

ヒト遺伝子ノックアウトシステムの効率化と疾患遺伝子機能解析への応用

●足立 典隆

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、ノックアウト細胞を利用した系統的な逆遺伝学的遺伝子機能解析は不可能に近かった。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うためのシステムを開発した。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さらに充実させるとともに、任意のヒト細胞株に適用可能な遺伝子ノックアウト技術の確立を目指す。また、DNA 鎖切断修復機構の全体像を捉えることを目的として、この修復機構に関わる遺伝子のノックアウト細胞を Nalm-6 細胞において系統的に作製し、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。また、放射線や抗がん剤が誘発する DNA 損傷に対して各経路がどのように協調ないし競合しつつ修復を行っているかを解析することで、感受性を規定する経路や因子を明確にし、放射線療法や化学療法への有効活用を目指す。

<2008 年度の研究の当初計画>

ゲノム切断修復に関わる遺伝子のうち、ジーンターゲットングやランダムインテグレーションへの関与が示唆される遺伝子群をヒト Nalm-6 細胞において系統的にノックアウトし、得られた変異細胞株におけるターゲットング効率を野生株と比較する。具体的には、組換え（ランダムインテグレーションとジーンターゲットング）効率の変化についての定量的検討を行い、ターゲットング効率を上昇させるための方策を見いだす。ターゲットング効率を上昇した遺伝子変異株については、siRNA による遺伝子ノックダウンでも同様の効果が得られるかどうかを検討する。

上記の実験と並行して、遺伝性疾患の原因となっているヒト修復関連遺伝子を系統的にノックアウトし、遺伝子機能を解析する。具体的には、まずヒト Nalm-6 細胞において疾患原因遺伝子をノックアウトし、ホモ変異細胞を作製する。次に、得られたホモ変異細胞の表現型を解析し、野生株および患者由来細胞の表現型と比較する。表現型解析においては、さまざまな DNA 傷害剤（放射線や抗がん剤）に対する感受性の解析に重点を置く。抗がん剤としては、アルキル化剤やプレオマイシン、シスプラチン、トポイソメラーゼ阻害剤等を用い、コロニーアッセイ法ないし増殖阻害アッセイ法等により感受性を調べる。Ku70 などの必須遺伝子については条件致死変異株を作製し解析を行う。

<2008 年度の成果>

我々はこれまでに、ヒト Nalm-6 細胞株において高効率でジーンターゲットングが可能であることを報告してきた。また、ターゲットングベクターを簡便かつ迅速に構築するための手法を確立

してきた。これらのシステムを利用して、これまでに多数のヒト遺伝子のターゲットングに成功し、取得したノックアウト変異株を用いて、さまざまな DNA 修復関連遺伝子の機能解析を進めてきた。たとえば、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遺伝学的相互作用を明らかにした。また、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役割が異なっていることを示した。さらに、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 がこれとは独立した機能を有しており、修復経路選択に関わっている可能性を明らかにした。特に今年度は、Artemis を欠損させるとジーンターゲットング効率が上昇することを明らかにすることができた。現在 siRNA での効果を検証中であり、Blm 欠損との相乗効果がみられるかどうか興味深い。また、DNA ligase IV 破壊株の解析から、ランダムインテグレーションの機構が複数存在しており、ターゲットングベクターと非ターゲットングベクターとでインテグレーションの機構が異なっている可能性が示唆された。

<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最も優れた系である。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。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

同調細胞を利用した表現型解析やコンディショナルノックアウト等、Nalm-6 細胞を使った遺伝子ノックアウト系のさらなる整備や、こうした系の任意の細胞株への適用が課題となる。

<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, Artemis 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ティ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

0811131232

Adachi, N. et al. Gene targeting using the human Nalm-6 pre-B cell line. *Bioscience Trends*, in press.

0811131230

Rao, A. et al. The iron chelator Dp44mT causes DNA damage and selective inhibition of topoisomerase-IIalpha in breast cancer cells. *Cancer Res.*, in press.

0811131228

Iiizumi, S. et al. Impact of non-homologous end-joining deficiency on random and targeted DNA integration: Implications for gene targeting. *Nucleic Acids Res.*, 36:6333-6342, 2008.

0811131223

Jayaram, S. et al. Loss of DNA Ligase IV prevents recognition of DNA by double-strand break repair proteins XRCC4 and XLF. *Nucleic Acids Res.*, 36: 5773-5786, 2008.

0811131219

Toyoda, E. et al. NK314, a topoisomerase II inhibitor that specifically targets the alpha isoform. *J. Biol. Chem.*, 283:23711-23720, 2008.

0806261205

Iwabuchi, K. et al. Cell sorting analysis of cell cycle- dependent X-ray sensitivity in end joining- deficient human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 372:662-667, 2008.

0710221633

Kurosawa, A. et al. The requirement of Artemis in double-strand break repair depends on the type of DNA damage. *DNA Cell Biol.*, 27:55-61, 2008.

0704201635

Adachi, N. et al. Highly proficient gene targeting by homologous recombination in the human pre-B cell line Nalm-6. *Methods Mol. Biol.*, 435:17-29, 2008.

0710221626

Nomura, Y. et al. Human Mus81 and FANCB independently contribute to repair of DNA damage during replication. *Genes Cells*, 12:1111-1122, 2007.

0702131641

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.

0608011252

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.

0608011257

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.

0608011300

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.

0608011304

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.

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、国内外の 30 以上のグループとの共同研究が進行中。

2)データベース/ソフトウェア

なし