

動物細胞における DNA 組換えに関する研究

Studies on DNA recombination in mammalian cells

代表研究者	東京大学医科学研究所教授 Prof., Inst. of Med. Sci., Univ. of Tokyo Hideo IKEDA	池田 日出男
	帝京大学理工学部助教授 Assoc. Prof., Fac. of Sci. and Eng., Univ. of Teikyo Yuuko NASHIMOTO	梨 本 裕 子
	東京大学医科学研究所助手 Assist., Inst. of Med. Sci., Univ. of Tokyo Masaaki HONDA	本 田 正 明
	東京大学医科学研究所助手 Assist., Inst. of Med. Sci., Univ. of Tokyo Ichiro KAWASAKI	川 崎 一 郎
	東京大学医科学研究所教務職員 Stuff, Inst. of Med. Sci., Univ. of Tokyo Akiko MASUDA	増 田 明 子
	東京大学医科学研究所院生 Grad. Student, Inst. of Med Sci., Univ. of Tokyo Young-Seuk BAE	裴 永 錫
	東京大学医科学研究所院生 Grad. Student, Inst. of Med. Sci., Univ. of Tokyo Masaharu KANNO	菅 野 正 治

General recombination is known to be crossing-over events which require substantial nucleotide-sequence homology. The recombination is also called homologous recombination. In microorganisms, general recombination depends on specific gene functions. The *rec* genes of *Escherichia coli* is analyzed extensively in genetical as well as in biochemical experiments. On the other hand, illegitimate recombination is defined as a DNA rearrangement between non-homologous and nonspecific sequences. The recombination is also called nonhomologous recombination. It can generate deletions, duplication, insertions, substitutions, inversions, and transducing phage formation. The purpose of the research program is to analyze the mechanisms of homologous and nonhomologous recombinations and to apply the results to develop the efficient method of gene targeting in mammalian cells. The projects of the research are divided into four classes. (1) Illegitimate recombination mediated by calf thymus DNA topoisomerase II *in vitro*. (2) Analysis of illegitimate recombination in monkey COS1 cells. (3) Cloning of gene(s) for homologous recombination in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. (4) Analysis of calf thymus histone H1 as a putative protein required for homologous recombination.

(1) Illegitimate recombination mediated by calf thymus DNA topoisomerase II *in vitro*. We found that purified calf thymus DNA topoisomerase II mediates recombination between two phage λ DNA molecules in an *in vitro* system. The enzyme mainly produced a linear monomer recombinant DNA that can be packaged *in vitro*. The DNA topoisomerase II inhibitor novobiocin

and anti-calf thymus DNA topoisomerase II antibody inhibit this ATP-dependent recombination. The recombinant molecules contain duplications or deletions, and most crossovers take place between nonhomologous sequences of λ DNA, as judged by the sequences of recombination junctions. Therefore, the recombination mediated by the calf thymus DNA topoisomerase II is an illegitimate recombination that is similar to recombination mediated by *Escherichia coli* DNA gyrase or phage T4 DNA topoisomerase. The subunit exchange model, which has been suggested for the DNA gyrase-mediated recombination, is now generalized as follows: DNA topoisomerase II molecules bind to DNAs, associate with each other, and lead to the exchange of DNA strands through the exchange of topoisomerase II subunits. Illegitimate recombination might be carried out by a general mechanism in organisms ranging from prokaryotes to higher eukaryotes.

(2) Analysis of illegitimate recombination in monkey COS1 cells. We have developed a shuttle vector pNK1 that contains three bacterial markers, *bla* (β -lactamase), *galK* (galactokinase), and *neo* (aminoglycoside 3'-phosphotransferase). The frequency of deletion occurring during the propagation of pNK1 DNA in monkey COS1 cells was measured by transfecting the plasmid into *E. coli* cells and counting the number of *galK* Ap^s (ampicillin-sensitive) double mutants among total Km^r (kanamycin-sensitive) cells. The DNA topoisomerase II inhibitor VM26 stimulated deletion formation in pNK1 DNA in monkey cells. Since VM26 does not inhibit the strand-break activity of DNA topoisomerase II, but rather stimulates formation of cleavable complex between DNA topoisomerase II and DNA, it is implied that DNA topoisomerase II participates in deletion formation in mammalian cells.

We have also found three insertion mutants. One of the mutants was shown to contain α -satellite sequences within the coding region of *galK* gene. This α -satellite has approximately 12 units of tandem repeats and is flanked by a 64 bp target site duplication. There is an inverted repeat of 4 bp at the insertion site of α -satellite sequence. Another insertion mutant had an unidentified repeated sequence and is flanked by 353 bp target site duplication. These results indicate that the insertion-duplication mutations may be frequently observed as a type of DNA rearrangements in mammalian cells.

(3) Cloning of gene(s) for homologous recombination from fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. We have isolated a *S. pombe* gene for homologous to budding yeast *S. cerevisiae* *DST2* gene, whose product have the activity of DNA strand exchange. At first, *S. pombe* genomic library was screened with a probe from *S. cerevisiae* *DST2* and nucleotide sequences of positive clones were determined. Approximately 3 kb open reading frame which encodes 991 amino acids was found in the resulted clone. The estimated amino acid sequence was homologous to the *DST2* protein. Northern analysis of the RNA from log-phage culture of *S. pombe* showed that the 3.4 kb transcription product homologous to the isolated *S. pombe* clone. The *DST2* homologue will be used to analyze the mechanism of homologous recombination in *S. pombe* as well as to isolate mammalian genes for homologous recombination.

(4) Analysis of calf thymus histone H1 as a putative protein required for homologous recombination. An activity that catalyzes the strand transfer from linear double-stranded tetracycline-resistance gene (Tc^R) DNA to circular M13mp8-Tc^R viral DNA was detected in a crude extract from calf thymus. This activity was purified to near homogeneity as judged by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. We have tentatively named this protein CTST1. The apparent molecular mass of the protein was 35 kDa by gel electrophoresis. Its sedimentation coefficient was approximately 1.5 S in glycerol gradient centrifugation. These values led us to examine the possibility that CTST1 is histone H1. Western blot analysis of CTST1 with anti rat-liver histone H1 antiserum showed that CTST1 crossreacts with the serum, indicating that CTST1 is histone H1. The mobility of CTST1 was identical to one of the subtypes of calf thymus histone H1 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. We have also confirmed the above conclusion by showing that calf thymus histone H1 has a strand-transfer activity with a specific activity comparable to that of CTST1. The reaction required homologous substrates, but neither Mg²⁺ nor ATP. The reaction also required stoichiometric amounts of protein. Later, we found that histone H1 did not have the strand transfer activity, but had an activity that anneals two complementary single-stranded DNAs to double-stranded DNA. Hence histone H1 has a function similar to β protein of phage λ , which is known to be required for homologous recombination in

phage λ -infected cells.

Above results will be used to analyze the mechanisms of homologous and nonhomologous recombination as well as to develop an efficient method for gene targeting in mammalian cells.

研究目的

生物は遺伝的組換えによって様々な遺伝形質を作り、それを子孫に伝えていく。この組換えの機構によって、様々な形質を持った個体が形成され、環境の変化に対応して生き残っていく。遺伝子の変化は実に様々であり、想像を越えた遺伝子の構造変化や移動が起きていることが明らかになってきた。このような遺伝子の構造変化の原因となる遺伝的組換えは、主として二つに分けられる。その一つ、相同的組換え (homologous recombination) は、二つの相同な親 DNA の間で相同性に依存して起こる組換えである。この組換えは、大腸菌では RecA 蛋白質に依存する組換えとして知られ、その機構の解析は RecA 蛋白質の研究を中心に進められてきた。一方、非相同的組換え (nonhomologous recombination) は、相同性のない DNA 間や短い相同性を持つ DNA 間で起こる組換えである。この組換えについては、先に我々は、大腸菌 DNA ジャイレースが関与していることを示している。しかしながら、動物細胞におけるこれらの組換えの機構はほとんど明らかではない。

また、最近の遺伝子工学の発展に伴って、動物や植物の遺伝子が次と分離され、高等生物遺伝子の構造と機能の解析が行なわれるようになると、それらの遺伝子を基にして人工的に変異遺伝子を作成し、それを元の細胞へ戻すことによって細胞内での遺伝子の機能を解析する方法が要求されてきた。大腸菌や酵母では、これらの一連の技術によって遺伝子を自由に操ることが可能になり、遺伝子の機能の解明に大きく貢献した。この技術は、遺伝子ターゲティング (gene targeting)、あるいは標的組込み (targeted integration) と呼ばれる。もし、この標的組込みが高等動物でも可能になり、その遺伝子を自由自在に改変することができるになれば、これまで蓄積されてきた各種遺伝子に関する情報が一挙に利用されて、

高等生物の生命現象に関する数多くの謎が明らかにされるに違いない。さらにまた、有用物質生産や医療の方向への研究が発展するに違いない。とくに、医学の分野では遺伝子治療の研究も盛んになってきたが、その基本となる技術はやはり標的組込みである。

それでは高等生物では組換えはどのように行なわれているかと言うと、高等真核生物の細胞に遺伝子を導入すると、遺伝子は染色体に組込まれるが、組込みの箇所の大部分は予測不可能であって、元の遺伝子の位置に組込まれたり、元の遺伝子と置き変わる頻度はかなり低い。その数少ない産物を PCR 法などを用いて検出するのが現在のやり方である。通常高等動物の体細胞では、何故相同的組換えの頻度が低いのか、また、何故非相同的組換えの頻度が高いかは明らかではない。これらの研究では動物細胞の遺伝的組換えに関する基礎的知識が得られると同時に、それらを標的組換えを効率良く行なわせるという技術の開発にも応用したいと考えている。

研究経過

筆者らの研究は、非相同的組換えに関する研究と相同的組換えに関する研究の二つに分けられる。また、実験の材料は大腸菌、酵母、動物細胞を用いて行なった。まず、本論にはいる前に、これまでに行なわれた主要な研究について簡単に解説をすることにする。

我々は、 λ (ラムダ) のファージの *in vitro* パッケージ系を利用してトランスポゾンの転移の系を作ることを行っている。いろいろな *in vitro* 系の試みをしていたが、その実験の過程でこの系が非相同的組換えの解析システムとして適していることを見いだした (池田ら, 1981)。*in vitro* パッケージ系は、大腸菌の特殊な λ プロファージを熱誘発し、その溶菌液から調製するもので、内在性のプロファージ DNA や外から加えた λ DNA がパッケージされて、ファージ粒子として生成するもの

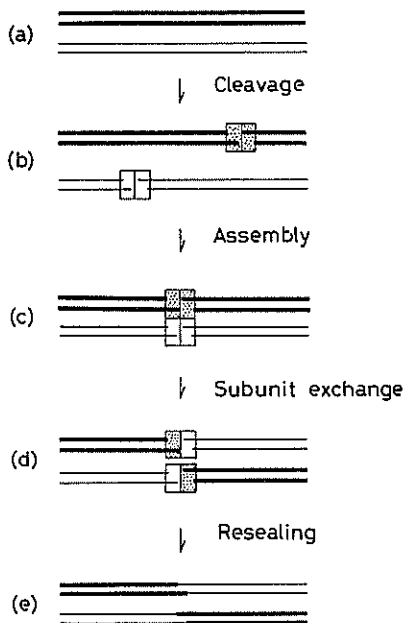


図1. 非相長的組換えに関するDNA ジャイレースサブユニット交換モデル。二本の線は二本鎖DNAを示す。DNAに付随する長方形はDNA ジャイレースのABサブユニットを表す。二つの長方形が集まった形が通常の A_2B_2 型のジャイレースである。(b)でジャイレースがDNAに結合して二本鎖の切断を起こし、(c)で二分子のジャイレースが集まって A_4B_4 型となる。(d)で A_2B_2 型に解離するときにジャイレースのサブユニット交換が起こる。

であるが、この溶菌液にプラスミッドDNAを混合すると、内在性DNAとの間で組換えを起こし、プラスミッドを含むハイブリッドファージが生成することが明らかになった。我々は、この系を用いて、次のような非相長的組換えの性質を明らかにした。(1)非相長的組換えは、DNA ジャイレースに依存して起こる(池田ら, 1981; 塩崎ら, 1984; 伴野ら, 1988)。(2)この組換えにはDNAの相同性は必要ではない(内藤ら, 1984)。(3)組換えは、DNA ジャイレースによって引き起こされるDNAの切断によって誘起される(池田ら, 1984)。(4)大腸菌内においてもDNA ジャイレースのサブユニット交換反応が非相長的組換えに関与しているというモデルを提唱した(池田ら, 1982; 池田, 1990)(図1)。DNA ジャイレースは、II型DNAトポイソメラーゼに属する酵素

で、環状DNAに超らせん構造を導入したり、逆に弛緩させたりする活性を持っている。この種の酵素がDNAのトポロジーを変えることによって間接的に組換えに影響を与える例は知られていたが、この研究では我々はDNA ジャイレースが非相長的組換えに直接働いていることを初めて示した。

さらに、我々は、より広くいろいろな生物系の酵素の組換え能を測定する目的で、異なる遺伝マーカーを持つ2種類の λ DNAを用いた*in vitro*組換え系を開発し、これをファージT4DNAトポイソメラーゼの組換え能の測定に応用した(図2; 池田, 1986)。T4DNAトポイソメラーゼは、II型のトポイソメラーゼに属し、大腸菌DNA ジャイレースと共通した性質を持つ酵素であるが、環状DNAに負の超らせんを入れることができず、超らせんを弛緩させる機能を持つという点で動物細胞のDNAトポイソメラーゼIIと共通した性質を持っている。もしこのT4DNAトポイソメラーゼを含む*in vitro*組換え系において二つの λ DNAの間で組換えが起きれば、*amber⁺*の組換えDNAが生成することになる。このDNAを*in vitro*でパッケージしてファージ粒子を形成させ、大腸菌Su⁻株にプレートし、野生型の組換えファージの頻度を測定した。この系を用いた実験において次のような性質が明らかになった。(1)T4DNAトポイソメラーゼは、相同性のないDNA間の組換えを行なう(池田, 1986a; 池田, 1986b)。(2)この組換えは、T4DNAトポイソメラーゼによる二本鎖DNAの切断によって起こる(千葉ら, 1989)。(3)*In vivo*においてもT4DNAトポイソメラーゼに依存する組換えは起こる(本田ら, 投稿準備中)。

このような基礎となる知見をもとにして、我々は次のような項目の真核細胞の組換えに関する実験を行なったので、ここに報告する。(1)コウシ胸腺DNAトポイソメラーゼIIに依存する非相長的組換え、(2)サルCOS1細胞における非相長的組換えの解析、(3)分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*の相長的組換えに関与する蛋白質遺伝子、(4)コウシ胸腺ヒストンH1の相長的組換え活性

に関する解析。

研究結果

1. コウシ胸腺 DNA トポイソメラーゼ II に依存する非相長的組換え (Bae ら, 1988)

T4DNA トポイソメラーゼの実験においてλファージ DNA を用いた *in vitro* 組換え系が組換え酵素の活性の測定に有効であること、そして動物細胞の DNA トポイソメラーゼ II と似ている T4DNA トポイソメラーゼが組換えの活性を持つことが分かったので、この系 (図 2) を用いてコウシ胸腺の DNA トポイソメラーゼ II の DNA 組換え活性について調べた。二種類のλファージ DNA とコウシ胸腺の DNA トポイソメラーゼ II を *in vitro* 組換え系に加えて加温した後、DNA を抽出し、*in vitro* パッケージ系においてファージ粒子を形成させた。もしトポイソメラーゼによって組換えが起これば組換え型 DNA ができるので、パッケージによって組換え型のファージ粒子が形成するはずである。両方のλファージにはアンバー変異のマーカが付いているので、全ファージ数を大腸菌 Su⁺ 株 (permissive) で、また *amber*⁺ 組換えファージ数を大腸菌 Su⁻ 株 (nonpermissive) で測定することができる。回収した全ファージ中での組換えファージの頻度を測定すると、 3.1×10^{-5} の頻度で *amber*⁺ 組換えファージを検出した。この反応は、Mg²⁺ と ATP

を要求し、DNA トポイソメラーゼ II 阻害剤であるノビオシンや抗コウシ胸腺トポイソメラーゼ II 抗体によって阻害された (表 1)。ノビオシン

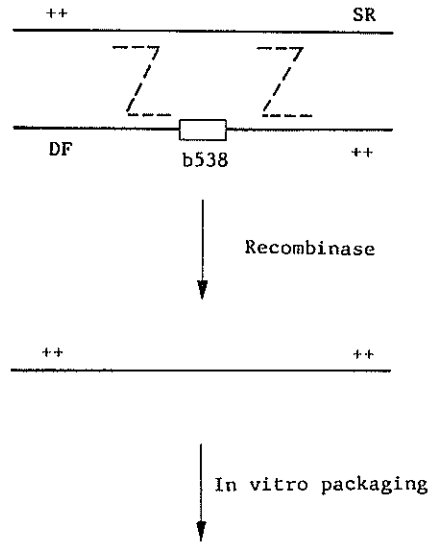


図 2. *In vitro* 組換え系に用いた 2 種類のλファージの遺伝子地図。SR は, *Sam7 Ram5*, DF は, *Dam15 Flam96B* を示す。点線で書かれたような組換えが起こると, *amber*⁺ の組換え型 DNA が生成する。この組換え型 DNA をλファージの *in vitro* パッケージ系でファージ粒子の形とし、ファージのブランクとして検出する。

表 1. コウシ胸腺 DNA トポイソメラーゼ II による組換え反応の条件。

Exp.	Conditions	Frequency of <i>am</i> ⁺ <i>imm434</i> recombinants, no. per no. of total <i>imm434</i> pcu	Relative frequency of recombinants
1	Complete mixture	3.1×10^{-5}	1
	-Topo II	7.8×10^{-7}	0.03
	-Mg ²⁺	4.8×10^{-7}	0.02
	-ATP	2.8×10^{-6}	0.09
2	Complete mixture	9.2×10^{-5}	1
	+Novobiocin (750 μg/ml)	1.3×10^{-5}	0.14
	+Novobiocin (1.5 mg/ml)	5.9×10^{-6}	0.06
3	Complete mixture	1.1×10^{-5}	1
	+Antibody (30 μg/ml)	3.7×10^{-7}	0.03

After the recombination reaction, 10-μl DNA samples were mixed with TE buffer containing 0.2% NaDodSO₄, extracted with phenol, and dialyzed against TE buffer, and an aliquot of the DNA sample was packaged *in vitro*. Topo II, DNA topoisomerase II; antibody, anti-calf thymus topoisomerase II antibody.

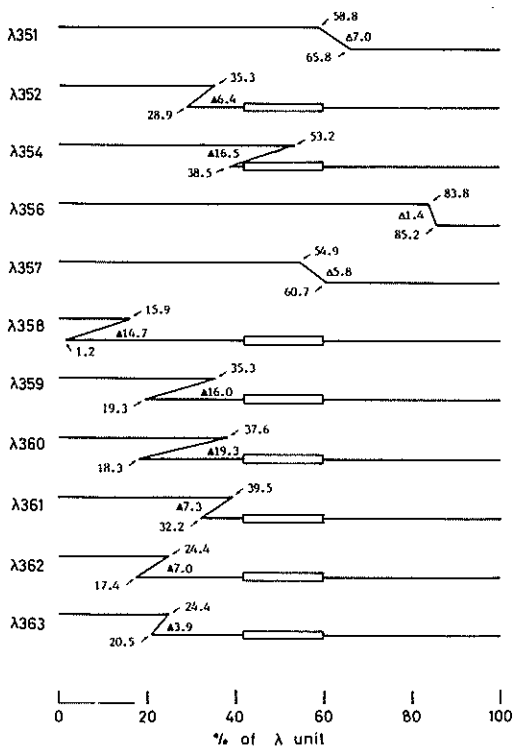


図3. コウシ胸線 DNA トポイソメラーゼによる組換えによって形成された *amber*⁺ の組換えファージ DNA の構造。組換えファージ DNA を種々の制限酵素で消化し、電気泳動によって解析した結果に基づいて作成した。それぞれの組換え部位は矢印と数字で示す。▲, 重複の大きさ (λ の%) ; △, 欠失の大きさ (λ の%) ; □, 親の λb538 D⁻F⁻上にもともと存在していた欠失 (b538) を示す。

は DNA トポイソメラーゼ II の ATPase 活性に影響を与える阻害剤であるので、オキソリン酸や VM26 (後述) と異なって、組換えに対しても阻害的に働くと考えられる。従って、我々は、コウシ胸線トポイソメラーゼ II が組換えを行なうと結論した。

次に、組換えファージを 12 株分離し制限酵素による解析をしたところ、11 株において欠失又は重複が認められた。従って、この組換えもまた非相同的組換えであった。さらに、組換えの結合部位の塩基配列を決定し、親 DNA のどの部位で組換えが起こるかどうかが調べたところ、図3のよ

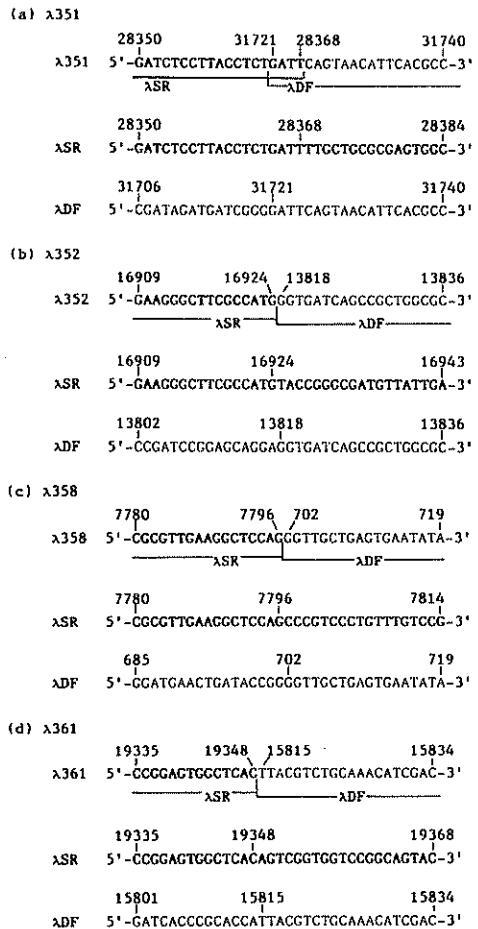


図4. コウシ胸線 DNA トポイソメラーゼによる組換えによって形成された *amber*⁺ 組換えファージの重複または欠失の結合部分の塩基配列と親ファージ λSR と λDF の DNA の塩基配列の比較。配列上の数字は λDNA 上の位置を塩基対で示す。(a) λ351 組換えファージと親ファージの DNA の比較。(b) λ352DNA。(c) λ358DNA。(d) λ361DNA。

うに組換えは相同性のない部位で起こっていた。実際に、組換え部位の間の DNA の塩基配列を調べたところ、それらの DNA 部位の間には相同性がないか、あっても最大で 4 塩基対のみであった (図4)。従って、この組換えも、大腸菌や T4 ファージの組換えと同様、非特異的かつ非相同的な部位の間で起こるものであり、相同性を要求しないものであることが明らかになった。

この一連の実験で大腸菌から哺乳動物細胞に至る様々なトポイソメラーゼの組換え活性について調べ、それらの酵素はいずれも類似した組換えを行なう能力を持っていることが明らかになった。非相同期組換えは、一般には大腸菌やファージの系において低い頻度でしか起こらないが、動物細胞

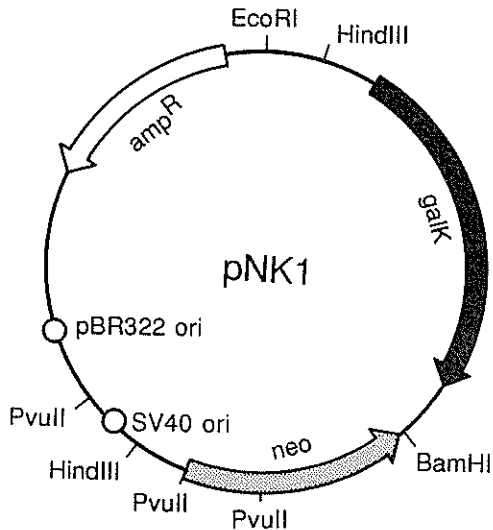


図5. シャトルベクター pNK1 の構造。選択マーカーとして大腸菌の三つの遺伝マーカー、*galK* (galactokinase), *bla* (β -lactamase), *neo* (aminoglycoside 3'-phosphotransferase) を含み、SV40 及び pBR 322 の replication origin を持つ。

胞においては高い頻度で起こることが知られている。この組換えの機構を分子レベルで調べることが可能になったことは、とくに動物細胞における解析において大きな意味があると思われる。

2. サル COS1 細胞における非相同期組換えの解析 (Bae ら, 印刷中)

動物細胞の DNA トポイソメラーゼ II が非相同期組換えを行なうことがわかったので、次に動物細胞内で実際にトポイソメラーゼ II 依存の組換えが起こるかどうかを検討した。その目的のために、大腸菌の三つの遺伝マーカー、*galK* (galactokinase), *bla* (β -lactamase; Ap^r), *neo* (aminoglycoside 3'-phosphotransferase; Km^r), と SV40 及び pBR 322 の replication origin を持つ shuttle vector, pNK1, を作製した (図5)。このプラスミッドをリン酸カルシウム法で COS1 細胞に導入、複製させた後、プラスミッドを回収して、大腸菌 HB101 (*galK*⁻*recA*⁻) に形質転換し、Km^r ではあるが *galK* と *bla* が同時に欠けたものを欠失変異株として検出した。この系を用いて *galK* と *bla* 遺伝子の二重変異株の出現頻度を調べたところ、変異率は 1.4% で、変異株の DNA はすべて欠失変異であった。一方、*galK* 単一変異は 3% で、その内、欠失変異が 81%、挿入変異が 6% であった。従って、培養細胞系では非相同期組換

表2. サル COS1 細胞における pNK1 の欠失形成に対する DNA トポイソメラーゼ阻害剤の影響。

Treatment ^a	Total no. of Km ^r colonies tested ^b	No. of <i>galK</i> Ap ^s colonies ^c	% of <i>galK</i> Ap ^s colonies ^d
DMSO	1585	190	12.0 (10.4-13.9)
VM26 (40 mM)	607	146	24.1 (20.2-28.1)
<i>m</i> -AMSA (4 mM)	1570	223	14.2 (12.3-16.3)
Camptothecin (4 mM)	1519	168	11.1 (9.5-12.9)

^aThe NEO-13 cells were treated for 1hr by the indicated drugs. DNA topoisomerase I inhibitor camptothecin was obtained from Yakult (Tokyo). DNA topoisomerase II inhibitor VM 26 was obtained from Dr. L. F. Liu (Johns Hopkins University, Baltimore). *m*-AMSA was obtained from the Drug Synthesis and Chemistry Branch, Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute (Bethesda).

^bLow molecular weight DNAs were extracted from the cells. The DNAs were then transformed into *E. coli* HB 101 cells and Km^r colonies were selected. The relevant genotype of HB 101 is *hdsS20 recA13 galK2*.

^cAll of 187 *galK*⁻ Ap^s mutants, which were analyzed by 0.7% agarose gel electrophoresis, contained deletions.

^dFrequency range with 95% probability is shown in parentheses.

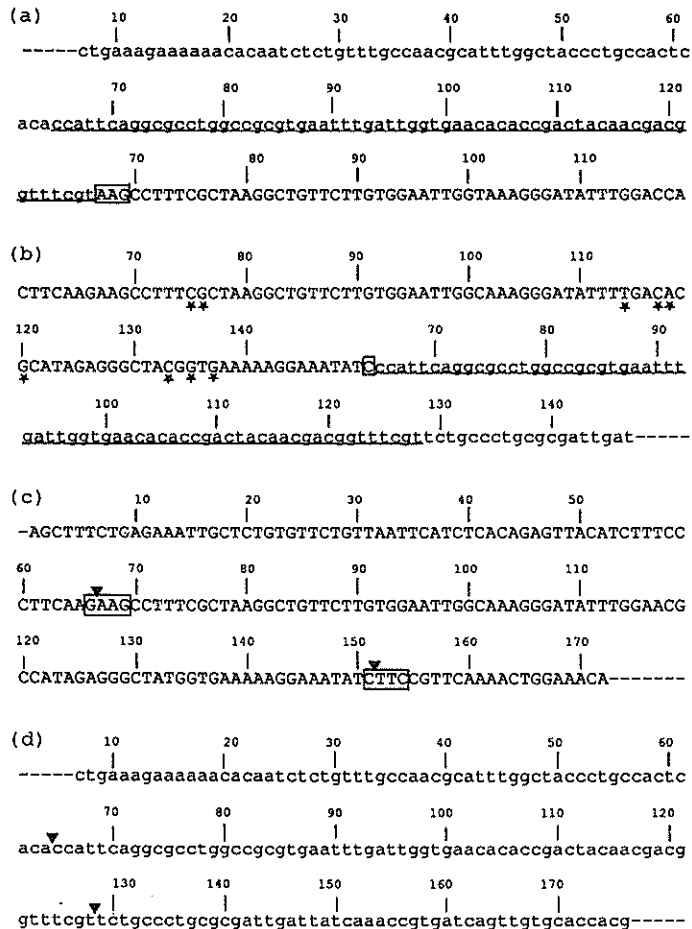


図6. α -サテライト配列が挿入されたプラスミド15Kの部分的な塩基配列。(a) プラスミド15Kの左側の結合部位の配列。小文字は *galK* の配列。大文字は α -サテライト配列を示す。重複した部分の *galK* の配列は下線で示す。数字は、 α -サテライト配列と *galK* の配列の位置を示す。(b) プラスミド15Kの右側の配列。星印は、 α -サテライト配列の挿入した二番目のプラスミドN13において15Kと違っている配列を示す。(c) α -サテライト配列のコンセンサス配列。□、 α -サテライト配列上の組換えの起きた場所にあった逆向き反復配列を示す。▲、挿入部位と考えられる場所。(d) *galK* 遺伝子の5'領域の配列。

えの頻度が高いことが分かった。この系を用いて欠失変異出現率に対するDNAトポイソメラーゼの阻害剤の影響を調べたが有意の差は認められなかった。

この系での問題となるのは、COS1細胞に導入した直後のプラスミドDNAが不安定で、DNAの切断によるDNA rearrangementを起こしやすいという可能性である。この問題を乗り越えるために、pNK1を導入の後、細胞をG418で選択し、pNK1が永続的に増えている状態の細胞を分

離した。この種の細胞株の一つ、NEO-13、にDNAトポイソメラーゼ阻害剤を処理した後、プラスミドDNAを回収し、大腸菌HB101に戻して、欠失変異の出現頻度を調べた。表2に見られるように、DNAトポイソメラーゼII阻害剤であるVM26(4'-dimethylphyllotoxin thenylidene- β -D-glucoside)が欠失変異の頻度を上昇させることが分かった。VM26は、DNAトポイソメラーゼIIのDNA鎖切断活性を阻害せず、むしろDNAトポイソメラーゼIIとDNAとの間の複

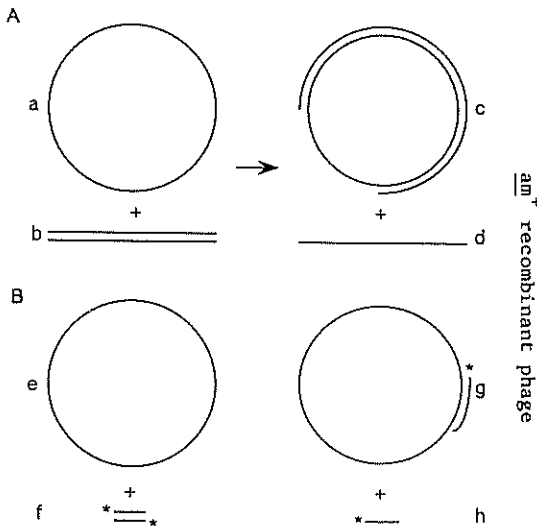


図7. DNA 鎖交換アッセイ (DNA strand exchange assay) に用いられる基質と反応産物。A. 従来の方における基質と反応産物。DNA 鎖交換反応によって a と b から c と d が作られる。a は一本鎖環状 DNA, b は二本鎖直鎖状 DNA, c は二本鎖環状 DNA, d は一本鎖直鎖状を表す。B. McCarthy の方法における基質と反応産物。DNA 鎖交換反応によって e と f から g と h が作られる。e は一本鎖環状 DNA, f は短い二本鎖直鎖状 DNA, g は一部二本鎖が形成された一本鎖環状 DNA, h は短い一本鎖直鎖状 DNA, * は末端の放射標識を表す。

合体の形成を保持する働きをするので、この結果は、DNA トポイソメラーゼ II が動物培養細胞において非相同的組換えに関与していることを示唆している。

次に、このプラスミド pNK1 の *galK*⁻ の単独変異株の中に、3 種類の挿入配列を検出した。その中の一つ、15 K、を解析した結果、サル細胞の高頻度反復配列である α -サテライト配列を持っていることが明らかになった。配列の両端には、逆向き反復配列があり、挿入部位に標的 DNA の 64bp が重複されている等、トランスポゾンと似た性状を持っていることが分かった (図6) (Baeら、投稿準備中)。さらに、2 個目のプラスミド、N11 の構造を解析したところ、組換え部位の構造は非常に似ており、未同定の反復配列が *galK* 領域に挿入を起こし、同時に挿入部位に 353 bp の

重複が起きていることがわかった。このような挿入と重複が同時に起こるような DNA の再編成は動物細胞において頻繁に起こっていると思われる。哺乳動物の染色体には多くの高度反復 DNA が含まれており、細胞学的にはヘテロクロマチンと呼ばれているが、この種の DNA の組換えの機構はほとんど分かっていない。この組換え検出系は反復配列 DNA の組換え機構について新しい知見を与えてくれると思われる。

3. 分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の相同的組換えに関与する遺伝子のクローニング (菅野ら、投稿準備中)

相同性をもつ DNA 間での遺伝的組換えは、普遍的な生命現象の一つであり、大腸菌においては、遺伝学的及び生化学的解析が精力的に進められてきた。一方、真核生物においては、相同的組換えに異常を引き起こす多くの突然変異体が単離されてはいるものの、生化学的に機能が決定されているものは極めて少ない。最近、杉野らは、出芽酵母 *S. cerevisiae* の減数分裂期及び通常の増殖期の細胞から、組換え反応に関与していると思われる蛋白質を精製した。彼らは、それらを DNA 鎖交換 (DNA strand exchange) 活性、または D ループ形成活性と呼ばれる活性を指標として用いて精製した。例えば、大腸菌 RecA 蛋白質はこの機能によって一本鎖 DNA をそれと相同な二本鎖 DNA に侵入させ、もとの相補鎖の対合をほどいて新たな対合を形成させることができる。これを一本鎖環状 DNA と二本鎖線状 DNA の間で反応させると、二本鎖環状 DNA と一本鎖線状 DNA が生成する (図7A)。また、短い二本鎖 DNA を使うと、図7Bのように一部だけ二本鎖になった環状 DNA が形成される。このアッセイ法を用いて出芽酵母の組換え蛋白質が分離精製された。次いでその遺伝子 *DST1* 及び *DST2* が単離された。この内、*DST1* は減数分裂期の細胞に、そして *DST2* は通常の増殖期の細胞に特異的に発現するものである。

我々は、出芽酵母よりも動物細胞に近いと言われている分裂酵母から *DST2* 相同遺伝子の単離を試みた。まず、出芽酵母 *DST2* 遺伝子をプロ

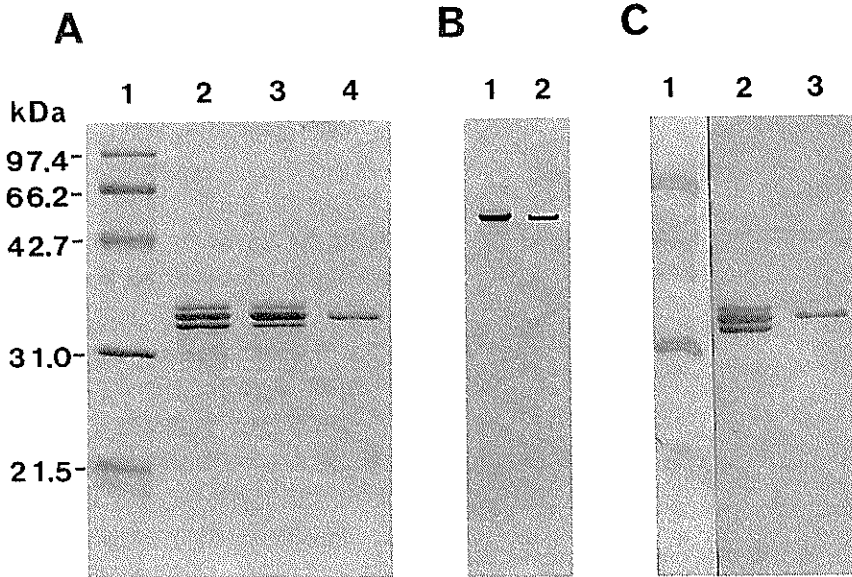


図8. CTST1の同定. CTST1とコウシ胸腺ヒストンH1をゲル電気泳動によって比較した. (A) SDS/15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動. レーン1, 分子量既知のマーカ-; レーン2, コウシ胸腺ヒストンH1 (2.0 μg); レーン3, CTST1 (0.6 μg)とコウシ胸腺ヒストンH1 (2.0 μg)の混合物; レーン4, CTST1 (0.6 μg). (B) 酢酸/尿素/20% ポリアクリルアミドゲル電気泳動. レーン1, コウシ胸腺ヒストンH1 (1.2 μg); レーン2, CTST1 (1 μg). (C) CTST1のウエスタンブロット解析. SDS/ポリアクリルアミドゲル電気泳動の後ニトロセルロースに移された. コウシ胸腺ヒストンH1 (2.5 μg)含むレーン (レーン2)とCTST1 (0.9 μg)を含むレーン (レーン3)を1:500で希釈した rabbit anti-rat liver histone H1 抗血清とインキュベートし, さらに avidin-biotin complex と biotin-conjugated peroxidase とによってインキュベートした. 抗体特異的バンドは peroxidase substrate solution [4-chloro-1-naphthol (0.5 mg/ml)と4 mM H_2O_2]によって発色させた. 分子量既知のマーカ-は Amido Black 10Bによって染色した (レーン1).

ブとして, 分裂酵母 *S. pombe* の genomic library をスクリーニングし, ポジティブクローンの塩基配列を決定した. 得られたクローンには, 991 アミノ酸残基をコードし得る約3 kbのORFが見られた. 推定アミノ酸配列は, *DST2*と有意に相同性があった(約30%). 次に, 対数増殖期にある一倍体及び二倍体の細胞よりRNAを調製し, Northern分析を行なったところ, 約3.4 kbの転写産物が見られた. 遺伝子破壊株を作製し, その形質の解析を行なったところ, この遺伝子は酵母の増殖に必須であることがわかった. この性質は大腸菌 *recA* や出芽酵母 *DST2* 遺伝子と異なるものであり, 大変興味深い. この遺伝子は, 分裂酵母の遺伝子組換え系の解析に用いられるが, さらに, この遺伝子をプローブとして使ったり, 相補性テストに使ったりして, 動物細胞の組換え遺伝子のクローニングへと進む予定である.

4. コウシ胸腺ヒストンH1の相同的組換え活性に関する解析 (川崎ら, 1989)

上記の遺伝子レベルの実験と並行して, 動物細胞の持つ *RecA* 蛋白質様活性の生化学的解析を試みた. *RecA* 蛋白質様活性のアッセイ法として McCarthy らが開発した strand-exchange assay 法 (図7B)を用い, コウシ胸腺粗抽出液中に *recA* 蛋白質様活性を検出し, それをCBB染色でほぼ単一のバンドにまで精製した. この蛋白 (CTST1) は幾つかの点で通常の蛋白とは異なる性質を示した. すなわち 1) 0.5M KCl 以下の低塩濃度では抽出されず, 2 mM KCl で最もよく抽出され, 2) 280 nm で最大吸収を示さず, 225 nm での紫外吸収が最大で, また 3) 通常の比色定量法では発色しないという性質を示した. これらの性質と, SDS-PAGE での見かけ分子量が 35 kDa で, グリセロール密度勾配遠心での沈降係数が

1.5 Sであった点を考え合わせ、我々はこの蛋白でトリプトファン残基を持たないもの、すなわちヒストンであり、その見かけ分子量からヒストン H1 ではないかと考えた。そこで抗ヒストン H1 血清を用いてウエスタンブロットをしてみたところ、交差反応を示し、しかも電気泳動上の挙動も一致したことから、この蛋白 (CTST1) は確かにコウシ胸腺ヒストン H1 のサブタイプの一つに一致することが明らかになった (図 8)。このことは従来法 (5%PCA 抽出) で精製されたヒストン H1 にも CTST1 に匹敵する活性が検出されたことから確認された。CTST1 による反応には基質 DNA 間の相同性が必要とされたが、ATP および Mg^{2+} は要求されていなかった。またこの反応には、20ヌクレオチドあたり1分子という化学量論的な蛋白量が必要とされた。さらにこの蛋白には、二本鎖直線状 DNA を巻き戻すヘリケース活性、および ATPase 活性、ヌクレアーゼ活性はどれも検出されなかった。

後に、我々が strand exchange 反応と考えていたのはアニーリング反応であることがわかった。アニーリング反応は相補的な一本鎖 DNA 同士の間で二本鎖が再生されるのを促進する活性である。両者は、良く似た反応であり、実際 RecA 蛋白には両方の活性が存在していることが知られている。また、 λ フェージの相同的組換えに働いている β 蛋白にはアニーリング活性はあるが、DNA 鎖交換活性は検出されない。ヒストン H1 にはアニーリング活性は顕著であるが、DNA 鎖交換活性は検出できなかった。従って、ヒストン H1 は、 λ フェージの β 蛋白のタイプの組換え酵素ではないかと考えられる。しかしながら、現時点ではヒストン H1 が組換えを直接的に媒介している証拠は得られていない。ヒストン H1 のアニーリング活性は動物細胞の組換え機構の解析の重要な糸口になることが期待される。

考察と今後の課題

我々は、動物細胞における遺伝的組換えという未開拓の分野においてその端緒となる研究成果を示すことができたと考えている。その一つは、DNA トポイソメラーゼ II に依存する非相同的組

換えに関する研究である。動物細胞においては、細胞増殖の様々な場面において欠失、挿入、転座等の非相同的組換えが数多く見られる。遺伝子の標的組み込みの実験においてもこの非相同的組換えの頻度が高いことが重大な障害となっていることは言うまでもない。我々の研究はこの問題の解決への手掛かりを与えるものである。我々は、さらにこの点を別の角度から追及する目的で、分裂酵母を用いて非相同組換えによる遺伝子の組み込みの機構の研究を始めている。この系によって真核生物での非相同的組換えの機構に遺伝的手法を用いてアプローチすることができると期待している。また、このやり方をさらに動物細胞での研究につなげるために、マウスの DNA トポイソメラーゼ II cDNA クロンの単離を行なっている。このクロンを用いてマウス DNA トポイソメラーゼを遺伝学的に解析することができれば、マウス細胞における非相同的組換えと遺伝子の標的組み込みの研究に役立てることができるとであろう。

もう一つの成果は、相同的組換えを行なう蛋白質及び遺伝子に関する研究である。動物細胞の組換え蛋白質として我々が単離したものはヒストン H1 であった。この蛋白質は DNA のアニーリングを行なう活性があることが分かり、組換え蛋白質の候補として今後さらに解析を進めていく必要がある。とくに、この蛋白質が遺伝子の標的組み込みを促進するかどうかを調べたいと考えている。また、分裂酵母の組換え遺伝子の単離によって分裂酵母における組換え機構の解析が可能になっただけでなく、さらに、動物細胞の組換え遺伝子単離の手掛かりを与えてくれるものとして期待できるものである。

現在までのところ、これらの組換えに関する成果を遺伝子の標的組み込みに応用する実験を行なうことができなかったことを残念に思っている。しかしこれまでの成果に基づいた標的組み込みの実験の計画をすでに立てており、今後できるだけ早くこの問題に取り組んでいきたいと考えている。

終わりに当たり、3年にわたって日産科学振興財団から資金援助によって上記の研究やその他の

種々の研究を資金の心配なしに行なうことができました。また、これらの成果によって今後の新しい研究への基礎を築くことができました。同財団に深く感謝の意を表します。

関連研究報告

- H. Ikeda, K. Moriya and T. Matsumoto: *In vitro* study of illegitimate recombination: Involvement of DNA gyrase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **45**, 399-408 (1981).
- H. Ikeda, K. Aoki and A. Naito: Illegitimate recombination mediated *in vitro* by DNA gyrase of *Escherichia coli*: Structure of recombinant DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3724-3728 (1982).
- T. Matsumoto and H. Ikeda: Role of R loops in *recA*-independent homologous recombination of bacteriophage lambda. *J. Virol.*, **45**, 971-976 (1983).
- I. Kobayashi and H. Ikeda: Double Holliday Structure: Possible *in vivo* intermediate form of general recombination in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **191**, 213-220 (1983).
- A. Naito, S. Naito and H. Ikeda: Homology is not required for recombination mediated by DNA gyrase of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **193**, 238-243 (1984).
- H. Ikeda, I. Kawasaki and M. Gellert: Mechanism of illegitimate recombination: Common sites for recombination and cleavage mediated by *E. coli* DNA gyrase. *Mol. Gen. Genet.*, **196**, 546-549 (1984).
- H. Ikeda and M. Shiozaki: Nonhomologous recombination mediated by *Escherichia coli* DNA gyrase: Possible involvement of DNA replication. *Cold Spring Harbor Symp. Biol.*, **49**, 491-499 (1984).
- H. Ikeda: Illegitimate recombination: Role of type II DNA topoisomerase. *Advances in Biophysics*, **21**, 149-160 (1986).
- H. Ikeda: Illegitimate recombination mediated by T4 DNA topoisomerase *in vitro*: Recombinants between phage and plasmid DNA molecules. *Mol. Gen. Genet.*, **202**, 518-520 (1986).
- H. Ikeda: Bacteriophage T4 DNA topoisomerase mediates illegitimate recombination *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 922-926 (1986).
- Y.-S. Bae, I. Kawasaki, H. Ikeda and L. F. Liu: Illegitimate recombination mediated by calf thymus DNA topoisomerase 11 *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2076-2080 (1988).
- K. M. Saing, H. Orii, Y. Tanaka, K. Yanagisawa, A. Miura and H. Ikeda: Formation of deletion in *Escherichia coli* between direct repeats located in the long inverted repeats of a cellular slime mold plasmid: Participation of DNA gyrase. *Mol. Gen. Genet.*, **214**, 1-5 (1988).
- K. Kawakami, Y. H. Jonsson, G. R. Bjork, H. Ikeda and Y. Nakamura: Chromosomal location and structure of the operon encoding peptide-chain-release factor 2 of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5620-5624 (1988).
- 池田日出男: 「働く遺伝子系と組換え, シリーズ分子生物学の進歩 1」, 「DNA の構造と動態」丸善, 東京 (1988), pp.153-186.
- M. Tomono, M. Shiozaki and H. Ikeda: Formation of λ transducing phage *in vitro*: Involvement of DNA gyrase. *J. Biochem.*, **105**, 423-428 (1989).
- I. Kawasaki, S. Sugano and H. Ikeda: Calf thymus histone H1 is a recombinase that catalyzes ATP-independent DNA strand transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5281-5285 (1989).
- M. Chiba, H. Shimizu, A. Fujimoto, H. Nashimoto and H. Ikeda: Common sites for recombination and cleavage mediated by bacteriophage T4 DNA topoisomerase *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **264**, 12785-12790 (1989).
- K. Kawakami, S. Naito, N. Inoue, Y. Nakamura, H. Ikeda and H. Uhida: Isolation and characterization of *herC*, a mutation of *Escherichia coli* affecting maintenance of ColE1. *Mol. Gen. Genet.*, **219**, 33-340 (1989).
- H. Ikeda: DNA topoisomerase-mediated recombination. in "DNA Topoisomerase," ed. by N. Cozzarelli and J. Wang, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1990), pp. 341-359.
- A. Masuda-Miura and H. Ikeda: The gyrase of *Escherichia coli* participates in the formation of a spontaneous deletion by *recA*-independent recombination *in vivo*. *Mol. Gen. Genet.*, **220**, 345-352 (1990).
- 川崎一郎, 池田日出男: 動物細胞の組換え酵素, 細胞工学, **9**, 312-313 (1990).
- Y.-S. Bae, M. Chiba, M. Ohira and H. Ikeda: A shuttle vector for analysis of illegitimate recombination in mammalian cells: effects of DNA topoisomerase inhibitors on deletion frequency. *Gene*, in press.