

糸状菌における組換えに関する研究

Studies of recombination in fungi

田中 秀逸^{1*}、井上 弘一¹、畠山 晋²
Shuuitsu Tanaka¹, Hirokazu Inoue¹, ana Shin Hatakeyama²

¹ 埼玉大学 大学院理工学研究科 (生体制御)

Graduate School of Science and Engineering (Regulatory Biology), Saitama University

² 埼玉大学 科学分析支援センター

Molecular Analysis & Life science Center, Saitama University

Abstract

At gene targeting in *Neurospora*, the deficient strains of non-homologous end joining, a mechanism for repair of DNA double strand break, induce amazing high efficiency. We had found this technique and gotten a patent concerning it. We had already checked disrupted strains of genes encoding *KU70*, *KU80*, or *LIG4* homologues, respectively. In this study, we have newly checked disrupted strains of genes encoding *XRCC* or *XLF* homologues, respectively. As these results, it was appeared that a *mus-53* strain, in which *LIG4* homologue was disrupted, is most effective one for gene targeting. We also start to examine characters of random insertion of DNA fragments injected into cells in *Neurospora*.

Key Words: *Neurospora crassa*, Gene targeting, Homologous recombination and Non-homologous end joining

研究成果

DNA 二本鎖切断の修復機構には相同組換え (homologous recombination, HR) と非同末端結合 (nonhomologous end-joining, NHEJ) の2つの機構が存在する。NHEJ のみで働くと考えられる遺伝子のなかでは、ヒト *KU70*、*KU80* および *LIG4* のアカパンカビホモログである *mus-51*、*mus-52* および *mus-53* 遺伝子の解析が済んでいる。それらの研究成果として *mus-51*、*mus-52*、*mus-53* 破壊株を宿主として細胞外から DNA を導入すると、ゲノムの相同部位への挿入頻度が野生株と比較して飛躍的に上

昇することが明らかとなっている[1, 2]。つまり、NHEJ を抑えることが HR を優先的に働かせることになり、その結果、相同挿入頻度が上昇したと考えることができる。特に *mus-53* 破壊株においては、導入 DNA 断片の相同配列長に関わらずに相同挿入頻度が 100%になることが判っている。本研究ではアカパンカビにおいて新たな2つの NHEJ 関連遺伝子 *nclif1*、*nclif2* (それぞれヒト *XRCC4*、*XLF* ホモログ) を単離して遺伝子破壊株を作製し、DNA 二本鎖切断修復における働きを調べると同時に細胞外からの DNA の相同挿入頻度を測定した。ヒト *XRCC4*、*XLF* は *LIG4* と複合体を形成して NHEJ の最終段階で重要な役割を担うと考えられている。変異原感受性試験とエピスタシス解析の結果、これら

* 〒338-8570 さいたま市桜区下大久保255
電話/FAX : 048-858-3414
Email : shtanaka@mail.saitama-u.ac.jp

の遺伝子も NHEJ で働くことが示唆された。外来 DNA の相同挿入頻度を測定した結果、*nclif1*、*nclif2* 破壊株においても野生株と比べて相同挿入頻度は著しく上昇したものの、*mus-53* 破壊株とは異なり、常に 100% の相同挿入頻度を示さなかった。

現在の段階において少なくともアカパンカビでは、遺伝子ターゲティングにおいて *mus-53* 破壊株が最も有効な宿主であることが示唆された。現在、導入 DNA 断片のランダムな挿入の特徴についても解析を進めている。

謝辞

この研究は、キッコーマン株式会社による資金援助を受け、共同研究として行なわれた。

参考文献

- [1] Y. Ninomiya, K. Suzuki, C. Ishii, and H. Inoue, Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 12248-12253 (2004).
- [2] K. Ishibashi, K. Suzuki, Y. Ando, C. Takakura, and H. Inoue, Nonhomologous chromosomal integration of foreign DNA is completely dependent on MUS-53 (human Lig4 homolog) in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **103**, 14871-14876 (2006).

特許

第 4050712 号 相同組換えを行なわせる方法
(申請開始 2004 年、認可 2007 年)

相同配列長 1 kbp の DNA 断片を用いた際の形質転換効率 (TF) と騒動 (HI) 及び非相同 (NHI) 組換えの効率

株	TF ± SE ($\times 10^{-5}$)	Relative value of TF	HI ± SE (%)	NHI ± SE (%)
野生株	5.13 ± 0.2	1	22.03 ± 3.81	77.97 ± 3.81
<i>mus-53</i>	0.76 ± 0.04	0.15	100 ± 0	0 ± 0
<i>mus-52</i>	3.52 ± 0.22	0.69	98.6 ± 0.76	1.4 ± 0.76