

ヒト遺伝子の系統的な機能解析に向けた高効率ジーンターゲティング系の開発

●小山秀機 ◆足立典隆

横浜市立大学木原生物学研究所

〈研究の目的と進め方〉

ジーンターゲティングによりヒト細胞から遺伝子破壊株の作製は、一般にターゲット効率が低く困難である。最近、我々はヒトプレB細胞腫由来Nalm-6が高いターゲット効率を持つことを見出した。そこで本研究はヒト遺伝子の系統的な機能解析に応用するため、Nalm-6株を用いた高効率ターゲティングシステムを開発することを目的とする。このシステムにより、遺伝子破壊株を系統的に作製して機能解析を行い、また2重ないし3重破壊株を作製し遺伝子間の相互作用を解析することが可能になる。今年度、常染色体遺伝子の突然変異・有糸分裂組換え系を作製し、また増殖必須遺伝子の条件致死細胞株の作製をテトラサイクリン(Tet)制御系を用いて行う。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 16番染色体に座乗するAPRT座を利用して変異・組換え検出系を作製するため、すでに作製したヘテロ破壊(APRT+/-)株を用いて揺動テストを検討する。一方、変異遺伝子の構造解析のため、5個のexonを含む領域を増幅・解析できるPCR条件を検討する。ついで、APRT座にリンクし16番相同染色体を区別できるミニサテライトマーカーを検索する。この成果を組み合わせ、得た変異クローンに遺伝子構造を解析し、APRT座の変異と組換え頻度および変異パターンを解析する。
- 2) DNAの2重鎖切断の非相同的末端連結修復に働くKU70の破壊株を作製し、その機能を解析するため、すでにヘテロ破壊株(KU70+/-)を得た。ついで第2のターゲティングを行ったが、ホモ破壊株が得られず、KU70は生存に必須と思われた。そこで、ヘテロ株にまずTet制御ベクターを、ついでTet応答プロモーターにヒトKu70 cDNAを連結したベクターを導入、TetによりKu70発現を制御できる株を分離する。最期に、残ったKU70遺伝子をターゲットし、条件致死株を完成し機能を解析する。

〈研究期間の成果〉

- 1) APRT+/-株を用いて、8-アザアデニン耐性APRT-/-への突然変異を検出する揺動テスト系を作製できた。また、APRT遺伝子領域を解析する有効なPCR条件を決定した。さらに、APRT座にリンクし相同染色体を識別できるミニサテライトマーカーを数種類見出した。
- 2) KU70+/-株からKU70条件致死株として分離するため、まずTet制御ベクターを導入したクローンを作製した。ついで、Tet-KU70 cDNA発現ベクターを導入し、最も発現の高いクローンを得た。この細胞は、ドキシサイクリン添加で、KU70の発現を抑制できることが分かった。そこで、ターゲティングを行ったが、第2のKU70遺伝子座をターゲットしたクローンを得ていない。

〈国内外での成果の位置づけ〉

以前、Nalm-6株のジーンターゲティングは、M. Lieberら(1989年)によるDNAリガーゼ4破壊株作製の報告のみであった。我々は、これまで3年間にNalm-6株を用いて

DNA修復・組換えに関与する20遺伝子座についてターゲティングを行い、高い効率で遺伝子破壊ができることを確認した。現在、国内の5研究室との共同研究で、様々な遺伝子の破壊株の作製を進めており、また外国の研究室へこのシステムや破壊株の供与を行っている。本研究班において作製したAPRT座の変異・組換え検出系を、すでに得た破壊株に導入し、発癌の原因となるゲノム不安定性やLoss of Heterozygosityへの関与の解析を進めている。また条件致死破壊株の作製が可能になれば、増殖必須遺伝子への応用の道も開けると期待できる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

条件致死のKU70破壊株の作製がまだできていない。その理由は、KU70は核内に多量に存在するタンパク質であるが、今回作製したTet制御系において、KU70発現ベクターの発現レベルが低く、第2のジーンターゲティングにおいてターゲットされた細胞が生存できず死滅したためと考えている。

〈今後の課題〉

Tet制御システムをさらに検討する。困難な場合には他の遺伝子発現制御系も検討し、増殖必須遺伝子の条件致死株の作製を軌道にのせる必要がある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文
1. So, S., Nomura, Y., Adachi, N., Kobayashi, Y., Hori, T., Kurihara, Y., and Koyama, H., Enhanced gene targeting efficiency by siRNA that silences the expression of the Bloom syndrome gene in human cells, *Genes Cells*. 11, in press (2006).
2. Uegaki, K., Adachi, N., So, S., Iizumi, S., and Koyama, H., Heterozygous disruption of the human KU70 gene does not affect cell growth, DNA double-strand break repair, or genome integrity, *Nucleic Acids Res.* 5, in press (2006).
3. Adachi, N., So, S., Iizumi, S., Nomura, Y., Murai, K., Yamakawa, C., Miyagawa, K., and Koyama, H., The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination, *DNA Cell Biol.* 25, 19-24 (2006).
4. So, S., Adachi, N., Lieber, M., and Koyama, H., Genetic interactions between BLM and DNA ligase IV in human cells, *J. Biol. Chem.* 279, 55433-55422 (2004).