

## ヒト細胞での遺伝子破壊系の開発とゲノム機能解析への応用

● 安井 明

東北大学加齢医学研究所

### 〈研究の目的と進め方〉

公開されるヒトゲノムには大量の未知遺伝子や既知遺伝子のホモログが存在する。これらの遺伝子の細胞での機能を知るための最も簡単で有効な方法は、まずその遺伝子を破壊したヒト細胞株を作成し、その細胞を解析することである。しかし、ヒト培養細胞でのDNA間の相同組換えは厳しく制御されていて、その頻度は大変低く、遺伝子破壊は容易でない。この研究は、細胞に種々の工夫を導入して、相同組換えの高いヒト及びマウス細胞系を確立することが目的である。

### 〈研究開始時の研究計画〉

相同組換えの亢進したヒト細胞を樹立する。そのために、例えば、相同組換えを亢進するRAD51遺伝子の高発現や相同組換えを抑制するBLM遺伝子のノックアウト細胞を樹立する。また、DNAに紫外線などの損傷を入れると遺伝子のトランスフェクション効率の増大が知られているので、ゲノムDNAにニックを入れる遺伝子の発現を増強したヒト細胞を樹立する。

### 〈研究期間の成果〉

1. 分裂酵母やアカパンカビ由来のUVDE (UV Damage Endonuclease) を単離し、それを高発現させたヒト細胞を樹立した。UVDEは紫外線照射のできるシクロブタン型ピリミジン二量体や6-4光産物の直ぐ5'側にニックを入れ除去修復を開始させるヒト細胞には存在しない酵素である。この酵素を発現させた細胞は、ヒト細胞で紫外線損傷を修復するヌクレオチド除去修復の欠損細胞であり、親細胞は紫外線に高感受性であるが、UVDEを発現している細胞は野性型の細胞とほぼ同じ紫外線抵抗性を獲得していた。すなわち、紫外線損傷の5'側に入れられたニックは損傷を取り除く除去修復につながる。

2. UVDEを発現させた細胞は外からの遺伝子の導入効率が増加する。これはUVDEによるニックが引き金となって外来遺伝子の取り込みが増加するためと考えられる。

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

UVDEを発現させたヒト細胞はニックの修復の解析のみならず、種々の細胞に導入して、遺伝子の導入効率の増加に使われている。とりわけ、植物に導入した細胞は、相同組換えが40倍程度の増加をもたらし、トランスジェニック植物の作成に使われている。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

ヒト細胞にRAD51を高発現させたり、BLM遺伝子をノックアウトさせることはこの時点では成功しなかった。また、そのように作製した細胞は正常細胞とは異なるために、その後に利用法に制限が出てくる (RAD51が高発現している細胞あるいはBLMの欠損細胞) ので、必ずしも汎用性のある細胞ではない。その後に、開発されたsiRNAによる遺伝子の発現制御の方法はこの目的には理想的で、BLM遺伝子をしばらく発現抑制しておいて、望

みの遺伝子を相同組換えでノックアウトすることが可能となった (未発表)

### 〈今後の課題〉

現在、世界中で用いられているヒト細胞の遺伝子ノックアウト法はヒトミスマッチ修復欠損細胞のノックアウトで、これでも組換え頻度が大変低い。すなわち、この実験方法はまだ完成していない。ミスマッチ修復も相同組換えを阻害する可能性があるので、この細胞の代わりに任意の正常細胞を用いて、BLMとミスマッチ修復のダブルsiRNAで相同組換えの頻度を向上させるを行っている。

### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

#### (1) 論文

Okano, S., Kanno, S., Nakajima, S., and Yasui, A. Cellular responses and repair of single-strand breaks introduced by UV damage endonuclease in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 275, 32635-32641, 2000., PMID: 10924509

Nara, K., Nagashima, F., and Yasui, A. Highly elevated UV-induced mutation frequency in isolated Chinese hamster cell lines defective in nucleotide excision repair and mismatch repair proteins. *Cancer Res.* 61, 50-52, 2001. PMID: 11196196

Okano S, Lan L, Caldecot K, Mori T, and Yasui A. Spatial and temporal assembly of the proteins involved in repair of single-strand breaks in human cells. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3974-3981, 2003., PMID: 12748298

#### (2) データベースなど 該当なし

#### (3) 特許など

「UVDE発現による相同組換え頻度の向上」

発明者：安井 明他。出願番号：特願2003-067262。