

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650006

研究課題名(和文) 高効率で簡易な遺伝子ターゲティング技術の開発

研究課題名(英文) Development of a method for increasing gene-targeting efficiency in human cells

研究代表者

武田 俊一 (Takeda, Shunichi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60188191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の最終目標は、ニワトリBリンパ細胞株(DT40)特異的な相同DNA組換え因子を見つけ、標的組換え効率を、現在の手法より1,000倍上昇させることである。CRISPR/Cas9が開発されたが、初代培養細胞やヒトES(iPS)細胞では、CRISPR/Cas9を使ってもゲノム編集(例、特定の点変異のノックイン)は非常に困難である。我々は、目標達成のために、相同組換え因子をDT40から精製する手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The CRISPR/Cas9 system, an artificial restriction enzyme, dramatically increases the efficiency of genetic manipulation, such as knock-in of designed point mutations, in human cell lines. However, genetic manipulation in primary cells is still a formidable challenge, because the efficiency of homologous recombination (HR) between genomic DNA and transfected DNA is still very low despite the usage of the CRISPR/Cas9 system. This study is to further increase the efficiency of genetic manipulation. To this end, I have explored molecular mechanisms underlying the extremely efficient HR of a chicken B cell line, DT40. HR is a very complex biochemical reaction, which is carried out by more than 50 proteins including many unidentified proteins. Having a support of Grant-in-Aid for Challenging Exploratory Research, we have established methods of biochemically purifying proteins involved in HR. In future, I will purify proteins involved in HR from DT40 (wild-type and HR deficient cell lines).

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム編集 CRISPR/Cas9 DNA組換え 標的組換え DT40 ニワトリBリンパ細胞 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集は初代培養細胞では非常に困難

ゲノム編集は、導入した外来 DNA (ノックインする変異が挿入されている) とゲノム DNA との間の相同組換えによって起こる。動物細胞の中でゲノム編集を効率よくできるのは、マウス ES 細胞であり、ヒト ES 細胞や iPS 細胞、植物細胞では標的組換えを事実上期待できない。そしてマウス ES 細胞を使っても、相同組換えによる外来 DNA の組込み (= 標的組換え) / 相同組換え以外の機構による外来 DNA の組込み (= ランダムインテグレーション) の比率は 1/1,000 程度にすぎない。

標的組換えを上昇させる手法として、人工制限酵素 (Zinc Finger Nucleases: ZFN、TALEN) が数年前から開発された。人工制限酵素によって遺伝子改変したい遺伝子座に 2 重鎖切断を導入すると、標的組換え効率を約 3 桁以上上昇させる。ZNF や TALEN は、作製に大変コストがかかったが、2 年前から CRISP/Cas9 と呼ばれる人工制限酵素が開発され、ほとんどコストをかけず人工制限酵素を創ることができるようになった。

人工制限酵素を使ったゲノム編集の問題点は、ゲノム編集が一部の細胞株でしかできず初代培養細胞には応用できないことである。ゼブラフィッシュ受精卵では、正確に点変異をノックインすることが今のところできない (予想外の変異も入る)。以上の問題点は、相同組換え効率をもっと上げてやれば克服できる。

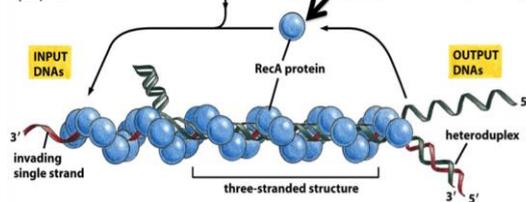
相同組換えの分子機構の解析

相同組換えは、数段階を経て完了する複雑な生化学反応であり、2 重鎖切断等を修復する。少なくとも 50 種類以上の分子が関与し、各分子種が数百ずつ集合して 1 つの組換え反応を完了する (図 1)。相同組換え因子は、酵母の順遺伝学的スクリーニングによって 1990 年代から同定され始め (Shinohara A. et al., *Cell* 1992)、酵母の相同組換え機構はヒトでも保存されていることが示された (Shinohara A. et al., *Nature Gene* 1993)。現在でも毎年複数種類の組換え因子が新規に同定されている。その中には、我々が解析した DNA 合成酵素 (Pol η) やユビキチン化酵素 (UBC13) が含まれる (Kawamoto T. et al., *Mol Cell* 2005; Zhao GY. et al., *Mol Cell* 2007)。相同組換え因子を一網打尽に精製する手法はない。

2. 研究の目的

相同組換えは、すべての細胞が共有する DNA 修復機構である。私は、ニワトリ B リンパ細胞株 (例、DT40) の標的組換え効率がニワトリの B リンパ細胞以外のいかなる細胞株

図 1 組換えタンパクの例



株 (例、ニワトリ T リンパ細胞株) やマウス・ヒト細胞よりも 3 桁以上高いことを見出した (Buerstedde, J-M. & Takeda, S. *Cell*, 1991)。我々は、DT40 細胞が人工制限酵素を使った標的組換えも非常に高い効率で起こることを確認済みである (Kikuchi, K. et al., *JBC*, 2009)

本研究の最終目標は、ニワトリ B リンパ細胞特異的な相同 DNA 組換え因子を見つけ、高等真核細胞で標的組換え効率を、現在の手法より 1,000 倍以上上昇させる実用的手法を開発することである。目的の相同 DNA 組換え因子を同定する為に、相同 DNA 組換え因子を精製する手法を開発する。精製条件を最適化する為に、精製度合いを質量分析で検定する。精製 → 質量分析 → 精製 → 質量分析を繰り返して最適化された精製条件で、SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture) によるプロテオーム解析をする。

質量分析による解析の精度を上げるために、本研究助成が始まる 2012 年以前に、DT40 細胞のトランスクリプトームを調べた。そして DT40 細胞において SILAC をタンパク質量分析に応用する実験手法を確立した。

3. 研究の方法

本研究は、ニワトリ B リンパ細胞特異的な相同 DNA 組換え因子を見つけるという最終目標を達成する為に、相同 DNA 組換え因子を精製する手法を開発することにある。精製は、以下の 3 種類の手法: (1-1)-(1-3) を実施する (図 2 第 1 ステップ)。十分な精製ができるようになれば (2) のステップ (図 2 第 2 ステップ) に進む:

- (1-1) 相同組換え因子、BRCA1 と複合体を作る分子を精製する方法を最適化
- (1-2) 相同組換え因子、Mre11 と複合体を作る分子を精製する方法を最適化
- (1-3) 複製フォークに集合するタンパクの解析方法 (iPOND) を最適化
- (2) この 3 種類の方法で精製される相同 DNA 組換えタンパク群を、相同 DNA 組換えを誘導する DNA 損傷剤 (PARP 阻害剤) に曝露する前後で SILAC を使って比較する。同様に、相同 DNA 組換えタンパク群を、標的組換え効率の高い細胞 (野生型 DT40) と低い細胞 (ニワトリ T リンパ細胞株、ヒト B リンパ細胞株、CtIP 欠損 DT40 細胞 (相同 DNA 組換えを開始

できないミュータント)) の間で比較する。発見したいニワトリ B リンパ細胞特異的な相同 DNA 組換え因子は、DNA 損傷剤 (PARP 阻害剤) に曝露された野生型 DT40 において最も多く精製されるはずである (図2 第3ステップ)。

精製相同 DNA 組換えタンパク群の質量分析データと様々な細胞でのトランスクリプトームやプロテオームを情報学的手法にて解析する (図2 第3ステップ)。もしニワトリ B リンパ細胞特異的な相同 DNA 組換え因子の候補を 50 までに絞れば、それらを siRNA で 1 つずつ DT40 細胞においてノックダウンすることにより、各候補分子が相同 DNA 組換えに機能するか否かを解析する (図2 第4ステップ)。ノックダウンのために、siRNA を 100% の効率で DT40 に導入する手法は確立済みである。もし、候補分子が相同 DNA 組換えに関与する新規因子であれば、それをニワトリ T リンパ細胞株やヒト細胞で発現する。そして標的組換え効率を大きく上昇できるか否かを調べる (図2 第5ステップ)。大きく上昇できれば、特許を申請する。

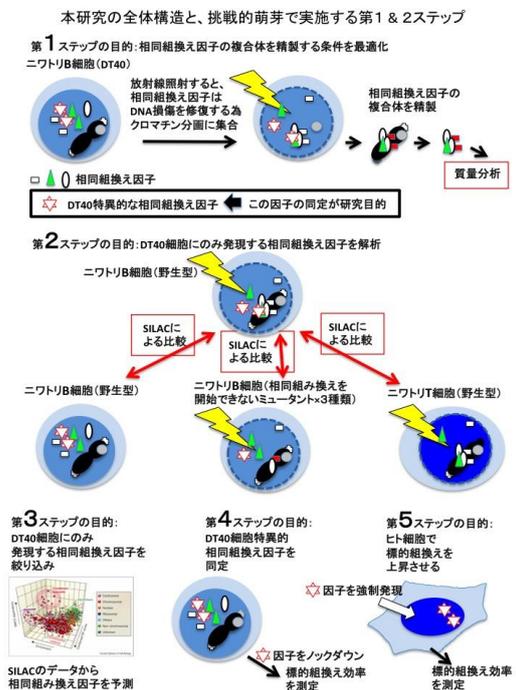


図2 本研究の全体構想

第1ステップでは相同組換え因子の精製法を樹立する。精製の原理は、相同組換え既知因子との結合である。第2ステップでは精製を様々な細胞で行う。そして様々な細胞で精製されたタンパク群を比べる。目的のタンパクは、DNA 損傷剤 (PARP 阻害剤) に曝露された野生型 DT40 において最も多く精製されるはずである。第3ステップで情報学的手法で候補タンパクを絞り込み、第4、5ステップで、絞り込んだタンパクが実際に標的組換えに関与するかを解析する。

4. 研究成果

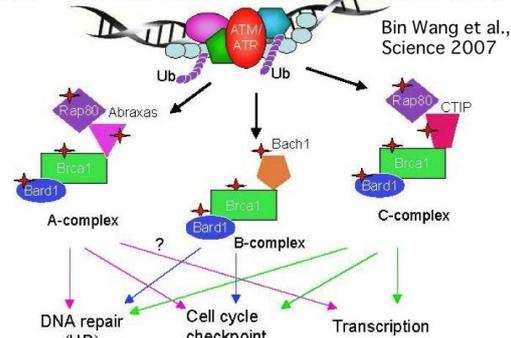
先にも述べたように、相同組換え因子を一網打尽に精製する手法はない。精製には、(i) 既知の相同組換え因子と結合、(ii) 相同組換えを誘導する条件で複製フォーク近くに存在、の2つの原理で可能である。

(1-1) 相同組換え因子、BRCA1 と複合体を作る分子を精製する方法を最適化

BRCA1 は、家族性乳がん・卵巣がんの抑制遺伝子によってコードされる、重要な相同組換え因子である。その重要性故に、過去に膨大な研究の蓄積がある。BRCA1 は、それ自身は組換え活性を持たずシャペロンとして機能する。BRCA1 が結合する分子が網羅的に解析されている (図3)。BRCA1 は BRCA2 と呼ばれる相同組換え因子と結合して機能することが推定されていた。

我々は、結合に必要な領域のみを *BRCA2* 遺伝子から欠失させることにより、BRCA1-BRCA2 結合が無くても相同組換えがかなり効率よく起こることを見出した。そして効率よく起こる理由は、BRCA2 タンパクの別の領域が BRCA1-BRCA2 結合の欠損を相補しているからであることを解明した。実際、その別の領域と BRCA1-BRCA2 結合は相乗的に機能し、両方を欠損させると、BRCA1 と BRCA2 が全く機能しなくなることを明らかにした (主な発表論文: 3)。

図3 BRCA1相同組換え因子は損傷部位で複合体を作る



我々は、図3で実施された実験結果が DT40 細胞で再現できるか否かを解析した。もし再現できれば、我々が採用した精製手法は良いと結論できる。精製のために、3 × FLAG タグを *BRCA1* 遺伝子の N 末端に DT40 細胞においてノックインした。N 末端にノックインしても、BRCA1 の機能を損ねないことも確認した。FLAG 認識抗体などで精製したタンパクを質量分析にかけたところ、既知の BRCA1 結合因子は全部精製されていたことが解った。

3 × FLAG タグを *BRCA1* 遺伝子の N 末端にノックインすることをヒト B 細胞株 (TK6) でも実施した。FLAG 認識抗体などで精製したタ

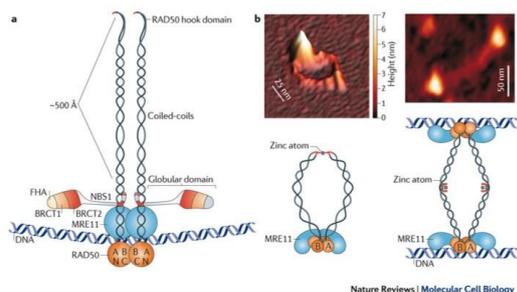
ンパクを DT40 とヒト B 細胞株 (TK6) で比較したときに、前者でのみ精製されるタンパクがあれば、それは我々が探しているニトリ B リンパ細胞特異的な相同 DNA 組換え因子である可能性がある。

BRCA1 が欠損すると、細胞は相同 DNA 組換えが効率よく開始できない。ゆえに野生型 DT40 細胞では精製されてくるが、BRCA1 欠損 DT40 細胞では精製されないタンパクがあれば、それは未知の相同 DNA 組換え因子の可能性もある (図 2 第 3 ステップ中央)。我々は、DT40 のみならずヒト B 細胞株 (TK6) でも BRCA1 の遺伝子破壊を実施した。

(1-2) 相同組換え因子、Mre11 と複合体を作る分子を精製する方法を最適化

Mre11 は、BRCA1 と同様に、相同組換えの開始に重要である。Mre11 は、コヒーシンやコンデンシンのような環状の巨大構造物を作り、相同組換え部位に大量に集積すると考えられている (図 4)。我々は過去に Mre11 条件欠損ミュータント DT40 細胞を作製した (Iwai-Yamaguchi, Y. et al., *EMBO J* 1999)。同様な Mre11 条件欠損ミュータントをヒト TK6 B 細胞株からも作製した (主な発表論文: 1)。3×FLAG タグを MRE11 遺伝子にノックインする実験は未だ完了していない。

図 4 Mre11はRad50, Nbs1と複合体を作る



(1-3) 複製フォークに集合するタンパクの解析方法 (iPOND) を最適化

相同組換えは、抗がん治療 (例、放射線照射や PARP 阻害剤に曝露) したときに DNA 複製中に生じた DNA 損傷を修復する。ゆえに、PARP 阻害剤に曝露したときと曝露しないときに複製フォークに集合するタンパクを比較すれば、新規の相同組換え因子を同定できる可能性がある。我々は、iPOND を実施し、予想される分子が DT40 細胞でも複製領域に集積することを確認した。

我々は、iPOND を PARP 阻害剤に曝露した時と曝露しない時とで比較する実験はできていない。このような比較実験を京大・放射

線生物研究センターからコペンハーゲン大学 (Dr. Anja Groth) に留学した中村博士が実施しており、連絡をとりあっている。コペンハーゲン大は、プロテオーム解析においては世界的拠点の 1 つである。

(2) 精製された相同 DNA 組換えタンパク群を、相同 DNA 組換えを誘導する DNA 損傷剤 (PARP 阻害剤) に曝露する前後で SILAC を使って比較する。

比較するまでには実験を進めていない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Hoa NG, Kobayashi J, Omura M, Hirakawa M, Yang SH, Komatsu K, Paull TT, Takeda S, Sasanuma H. BRCA1 and CtIP Are Both Required to Recruit Dna2 at Double-Strand Breaks in Homologous Recombination. (2015) PLoS One. 10 (4): e0124495. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0124495.
2. Hirota K, Tsuda M, Murai J, Takagi T, Keka IS, Narita T, Fujita M, Sasanuma H, Kobayashi J, Takeda S. (2014) SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4 plays a critical role in preventing chromosome loss. Genes Cells 19 (10): 743-754. 査読有
DOI: 10.1111/gtc.12173.
3. Al Abo M, Dejsuphong D, Hirota K, Yonetani Y, Yamazoe M, Kurumizaka H, Takeda S. (2014) Compensatory functions and interdependency of the DNA-binding domain of BRCA2 with the BRCA1-PALB2-BRCA2 complex. Cancer Res. 74 (3): 797-807. 査読有
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1443.

[学会発表] (計 2 件)

1. Takeda S: Genetic Analysis of Proteins Involved in The Initial Step of Double-strand Break Repair. ICRR2015, 2015 年 5 月 27 日、京都府京都市 (招待講演)
2. 武田俊一、笹沼博之: DNA2 重鎖切断修復、相同組換えと非相同末端結合の制御に関する真実と神話 —酵母の研究成果はヒト細胞にあてはまらない、日本がん学会総会、2014 年 9 月 26 日、神奈川県横浜市 (招待講演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 俊一 (TAKEDA, Shunichi)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60188191

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

笹沼 博之 (SASANUMA, Hiroyuki)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：00531691