

ニワトリDT40細胞を用いたチェックポイント関連遺伝子Rad9の放射線感受性に関する検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4524

ニワトリ DT40細胞を用いたチェックポイント関連遺伝子 Rad9の放射線感受性に関する検討

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻経血管診療学
(旧講座名：放射線医学)
(主任：松井修教授)

熊 野 智 康

分裂酵母における *rad9* (radiation sensitive) 遺伝子は放射線感受性変異株から同定された遺伝子で、その変異株は電離放射線、紫外線、DNA合成阻害剤であるヒドロキシ尿素に対して高感受性を示す。その後、この遺伝子はDNA損傷による細胞周期チェックポイントに関わることが示され、さらに最近になりヒトを含む高等動物細胞においてこの *rad9* に相同性を有する遺伝子が同定された。そこで、高等動物細胞における Rad9 の機能を検討する目的で、我々はニワトリBリンパ球由来の細胞株であるDT40細胞を用いてRad9のノックアウト細胞 (Rad9^{-/-}細胞) を作成した。まず、ヒトのRad9とアミノ酸レベルにて54%の相同性を持つ、ニワトリのRad9と考えられるcDNAを得た。次にそのcDNAを含むゲノムの塩基配列を同定し、エクソンとイントロンの構造を決定後、エクソンの1番から3番を薬剤耐性遺伝子にて置換しターゲティングベクターを作成した。サザンブロット解析にて標的組み換えが成功した細胞を同定し、RT-PCR法にてRad9遺伝子の発現が見られないことを確認した。得られたRad9^{-/-}細胞の放射線感受性を調べるため、コロニー形成法にて各線量での生存率を求めた。Rad9^{-/-}細胞は野生型に比べ、各線量いずれの場合もX線に対して高感受性を示した。しかし、X線に対する高感受性やチェックポイントの異常を示すことが明らかとなっているATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) のノックアウト細胞 (ATM^{-/-}細胞) と比べると感受性は低かった。一方、紫外線やヒドロキシ尿素に対して、Rad9^{-/-}細胞は野生型に比べ著明な高感受性を示した。また、X線照射後に分裂期へ進行した細胞の割合を示す分裂係数を測定し、G2期チェックポイント機構に関しても検討を行った。野生型では、X線照射後2時間まで分裂期の細胞はほとんど増加しなかったのに対し、Rad9^{-/-}細胞ではATM^{-/-}細胞と同程度に分裂期の細胞の増加を認めた。これらの結果から、Rad9は分裂酵母同様、高等動物細胞においてもX線、紫外線、ヒドロキシ尿素に対する感受性に関連し、またX線に対する細胞周期チェックポイント機構に重要な役割を果たすことが示唆された。

Key words Rad9, cell cycle checkpoint, radiation sensitivity, ATM, DT40

細胞に電離放射線を照射した場合に、細胞周期遅延という現象が見られることが知られてきた¹⁾²⁾。これは、電離放射線照射後に細胞周期のG1期からS期への進行、あるいはG2期からM期への進行が遅延する現象である。

近年、この現象は細胞周期チェックポイントという概念にて説明されるようになった。これは、電離放射線などによってDNA損傷が生じた場合や、G2期においてDNA複製が終了していない場合などに、S期やM期へ進行して細胞が致命的な状態になることを抑制するため、DNA損傷の有無やDNA複製の状態を監視する機構と考えられている³⁾⁴⁾。

出芽酵母や分裂酵母にて見出された放射線感受性に関連する遺伝子として、*rad* (radiation sensitive) 遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子が存在する⁵⁾⁶⁾。このうち分裂酵母にて見出された *rad1*, *rad3*, *rad9*, *rad17*, *rad26*, *hus1* (hydroxyurea

sensitive) の6つに関しては、上記の細胞周期チェックポイントに関わることが知られている⁷⁾。

これらの遺伝子のうち *rad3* は、ヒトにおいて相同性を有する遺伝子が同定され、*ATR* [*ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated) -and *Rad3*-related] と名付けられている⁸⁾。この *ATR* は主として紫外線によるDNA損傷やDNA複製異常に対するチェックポイントに関わるとされる⁹⁾¹⁰⁾。また、*rad3* はヒトの毛細血管拡張性小脳失調症 (Ataxia Telangiectasia, AT) の原因遺伝子として同定された *ATM*¹¹⁾ と構造的・機能的に関連を有する¹²⁾。AT患者の細胞は電離放射線に対して高感受性を示す¹³⁾¹⁴⁾ ことから、*ATM* は放射線感受性に関連する遺伝子として注目されると同時に、この細胞は各種DNA損傷チェックポイントの異常を示し、*ATM* はチェックポイントの中心的役割を果たす遺伝子と考えられている¹⁴⁾。

平成14年9月26日受付, 平成14年11月21日受理

Abbreviations : AT, Ataxia Telangiectasia; ATM, Ataxia Telangiectasia Mutated; ATR, ATM- and Rad3- related; hus/Hus, hydroxyurea sensitive; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; rad/Rad, radiation sensitive; RT-PCR, reverse transcription-PCR

その他の分裂酵母の *rad* 遺伝子に関しても, *rad1*, *rad9*, *rad17*, *hus1* でヒトにおいて相同性を有する遺伝子が同定され, その遺伝子産物はそれぞれ hRad1, hRad9, hRad17, hHus1 と名付けられている^{15)~18)}. このうち hRad1, hRad9, hHus1 は相互に結合することが示され¹⁹⁾²⁰⁾, またアミノ酸配列のコンピューター解析により DNA 複製・修復関連蛋白質である増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) と構造的に類似していることが報告されており²¹⁾, PCNA と同様, 三量体を形成している可能性が示唆されている. また hRad17 は, PCNA の働きに必要な複製因子 C (replication factor C, RFC) のサブユニットとして作用すると考えられている²¹⁾.

このようにチェックポイント Rad 蛋白質は進化の過程で高度に保存されていることが明らかとなったため, 細胞周期チェックポイント機構は種を超えて保存されていることが示唆されている. 近年, 高等動物においてこれらの遺伝子産物に関する研究が盛んに行われているが, その機能に関してはまだよく分かっていない. そこで, 分裂酵母の Rad 蛋白質の一つである Rad9 に関して, 高等動物における電離放射線感受性やチェックポイント機構への関連を調べることにした.

遺伝子の機能を調べる方法として, ノックアウトマウスに代表される遺伝子ノックアウト法がある. これは, 細胞内に DNA 断片を導入した場合に, それと相同な塩基配列を持つ染色体 DNA との間で相同組み換えを起こす標的組み換えという現象を利用して, 特定の遺伝子をノックアウトする方法である. 目的の遺伝子を発現させない状態にした場合に, 個体レベルや細胞レベルでの表現型が野生型と比べてどのように変化するかを見ることで, その遺伝子の機能を推測することが可能となる. しかし, 一般に高等真核細胞では標的組み換えが非常に稀にしか起らないことから, 遺伝子ノックアウトが困難である場合が少なくない.

そこで近年, 遺伝子ノックアウトを行う場合, ニワトリの B リンパ球由来の細胞株である DT40 細胞がよく用いられるようになった²³⁾²⁴⁾. この細胞株では, 高等真核細胞で唯一, 標的組み換えが効率よく起こるため, 遺伝子ノックアウトを比較的容易に行うことができ, 遺伝子の機能解析が行いやすいという利点を持つ.

今回我々は, この DT40 細胞を用いて Rad9 のノックアウト細胞の作成を行い, 高等動物細胞における Rad9 の放射線感受性や細胞周期チェックポイントへの関連を検討した.

材料および方法

I. Rad9 ノックアウト細胞の作成

1. ニワトリ Rad9 cDNA 断片の獲得

DT40 EST (Expressed Sequence Tags) データベース (<http://genetics.hpi.uni-hamburg.de/dt40.html>, Hamburg University, Germany)²⁵⁾にて Rad9 をキーワードに検索を行い, ヒトの Rad9 (hRad9) とアミノ酸レベルにて相同性を有する 711bp の cDNA clone (AJ398269 dkfz426 Gallus gallus cDNA clone 5c5r1) の塩基配列を得た. その配列に基づきプライマー (5'-TCACCATCCACTACGATGA-3', 5'-GTAATGGGTCTTAAGATGTGGC) を設定し, λ ZAP II (Stratagene, La jolla, USA) をクローニングベクターとした DT40 細胞の oligo dT cDNA ライブラリー (京都大学放射線遺伝

学講座 武田俊一教授より供与) を鋳型 DNA として PCR 反応を行うことにより, その DNA 断片の一部 (637bp) を得た. プライマー合成はジェンセット社 (京都) に依頼し, PCR 反応は Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim, Germany) を用いた.

2. cDNA ライブラリーのスクリーニング

得られた 637bp の DNA 断片をプローブとし, 上記の cDNA λ フェージライブラリーに対し以下の方法にてブランクハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った. まず一次スクリーニングとして, LB (Luria-Bertani) 培地にて振盪培養した宿主大腸菌 XL-1 Blue MRF^r に対し, プレート 1 枚あたり 5×10^4 PFU となるよう cDNA ライブラリーのフェージ液を加え, 37°C にて 15 分間インキュベーションした. ソフトアガロースを加え, 5 枚の 15cm 径 LB プレート培地上に素早く広げた. 37°C にて 16 時間インキュベーションしブランクの出現を確認後, プレート培地上に OPTITRAN BA-S フィルター (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) をのせ, 各プレートに対し 2 枚ずつ転写した. アルカリ変性・中和の後, UV クロスリンカー (SPECTRONICS, Westbury, USA) にて固定した.

次に 637 bp の DNA 断片を Prime It Random Primer Labeling Kit (Stratagene) を用い ³²P-dCTP で標識した後, ハイブリダイゼーションを行った. ハイブリダイゼーション溶液 (6 \times SSC, 5 \times デンハルト溶液, 0.5% SDS) に熱変性させたサケ精子 DNA 0.1mg/ml を加え, 65°C にて 2 時間プレハイブリダイゼーションした後, 標識したプローブを加え 65°C にて 16 時間反応させた. それぞれ 2 \times SSC \cdot 0.1% SDS, 1 \times SSC \cdot 0.1% SDS, 0.1 \times SSC \cdot 0.1% SDS の洗浄液にて 3 回の洗浄後, X 線フィルムを用いて -70°C にて 16 時間露光しオートラジオグラフィーを行い, 2 枚のフィルター共に陽性となる 7 個のシグナルを得た.

各陽性シグナル部分のブランクを採取し, それぞれ SM 緩衝液 500 μ l に懸濁後, クロロホルム 10 μ l 加えフェージ溶液を回収した. 二次スクリーニングでは, 10 cm 径の LB プレートに数百個のブランクができるようにし, その他は一次スクリーニングと同様の方法にて行った. 7 種類いずれでも陽性シグナルが見られたため, これらの単一ブランクを一次スクリーニングの際と同様に回収した.

3. ニワトリ Rad9 cDNA の解析

得られた 7 個のブランクは, 以下の方法にてそれぞれプラスミドに変換した. まず, LB 培地にて振盪培養した大腸菌 XL1-Blue MRF^r と XL0LR をそれぞれ 10mM 硫酸マグネシウム溶液 200 μ l に懸濁し, XL1-Blue MRF^r 液に上記のフェージ液 40 μ l と Helper phage (Stratagene) 1 μ l を加え, 37°C にて 15 分間静置後, LB 培地 3ml を加え 37°C にて 3 時間振盪培養した. 65°C にて 20 分間静置後遠心し, フェージを含む上清を回収した. このうち 10 μ l を上記の XL0LR 液に加え, 37°C にて 15 分間静置後, アンピシリンを含む LB プレートに広げ 37°C にて 16 時間培養した. 出現したコロニーを回収し LB 培地にて振盪培養後, Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad, Hercules, USA) を用い 7 種類のプラスミド DNA を抽出した. cDNA の塩基配列は CEQ2000 DNA Analysis System (ベックマン・コールター, 東京) を用いて決定し, 塩基配列の解析は GENETYX-MAC Version10.1.4 (ソフトウェア開発社, 東京) を用いて行った.

4. ゲノムライブラリーのスクリーニングとゲノムマッピング
得られた cDNA の塩基配列を基に, λ FIX II (Stratagene) を

クローニングベクターとしたDT40細胞のゲノムライブラリー(がん研究所細胞情報調節講座 原田文夫教授より供与)のスクリーニングを行った。宿主大腸菌にXL1-Blue MRA (P2)を用いたこと以外、cDNAライブラリーの場合と同様の方法にて行った。陽性シグナルが見られた5個のファージを回収し、Lambda Mini Kit (キアゲン, 東京)を用いてファージDNAの抽出を行った。各ファージDNAに対し、cDNAの塩基配列に基づき作成したプライマーを用いPCR反応を行った。明らかなDNA断片の増幅が見られた1個のファージDNA(約15kbp)に関して解析した。*Not I* (東洋紡, 東京)にて制限酵素処理した後、cDNAの一部をプローブとし後述の方法でサザンブロット解析を行った。検出された約8 kbpのDNA断片をLigation High (東洋紡)を用いpBluescript II KS (-) (Stratagene)の*Not I*サイトに挿入した。このDNA断片に関して各種制限酵素処理にて制限酵素地図を作成後、塩基配列を解析してゲノムマッピングを行った。また、ヒトRad9遺伝子のエクソン・イントロン関係との比較を行った。

5. ターゲッティングベクターの作製

上記の約8kbpのDNA断片が挿入されたプラスミドDNAを*Xho I*と*Not I* (いずれも東洋紡)にて制限酵素処理し、得られた約3 kbのDNA断片をターゲッティングベクターの5'側のアームとした。次に、図2に示した部位にそれぞれプライマー(5'-AAGACGGGATCCCGCTGCAAGGTGCTGATGAA-3', 5'-GTCTGATCTAGATGCCAGCCCGTGTGCGGTGT-3')を設定し、上記の約8kbpのDNAを含むプラスミドDNAを基質としてPCR反応を行い、増幅された約3kbpのDNA断片を3'側のアームとした。そして、この2つのDNA断片がそれぞれ5'側、3'側に来るようにpBluescript II KS(-) (Stratagene)に挿入した後、2つのDNA断片間に選択用マーカーを挿入してターゲッティングベクターとした。選択用マーカーとして、一つのベクターにはヒスチジノール耐性遺伝子、もう一つにはネオマイシン耐性遺伝子を挿入した(以下、それぞれpRad9-His, pRad9-Neoと記載)。ターゲッティングベクターは、これらをプラスミドとして持つ大腸菌を大量に震盪培養した後、アルカリ-SDS法にてプラスミドDNAを抽出し、塩化セシウム超遠心法にてDNAの精製を行ったものを遺伝子導入に用いた。

6. 細胞培養

ニワトリBリンパ細胞株のDT40細胞は、RPMI1640培地(Sigma, St. Louis, USA)にて39°C・5%CO₂の条件下で培養した。培地には10%牛胎仔血清(56°Cで30分処理して非動化したもの)、1%ニワトリ血清、50 μM 2-メルカプトエタノール、2mM グルタミン、50U/ml ペニシリンG、50 μg/ml ストレプトマイシンを加えて使用した。

7. Rad9ノックアウト細胞のクローニング

細胞をPBSにて 1.25×10^7 /mlに調整し、その0.8mlと作成したターゲッティングベクター25 μgをキュベットに入れて混和した。氷上にて10分間静置した後、ジーンバルサー発生装置(Bio-Rad)にて550V、25 μFDの条件下に電圧ポレーション法にて遺伝子導入を行った。室温にて10分間静置後、20 mlの培地を加えてフラスコ内で24時間培養した。80mlの培地と選択用薬剤(最終濃度はヒスチジノールD 1mg/ml, ネオマイシン2mg/ml)を加え混和した後、96穴プレート5枚に各ウェル0.2 mlずつ細胞を播き、7~9日間培養した。出現したコロニーを回収し、細胞クローニングを行った。

8. サザンブロット法

1) 染色体DNA抽出

クローニングした細胞の培養液をPBSにて洗浄した後、DNA抽出緩衝液(150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM EDTA) 3mlにて懸濁し、10% SDS溶液 30 μlと20mg/ml プロテナーゼK溶液 15 μlを加え混和後、55°Cにて16時間処理した。PCI溶液(フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1)を3ml加え室温にて10分間混和後、室温にて2000rpm, 5分間遠心した。水層を回収し100%エタノール6mlを加え混和した。析出したDNAを70%エタノールにて洗浄後、滅菌脱イオン水に溶解した。

2) プローブ作製

上記の約8 kbpのDNAが挿入されたプラスミドDNAを基質として、プローブ作製のプライマー(5'-GTGAACCCCTCCAGGGGGCTG-3', 5'-CTGTGCGGGAGTGCAGGACTGTT-3')を設定してPCR反応を行い、得られた約700bpのDNA断片をプローブとした。

3) 電気泳動, 転写, ハイブリダイゼーション

抽出した染色体DNAを*BamH I* (東洋紡)にて37°C, 16時間の制限酵素処理後、エタノール沈澱にて回収した。各サンプルを30Vの定電圧の下、1×TAE緩衝液にて0.7%アガロースゲル電気泳動で分画した後、アルカリ転写法にてHybond-N⁺ nylon membrane (アマシャム・バイオサイエンス, 東京)に転写した。緩衝液として0.4N水酸化ナトリウム溶液を用い、転写は16時間行った。転写後、UVクロスリンカー(SPECTRONICS)を用いてDNAをナイロン膜に固定した。

次に、前述の約700bpのプローブをPrime It Random Primer Labeling Kit (Stratagene)にて³²Pで標識した後、ハイブリダイゼーション反応を行った。ハイブリダイゼーション溶液(6×SSC溶液, 5×Denhardt溶液, 0.5% SDS溶液)に熱変性させたサケ精子DNA 0.1mg/mlを加え、その溶液内でナイロン膜を65°C, 2時間のプレハイブリダイゼーション後、標識プローブを加え65°C, 16時間反応させた。それぞれ2×SSC・0.1% SDS, 1×SSC・0.1% SDS, 0.1×SSC・0.1% SDSの洗浄液にて3回の洗浄(いずれも65°C, 30分間)後、イメージングプレートとバイオイメージアナライザー(BAS1000)(富士フイルム, 東京)を用いてオートラジオグラフィによる測定を行った。

9. 逆転写PCR反応(reverse transcription-PCR, RT-PCR)

1) RNA抽出

5~10×10⁶個の細胞を回収しTRIZOL reagent (Gibco BRL, Rockville, USA)を1ml加え、室温にて5分放置した。クロロホルム0.2mlを加え混和し室温にて3分静置後、4°Cにて12000rpm, 20分間遠心した。水層抽出後イソプロピルアルコール0.5mlを加え混和し、室温にて10分間静置後4°Cにて12000rpm, 10分間遠心した。沈殿物を75%エタノールにて洗浄後、4°Cにて11000rpm, 5分間遠心し、上清除去し室温にて10分間乾燥させた。滅菌脱イオン水30 μl加え、55°Cにて10分間加温した。

2) cDNA合成

抽出したRNA 5 μgにオリゴdTプライマー0.5 μgと滅菌脱イオン水を加え、総量12 μlにて70°C, 10分間インキュベーション後、氷上にて5分間冷却した。5×緩衝液4 μl, 0.1M DTT 2 μl, 10mM dNTP 1 μl加え混和後、42°Cにて2分間ブレイン

キュベーションした。SUPERScript II (Gibco BRL) 1 μ l加え42 $^{\circ}$ Cにて50分間反応させcDNAを合成した後、70 $^{\circ}$ Cにて15分間インキュベーションし、RNase H 1 μ l加え37 $^{\circ}$ Cにて20分間反応させた。

3) PCR反応

上述のcDNAの塩基配列を基に、プライマー (5'-GTGAAAGCCCTCGGCCACGCCGT-3', 5'-CAACCACAGCTCTGTACCA-3')を設定し、PCR反応にはExpand High Fidelity PCR System (Roche)を用いた。上記cDNA溶液のうち1 μ lを鋳型とし、10 \times PCR緩衝液2.5 μ l, 2.5 mM dNTP 2 μ l, PCR酵素ミックス0.5 μ l (1.75U), 5pM

Rad9プライマー各2.5 μ lを添加後、滅菌脱イオン水にて25 μ lとしPCR反応を行った。94 $^{\circ}$ Cで30秒間の熱変性、58 $^{\circ}$ Cで30秒間のアニーリング反応、72 $^{\circ}$ Cで1分30秒間の伸長反応を1サイクルとして、30サイクル行った。

II. 表現型の解析

1. コロニー形成法

野生型DT40細胞、得られたRad9^{-/-}細胞のうちの2クローン、そして以前本教室にて作成されたATMのノックアウト細胞²⁴⁾を用いた。各種刺激の後、メチルセルロース培地に各細胞が適当な数になるようにまいた。7から12日後に出現したコロニー数を計測し、細胞の生存率を調べた。

刺激としてX線、紫外線、ヒドロキシ尿素を用いた。X線照射は日立X線照射装置MBR-1520型(日立メディコ、東京)を用

Chicken	1*	VKALGHAVHALSRVGDHLYLEPSDAGLSLRAASTSRSAFASFLVPLVFRQ
Human	1*	MKCLVTGGNVKVLGKAVHSLSRIGDDELYLEPLEDGLSLRTVNSRSAYACFLFAPLFFQK
Chicken	52*	YEPGPPG---TRCKVLMKSFVFRSLPTLDKSVRCLVLLRPRAGRLVLQHKHGVTR
Human	61*	YQAATPQQDLRCKIKLMSFVFRSLAMLEKTEKCCISLNGRSSRLVQVQHKCFGVRK
Chicken	109*	THQLAFQECERLQAVFDTCASRLRAPAQLLAEAVVHFPQTLAEVTLGAAAGGRIGLRS
Human	121*	THNLSFQDCESLQAVFDPASCPHMLRAPARVLGEAVLPFSPALAEVTLGIGRGRVILRS
Chicken	169*	-HLEEGSEPGKAMVTELMWLPDEFQEVAVVPGSRITFCLKEFRGLLSFAXASSLPLTIHY
Human	181*	YHEEEADSTAKAMVTEMLGEEDFQQLQAQEGVAITFCLKEFRGLLSFAESANLNSIHF
Chicken	228*	DEPGRPAIFTLDDSLMEHLVLAATLDPESDSQPPATNGRPVAIGDQSEPPAPPDDFA
Human	241*	DAPGRPAIFTIKDSSLGDHFLVLAATLSDTDSHQ-DLGSPEHQVVPQLQAHSTPHDDFA
Chicken	288*	-DDLESYMALESSACEGEGAPPSPNFSL--HTPRPAESDPEEED---GAVPGTPPHK
Human	300*	NDDIDSYMIAMETTIGNEGSRVLPSSISLSPGQPPKSPGPHSEEEADEAEPSTVPGTPPHK
Chicken	342*	KFRSLFFGSVLTGGPGPAPSQEVLAEVSDAEAC
Human	360*	KFRSLFFGSILAPVRSQGPSP-VLAEDSEGEK

Fig. 1. Amino acid sequence alignment of chicken Rad9 with the sequence of human Rad9. Asterisk between amino acids indicate identical molecules. Dots indicate amino acids with similar physicochemical properties. The part of N-terminal end was not acquired. Ser272 of hRad9 which is phosphorylated by ATM is underlined.

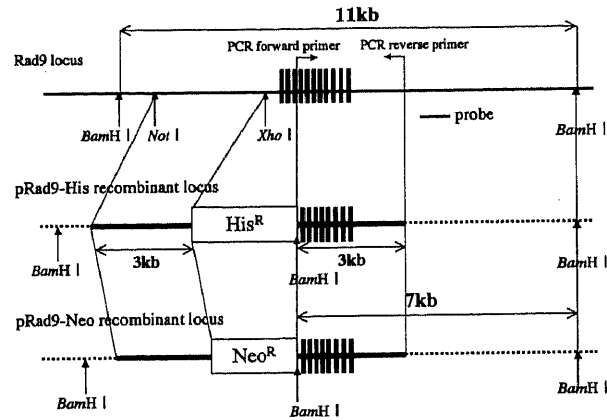


Fig. 2. Schematic representation of targeted disruption of the chicken Rad9 gene. The chicken Rad9 genomic locus, two targeting constructs (pRad9-His and pRad9-Neo) and the targeted locus are shown. The black boxes indicate the positions of the 11 exons.

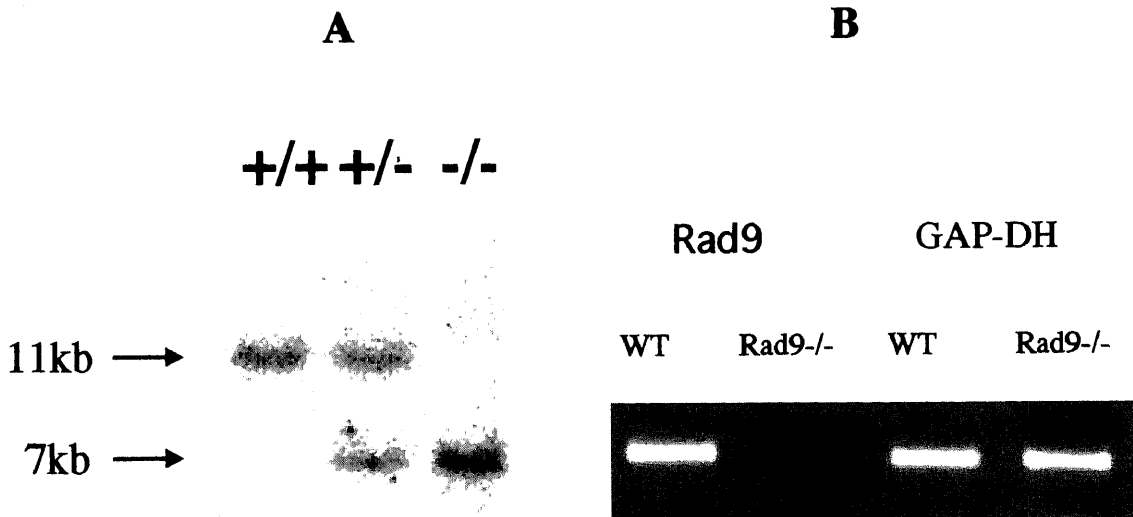


Fig. 3. (A) Southern blot analysis. BamHI-digested genomic DNA of wild type (+/+), heterozygous mutant (+/-) and homozygous mutant (-/-) DT40 cells was hybridized with the probe shown in Fig. 2. (B) RT-PCR analysis. Total RNA of wild type and Rad9^{-/-} DT40 cells was used as a template to amplify chicken Rad9 cDNA. GAP-DH: glyceraldehydephosphate dehydrogenase

い、エネルギー150kV、線量率は約0.71Gy/分にて行い、各細胞にそれぞれ0Gy (非照射)、2Gy、4Gy、6Gy、8Gyの照射後、速やかにメチルセルロース培地にまいた。紫外線照射は金沢大学薬学部遺伝子応答学講座が作成した照射装置を使用し、波長

は254nm、線量率は約0.1J/秒にて行い、各細胞にそれぞれ0J/m² (非照射)、0.5J/m²、1.0 J/m²、1.5J/m²、2.0J/m²の照射後、速やかにメチルセルロース培地にまいた。ヒドロキシ尿素 (Sigma) の場合は、培地に最終濃度10mMになるよう加え、各細胞にそれぞれ0時間 (未刺激)、3時間、6時間、9時間、12時間後に培養液を回収し培地交換後、メチルセルロース培地にまいた。

X線や紫外線での非照射の場合やヒドロキシ尿素での未刺激の場合の生存率を1とし、各照射線量や刺激時間毎の生存率を計算した。実験は各刺激に対して3回ずつ行った。

2. 分裂係数測定

野生型細胞、Rad9^{-/-}細胞、ATM^{-/-}細胞にそれぞれ上記のX線照射装置にて1Gy照射後、コルセミド (Gibco BRL) (最終濃度0.1 μg/ml) を加え、それぞれ0、1、2、3時間後に以下の処理を行った。培養液を遠心 (1000rpm、5分) 後、0.9%クエン酸ソーダ1mlを加え室温にて15分放置した。カレノア固定液 (メタノール：酢酸=3：1) 5mlを加え転倒混和後、遠心し上清を除去した。再びカレノア固定液5mlを加え、室温にて30分以上放置した。遠心し上清除去後、カレノア固定液を0.1ml加え混和した。

100%エタノールに浸したスライドグラスを取り出し、エタノールが適度に蒸発後、ピペットにて上記の細胞液約10 μlを滴下しスライドグラス上に広げた。アルコールランプにて軽く乾燥後、翌日まで室温にて放置した。3%ギムザ液にて約2時間染色し軽く水洗後、室温にて乾燥させた。光学顕微鏡にて各スライドグラスを観察し、約1000個の細胞のうち、凝集した染色体が見られる分裂中期の細胞の占める割合を算出して分裂係数とした。

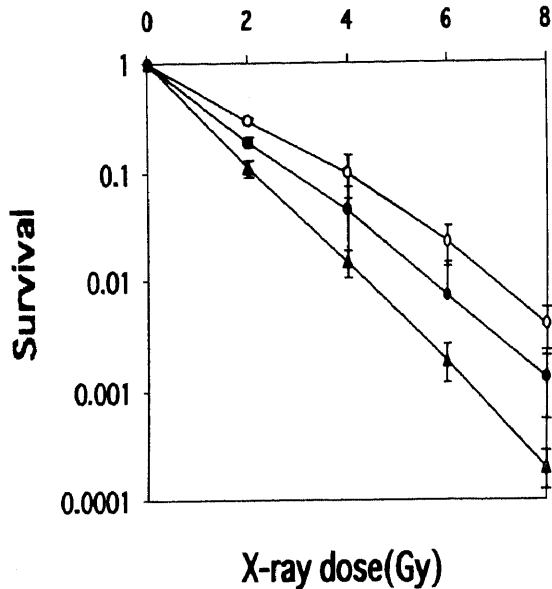


Fig. 4. Sensitivity to X-ray irradiation. The fraction of surviving colonies after X-ray irradiation is shown. The genotypes of the cells used are wild type (○), Rad9^{-/-} (●) and ATM^{-/-} (▲). Each value represents the mean of results of three separate experiments. Error bars show the standard deviation of the mean.

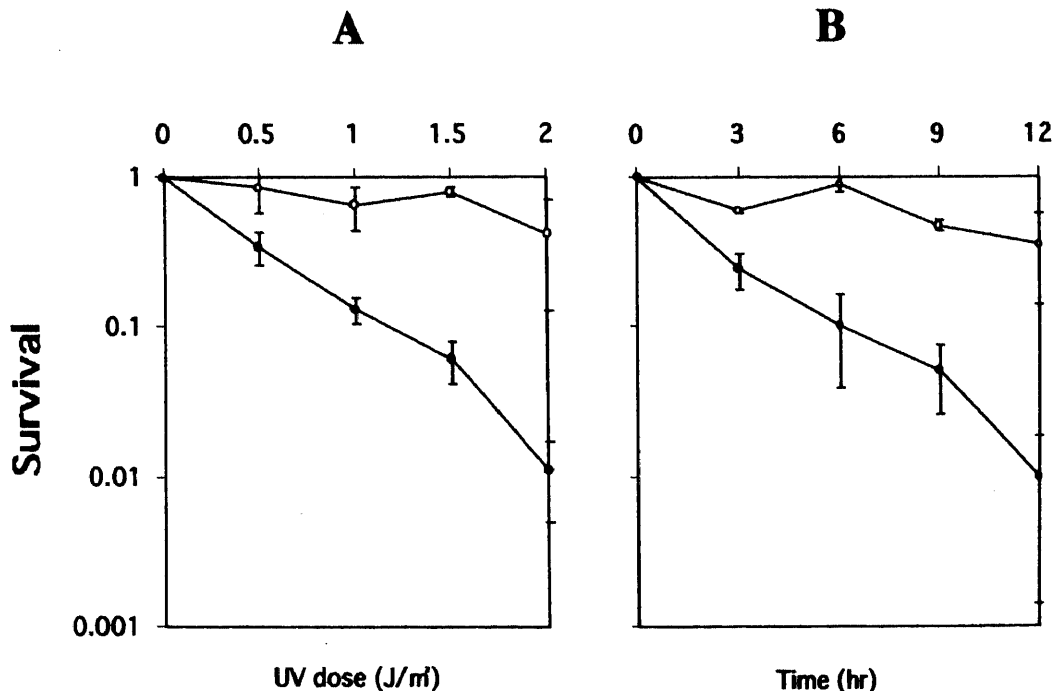


Fig. 5. Sensitivity to UV irradiation and hydroxyurea. The fractions of surviving colonies after UV irradiation (A) and hydroxyurea treatment (B) are shown. The concentration of hydroxyurea is 10mM. Others are the same as in Fig. 4.

成 績

I. Rad9ノックアウト細胞の作成

Rad9のノックアウト細胞を作成するため、まずDT40 ESTデータベースでの検索にて、ニワトリのRad9遺伝子の一部と思われる711 bpの塩基配列を得た。次に、その配列の一部をプローブとしてDT40細胞cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、1301bpのcDNA断片をクローニングした。その塩基配列を基に再度ESTデータベースにて検索を行い、5'側149bpの塩基配列を得た結果、合計1450bpの塩基配列を決定した。その塩基配列から予測されるニワトリRad9の374個のアミノ酸配列は、ヒトRad9の391個のアミノ酸配列と54%の相同性を示した(図1)。アミノ酸配列の比較から、ニワトリRad9の開始メチオニンは今回得られた配列には含まれていないものと思われた。

このcDNA配列の一部をプローブとしてゲノムライブラリーのスクリーニングを行い、約15kbpのゲノムDNAを獲得した。そのうちRad9遺伝子座を含むと思われる約8kbpのDNAを切り出し、制限酵素地図を作成後、一部を除いて塩基配列を決定してゲノムマッピングを行った(図2)。ヒトとほぼ対応する11個のエクソンが存在した。

ターゲティングベクター(pRad9-His, pRad9-Neo)はRad9遺伝子のエクソン1からエクソン3の一部を欠損させるようにデザインして作成した(図2)。野生型DT40細胞にpRad9-Hisベクターをトランスフェクションし、ヒスチジノール耐性のクローンを選択したところ、40個のコロニーが出現した。そのうち15個を選択し、それらの細胞より抽出したゲノムDNAをBamHIにて処理しサザンブロット解析を行い、6個のRad9+/-細胞を選択した。次に、得られたRad9+/-細胞に対してpRad9-

Neoベクターをトランスフェクションし、ネオマイシンにて選択を行うと70個のコロニーが出現した。この70個すべてに対し同様にサザンブロット解析を行い、3個のRad9-/-細胞を選択した。図3には野生型DT40細胞(Rad9+/+), Rad9+/-, Rad9-/-の3種類の細胞から抽出したゲノムDNAを、それぞれBamHIにて処理してサザンブロット解析を行った結果を示した。これにより標的組み換えに成功したことを確認した(図3A)。

さらにRad9エクソン1/2とエクソン6の内部にプライマーを設定して行ったRT-PCR法では、野生型細胞ではバンドが検出されたのに対してRad9-/-細胞ではバンドが検出されなかった。これによりRad9遺伝子がノックアウトされていることを確認した(図3B)。

II. 表現型の解析

1. X線感受性

Rad9-/-DT40細胞の電離放射線感受性を解析するため、コロニー形成法を用いてX線照射後の各線量での生存率を調べた。図4に示すように、Rad9-/-細胞では野生型に比べ各線量いずれにおいても生存率が低下しており、感受性が増大していた。これは、同時に行ったRad9-/-細胞の別のクローンに関してもほぼ同様の結果であった。ただし、以前当教室にて作成された、電離放射線に対する高い感受性を示すことが知られているATMのノックアウトDT40細胞(ATM-/-)と比べると、感受性の増大は少なかった。

2. 紫外線感受性

X線の場合と同様、コロニー形成法にて紫外線に対する感受性を調べた。図5Aに示すように、Rad9-/-細胞では野生型に比べ各線量いずれにおいても生存率が著明に低下しており、感受性が著明に増大していた。この結果は、同時に行ったRad9-/-

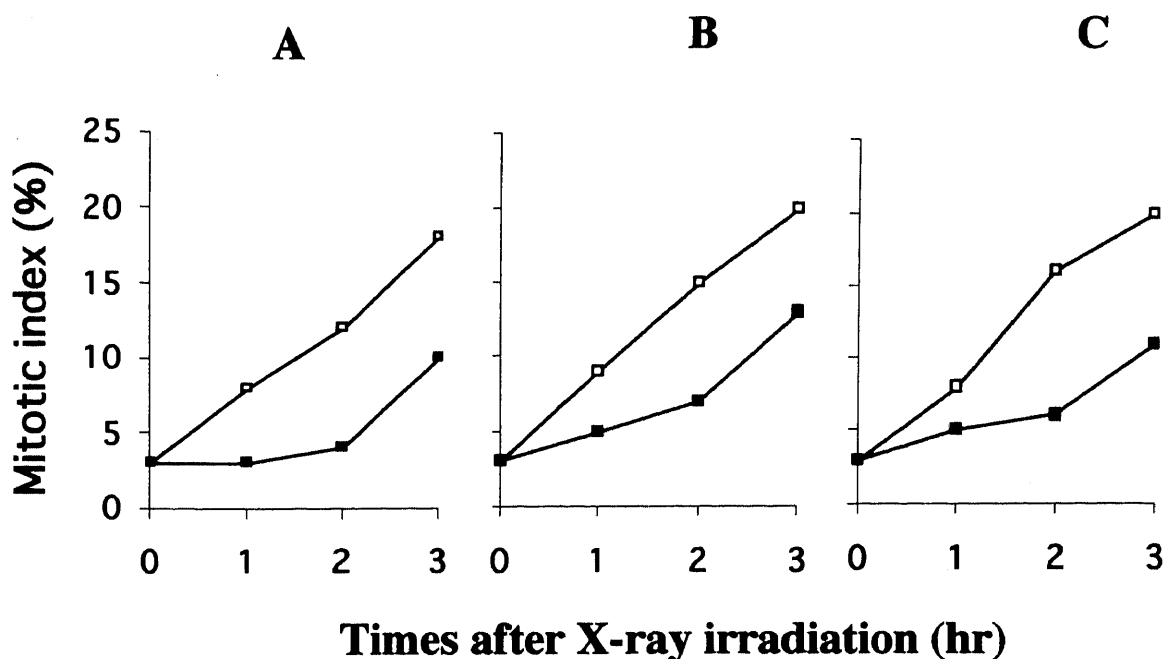


Fig. 6. Mitotic index. Wild type (A), ATM-/- (B) and Rad9-/- (C) DT40 cells were untreated (□) or treated with 1Gy X-ray irradiation (■) and were cultured with colcemid for indicated times. Cells were fixed, stained, and examined on microscopy to determine the fraction of cells in mitosis.

細胞の別のクローンに関してもほぼ同様であった。

3. ヒドロキシ尿素感受性

ヒドロキシ尿素に関しても同様に、コロニー形成法にて感受性を調べた。ヒドロキシ尿素はDNA合成阻害剤で、細胞周期のS期に特異的に作用するため時間依存性に作用する。そのため、薬剤濃度を一定(10mM)にして薬剤処理時間を3時間ごとに延ばし、生存率を調べた。図5Bに示すように、紫外線同様Rad9^{-/-}細胞では、野生型に比べ各処理時間における生存率はいづれも著明に低下しており、感受性の著明な増大が示された。この結果は、同時に行ったRad9^{-/-}細胞の別のクローンに関してもほぼ同様であった。

4. 分裂係数

DT40細胞におけるRad9の細胞周期チェックポイントへの関与を調べる目的で、X線照射による細胞周期の分裂期への進展抑制に関して検討した。X線1Gy照射後、細胞分裂抑制作用を有するコルセミドを加え、0時間、1時間、2時間、3時間後にそれぞれ分裂中期の細胞数を計測した。この実験では、細胞周期チェックポイント機構への関与が知られているATMのノックアウト細胞も同時に使用した。図6に示すように、野生型ではX線照射後2時間までで分裂中期の細胞数の増加がほとんど見られなかった(0時間後:3%, 1時間後:3%, 2時間後:4%)のに対して、ATM^{-/-}細胞(0時間後:3%, 1時間後:5%, 2時間後:7%)とRad9^{-/-}細胞(0時間後:3%, 1時間後:5%, 2時間後:6%)では軽度ではあるが増加が見られた。

考 察

今回、高等動物におけるRad9の放射線感受性や細胞周期チェックポイントへの関連を調べる目的で、ニワトリBリンパ球由来の細胞株であるDT40細胞におけるRad9のノックアウト細胞の作成を行った。

まず、遺伝子ノックアウトに必要なターゲティングベクターを作成するため、DT40細胞のESTデータベース²⁵⁾の検索やDT40細胞cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、5'側の一部を除き、ニワトリのRad9遺伝子と思われるcDNAを得た。その塩基配列から類推されるアミノ酸配列を用いて、ヒトのRad9との比較を行ったところ54%の相同性が見られたため、この配列がニワトリのRad9遺伝子であると判断した(図1)。

次に、ニワトリRad9遺伝子のゲノム上での塩基配列を得るため、上記のcDNA配列を基にしてDT40細胞のゲノムライブラリーのスクリーニングを行った。得られた約8kbのゲノムDNAに関してゲノムマッピングを行い、Rad9遺伝子のコード領域を含んでいること、またエクソン・イントロン構造もヒトのRad9遺伝子とほぼ同一であることが確認され、この領域がニワトリのRad9遺伝子座であると考えた。

そして、エクソン1からエクソン3の一部を欠損させるようにターゲティングベクターを作成し(図2)、それをDT40細胞に対し遺伝子導入してRad9のノックアウト細胞(Rad9^{-/-}細胞)を得た(図3)。

分裂酵母での*rad9*変異株は、野生型に比べ電離放射線に対して高感受性を示し、*rad9*の電離放射線感受性との関連が示されている²⁶⁾²⁷⁾。電離放射線はその電離作用によりDNA切断作用を有し、特にDNA二本鎖切断は電離放射線による細胞死につながるものとして重要視されている。このDT40細胞での

Rad9^{-/-}細胞も、野生型に比べ電離放射線に対して高感受性を示した(図4)ことから、Rad9は高等動物細胞においても電離放射線感受性ならびにDNA二本鎖切断に対する反応への関与が示唆された。ただし、以前当教室にて作成されたATMのノックアウト細胞(ATM^{-/-}細胞)²⁴⁾を用いた場合の結果と比較するとその変化は小さく、DT40細胞においては、Rad9の電離放射線感受性への関与はATMに比べると少ないものと思われた。Rad9と複合体を形成すると考えられているHus1のノックアウトマウスの細胞では、紫外線やヒドロキシ尿素に比べて電離放射線に対する感受性はあまり変化しないことが報告されており²⁸⁾、高等動物ではRad9の電離放射線感受性に対する影響はあまり大きくない可能性も考えられる。

一方、分裂酵母の*rad9*変異株は、紫外線やヒドロキシ尿素に対しても高感受性になることが示されている²⁶⁾²⁷⁾。紫外線は非電離放射線で、主にピリミジンダイマーに代表されるチミン二量体を生じさせることで細胞死を起こすと考えられている。一方、ヒドロキシ尿素はリボヌクレオチドレダクターゼを阻害し、DNA合成の伸長反応を阻害するため、DNA複製を阻害してS期の細胞に特異的に作用し細胞死を起こすとされる。従って、分裂酵母においてRad9はDNA損傷に対する反応のみならず、DNA複製異常に対しても関与すると考えられている。今回、DT40細胞においても分裂酵母の場合と同様に、Rad9^{-/-}細胞は野生型に比べ紫外線やヒドロキシ尿素に対して著明な高感受性を示した(図5)。電離放射線の場合と比べ野生型との感受性の差が大きいことから、高等動物細胞におけるRad9はDNA二本鎖切断に対する反応以上に、紫外線によるチミン二量体やDNA複製阻害に対する反応に、より強く関与している可能性が示唆された。上述のHus1ノックアウトマウス細胞も同様の表現型を示す²⁸⁾ことから、複合体を形成するとされるRad9とHus1の機能は類似している可能性があると思われる。

ATMは電離放射線、紫外線、ヒドロキシ尿素のいずれの刺激に対してもRad9の272番目のSerをリン酸化し(図1)、この部位に変異を導入すると電離放射線感受性に対して高感受性になることが報告され²⁹⁾、ATMとRad9の関連が示されている。DT40細胞におけるATM^{-/-}細胞は電離放射線に対して著明に高感受性を示す一方、データは示していないが紫外線やヒドロキシ尿素に対する感受性はほとんど変化が見られなかった。一方、Rad9^{-/-}細胞は電離放射線に対して高感受性を示したものの、ATM^{-/-}細胞に比べるとその変化は小さかったのに対し、紫外線やヒドロキシ尿素に対しては著明な高感受性を示した。このようにATMとRad9ではDT40細胞におけるノックアウト細胞の表現型に違いが見られた。

一方、分裂酵母*rad3*遺伝子に対して相同性を有するヒトでの遺伝子産物であり⁸⁾、ATMとともにチェックポイント機構の中心的役割を果たしていると考えられるATRに関しては、ノックアウトを行うと細胞致死になることが分かっている³⁰⁾³¹⁾。キナーゼ領域を変異させた蛋白質を発現させたドミナントネガティブ法での機能解析では、電離放射線、紫外線、ヒドロキシ尿素のいずれに対しても高感受性になることが報告され³⁰⁾³¹⁾、最近では、特に紫外線によるDNA損傷やヒドロキシ尿素によるDNA複製に対する反応に強く関与することが示唆されている⁹⁾¹⁰⁾。従って、今回のRad9のノックアウト細胞の表現型から推測すると、これまで報告されてきたATMとの関連以上にRad9はATRと強く関連しているのかもしれない。

一方、チェックポイント機構に関してDT40細胞ではp53の発現が見られないこともあり、野生型においてもG1チェックポイント機構がほとんど作用しない。そのため、細胞周期のM期への進行状態を評価できる分裂係数の測定を行い、主にG2チェックポイント機構に関して検討した。X線照射の後2時間までは、野生型では分裂期への進行がほぼ完全に抑制されていたのに対して、Rad9^{-/-}細胞では抑制はされるものの分裂期への進行が見られた(図6)。G2チェックポイントの異常を示すことが知られているATM^{-/-}細胞でもほぼ同様の結果を示しており、高等動物細胞においても、Rad9はDNA損傷に対する細胞周期チェックポイント機構に関連しているものと考えられた。最近、ヒト乳癌細胞株MDA-MB-468細胞にsmall interfering RNAを導入しRad9の発現を抑制すると、G2チェックポイントが障害されることが報告されており³²⁾、今回の結果はこれを裏付けるものと思われる。

AT患者の細胞では、電離放射線に対し高感受性になるとともに各種チェックポイントの異常が見られる¹⁴⁾。一方、p53を欠損したヒトの腫瘍細胞においてもAT患者の細胞と同様、電離放射線によるDNA損傷チェックポイントの異常が見られるにも関わらず、むしろ放射線に対し抵抗性となる場合が報告されている³³⁾³⁴⁾。これにはp53がアポトーシスの制御に関わっていることと関係する可能性があると思われるが、このようにDNA障害に対するチェックポイントの異常と電離放射線感受性が単純に1対1に対応するとは言えない。今回、DT40細胞におけるRad9^{-/-}細胞は、ATM^{-/-}細胞と比べると変化は大きくないものの電離放射線に対する高感受性を認めるとともに、チェックポイントの異常も見られたが、両者の関連に関しては今後検討が必要な問題と思われる。

結 論

分裂酵母にて発見されたチェックポイントRad蛋白質の一つであるRad9に関して、高等動物細胞におけるX線などに対する感受性や細胞周期チェックポイント機構への関連について検討した。

1. 遺伝子ノックアウトが比較的容易に行えるニワトリBリンパ球由来のDT40細胞株を用いて、Rad9のノックアウト細胞(Rad9^{-/-}細胞)を作成した。

2. コロニー形成法による生存曲線において、Rad9^{-/-}細胞は野生型に比べX線に対する感受性の増加が見られたが、X線高感受性として知られるATM^{-/-}細胞と比較するとその変化は少なかった。一方、紫外線やヒドロキシ尿素に対する感受性はRad9^{-/-}細胞にて著明な増加が見られた。

3. X線照射後の分裂係数の測定により、Rad9^{-/-}細胞ではATM^{-/-}細胞と同様に、X線による細胞周期遅延の異常が見られた。

以上の結果より、Rad9は高等動物細胞においても、DNA損傷やDNA複製阻害に対する感受性、および細胞周期チェックポイント機構に関連することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科経血管診療学 松井修教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始直接御指導を賜りました金沢大学がん研究所細胞分子病態部門 山本健一教授に心から感謝致します。本研究の遂行に際し終始、御指導、

御助言を頂きました金沢大学がん研究所細胞周期制御部門 善岡克次教授、同研究所細胞分子病態部門 清水弘子助手、小林昌彦助手に感謝致します。さらに、多大なる御協力を頂きました金沢大学大学院医学系研究科経血管診療学講座、金沢大学がん研究所細胞分子病態部門の皆様には厚く御礼申し上げます。

文 献

- Whitmore GF, Stanners CP, Till JE, Gulyas S. Nucleic acid synthesis and the division cycle in X-irradiated L-strain mouse cells. *Biochim Biophys Acta* 47: 66-77, 1961
- Puck TT, Steffen J. Method for localizing metabolic events within the life cycle, and its application to the action of colcemid and sublethal doses of X-irradiation. *Biophys J* 3: 379-397, 1963
- Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-633, 1989
- Paulovich AG, Toczyski DP, Hartwell LH. When checkpoints fail. *Cell* 88: 315-321, 1997
- Nasim A, Smith BP. Genetic control of radiation sensitivity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 79: 573-582, 1975
- Lieberman HB, Richard Riley, Mary Martel. Genetic control of radiation sensitivity in *Schizosaccharomyces pombe* mutant exhibiting temperature-dependent radiation sensitivity due to a mutation in a previously unidentified rad locus. *Mol Gen Genet* 218: 554-558, 1989
- Al-Khodairy F, Carr AM. DNA repair mutants defining G2 checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* 11: 1343-1350, 1992
- Nicola J, Bentley, Douglas A, Holtzman, Gail Flaggs, Kathleen S. Keegan, Anthony DeMaggio, Jon C. Ford, Merl Hoekstra and Antony M. Carr (1996) The *Schizosaccharomyces pombe* rad3 checkpoint gene. *EMBO J*, 15, 6641-6651
- Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Yaya Y, Prives C, Abraham RT. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 13: 152-157, 1999
- Guo Z, Kumagai A, Wang SX, Dunphy WG. Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* 14: 2745-2756, 2000
- Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NGJ, Taylor AMR, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y. A single ataxia telangiectasia gene with a product to PI-3 kinase. *Science* 268: 1749-1753, 1995
- Lehmann AR, Carr AW. The ataxia-telangiectasia gene: a link between checkpoint controls, neurodegeneration and cancer. *Trends Genet* 11: 375-377, 1995
- Taylor AM, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, Bridges BA. Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* 258: 427-429, 1975
- Shiloh Y. Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet*

- 31: 635-662, 1997
- 15) Udell CM, Lee SK, Davey S. HRAD1 and MRAD1 encode mammalian homologues of the fission yeast rad1⁺ cell cycle checkpoint control gene. *Nucleic Acids Res* 26: 3971-3978, 1998
- 16) Lieberman HB, Hopkins KM, Nass M, Demetrick D, Davey S. A human homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* rad9⁺ checkpoint gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13890-13895, 1996
- 17) Parker AE, Van de Weyer I, Laus MC, Verhasselt P, Luyten WH. Identification of a human homologue of the *Schizosaccharomyces pombe* rad17⁺ checkpoint gene. *J Biol Chem* 273: 18340-18346, 1998
- 18) Kostrub CF, Knudsen K, Subramani S, Enoch T, Kostrub CF, Knudsen K, Subramani S, Enoch T. Hus1p, a conserved fission yeast checkpoint protein, interacts with Rad1p and is phosphorylated in response to DNA damage. *EMBO J* 17: 2055-2066, 1998
- 19) St. Onge RP, Udell CM, Casselman R, Davey S. The human G2 checkpoint control protein hRAD9 is a nuclear phosphoprotein that forms complexes with hRAD1 and hHUS1. *Mol Biol Cell* 10: 1985-1995, 1999
- 20) Volkmer E, Karnitz LM. Human homologs of *Schizosaccharomyces pombe* rad1, hus1, and rad9 form a DNA damage-responsive protein complex. *J Biol Chem* 274: 567-570, 1999
- 21) Venclovas C, Thelen MP. Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. *Nucleic Acids Res* 28: 2481-2493, 2000
- 22) Buerstedde JM and Takeda S. Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* 67: 179-188, 1991
- 23) Takeda S, Masteller EL, Thompson CB, Buerstedde JM. RAG-2 expression is not essential for chicken immunoglobulin gene conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4023-4027, 1992
- 24) Takao N, Kato H, Mori R, Morrison C, Sonoda E, Sun X, Shimizu H, Yoshioka K, Takeda S, Yamamoto K. Disruption of ATM in p53-null cells causes multiple functional abnormalities in cellular response to ionizing radiation. *Oncogene* 18: 7002-7009, 1999
- 25) Abdrakhmanov I, Lodygin D, Gerth P, Arakawa H, Law A, Plachy J, Korn B, Buerstedde JM. A large database of chicken bursal ESTs as a resource for the analysis of vertebrate gene function. *Genome Res* 10: 2062-2069, 2000
- 26) Murray JM, Carr AM, Lehmann AR, Watts FZ. Cloning and characterization of the rad9 DNA repair gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acid Res* 19: 3525-3531, 1991
- 27) Lieberman HB, Hopkins KM, Lavery M, Chu HM. Molecular cloning and analysis of *Schizosaccharomyces pombe* rad9, a gene involved in DNA repair and mutagenesis. *Mol Gen Genet* 232: 367-376, 1992
- 28) Weiss RS, Enoch T, Leder P. Inactivation of mouse Hus1 results in genomic instability and impaired response to genotoxic stress. *Genes Dev* 14: 1886-1898, 2000
- 29) Chen MJ, Lin YT, Lieberman HB, Chen G, Lee EYH. ATM-dependent phosphorylation of human Rad9 is required for ionizing radiation-induced checkpoint activation. *J Biol Chem* 276: 16850-16856, 2001
- 30) William A. Cliby, Christopher J. Roberts, Karlene A. Cimprich, Cheri M. Stringer, John R. Lamb, Stuart L. Schreiber and Stephen H. Friend. Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *EMBO J* 17: 159-169, 1998
- 31) Wright JA, Keegan KS, Herendeen DR, Bentley NJ, Carr AM, Hoekstra MF, Concannon P. Protein kinase mutants of human ATR increase sensitivity to UV and ionizing radiation and abrogate cell cycle checkpoint control. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7445-7450, 1998
- 32) Hirai I, Wang HG. A role of the C-terminal region of human Rad9 (hRad9) in nuclear transport of the hRad9 checkpoint complex. *J Biol Chem* 277: 25722-25727, 2002
- 33) Pardo FS, Su M, Borek C, Preffer F, Dombkowski D, Gerweck L, Schmidt EV. Transfection of rat embryo cells with mutant p53 increases the intrinsic radiation resistance. *Radiat Res* 140: 180-185, 1994
- 34) McIlwraith AJ, Vasey PA, Ross GM, Brown R. Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res* 54: 3718-3722, 1994

Rad9 Contribution to Radiosensitivity and the G2 Checkpoint in a DT40 Cell Line Tomoyasu Kumano, Department of Radiology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **111**, 290 — 299 (2002)

Key words Rad9, cell cycle checkpoint, radiation sensitivity, ATM, DT40

Abstract

In fission yeast, the *rad9* (radiation sensitive) gene was cloned from a mutant that is sensitive to ionizing radiation, ultraviolet and hydroxyurea. This gene has also been shown to be required for a DNA damage checkpoint. Orthologues of the *rad9* gene have recently been identified in higher eukaryote cells including human. Here we generated Rad9 knockout (Rad9^{-/-}) cells from the chicken B lymphocyte line DT40 to examine the role of Rad9 in higher eukaryotes. First we isolated a part of the chicken Rad9 gene which was 54% identical with human Rad9 at the amino acid sequence level. Next we isolated genomic clones, determined exons and introns, and constructed targeting vectors designed to disrupt exon1-3 of the chicken Rad9 gene by replacement with a drug-resistant gene. Successful targeted integration was verified by Southern blot analysis and the disruption of the Rad9 gene was confirmed by RT-PCR. To analyze the radiosensitivity of these Rad9^{-/-} cells, we monitored the clonogenic survival after various degrees of X-ray irradiation. Rad9^{-/-} cells were more sensitive to X-rays than wild type cells at all dosages. However, these cells were less sensitive than ATM knockout (ATM^{-/-}) cells that are known to be X-ray sensitive and that showed a defective checkpoint control. In contrast, Rad9^{-/-} cells were markedly more sensitive to ultraviolet and hydroxyurea. In addition, we assessed the G2 checkpoint by measurement of the mitotic index that is the fraction of the accumulating number of cells in mitosis at various times after X-ray irradiation. While the number of mitotic wild type cells did not increase until 2hrs after X-ray irradiation, the number of mitotic Rad9^{-/-} cells showed an increase similar to that of ATM^{-/-} cells. These results suggest that just as in fission yeast, in higher eukaryotes Rad9 also contributes to X-ray, ultraviolet and hydroxyurea sensitivity, and plays an important role in the G2 checkpoint in response to X-rays.