

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「高等真核細胞で標的組換えの効率を上昇させる方法の開発」

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

武田 俊一 (京都大学大学院医学研究科 教授)

主たる共同研究者

伊藤 隆 (理化学研究所横浜研究所 前任研究員)

中山 建男 (宮崎大学医学部 教授)

岩崎 博史 (横浜市立大学大学院総合理学研究科 助教授)

3. 研究内容及び成果

武田グループの当初の研究目的は、高等真核細胞で、極めて組換え効率の高いニワトリリンパ球細胞株DT40を解析し、その高い組換え効率の分子メカニズムを明らかにし、それらの情報をもとに、ヒト細胞などほかの高等真核細胞においても高効率な組換えを行う細胞株を樹立することであった。本目的に到達する為に武田グループは以下の研究目的を当初、設定した。(1) DT40 株における相同組換えに関与する遺伝子の機能解析(2) 標的組換えに関与する未知分子の同定(3) 細胞の本来持つ標的組換え能力を刺激、高める方法の確立であった。武田グループは(1)の相同組換えに関する遺伝子の機能解析については、以下に述べるように成果を挙げたが、(2)および(3)に関しては所期の目的を達するには、不十分な成果に終わった。以下に(1)の相同組み換えに関する遺伝子の機能解析について得られた成果を中心にまとめる。

武田グループは相同組換えの中心分子、Rad51及びそれと機能的に相互作用する分子の機能解析を行い、各変異株の表現型の定量的比較より、3種類の重要な組み換え遺伝子(Rad51、Rad52、Rad54)が、ヒトやニワトリではRad51>>>Rad54>Rad52の順に相同組換えに貢献してRad51が圧倒的に重要であることを明らかにした。従って、ヒトやニワトリでは酵母に比べて、Rad51の機能を調節していると考えられる遺伝子(Brca1とBrca2、Bard1、Rad51パラログなど)の種類も多い。武田グループは既に、5種類のRad51類似遺伝子群(Rad51B、Rad51C、Rad51D、XRCC2、XRCC3)の各欠損株が非常に似た表現型を示すことを明らかにしていたが、5種類のRad51パラログは各々が必須の構成因子としてコンプレックスを作り、損傷部位においてRad51が重合するのを促進することを明らかにした。更に、Rad51パラログの一部が相同組み換えの後期ステップにも関与することを明らかにした。また、相同組み換えの初期ステップにおいて、Rad51パラログコンプレックスと他の組み換えタンパクとの機能的相互作用を、多重遺伝子欠損細胞を作製することによって解析した。

武田グループは又、Brca2分子の機能解析を行いBrca2非依存的にRad51が機能し、そのRad51の機能の一部はRad54との相互作用によることを明らかにした。現在DNAポリメラーゼは

十数種類知られているが、武田グループは全ポリメラーゼの機能を多重遺伝子破壊により網羅的に解析し、複数種類のポリメラーゼ間の複雑な関係を明らかにした。DNA 損傷が発生したときに急速に多種類の分子が損傷部位に集まってくるが、武田グループは、酵母の損傷チェックポイントに働く分子のニワトリホモログが相同組み換えや DNA 修復を促進することを明らかにした。ほかに武田グループは H2AX のリン酸化サイト(Ser139)をアラニンに置換したミュータント細胞を作製し、この細胞や XRCC3 欠損との 2 重欠損株を作製したが、この欠損株は Rad51 の重合が大きく遅れ、合成致死になったことから、ヒストン修飾と Rad51 パラログとが互いに相補しながら Rad51 の重合を促進していると結論した。武田グループは、他にも幅広い研究を行い、Mre11/Rad50/Nbs1 コンプレックスの機能解析や、CDK による相同組み換えの制御についても研究を進めた。

武田グループの初期の研究目標であった標的組換えに関与する未知分子の同定及び細胞の本来もつ標的組換え能力を刺激する方法の開発については、ある特定の成果が見られたが、残念ながら当初の目的であったより汎用性のある哺乳動物細胞においてニワトリ DT40 と同じ組み換え効率をもった細胞の樹立には至らなかった。

#### 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

武田グループの研究成果に対する評価の結果についてはいくつかの問題点が指摘された。まず、武田グループの研究の成果を示す論文の質・量ともまず、妥当であり、いくつかの興味深い知見を得られたことについては一定の評価がなされた。この点から見ると本プロジェクトにおける武田グループの成果については合格点を与えてもよいと思われる。

一方、いくつかの問題点が指摘された。まず、本研究課題である「高等真核細胞で標的組換えの効率を上昇させる方法の開発」については率直に言って、ほとんど研究成果が得られなかったという厳しい意見が評価者ほぼ全員の指摘である。即ち、本プロジェクト開始時に既に分かっていた、ニワトリの DT40 細胞の持つ高い相同組換えが何に起因しているかという機構を少しでも明らかにし、それによって哺乳類をはじめとするほかの高等真核細胞に応用し、そのような株を樹立することを目指すはずであった。研究代表者らは当初の申請の根幹を成す相同組換えに DT40 細胞の機能については、上にも述べたように、おぼろげな解決をただけに終わっていると受け取られてもやむをえない結果であった。この点は評価者全員のほぼ一致した意見であり、また、中間評価でも指摘したにも関わらずこのような結果に終わったことは遺憾であるといえる。また、いくつかの論文発表については、それらの研究を統一的に貫くテーマというよりも散漫な研究テーマに終始したことも問題点としてとりあげられよう。これは、武田グループが更に細かいいくつかのサブグループから成り立っており、その中における、相互に成果を生かしていくという試みがあまり無かったのではないかという指摘もあった。

結論として武田グループの研究成果は、様々な理由があるにせよ当初の研究課題から逸脱した場合、また客観的理由で逸脱せざるをえなかった時に、どのように対処是正してゆくかは CREST の

今後の課題であろう。総合的に判断して、評価委員は論文・口頭発表については比較的妥当だという点に集約されているが、多額の研究費が費やされたという事実、また上に述べたように、当初の研究計画に対して努力がはらわれていなかったという点、研究の体制に関しては多くの評価者が激しい意見を寄せている。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

武田グループの相同組換えの分子機構に関しては一定のレベルの研究成果を出しており、その点に限っていえば、科学技術への貢献はあったといえるが、成果の戦略目標に関していえば、4-1で述べたように非常に不満の残る結果となったことは残念である。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

日本遺伝学会奨励賞（岩崎 博史）平成13年9月