

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, and 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 (NHEJ), 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 *XRCC* and *SLF* homologues, adding to *KU70*, *KU80*, or *LIG4* homologues, which have directly roles in the NHEJ pathway. In this study, we have newly checked disrupted strains of genes *mus-23*, *uvs-6*, *mus-45*, which encode each protein for MRX protein trimer, respectively. It is known that MRX complex works on upstream of the NHEJ pathway in DNA repair. We also examine characters of random insertion of DNA fragments injected into cells in *Neurospora*.

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

研究成果

細胞内に導入されたDNA断片が宿主の染色体に組み込まれる際、DNA断片はそれが持つ標的部ととの相同配列により標的部に相同的に(相同組込み)、または染色体DNA中の様々な部位に(ランダム挿入)組み込まれる。この時、DNA二本鎖切断(Double Strand Break, DSB)の修復機構である相同組換え(Homologous Recombination, HR)及び非相同末端結合(Non-Homologous End Joining, NHEJ)が、そ

れぞれに関与することが示唆されている。遺伝子ターゲティングにおいては、前者が機能することを必要とする。当研究室ではすでに、遺伝子ターゲティングの効率を飛躍的に上昇させる技術としてNHEJ因子であるKu70/Ku80タンパク質をコードする*mus-51/mus-52*遺伝子、あるいはDNA ligase IVをコードする*mus-53*遺伝子の破壊株を遺伝子導入の宿主として用いることを見出し、その導入を推奨した。しかし、依然として遺伝子導入機構の詳細は不明であり、染色体DNAへの遺伝子組み込みにおけるDSB修復関連因子の役割に興味を持たれる。

* 〒338-8570 さいたま市桜区下大久保2 5 5
電話/FAX : 048-858-3414
Email : shtanaka@mail.saitama-u.ac.jp

謝辞

本研究は、昨年度に引き続き、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。

本年度は、まず、*mus-23*、*uvs-6*、*mus-45*の3遺伝子の産物でDSB修復において三量体を形成しDNA切断部で機能するタンパク質複合体(以下MRXと記す)についての解析を行った。DSB修復機構におけるMRXの遺伝学的位置はHRとNHEJの上位であることが示されているが、遺伝子組み込みにおけるMRXの関与については不明であった。そこで、アカパンカビゲノムに内在する遺伝子座を標的とした外来DNA断片の導入実験を行った。MRXを構成するそれぞれの因子の単独変異株では、形質転換頻度が導入断片に持たせた相同配列長に関わらず著しく上昇し、その形質転換体の99%以上がランダム挿入によって生じていた。*mus-52*変異とMRX因子の変異を持つ二重変異株の場合においても、同様に形質転換頻度の顕著な上昇が観察されたが、相同配列長が2 kbpの場合には形質転換体の大部分は相同組込みにより生じていた。これに対し、相同配列長が50 bpの場合には100%がランダム挿入によるものであった。以上の結果より、(1) DSB修復において、MRXはNHEJ因子である

mus-51/mus-52 にエピスタティックであるのに対して、遺伝子組み込みにおいてはMRXを欠損していてもランダム挿入が起こること、及び(2) MRXを必要としない相同組込みとランダム挿入の経路が存在することが示唆された。

また、これまでの結果を踏まえると、相同領域を持たないDNA断片を細胞内へ導入した場合、それらは「ランダムな組み込み」により染色体に組み込まれるはずである。そこで、その点についても実験による検証を続けている。