

## ヒト DNA 鎖切断修復の逆遺伝学的解析と医療への応用

●足立 典隆 ◆小山 秀機

横浜市立大学 大学院国際総合科学研究科

### <研究の目的と進め方>

一般にヒト細胞でのジーンターゲットングは極めて困難であり、遺伝子ノックアウトによる系統的な逆遺伝学的解析は不可能であった。しかし最近我々は、ヒト pre-B 細胞株 Nalm-6 を用いて、遺伝子ノックアウトを効率良く行えるシステムの開発に成功した。そこで本研究では、Nalm-6 細胞を使った逆遺伝学的解析システムを利用して、DNA 鎖切断修復機構に関わる遺伝子のノックアウト細胞を系統的に作製し、機能解析を行う。これにより、さまざまなヒト DNA 鎖切断修復経路の分子機構と各経路の役割分担を明らかにし、修復異常と疾患発症との関連に迫る。DNA 鎖切断修復経路はゲノム安定性維持に不可欠であり、その異常や欠損はさまざまな遺伝病やがんと密接に関連している。本研究では、こうした疾患の原因遺伝子をノックアウトすることにより、遺伝子異常と疾患との関連を明らかにする。一方、放射線や抗がん剤によって生じる DNA 鎖切断に対して各修復経路がどのように協調ないし拮抗し修復を行うかを解析することで、感受性を規定する経路や因子を明らかにし、放射線療法や化学療法の効率化や副作用軽減、テーラーメイド医療への有効活用を目指す。

### <2007 年度の研究の当初計画>

ヒト Nalm-6 細胞を用いて、DNA 一本鎖・二本鎖切断修復に関わる遺伝子を系統的にノックアウトし、網羅的に遺伝子機能解析を行う。特に、脊髄小脳変性症の原因遺伝子である APTX と TDP1、および免疫不全症の原因遺伝子である Artemis の解析を重点的に進める。得られたホモ変異細胞の表現型を野生株および患者由来の細胞と比較し、修復遺伝子間、修復経路間の相互作用を明らかにする。表現型解析では、各種 DNA 傷害剤(放射線や種々の抗がん剤)に対する感受性の解析や組換え頻度の解析に重点を置く。また、必要に応じてホモ変異細胞における遺伝子発現の変化をマイクロアレイで解析する予定である。必須遺伝子については条件致死変異株の作製を試みる。テトラサイクリン制御系に改良を加え、ヘテロ変異細胞におけるトランスジーンからの遺伝子発現を内在性タンパク質の発現レベルに近付けた後、再度ターゲットングベクターを導入し、ホモ変異細胞を得る。以上の研究により、Nalm-6 細胞を使った遺伝子ノックアウト系の整備と活用を図るとともに、任意のヒト細胞に応用可能なジーンターゲットング技術の開発を目指す。

### <2007 年度の成果>

ヒト Nalm-6 細胞株を用いて DNA 鎖切断修復に関わる遺伝子について系統的に遺伝子ノックアウトを行い、得られた変異細胞株の表現型解析を行った。特に、二重変異株の作製と解析により、遺伝子間あるいは経路間の相互作用の解析を進めた。主な成果の概要は以下の通り。

- ・二本鎖切断修復に関わる遺伝子の機能解析を行い、特に BLM(ブルーム症候群原因遺伝子) や p53, DNA ligase IV, Mus81 エンドヌクレアーゼ, FANCB(ファンコニー貧血原因遺伝子の一つ) の変異株の詳細な表現型解析から、ヒト細胞におけるこれら遺伝子群の相互作用を明らかにした。
- ・DNA 二本鎖切断の修復には、相同組換えとエンドジョイニングの双方が重要な働きをしているが、傷の種類や量によってそれぞれの働きが大きく異なることを明らかにした。
- ・エンドジョイニング欠損細胞においてジーンターゲットング効率が僅か乍ら上昇していることを明らかにした。
- ・TDP1(脊髄小脳失調症 SCAN1 原因遺伝子) 欠損細胞は、カンプトテシンやブレオマイシンなどの抗がん剤に対して高感受性を示したが、APTX(脊髄小脳失調症 AOA1/EAOH 原因遺伝子) 欠損細胞ではこうした表現型が観察されないことを明らかにした。
- ・DNA ligase IV と Artemis(ともに重症複合免疫不全症の原因遺伝子) はともにエンドジョイニング経路において機能しているが、Artemis はこれとは独立した機能を有しており、修復経路選択のステップに関わっていることを明らかにした。

### <国内外での成果の位置づけ>

我々が開発したヒト遺伝子ノックアウトシステムは、ヒト細胞での系統的遺伝子ターゲットングを可能にする唯一の系である。大腸がん由来 HCT116 細胞株においていくつかノックアウト細胞が作製されているが、ターゲットング効率は Nalm-6 細胞に比べかなり低く、核型も異常で不安定なため、DNA 修復解析や網羅的遺伝子機能解析にはあまり適していない。我々がノックアウトした遺伝子の中には、既にマウスやニワトリなどのモデル生物で変異株が単離されているものもあるが、ヒト細胞でのみ必須な機能をもつタンパク質や、霊長類に特異的な遺伝子スプライシングに関する報告もあり、ポストゲノムにおける創薬、医療への応用を考えた場合、種差を考慮する必要のないヒト細胞を用いて研究を進めていくことのメリットは大きい。

### <今後の課題>

ヒト Nalm-6 細胞株を用いた遺伝子ノックアウト法により、DNA 一本鎖・二本鎖切断修復に関わる遺伝子の機能解析を継続して行う。特に、TDP1 や APTX などの疾患関連遺伝子を中心に、二重変異株の作製と詳細な表現型解析を行い、放射線や抗がん剤による DNA 損傷の修復機構や、修復遺伝子間、修復経路間の相互作用を明らかにする。また、コンディショナルノックアウト細胞の作製やベクター系の改良など、Nalm-6 細胞を使った遺伝子ノックアウト系の整備・充実化を図るとともに、任意のヒト細胞における遺伝子ターゲットングの効率化を目指し、疾患遺伝子研

究の円滑な進行に貢献したい。

#### <成果公表リスト>

##### 1) 論文／プロシーディング（査読付きのものに限る）

Kurosawa, A. et al. The requirement of Artemis in double-strand break repair depends on the type of DNA damage. DNA Cell Biol., in press. (登録受付番号 0710221633)

Adachi, N. et al., Highly proficient gene targeting by homologous recombination in the human pre-B cell line Nalm-6. Methods Mol. Biol., in press. (登録受付番号 0704201635)

Nomura, Y. et al. Human Mus81 and FANCB independently contribute to repair of DNA damage during replication. Genes Cells, 12:1111-1122, 2007. (登録受付番号 0710221626)

So, S. et al., Absence of p53 enhances growth defects and etoposide sensitivity of human cells lacking the Bloom syndrome helicase BLM. DNA Cell Biol., 26:517-525, 2007. (登録受付番号 0702131641)

Iiizumi, S. et al., Simple one-week method to construct gene-targeting vectors: application to production of human knockout cell lines. Biotechniques, 41:311-316, 2006. (登録受付番号 0608011252)

So, S. et al., Enhanced gene targeting efficiency by siRNA that silences the expression of the Bloom syndrome gene in human cells. Genes Cells, 11:363-371, 2006. (登録受付番号 0608011257)

Adachi, N. et al., The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination. DNA Cell Biol., 25:19-24, 2006. (登録受付番号 0608011300)

Uegaki, K. et al., Heterozygous inactivation of human Ku70/Ku86 heterodimer does not affect cell growth, double-strand break repair, or genome integrity. DNA Repair, 5:303-311, 2006. (登録受付番号 0608011304)

##### 2) データベース／ソフトウェア

なし

#### 共同研究

我々が開発したシステムとこれを利用して作製したノックアウト細胞に関連して、国内の15グループおよび海外の13グループと共同研究を行っている。応用ゲノム領域内では、井ノ上逸朗先生（東海大学医学部）および中林一彦先生（国立成育医療センター研究所）との共同研究が進行中。