Murakami, H., Shirahige, K. and Shibata, T. “Distribution of Mre11 and Spo11” 2003 FASEB Summer Research conference, Snowmass, USA, July (2003)
 4. Ling, F., Hori, A. and Shibata, T. “Mhr1p-dependent homologous recombination for preferential inheritance of suppressive mutant mtDNA in yeast” 2003 FASEB Summer Research conference, Snowmass, USA, July (2003)
 5. 川崎勝己、中山実、丸山沙耶子、草野好司、松本幸次、柴田武彦 “DmRECQ5/QE helicase: the response to DNA damage” 第76回日本生化学会大会、2003年10月、横浜
 6. 凌 楓、柴田武彦 “The concatemer formation of mtDNA and its processing into monomers as the essential pathway of mtDNA partitioning in *Saccharomyces cerevisiae*” 第76回日本生化学会大会、2003年10月、横浜
 7. 吉益雅俊、伊藤隆、本多賢吉、石部聡子、美川務、柴田武彦 “NMRを用いた大腸菌 DinI と ssDNA-RecA 複合体との相互作用の解析” 第3回日本蛋白質科学会年会、2003年6月、札幌
 8. 川崎勝己、中山実、柴田武彦 “Dm RECQ5/QE DNA helicase and retrotransposon mdg3” ショウジョウバエ研究会第6回研究集会、2003年7月、東京
 9. 中山実、川崎勝己、松本幸次、柴田武彦 “Possible roles of RecQ5: complementation study in yeast” ショウジョウバエ研究会第6回研究集会、2003年7月、東京

プレス発表

1. 2002年10月18日
Pecina, A., Smith, K. N., Mezard, C., Murakami, H., Ohta, K., and Nicolas, A.: "Targeted stimulation of meiotic recombination." *Cell* **111**, 173-184 (2002).

(3)特許出願 (国内 7件、海外 5件)

国内

1. 太田邦史、柴田武彦：テロメア長の調節方法：出願番号 2000-041929 PCT/JP01/01024：2000年
2. 胡桃坂仁志、横山茂之、柴田武彦：DNA 組換え活性を有するポリペプチド複合体：出願番号 2001-171705：2000年
3. 武田俊一、高田穰：抗がん剤のターゲット：出願番号 PCT/JP00/04739：2001年
4. 太田邦史、瀬尾秀宗、柴田武彦：体細胞相同組換えの促進方法：出願番号 2002-221232、PCT/JP03/09563：2002年
5. 太田邦史、山田貴富、柴田武彦：ヒストンアセチル化酵素活性の調節による遺伝子組換え頻度の制御：出願番号 2002-339392：2002年
6. 太田邦史、瀬尾秀宗、柴田武彦：体細胞相同組換えの誘発方法：出願番号 2002-376555：2002年

7. 太田邦史、水野健一、柴田武彦：クロマチン再編成因子の機能改変による相同組換えの調節：2003年

海外

1. 太田邦史、柴田武彦：テロメア長の調節方法：出願番号 2000-041929 PCT/JP01/01024：2000年
2. 胡桃坂仁志、横山茂之、柴田武彦：DNA 組換え活性を有するポリペプチド複合体：出願番号 2001-171705：2000年
3. 武田俊一、高田穰：抗がん剤のターゲット：出願番号 PCT/JP00/04739：2001年
4. 太田邦史、瀬尾秀宗、柴田武彦：体細胞相同組換えの促進方法：出願番号 2002-221232、PCT/JP03/09563：2002年
5. 太田邦史、瀬尾秀宗、柴田武彦：体細胞相同組換えの誘発方法：出願番号 2002-376555：2002年

(4)新聞報道等

新聞報道

1. 2002年10月18日
Pecina, A., Smith, K. N., Mezard, C., Murakami, H., Ohta, K., and Nicolas, A.: "Targeted stimulation of meiotic recombination." *Cell* **111**, 173-184 (2002).
について、日本経済新聞、日本工業新聞、日経産業新聞にて報道

受賞

1. 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”

その他

(5)その他特記事項

7. 結び

提案書では、具体的問題として「(1) 目的としない組換えの方が桁違いに多く起こることと、極めて低い標的組換え(狙った場所での組換え)の率を引き上げる手だての不在により、標的組換えによるDNA導入が困難である。(2) 多数のコピーが直列に取り込まれた場合、組み込まれた遺伝子の発現抑制が起こることがある(多コピー抑制)。(3) 導入された遺伝子で組換えが誘導され、遺伝子導入実験の結果が安定しない。(4) 高等動植物で、細胞を株化するとゲノムの再編成が起こり、特に植物で細胞から個体を再生しようとするときの傷害となる。(5) 結果が予測できない技術は社会に不安を与える。また、(6) ヒトでは、加齢に伴うミトコンドリアゲノム等への変異の蓄積や、Bloom's syndrome、Werner's syndromeなど組換えを介したゲノム流動化が原因と考えられている遺伝疾病が知られている。これらの問題に対する対策・予防と治療技術の基盤としても組換え制御の理解が必要である。(7) 学術面においても組換え制御技術が必要である。遺伝子の未知機能を明らかにする最も有効で普遍的な方法は、細胞内の正常な遺伝子を試験管内加工で得た変異遺伝子で置き換え、その表現型を調べること(逆遺伝学)であるが、現在は、標的組換えの困難さのために適応範囲に限られる。」を挙げ、「組換え制御についての理解を深め、上にあげた問題を解き、人為的組換え制御によるゲノム加工、医療のために新技術基盤の構築を目指した、"ゲノムの流動性・恒常性制御の研究"を提案する。」と書いた。小川Gと柴田Gの共同研究で出芽酵母の組換えに働く遺伝子群の同定と組換え機能の解析が進んだ。特にクロマチン遷移に働く遺伝子の解析やMre11蛋白質についての研究では、協力と競争とが相乗的に作用して世界をリードするまでになった。一方、武田Gとの共同研究では、ヒトRad51蛋白質パラログの研究で、武田Gが得意とするニワトリBリンパ細胞株での遺伝学的解析と、柴田Gが得意とする生化学的および蛋白質立体構造解析とが奏功し互いに研究を促進する多くの刺激を得て研究が進んだ。。全く異なるアプローチを得意とする3つのグループによる共同研究は共同著者の論文の数では計れない大きな効果があったといえる。後述するニワトリBリンパ細胞株での相長的組換え人為制御の成果も、武田Gとの共同研究が大きな刺激になっている。

挙げた問題の内、1と7については、研究成果の3.3の(2) 2)で書いたように、出芽酵母で、特定遺伝子座をねらって集団の1/4の細胞で人為的の相長的組換えを誘導することに成功し、ニワトリBリンパ細胞株では、集団の半数の細胞で特別な遺伝子座ではあるが相長的組換えを人為的に誘導することに成功した。一般には、高等動物細胞の相長的組換えでは、「高頻度」を唱っているものでも、組換えた細胞は集団の 10^{-5} 程度であり、出芽酵母の減数分裂期組換えにおいて組換えホットスポット

トでの組換えでも組換えた細胞は集団の10%以下である。我々が到達した相同的組換えの人為制御での組換え頻度の数10%という値が如何に桁外れであるか理解頂きたい。未だ、「任意の」細胞で、染色体上の「任意の」遺伝子座でというレベルではないが、その実現に必要な理解にかなりの程度に近づいている。今後、伝統育種に変わる（研究成果の3.3の(2) 2）を参照）利用技術まで視野に入れて重点的に推進すべき研究課題であると考え。

問題3の原因は特に書かなかったが、染色体DNAに組み込まれた異種DNAともとの染色体DNAとのつなぎ目でクロマチン構造が乱れ、その部分が減数分裂期相同的組換えのホットスポットになることを柴田Gの太田らは明らかにしている(Ohta, *et al.* (1999) *Nucleic Acids Res.* 27, 2175)。組換えホットスポットを持つDNAと持たないDNAでのジーンコンバージョンは必ずホットスポットが失われる方向に起こるので、減数分裂でのジーンコンバージョンで異種DNAは失われ傾向をもつことになる。この研究は、当初競争相手であった米国NIHのDr. M. Lichtenとの共同研究で、この結果、Dr. Lichtenがクロマチン遷移の相同的組換え開始での重要性を理解したという余話がある。問題点2と4は、研究対象にならなかったが、他グループの研究で、問題4はトランスポゾンの活性化が原因として注目されていると聞いている。問題5については、相同的組換え開始の機構と法則がかなり明らかになってきたので、5年前に比べるとかなりの疑問に答えることができるのではないかと考える。

問題6については、組換えに特異的に働くDNA立体構造の研究から派生したATPを必要としない相同的DNA対合蛋白質群の研究とミトコンドリアでの相同的組換えの研究が合わさり、これまで能動過程であるのかランダムなmtDNA分離で説明が付くのかさえが議論になっていたホモプラスミー成立について、そこに働く蛋白質/遺伝子の最初の例（未だ他にない）を見つけ、それを基に成立機構のモデルを導き、それを裏付けるデータを集めることができた。現在のところ、ホモプラスミー成立過程の分子機構についての研究は我々単独の分野である。また、研究成果3.4(2)で述べたように、ホモプラスミーという遺伝的均質化は、これまでられていなかった相同的組換えの機能である。これと同様な遺伝現象は、細胞核でもみられ、ミトコンドリアで働くMhr1蛋白質と同じクラスの相同的DNA対合蛋白質であるRad52蛋白質が要に働いていることから、機構的にも共通性が推定でき、今後新しい研究分野に発展できると期待している。

戦略的創造研究推進事業チーム型研究費の使い勝手は、他の研究費より遙かによかったことを特記したい。この研究を5年間にわたり支援してくださいました戦略

的創造研究推進事業チーム型研究研究領域「ゲノムの構造と機能」の研究総括 大石道夫（財）かずさDNA研究所所長および独立行政法人科学技術振興機構に多大の感謝の念を表したい。