

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590066

研究課題名（和文） ヒト遺伝子ノックアウトによるDNA鎖切断修復機構の解析とその応用研究

研究課題名（英文） Genetic analysis of DNA strand break repair in human cells

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

研究成果の概要（和文）：ヒト Nalm-6 細胞を用いて、DNA 鎖切断修復に関わる遺伝子をジーンターゲット法により破壊し、さまざまなヒト遺伝子ノックアウト細胞を系統的に作製した。これらの細胞株について詳細な表現型解析（特に放射線感受性や抗癌剤感受性、組換え頻度の解析）を行い、遺伝子機能や修復機構に関する多くの興味深い知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have generated a series of human cell mutants that lack one or two genes implicated in DNA strand break repair. These gene-knockout mutants allowed us to perform comprehensive genetic analysis of human DNA repair genes, especially those involved in DNA double-strand break repair and genetic recombination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物系薬学

科研費の分科・細目：6803

キーワード：遺伝子ノックアウト・DNA鎖切断・エンドジョイニング・組換え

1. 研究開始当初の背景

DNA 鎖切断修復は細胞や個体のゲノム安定性維持に不可欠であり、その異常や欠損はゲノム不安定化や細胞死を引き起こすのみならず、がん化や遺伝病、早期老化などの重篤な疾患に直結する。しかし、DNA 鎖切断修復には多様な経路が存在しており、各々の分子機構の詳細はよくわかっていない。また、さまざまなタイプの損傷に対してこれらの経

路がどのように作用するかについても解明されていない。こうした課題をヒト細胞を用いて解決できれば、がん化機構の解明や、より優れた放射線療法や化学療法の開発にも貢献できる。疾患の診断や治療などの医療応用を考えると、種差を考慮する必要のないヒト細胞由来の変異株を作製し解析するのが望ましいが、一般にヒトなどの高等動物細胞では、導入した DNA が染色体上のランダムな

位置に挿入される反応（ランダムインテグレーション）が圧倒的に高い頻度で起こってしまうため、ジーンターゲティング効率は極めて低く、遺伝子ノックアウトによる逆遺伝学解析は不可能であった。しかし、私たちは最近、ヒト体細胞を用いたジーンターゲティング法により遺伝子ノックアウト細胞の作製を効率良く行えるシステムの開発に成功した。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに開発したヒト遺伝子ノックアウトシステムを利用して、DNA 鎖切断修復に関与する遺伝子を破壊した変異株（ノックアウト細胞）を系統的に作製し、その機能を逆遺伝学的に解析することを目的とする。これにより、ヒト細胞におけるさまざまな DNA 鎖切断修復経路の詳細な分子機構や細胞内での役割分担、遺伝学的相互作用を明らかにし、修復機構の全体像を分子レベルで捉えるとともに、得られた知見をジーンターゲティングに応用していくことを目標とする。特に、“Alternative (Back-up) End-Joining” の分子機構とランダムインテグレーションとの関係を調べることに重点を置く。また、放射線や抗がん剤によって誘発されるさまざまなタイプの DNA 損傷（特に DNA 鎖切断）に対して、各修復経路がどのように協調してゲノムを安定に維持しているのかを明らかにする。以上のアプローチを通じて、がん化機構の解析や、より優れたがん治療法の開発など、医療分野への応用展開を図るとともに、任意の動物細胞（特にヒト細胞）に適用可能な高効率ジーンターゲティング技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

DNA 鎖切断修復に関わるヒト遺伝子を Nalm-6 細胞において系統的にノックアウトし、ホモ変異細胞の作製を行った。一本鎖切断修復に関わる POL β , APTX, TDP1、相同組換えに関わる RAD52, RAD54, MUS81, BLM, FANCB、非相同末端連結（エンドジョイニング; NHEJ）に関わる KU70, KU80, LIG4, ARTEMIS, DNA-PKcs, 53BP1 等をターゲットとした。作製したヒト細胞変異株の表現型解析においては、まず、得られたノックアウト細胞の増殖速度とコロニー形成率、細胞周期分布を調べ、野生株との比較を行った。次に、さまざまな DNA 損傷に対する感受性を調べた。損傷誘発剤としては、電離放射線（X 線）、紫外線および以下の薬剤を主に使用した：過酸化水素、メチルメタンスルホン酸（アルキル化剤）、ブレオ

マイシン（放射線類似作用物質）、ネオカルチノスタチン（放射線類似作用物質）、カンプトテシン（トポイソメラーゼ I 阻害剤）、エトポシド（トポイソメラーゼ II 阻害剤）、NU1025（ポリ ADP リボース合成酵素阻害剤）、シスプラチン（DNA 架橋剤）。感受性試験は、コロニーアッセイ法ないし増殖阻害アッセイ法（生細胞内の ATP 濃度を測定）、アポトーシスアッセイ（カスパーゼ 3/7 活性を測定）等により行い、野生株と比較した。ヒト変異細胞株における組換え頻度の解析においては、ランダムインテグレーションとジーンターゲティングの頻度を *HPRT* 遺伝子座を用いて定量的に調べた。また、ランダムインテグレーションにおけるトポイソメラーゼ II と DNA リガーゼの役割についても検討を行った。

4. 研究成果

ヒト Nalm-6 細胞を用いたジーンターゲティングにより、さまざまなヒト DNA 鎖切断修復遺伝子を系統的に破壊し、得られた変異細胞株（ノックアウト細胞）の詳細な表現型解析を行った。特に、*LIG4* との二重変異株の作製を中心的行い、概ね予定通りにヒト遺伝子ノックアウト細胞の作製を行うことができた。作製したヒト遺伝子ノックアウト細胞株の表現型解析により、相同組換えと非相同末端連結がともに DNA 二本鎖切断修復に重要であること、低線量の電離放射線やトポイソメラーゼ II 阻害剤による損傷に対しては非相同末端連結が重要であること、また非相同末端連結がトポイソメラーゼ I 阻害剤やポリ ADP リボース合成酵素阻害剤による損傷に対しては toxic な（生存に不利な）修復を行うこと、等を明らかにした。その他、ARTEMIS が DNA 二本鎖切断修復の経路選択に働いている（相同組換えを負に制御している）可能性や、POL β と非相同末端連結との間に何らかの遺伝学的相互作用があること等も明らかにした。また、ARTEMIS と *LIG4* が直接相互作用していることを初めて示した（*J. Exp. Med.*, 2012）。一方、組換え頻度に関する詳細な解析から、Alternative End-Joining によるランダムインテグレーションが非相同末端連結の不在時に促進されること、また、この反応には導入ベクター中に存在するゲノムとの相同領域が重要であること、さらにこの反応には 2 種類の DNA リガーゼ (*LIG1* と *LIG3*) が関わっている可能性が高いこと、等を明らかにした。これらの知見、および、その他の解析結果から、相同領域中の反復配列を最少限にとどめたベクターの構築、あるいは、ARTEMIS や 53BP1, BLM, *LIG4* の発現抑制が、効率的なジーンターゲティングに有効であるという可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

- ① Cowell IG, Sondka Z, Smith K, Lee KC, Manville CM, Sidorcuk-Lesthurige M, Rance HA, Padget K, Jackson GH, Adachi N, Austin CA. Model for MLL translocations in therapy-related leukemia involving topoisomerase IIbeta mediated DNA strand breaks and gene proximity. Proc Natl Acad Sci USA (in press)
- ② Kohzaki M, Chiourea M, Versini G, Adachi N, Takeda S, Gagos S, Halazonetis TD. The helicase domain and C-terminus of human RecQL4 facilitate replication elongation on DNA templates damaged by ionizing radiation. Carcinogenesis (in press)
- ③ Malu S, De Ioannes P, Kozlov M, Greene M, Francis, D, Hanna M, Pena, J, Escalante CR, Kurosawa A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Adachi N, Vezzone P, Villa A, Aggarwal AK, Cortes P. Artemis C-terminal region facilitates efficient V(D)J recombination through its interaction with both DNA Ligase IV and DNA-PKcs. J Exp Med. (in press)
- ④ Schrijvers R, De Rijck J, Demeulemeester J, Adachi N, Vets S, Ronen K, Christ F, Bushman FD, Debyser Z, Gijssbers R. LEDGF/p75-independent HIV-1 replication demonstrates a role for HRP-2 and remains sensitive to inhibition by LEDGINs. PLoS Pathog. 8: e1002558, 2012.
- ⑤ Kurosawa A, Saito S, Mori M, Adachi N. Nucleofection-based gene targeting in human pre-B cells. Gene 492: 305-308, 2012.
- ⑥ Sato R, Iizumi S, Kim ES, Honda F, Lee SK, Adachi N, Koyama H, Mizutani S, Morio T. Impaired cell adhesion, apoptosis, and signaling in WASP gene-disrupted Nalm-6 pre-B cells and recovery of cell adhesion using a transducible form of WASp. Int J Hematol. 95: 299-310, 2012.
- ⑦ Adachi N. High-efficiency gene targeting in a human pre-B cell line: towards the human gene knockout project. Genome Biol. 11: P1, 2010.
- ⑧ Kurosawa A, Adachi N. Functions and regulation of Artemis: A goddess in the maintenance of genome integrity. J Radiat Res. 51: 503-509, 2010.
- ⑨ Saito K, Adachi N, Koyama H, Matsushita M. OGFOD1, a member of the 2-oxoglutarate and iron dependent dioxygenase family, functions in ischemic signaling. FEBS Lett. 584: 3340-3347, 2010.
- ⑩ Uemura M, Niwa Y, Kakazu N, Adachi N, Kinoshita K. Chromosomal manipulation by site-specific recombinases and fluorescent protein-based vectors. PLoS ONE. 5: e9846, 2010.
- ⑪ Asagoshi K, Tano K, Chastain PD II, Adachi N, Sonoda E, Kikuchi K, Koyama H, Nagata K, Kaufman DG, Takeda S, Wilson SH, Watanabe M, Swenberg JA, Nakamura J. FEN1 functions in long patch base excision repair under conditions of oxidative stress in vertebrate cells. Mol Cancer Res. 8: 204-215, 2010.
- ⑫ Rao VA, Klein SR, Agama KK, Toyoda E, Adachi N, Pommier YG, Shacter EB. The iron chelator Dp44mT causes DNA damage and selective inhibition of topoisomerase-IIalpha in breast cancer cells. Cancer Res. 69: 948-957, 2009.
- ⑬ Killen MW, Stults DM, Adachi N, Hanakahi L, Pierce AJ. Loss of Bloom syndrome protein destabilizes human gene cluster architecture. Hum Mol Genet. 18: 3417-3428, 2009.
- ⑭ Suzuki J, Yamaguchi K, Kajikawa M, Ichiyanagi K, Adachi N, Koyama H, Takeda S, Okada N. Genetic evidence that the non-homologous end-joining repair pathway is involved in LINE retrotransposition. PLoS Genetics. 5: e1000461, 2009.
- ⑮ Toyoda E, Kurosawa A, Kamekawa H, Adachi N. Topoisomerase IIalpha inhibition following DNA transfection greatly enhances random integration in a human pre-B lymphocyte cell line. Biochem Biophys Res Commun. 382: 492-496, 2009.
- ⑯ Toyoda E, Kurosawa A, Fujii M, Adachi N. Heterozygous disruption of the DNA topoisomerase I gene confers cellular resistance to camptothecin in human cells. Biol Pharm Bull. 32: 724-727, 2009.
- ⑰ Yano K, Morotomi-Yano K, Adachi N, Akiyama H. Molecular mechanism of protein assembly on DNA double-strand breaks in the non-homologous end-joining pathway. J Radiat Res. 50: 97-108, 2009.

[その他]

ホームページ等

<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