

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659035

研究課題名(和文) 超高効率ジーンターゲティングを可能にするヒト遺伝子の網羅的探索と応用

研究課題名(英文) Analysis of human genes that enable high-efficiency gene targeting

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) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：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、農畜産等の分野において大きな発展が期待できる。本研究では、ジーンターゲティング(標的遺伝子破壊)技術を医療創薬の分野に応用していくことを目的とした基礎研究として、ヒト細胞のジーンターゲティング効率に大きく影響する因子の探索を行った。その結果、いくつかの遺伝子の発現抑制によりジーンターゲティング効率が上昇することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have recently constructed an efficient system that enables rapid production of genetically modified human cell lines by gene targeting. Human cell mutants thus made will provide invaluable tools for human medicine and future drug development. In this research project, we have identified several human genes, which, when down-regulated, increase the efficiency of gene targeting by homologous recombination.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学-生物系薬学

キーワード：ジーンターゲティング

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、農畜産等の分野において大きな発展が期待できる。本研究代表者は長年にわたり動物細胞のゲノム改変、特にヒト細胞のジーンターゲティング(標的遺伝子破壊)の効率化に関する研究を幅広く行ってきた。その代表的な成果の一つに、ヒト preB 細胞 Nalm-6 を使った独自の遺伝子ノックアウトシステムの確立がある。この系により最短約 2 ヶ月という短期間でヒト遺伝子変異株を作製することが可能になったが、ごく最近、エクソントラップ型のターゲティングベクターを用いることにより、Nalm-6 細胞におけるターゲティング効率を最大 100% にまで上昇させることに成功した。これは従来よりも一桁以上高い効率であるが、こうしたジーンターゲティング技術を医療創薬の分野に応用していくためには、幹細胞や初代細胞等のヒト正常細胞において Nalm-6 と同レベルの高いターゲティング効率を達成する必要がある。

2. 研究の目的

上記の目標を実現するためのアプローチとして、(1) 何故ヒト Nalm-6 細胞におけるターゲティング効率(相同組換えによる標的遺伝子破壊の効率)が例外的に高いのか、(2) どのような因子群がターゲティング効率の効率化に関わっているのか、を明らかにし、(3) そこで得られた成果を他のヒト細胞系に応用していく、という一連の戦略が有効と考えられる。本研究ではこの課題に取り組むべく、ヒト細胞のジーンターゲティング効率に大きく影響する因子の探索を行った。

3. 研究の方法

ヒト *HPRT* 遺伝子座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 Nalm-6 細胞株に導入し、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を定量的にアッセイした。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。なお、siRNA の導入はターゲティングベクターの導入と同時にコトランスフェクションにより行った。無処理時(siRNA 非導入時)の値を指標に、各 siRNA の効果の有無や程度を検討した。

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。したがって、この効率を高めるための戦略として、① ランダム挿入頻度を低下させる、② 相同組換え挿入頻度を上昇させる、③ ①

と②を同時に行う、の3通りが考えられる。本研究により、主に以下の成果が得られた。

戦略①として、Top2 α 、Lig1、Lig3 α の発現抑制(siRNA によるノックダウン)が有効であることがわかった。また、低酸素濃度下での細胞培養や Lig4 遺伝子の完全破壊が有効であることが明らかとなった。低酸素培養と Top2 α ノックダウンの効果はヒト iPS 細胞においても確認された。戦略②に関しては、Parp1、Lig4、Artemis、Exo1 の siRNA による発現抑制が効果をもつことが初めて明らかとなった。これらの因子はいずれも二本鎖 DNA 切断修復における NHEJ(非相同末端連結)機構、またはその経路選択に関与することが近年の研究から明らかにされている。しかし、これら 4 因子の抑制による効果は、Blm siRNA を上回る効果ではなかった(以前から Blm の発現抑制が高い効果をもつことがわかっていた)ため、さらに検討を進めた結果、53bp1 の発現抑制が Blm 抑制と同程度の効果をもつことがわかった。そこで、53bp1 遺伝子をノックアウトしたヒト細胞株を新たに作製し、解析したところ、53bp1 欠損によりターゲティング効率が大幅に上昇することが実証された。Blm siRNA と同レベルの効果を示す siRNA の発見は 53bp1 が初めてであるが、不思議なことに両者の抑制による相乗効果は認められなかった。戦略③に関しては、Lig4 遺伝子破壊株を用いて上記の siRNA の効果を検討したが、強い相乗効果を見いだすことはできなかった。しかしながら、Lig4 と Artemis をともに欠損するとターゲティング効率が僅かながら上昇することが明らかとなった。

本研究においてジーンターゲティングの効率化に効果のあった遺伝子の Nalm-6 細胞における発現レベルに際立った特徴は見いだせていない。このため目的(1)の解明は今後の課題となるが、今回見いだした因子と同様のステップで働く因子の一つが Nalm-6 細胞で全く発現していないことが明らかとなったため、現在この因子の発現ベクターの構築を進めている。また、目的(3)の一部に関しても今後の課題となるが、戦略③が確立されれば即検討可能な状況にあるため、超高効率ターゲティング技術の確立に向けた今後の研究の発展が大いに期待できる。ただし、近年脚光を浴びている人工ヌクレアーゼ(を用いたゲノム改変)の問題点と同様に、DNA 損傷修復機構(ゲノムの安定性維持に必要な不可欠)の一過性の破綻がオフターゲット変異を引き起こさないことが医療創薬応用に向けての大前提であることを忘れてはならない。今後、この点に十分留意しながら研究を進めていく必要があるだろう。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- Sassa A, Suzuki T, Kanemaru Y, Niimi N, Fujimoto H, Katafuchi A, Gruz P,

- Yasui M, Gupta RC, Johnson F, Ohta T, Honma M, Adachi N, Nohmi T. In vivo evidence that phenylalanine 171 acts as a molecular brake for translesion DNA synthesis across benzo[a]pyrene DNA adducts by human DNA polymerase kappa. *DNA Repair (Amst)*. 2014 Mar;15:21-8.
doi: 10.1016/j.dnarep.2013.12.008.
2. Adachi N, Saito S, Kurosawa A. Repair of accidental DNA double-strand breaks in the human genome and its relevance to vector DNA integration. *Gene Technology* 2013; 3:e107.
doi: 10.4172/2329-6682.1000e107
 3. Liu S, Liu X, Kamdar RP, Wanotayan R, Sharma MK, Adachi N, Matsumoto Y. C-terminal region of DNA ligase IV drives XRCC4/DNA ligase IV complex to chromatin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Sep 20;439(2):173-8.
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.068.
 4. Kamekawa H, Kurosawa A, Umehara M, Toyoda E, Adachi N. Endogenous factors causative of spontaneous DNA damage that leads to random integration in human cells. *Gene Technology* 2013; 2:105.
doi: 10.4172/2329-6682.1000105
 5. Adachi N. Generation and use of genetically modified human cell lines: a promising approach for in vitro toxicology studies. *J Clin Toxicol*. 2013;3(5):45.
doi: 10.4172/2161-0495.S1.009
 6. Kurosawa A, Saito S, So S, Hashimoto M, Iwabuchi K, Watabe H, Adachi N. DNA ligase IV and Artemis act cooperatively to suppress homologous recombination in human cells: Implications for DNA double-strand break repair. *PLoS One*. 2013 Aug 14;8(8):e72253.
doi: 10.1371/journal.pone.0072253.
 7. Suzuki T, Ukai A, Honma M, Adachi N, Nohmi T. Restoration of mismatch repair functions in human cell line Nalm-6, which has high efficiency for gene targeting. *PLoS One*. 2013 Apr 15;8(4):e61189.
doi: 10.1371/journal.pone.0061189.
 8. Fujita M, Sasanuma H, Yamamoto KN, Harada H, Kurosawa A, Adachi N, Omura M, Hiraoka M, Takeda S, Hirota K. Interference in DNA replication can cause mitotic chromosomal breakage unassociated with double-strand breaks. *PLoS One*. 2013;8(4):e60043.
doi: 10.1371/journal.pone.0060043.
 9. Cui X, Lu Z, Kurosawa A, Klemm L, Bagshaw A, Tsai A, Gemmell N, Muschen M, Adachi N, Hsieh CL, Lieber MR. Both CpG methylation and AID are required for the fragility of the human Bcl-2 major breakpoint region: Implications for the timing of the breaks in the t(14;18). *Mol Cell Biol*. 2013 Mar;33(5):947-57.
doi: 10.1128/MCB.01436-12.
 10. Cowell IG, Sondka Z, Smith K, Lee KC, Manville CM, Sidorczyk-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 U S A*. 2012 Jun 5;109(23):8989-94.
doi: 10.1073/pnas.1204406109.
 11. 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*. 2012 May 7;209(5):955-63.
doi: 10.1084/jem.20111437.
 12. 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*. 2012 Jun;33(6):1203-10.
doi: 10.1093/carcin/bgs149.
- [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