

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670031

研究課題名(和文) ヒト細胞において超高効率標的遺伝子破壊を可能にする遺伝子の網羅的探索とその応用

研究課題名(英文) Genes that enable high-efficiency gene disruption 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(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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト培養細胞において相同組換えに依存した標的遺伝子破壊(ジーンターゲティング)の効率を制御する因子の探索を行った結果、効率的なゲノム改変法の確立に直結する重要な成果をいくつか得ることができた。特に、シチジン脱アミノ化酵素の一つが非相同末端連結(NHEJ)欠損下において機能していることを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we have identified several human genes that increase the efficiency of gene targeting by homologous recombination. We have shown for the first time that an enzyme with cytidine deaminase activity can enhance gene targeting in NHEJ-null cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム改変 ジーンターゲティング Nalm-6

1. 研究開始当初の背景

生細胞中の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、生物学全般はもとより、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。本研究代表者は長き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)の効率化を指向した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 pre-B 細胞株 NaIm-6 を使った独自の遺伝子ノックアウトシステムがあげられる。この系の確立により最短約 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。さらに、エクソントラップ型(選択マーカー遺伝子がプロモーターを有さない)のターゲティングベクター(プラスミドを直鎖化した遺伝子改変用ベクター)を用いることにより、NaIm-6 細胞におけるジーンターゲティング効率を大幅に上昇させることに成功した。しかしながら、こうしたジーンターゲティング技術を医療創薬の分野で活用していくためには、幹細胞や初代細胞をはじめとするさまざまなヒト細胞において NaIm-6 と同レベルのジーンターゲティング効率を達成する必要がある。ジーンターゲティング効率は、「ジーンターゲティング頻度 ÷ (ランダム挿入頻度 + ジーンターゲティング頻度)」によって求められるが、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(NaIm-6 細胞は例外中の例外である)。

2. 研究の目的

上記の目標を達成するためのアプローチとして、(1) なぜ NaIm-6 細胞が高いターゲティング効率を示すのか、(2) どのような因子群がターゲティング効率のアップダウン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適用していく、という戦略が有効と考えられた。そこで本研究では、ジーンターゲティング効率を制御するヒト細胞中の因子をハイスループットに探索・解析し、得られた成果を普遍的なゲノム改変技術に応用していくことを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

ヒト *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 NaIm-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ジーンターゲティング頻度)およびジーンターゲティング効率についての定量的なモニタリングを行った。上述した通り、ジーンターゲティング効率は、「ジーンターゲティング頻度 ÷ (ランダム挿入頻度 + ジーンターゲティン

グ頻度)」により算出した(ただし、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。無処理時(siRNA 非導入時)の値を指標に、各 siRNA の効果を検討した。NaIm-6 細胞を用いた遺伝子破壊株の作製はエクソントラップ型ターゲティングベクターを用いて行った。

4. 研究成果

上述の方法により、BLM や 53BP1 の遺伝子ノックダウンがジーンターゲティングの効率化に有効であることが確認されたが、これらとは別の候補遺伝子として新規に APOBEC3G が同定された。APOBEC3G はヒト細胞が発現しているシチジンデアミナーゼの一つである。APOBEC3G は細胞質に局在するタンパク質であるため、核内で起こる組換えに影響している可能性が示唆されたのは意外であった。実際、免疫染色を行ったところ、APOBEC3G は細胞質に存在しており、核局在はほとんど認められなかった。そこで、NaIm-6 細胞野生株および DNA ligase IV 遺伝子(*LIG4*)破壊株を用いて APOBEC3G 遺伝子破壊株の作製を行い、表現型解析、特に組換え頻度についての定量的なアッセイを行った。その結果、*LIG4/APOBEC3G* 二重破壊株では、ゲノム上での相同組換え頻度が著しく上昇していることがわかった。さらに、*LIG4/APOBEC3G* 二重破壊株は、単独変異株よりも高いジーンターゲティング効率を示すことが明らかとなった。ただし組換え頻度に着目してみると、ジーンターゲティング頻度の上昇ほどではないものの、ランダム挿入頻度も二重破壊株において上昇していることがわかった。これらの結果から、APOBEC3G が「end resection(切断末端の削り込み)」の制御に関わっている可能性が示唆される。すなわち、53BP1 による制御を逃れた切断末端が CtIP/MRN 複合体による resection を受け 3' 突出一本鎖 DNA が生じても、APOBEC3G の働きによってその後の組換え反応が阻害される可能性があることがわかった。53BP1 遺伝子のノックアウトやノックダウンでは *LIG4* 存在下でジーンターゲティング効率の上昇が見られたが、不思議なことに *LIG4* 非存在下ではその効果が弱かった。これは APOBEC3G のケースとは真逆である。今後、二本鎖 DNA 切断修復やジーンターゲティングにおける 53BP1 と APOBEC3G の関係性を明らかにしていきたいと考えている。

次に、NaIm-6 細胞で得られた成果を他のヒト細胞系に応用するべく実験を進めた。一般に APOBEC3G はリンパ球においてのみ高発現しているが、ヒト iPS 細胞においても APOBEC3G の発現が認められたため、この細胞を用いてジーンターゲティングにおける APOBEC3G の効果を検証することにした。しかし、通常の方法でトランスフェクションを行

っても組換え体(トランスフェクタント)をほとんど得ることができず、定量的なアッセイを遂行することは不可能であった。そこで、ヒト iPS 細胞における遺伝子導入条件についてさまざまな検討を行ったところ、細胞に導入するベクターDNA 量を変化させるだけでコロニー形成率に大幅な改善が見られることがわかった。そこで、この条件下でジーンターゲティング実験を行ったところ、ヒト iPS 細胞においてパーセントオーダーで標的遺伝子破壊を行うことが可能になった。この系においては、従来の報告とは異なり、長い相同領域をもつターゲティングベクターを用いる必要がない。また、人工ヌクレアーゼ(CRISPR/Cas9)を併用することでジーンターゲティング効率のさらなる上昇が見られることがわかった。現在、APOBEC3G 遺伝子のノックアウトによる効果を調査するべく研究を進めているところである。

以上述べてきたように、本研究では当初に掲げた目標の一部を達成することができた。目的(3)については特に明るい兆しが見られた。目的(1)の解明は今後の課題となるが、これまでに見いだした因子と同一のステップで働く因子が Nalm-6 細胞で全く発現していないことがわかったため、現在この因子の解析を進めている。本研究の成果はヒト細胞において効率的にゲノム改変を行うための簡便な手法の確立に直結すると思われ、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(ゲノム安定性の維持に不可欠)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ため、今後この点に留意しながら研究を進めていく必要がある。

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7件)

1. Saito S, Kurosawa A, Adachi N. Mutations in *XRCC4* cause primordial dwarfism without causing immunodeficiency. *J. Hum. Genet.*, in press.
doi: 10.1038/jhg.2016.46.
2. 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.
3. 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.

4. Kanemaru Y, Suzuki T, Niimi N, Gruz P, Matsumoto K, Adachi N, Honma M, Nohmi T. Catalytic and non-catalytic roles of DNA polymerase kappa in protection of human cells against genotoxic stresses. *Environ. Mol. Mutagen.* 2015 Oct;56(8):650-662.
doi: 10.1002/em.21961.
5. 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.
6. Ishii T, Hayakawa H, Sekiguchi T, Adachi N, Sekiguchi M. Role of Auf1 in elimination of oxidatively damaged messenger RNA in human cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2015 Feb;79:109-116.
doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.018.
7. Ishii A, Kurosawa A, Saito S, Adachi N. Analysis of the role of homology arms in gene-targeting vectors in human cells. *PLoS One.* 2014 Sep 24;9(9):e108236.
doi: 10.1371/journal.pone.0108236.

[図書](計1件)

1. 斎藤 慎太, 黒沢 綾, 足立 典隆. 遺伝子改変技術の効率化を指向したターゲティングベクターの開発. 『進化するゲノム編集技術』(NTS社) 2015年10月.

[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