

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04323

研究課題名(和文) ランダム挿入機構の解明とベクター構造の最適化による高効率ヒトゲノム改変技術の開発

研究課題名(英文) Development of high-efficiency gene targeting technologies

研究代表者

足立 典隆 (Noritaka, Adachi)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科(八景キャンパス)・教授

研究者番号：30264675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、任意の細胞に適用可能な高効率ジーンターゲティング法の開発を目指した。このため特に、細胞内に導入したベクターDNAの非特異的な組込みがどのようなメカニズムで起こるのかを解析した。その結果、alternative end-joiningと呼ばれるDNA修復機構に必須の因子を突き止めることに成功し、さらにベクターDNAの非特異的な組込みを完全に抑制することが可能であることを示すことができた。ヒト細胞において非特異的な組込みを抑制すれば高効率で遺伝子ターゲティングを行えることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we have successfully identified a human protein that is essential for alternative end-joining, a minor pathway of DNA double-strand break repair. This discovery has led us to develop a unique system to suppress random integration of transfected DNA, making it possible to perform human cell gene targeting with 100% efficiency.

研究分野：分子生物学

キーワード：ジーンターゲティング ヒトゲノム ゲノム編集 DNA修復

1. 研究開始当初の背景

相同組換えによるジーンターゲティングにより、ゲノム上の目的とする遺伝子を自由自在に改変できるようになれば、生物学全般のみならず、医療や創薬、農畜産等さまざまな分野において大きな発展が期待できる。しかし、ヒト細胞をはじめとする高等動物細胞にターゲティングベクターを導入すると、非相同組換えによるランダム挿入がターゲット挿入よりも圧倒的に高い頻度で起こるため、ジーンターゲティングの効率は極めて低く、理想的な遺伝子治療法という期待には応えられていないのが現状である。最近、人工ヌクレアーゼ (TALEN や CRISPR/Cas9 等) の利用によりターゲティング頻度が著しく上昇することが報告され、ゲノム改変の世界に革命が起こりつつあるが、こうした手法では非特異的な DNA 鎖切断によるオフターゲット変異が生じてしまう恐れがあるため、特殊なケースを除くと医療創薬分野への適用は困難を極めると予想される。よって、効率面だけでなく安全面も考慮した技術開発が今後必要であり、そのためには、細胞に導入したベクターDNA がどのようにして染色体中に組み込まれるか (特異的挿入、非特異的挿入ともに) を理解する必要がある。しかし意外なことにそのメカニズム、特にランダム挿入の機構はほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

ヒト細胞において、人工ヌクレアーゼやウイルスベクターを用いずに効率的に遺伝子改変を行うための手法の開発に取り組んだ。特に、ランダム挿入機構の解明とその効果的な抑制法の開発を通して、あらゆる細胞への適用が可能な安全で効率的なジーンターゲティング法の開発を目指した。

3. 研究の方法

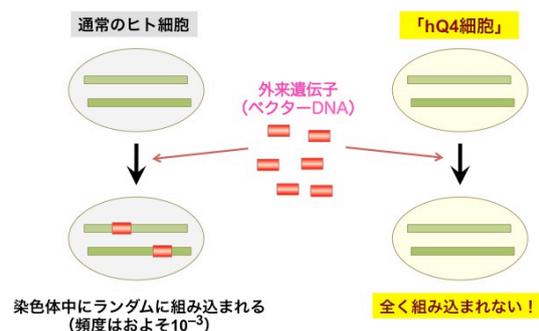
さまざまなヒト遺伝子 (主に *HPRT* 遺伝子) を標的とするターゲティングベクターをエレクトロポレーション法によりヒト細胞株 (Nalm-6 および iPS 細胞) に導入し、組換え頻度 (すなわちランダム挿入頻度と相同組換え挿入頻度) およびターゲティング効率についての定量的なアッセイを行った。ターゲティング効率は、「相同組換え挿入頻度 ÷ (ランダム挿入頻度 + 相同組換え挿入頻度)」により算出した (これらの挿入頻度は細胞の生存率で補正した値を用いた)。siRNA の導入はターゲティングベクターとのコトランスフェクションにより行った。本研究では Nalm-6 細胞の野生株や非相同末端連結 (NHEJ) 欠損株、DNA ポリメラーゼ θ (*Pol* θ) 欠損株、相同組換え変異株を主に使用した。これらの変異株の構築には人工ヌクレアーゼを使用せず、相同組換えによる遺伝子破壊を利用した。ランダム挿入部位のジャンクション解析では逆 PCR 法により DNA 断片を抽出した後シーケンズ解析を行った。

4. 研究成果

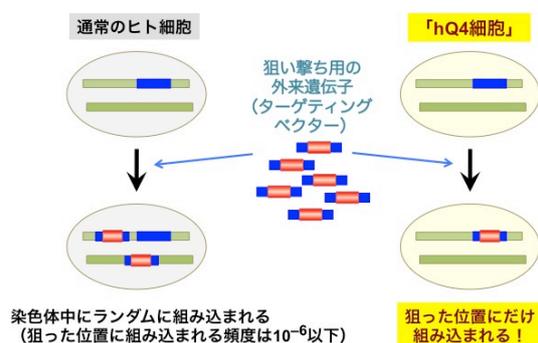
上述の通り、ターゲティング効率は、「相同組換え挿入頻度 ÷ (ランダム挿入頻度 + 相同組換え挿入頻度)」によって求められる。通常この効率は高くても 0.1~1% であり、これがヒト細胞での遺伝子ターゲティングが困難な最大の要因である。したがって、ターゲティング効率を上昇させるための有効な戦略の一つは「ランダム挿入頻度を低下させる」ことである。さらに正確に言うと「ランダム挿入体 (である薬剤耐性コロニー) の出現頻度を低下させる」ことができれば結果的に高いターゲティング効率を達成することができる。

我々の以前の研究から、DNA 二本鎖切断修復の主要機構である非相同末端連結 (NHEJ) 経路を欠損させるとランダム挿入頻度が約半分に低下するが、相同領域の比較的長いターゲティングベクターを用いるとランダム挿入頻度はほとんど低下しないことが明らかになっている。このことから、ランダム挿入に関する研究はターゲティングベクターを使って実験を行わなければ全く価値がないことがわかる。一方、メカニズムの面からは、ランダム挿入反応を抑制するためには alternative end-joining (alt-EJ) の抑制が鍵を握っていることが強く示唆される。alt-EJ は DNA 二本鎖切断修復の第 3 の機構であり、通常 2 つの主要機構 (相同組換えと NHEJ) によって抑制されていると考えられているが詳細は不明である。alt-EJ に特異的に関与する因子はわかっておらず、これを同定することがゴールへの近道であると考えられる。

そこで本研究では、まず、NHEJ に必須な DNA 連結酵素「Lig4 (リガーゼ 4)」を欠損したヒト細胞におけるランダム挿入の反応の特徴を網羅的に解析した。その結果、DNA 合成酵素の一つであるポリメラーゼ θ が関与したことが示唆される DNA 配列上の特徴 (痕跡) が連結部位に頻繁に見られることがわかった。そこで次に、*Pol* θ と Lig4 を共に欠損したヒト遺伝子改変細胞 (ここでは「hQ4 細胞」と呼ぶ) を構築し、この細胞を使って解析を進めたところ、「hQ4 細胞」では導入したベクターが染色体中に全く組み込まれないことがわかった (下図)。*Pol* θ のみを欠損した細胞におけるランダム挿入の頻度は野生株と同レベルであった。



ランダム挿入が全く起こらないということは、「狙い撃ちの組込み」のためのベクターであるターゲティングベクターを用いて実験を行った場合、ベクターの挿入が起こるとすればそれは染色体中の狙った位置でしか起こらないであろうと推測される。このことを実験的に検証したところ、予想通り「hQ4細胞」ではランダムな組込みが全く観察されなかった。一方、狙い撃ちの組込みは低頻度ながら正常に起こっていた（下図）。この結果は、「hQ4細胞」ではランダムな組込みが起こらないが相同組換えは正常に機能しているため、100%という高い効率で遺伝子ターゲティングを行えることを明確に示している。



以上の結果から、Pol θ が alt-EJ の必須因子であることが証明された。alt-EJ は非常に複雑な反応であるため、たった一種類の DNA ポリメラーゼが全ての反応に関わっているのは驚きであるが、このおかげで意外にも早くランダム挿入撲滅という野望を実現することができた。

次に、NHEJ を介したランダム挿入と Pol θ を介したランダム挿入のメカニズムの違いを明らかにするため、実際に染色体中に組み込まれたベクターの近傍の配列を詳しく解析した。その結果、NHEJ を介したランダム挿入反応ではベクター DNA と染色体 DNA がほぼそのまま連結されていたのに対し、Pol θ を介したランダム挿入反応では複雑な再編成を伴うケースや連結部分に「痕跡」(特徴的な DNA 配列) が残されるケースが多いことがわかった。ランダム挿入が「単純な生命現象なのに実際には複雑」であることの理由は Pol θ というユニークな性質に起因していることがわかった。

以上述べたように、本研究により、任意のヒト細胞に適用可能な超高効率遺伝子ターゲティング法の開発に直結する貴重な成果を得ることができた。一見とても単純な生命現象であるにもかかわらず、その分子メカニズムが 30 年以上も不明であったランダム挿入のメカニズムの一端を解明できたことは非常に大きな成果である。ゲノム改変の分野では、近年 TALEN や CRISPR などの人工ヌクレアーゼが大変な脚光を浴びており、効率面では大きな進展が見られたが、こうした技術

を医療創薬に応用していくための大前提は安全性の確保、すなわちオフターゲット変異を引き起こさないことであることを忘れてはならない。

NHEJ と Pol θ を同時に抑制すれば遺伝子ターゲティングを効率 100%で行えるという今回の驚くべき発見は、ゲノム編集における一つのブレイクスルーになると考えられ、人工ヌクレアーゼに依らない安全なゲノム改変技術の開発に弾みがつくと期待される。この点で、Pol θ を特異的に阻害する低分子化合物の探索は極めて重要な研究テーマとなる。また、NHEJ を効率的に抑制する化合物の再探索も必要になるかもしれない。

5. 主な発表論文等 (下線は研究代表者)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Duncan JR, Lieber MR, Adachi N, Wahl RL. DNA repair after exposure to ionizing radiation is not error-free. *J Nucl Med.* 2018 Feb;59(2):348. doi: 10.2967/jnumed.117.197673.
2. Saito S, Maeda R, Adachi N. Dual loss of human *POLQ* and *LIG4* abolishes random integration. *Nat Commun.* 2017 Jul 11;8:16112. doi: 10.1038/ncomms16112.
3. Saito S, Kurosawa A, Adachi N. Mechanistic basis for increased human gene targeting by promoterless vectors-roles of homology arms and Rad54 paralogs. *FEBS J.* 2017 Sep;284(17):2748-2763. doi: 10.1111/febs.14137.
4. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Aug;18(8):495-506. doi: 10.1038/nrm.2017.48.
5. Maeda R, Tamashiro H, Takano K, Takahashi H, Suzuki H, Saito S, Kojima W, Adachi N, Ura K, Endo T, Tamura TA. TBP-like protein (TLP) disrupts the p53-MDM2 interaction and induces long-lasting p53 activation. *J Biol Chem.* 2017 Feb 24;292(8):3201-3212. doi: 10.1074/jbc.M116.763318.

6. Kanemaru Y, Suzuki T, Sassa A, Matsumoto K, Adachi N, Honma M, Numazawa S, Nohmi T. DNA polymerase kappa protects human cells against MMC-induced genotoxicity through error-free translesion DNA synthesis. *Genes Environ.* 2017 Jan 7;39:6. doi: 10.1186/s41021-016-0067-3.
7. Suzuki T, Grúz P, Honma M, Adachi N, Nohmi T. The role of DNA polymerase ζ in translesion synthesis across bulky DNA adducts and cross-links in human cells. *Mutat Res.* 2016 Sep - Oct;791-792:35-41. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2016.08.004.
8. Suzuki T, Grúz P, Honma M, Adachi N, Nohmi T. Sensitivity of human cells expressing low-fidelity or weak-catalytic-activity variants of DNA polymerase ζ to genotoxic stresses. *DNA Repair (Amst).* 2016 Sep;45:34-43. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.06.002.
9. Saito S, Kurosawa A, Adachi N. Mutations in *XRCC4* cause primordial dwarfism without causing immunodeficiency. *J Hum Genet.* 2016 Aug;61(8):679-85. doi: 10.1038/jhg.2016.46.
10. Saito S, Adachi N. Advances in the development of gene-targeting vectors to increase the efficiency of genetic modification. *Biol Pharm Bull.* 2016;39(1):25-32. doi: 10.1248/bpb.b15-00701.
11. Saito S, Ura K, Kodama M, Adachi N. Construction and applications of exon-trapping gene-targeting vectors with a novel strategy for negative selection. *BMC Res Notes.* 2015 Jun 30;8:278. doi: 10.1186/s13104-015-1241-6.
12. Kanemaru Y, Suzuki T, Niimi N, Grúz P, Matsumoto K, Adachi N, Honma M, Nohmi T. Catalytic and non-catalytic roles of DNA polymerase κ in the protection of human cells against genotoxic stresses. *Environ Mol Mutagen.* 2015 Oct;56(8):650-62. doi: 10.1002/em.21961.
13. Moscariello M, Wieloch R, Kurosawa A, Li F, Adachi N, Mladenov E, Iliakis G. Role for Artemis nuclease in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks by alternative end joining. *DNA Repair (Amst).* 2015 Jul;31:29-40. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.04.004.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：非相同末端連結欠損細胞及びその利用

発明者：足立 典隆

権利者：公立大学法人横浜市立大学

種類：特許出願

番号：2017-091736

出願年月日：平成 29 年 5 月 2 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ

<http://dnar.sci.yokohama-cu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 典隆 (ADACHI, Noritaka)

横浜市立大学・

生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号：30264675

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし