

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：22701
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2018～2019
課題番号：18K19407
研究課題名（和文）ベクターDNAの非特異的組込みを抑制する手法の開発

研究課題名（英文）Efficient suppression of random DNA integration

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（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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：DNAポリメラーゼは、最も重篤なDNA損傷であるDNA二本鎖切断の修復においてユニークな役割を果たす。このタンパク質の機能解明や阻害剤取得は、がん生物学における重要なテーマであるだけでなく、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の鍵を握る。本研究では、ヒトDNAポリメラーゼの構造と機能の相関に関する解析を進めるとともに、表現型の変化を指標とした化合物スクリーニングを利用してDNAポリメラーゼを阻害する物質の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒト細胞に導入したベクターDNAが常に狙った位置に組み込まれるシステムの構築を目指し、その目標の一部を達成することができた。具体的には、DNAポリメラーゼの重要な機能ドメインを明らかにしただけでなく、その活性を阻害する化合物の探索にも成功した。ランダム挿入の完全抑制の実現は高等動植物における安全で効率的なゲノム編集技術の確立に直結するため、本研究で得られた知見は今後幅広い分野に貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we have conducted a functional analysis of DNA polymerase theta, an essential protein for alternative end-joining-mediated DNA double-strand break repair. Additionally, using a cell-based screening method, we have screened compounds that inhibit human DNA polymerase theta. Our study will help develop a unique system to suppress DNA polymerase theta-mediated random integration, which will lead to human cell gene targeting with high efficiency.

研究分野：生命薬学、分子生物学

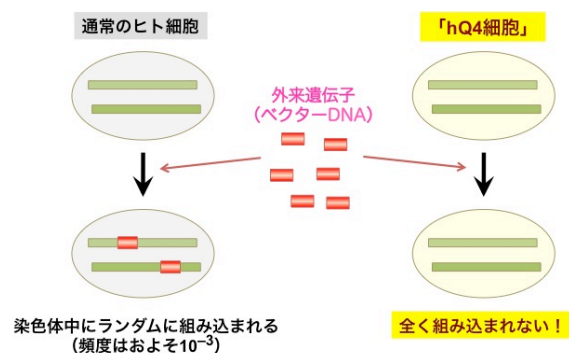
キーワード：非相同末端連結 ゲノム編集 DNAポリメラーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム上の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遺伝子改変用のベクターを導入すると、非同相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ってしまうため、同相組換えによるジーンターゲットングの効率は極めて低く、理想的な遺伝子治療には程遠いのが現状である。最近、人工ヌクレアーゼ (TALEN や CRISPR/Cas9 等) の利用によりターゲット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。よって今後は、効率面だけでなく安全面も考慮した技術開発が必要であり、そのためには、細胞に導入したベクターDNA がどのような仕組みで染色体中に組み込まれるかを理解しておく必要がある。

ヒト細胞におけるランダム挿入の分子機構は長らく不明であったが、最近我々は遂にその一端を明らかにすることができた。すなわち、この反応は DNA ポリメラーゼ θ または DNA リガーゼ IV (非同相末端連結 NHEJ の必須因子) のいずれかに完全に依存しており、双方を同時に失った細胞 (「hQ4 細胞」とよぶ) ではランダム挿入が起こらなくなることを突き止めた (Nat. Commun., 2017)。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。そこで、次に解決すべき重要な課題は、「いかにして「hQ4 細胞」のような状態を一過性に作り出すか?」である。本研究では、DNA ポリメラーゼ θ の機能に着目し、このタンパク質の構造機能相関解析と特異的阻害剤の探索を通じて、ヒト細胞に導入したベクターDNA が狙った位置にだけ組み込まれる状況を人為的に作り出すためのシステムを開発することを目指した。



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えるシステムの開発を目指した。具体的には、DNA ポリメラーゼ θ に依存したランダムな組み込みのメカニズムを明らかにし、これを効果的に抑制するための手法を開発することで、いかにして「hQ4 細胞」のような状態を一過性に作り出すかを追究することを目的とした。

3. 研究の方法

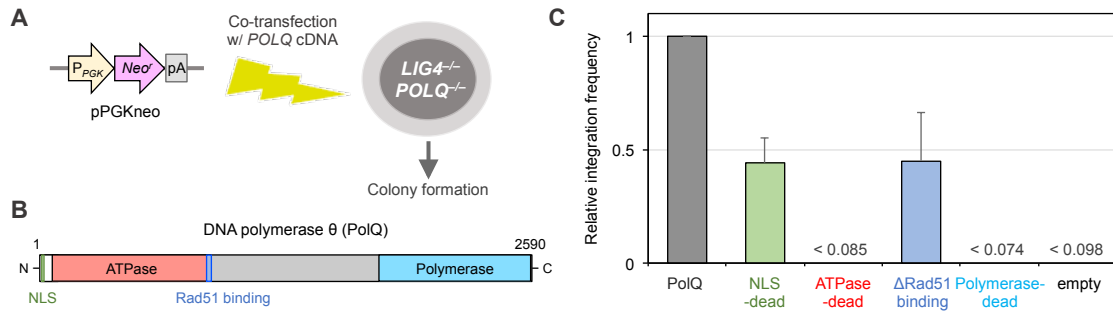
上述の「hQ4 細胞」の表現型を遺伝子ノックアウトに依らず再現するためには、DNA リガーゼ IV (NHEJ) と DNA ポリメラーゼ θ のはたらきを一過性に効果的に抑制する必要がある。NHEJ 阻害剤が多数知られている一方、DNA ポリメラーゼ θ 阻害剤に関しての報告は皆無である。そこで本研究では、ヒト DNA ポリメラーゼ θ の構造機能相関についての解析を進めるとともに、DNA ポリメラーゼ θ 阻害物質の探索を行い、その効果についてランダム挿入頻度を指標に検討を行った。

ランダム挿入頻度の解析は以下の要領で行った。作製した各変異型 *POLQ* 発現ベクター (または野生型ヒト *POLQ* 発現ベクター) とネオマイシン耐性遺伝子をもつベクター (pPGKneo) をエレクトロポレーション法により *LIG4/POLQ* 二重破壊株 (ヒト Nalm-6 細胞由来のノックアウト細胞) に共導入し、G418 含有アガロース培地中で 3 週間培養を行った。生じたコロニーの数を測定することで、ランダム挿入頻度 (ベクターDNA が染色体中に組み込まれる頻度) を算出した。

4. 研究成果

4-1. ヒト DNA ポリメラーゼ θ の機能ドメインの役割と意義

DNA ポリメラーゼ θ と DNA リガーゼ IV を同時に欠損したヒト細胞では、導入した外来遺伝子が染色体中に全く組み込まれないが、この細胞に DNA ポリメラーゼ θ を一過性に発現させるとランダム挿入体が出現するようになる。この表現型を利用することで、DNA ポリメラーゼ θ の変異による活性への影響を正確かつ容易に調べることができる。各変異型 *POLQ* 発現ベクターを pPGKneo とともに *LIG4/POLQ* 二重破壊株に導入した際のランダム挿入頻度を調べたところ、Polymerase ドメインと同様、ATPase ドメインに変異を入れた場合もランダム挿入体が出現しなくなることがわかった。この結果は、DNA ポリメラーゼ θ 依存性のランダム挿入において、Polymerase ドメインに加え ATPase ドメインも必須の機能を果たしていることを示している。一方、Rad51 結合ドメインはランダム挿入反応に必須ではなかったが、導入するベクター量を減らすと挿入頻度の低下がみられたことから (データ非掲載)、このドメインの存在が DNA ポリメラーゼ θ 活性に影響を与えている可能性がある。



4-2. ヒト DNA ポリメラーゼ θ 阻害剤の探索

上述した表現型変化を指標としたアッセイを用いて化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、DNA ポリメラーゼ θ を阻害する候補化合物を複数取得することができた。そのうち一つの化合物は、NHEJ 欠損細胞におけるランダム挿入の頻度を 10 倍以上低下させた ($2\mu M$)。また、DNA ポリメラーゼ θ も NHEJ も正常なヒト細胞におけるランダム挿入の頻度を約 1/3 にまで低下させることがわかった。さらに、この化合物の添加により遺伝子ターゲティング (標的組込み) の効率が 2~3 倍に上昇することも確認された。

以上述べた通り、本研究では、ヒト細胞に導入したベクターDNA が常に狙った位置に組み込まれるシステムの構築を目指し、その目標の一部を達成することができた。ランダム挿入の完全抑制の実現は高等動植物における安全で効率的なゲノム編集技術の確立に直結するため、今後より強力な阻害剤を開発していくことが急務となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morotomi-Yano K, Saito S, Adachi N, Yano KI.	4. 巻 8
2. 論文標題 Dynamic behavior of DNA topoisomerase II in response to DNA double-strand breaks.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 10344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41598-018-28690-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kurosawa A, Kuboshima H, Adachi N.	4. 巻 287
2. 論文標題 Complex genetic interactions between DNA polymerase and the NHEJ ligase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 377-385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/febs.15012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Adachi N.
2. 発表標題 Role of Human DNA Polymerase at Double-Strand Breaks
3. 学会等名 The 5th DNA polymerases meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Adachi N.
2. 発表標題 Role of human DNA polymerase at double-strand breaks
3. 学会等名 International Conference of Genetics Society of Korea（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Adachi N.
2. 発表標題 Crosstalk between DSB repair pathways: role of human DNA polymerase at double-strand breaks
3. 学会等名 Seminars at IBS Center for Genomic Integrity, UNIST (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----