

91. 標的組換え機構の解明と高頻度標的組換え技術の創成

廣田 耕志

Key words: 標的組換え, 相同組換え,
ニワトリ B リンパ球 DT40 細胞, 分裂酵母

首都大学東京 大学院理工学研究科
分子物質化学専攻 生物化学教室

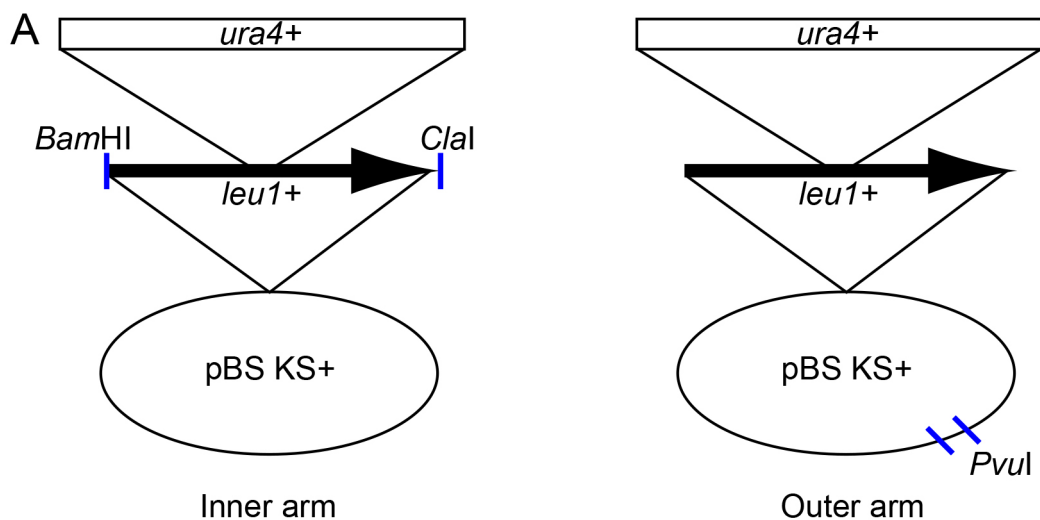
緒言

生きた細胞（例, 受精卵, ヒト iPS 細胞, 植物細胞）の中の染色体 DNA の塩基配列を自由に変える為の手法を標的組換えと呼び, それは導入した外来 DNA と染色体上の相同配列との間の相同組換えによって起こる. 動物細胞に対して酵母細胞は遺伝子標的効率が 1,000 倍以上高いことが知られている. また, 動物細胞の唯一の例外として, ニワトリ B リンパ球 DT40 細胞も酵母と同程度の高確率で遺伝子標的が起こることが知られている¹⁾. 本研究では, 酵母やニワトリ細胞で標的組換えが高い秘密を探り, 標的組換え効率を現在の手法に比べてさらに 1,000 倍上昇させる為の基礎データを集めることである. 本研究では, 酵母に特異の標的メカニズムを同定し, 動物細胞に応用することで, 動物細胞の遺伝的エンジニアリングを可能とする基盤技術を創成する.

方法および結果

1. 酵母の標的組換え機構の解析

分裂酵母を研究材料に用い, *leu1* 遺伝子標的破壊コンストラクトを 2 種類の方法で切断し形質転換した (図 1 A). この DNA コンストラクトは, 複製起点を含んでいないため, ホストの染色体に導入された時のみ増殖できる. 得られたコロニーの栄養要求性から, 遺伝子破壊率を調べることができる. *leu1* 遺伝子が標的破壊されることにより, ロイシン要求性になった細胞の比率を全形質転換体に対し計測した. さらに, 形質転換体の実数を測定することによって, 標的組換え率との積から標的イベント数を計測した. その結果, 遺伝子破壊コンストラクトの末端部分で切断した時 (図 1 A 左), 末端部分から離れた部位で切断した場合 (図 1 A 右) に対し, 標的率が 2 倍程度, 標的破壊効率で 100 倍程度上昇していることがわかった (図 1 B). この結果から, 標的コンストラクトの相同性アームの末端に DNA 2 重鎖切断が存在することで, 標的組換えを 100 倍程度活性化できることが明らかとなった. さらに, 酵母細胞では標的コンストラクトの相同性アームの 2 重鎖切断を認識し, そこから相同組換えを開始する機構が存在することを示唆している.



B

	Inner arm	Outer arm
Number of clones / exp.	389 ± 257 (n=3)	9.3 ± 4.9 (n=7)
Percentage of targeting events	97.0% (97/100)	51.1% (40/88)
Number of targeting events / exp.	377	4.75

図1. 酵母での遺伝子標的コンストラクトの切断部位の違いによる標的率への影響.

A) *leu1* 遺伝子を標的破壊するコンストラクトを相同配列の末端で切断する場合 (左) とプラスミド中で切断する場合 (右). B) 切断法の違いによる遺伝子破壊率 (%) と破壊効率 (events/exp).

2. ニワトリ DT40 細胞の標的組換え機構の解析

次にニワトリ DT40 細胞でも同様の2種類の遺伝子破壊コンストラクトの切断法による、標的率に与える影響の調査を行った。*POLD1* 遺伝子 (複製ポリメラーゼ δ をコード) の標的破壊コンストラクトを作製した (図2 A) ²⁾. 遺伝子の標的組換えはサザンブロットで行った (図2 C). この遺伝子座は、父、母の両アレルが異なるため野生型に対応するバンドが2本現れる. どちらかのバンドが消失し、遺伝子破壊体に相当するバンドが現れた場合、遺伝子が標的破壊されたと結論できる (図2 C). さらに、得られたコロニーの実数を測定することによって、標的組換え率との積から標的イベント数を計測した. その結果、遺伝子破壊コンストラクトの末端部分で切断した時 (図2 A 左)、末端部分から離れた部位で切断した場合 (図2 A 右) に対し、標的率が2倍程度、標的破壊効率で3倍程度上昇していることがわかった (図2 B). この結果から、ニワトリ細胞でも、酵母細胞と同様の標的コンストラクトの相同性アームの2重鎖切断を認識し、そこから相同組換えを開始する新規機構が存在することを示唆された. しかし、酵母での新規機構の標的組換えの寄与 (300倍) に比べ、ニワトリ細胞での寄与 (3倍) は小さかった. このことは標的率が酵母 (100%近く) よりもニワトリ細胞 (20%程度) で低い事実と一致している. このように、本研究で発見した、組換えコンストラクト中のDNA 2重鎖切断から開始される標的組換えの新機構は、酵母とニワトリに見られ、細胞のタイプごとにその寄与の大きさが異なると考えられる. さらに、ヒトなど動物でもこの機構が存在するが、その寄与が極めて小さいゆえに、標的組換えが事実上検出できない可能性がある.

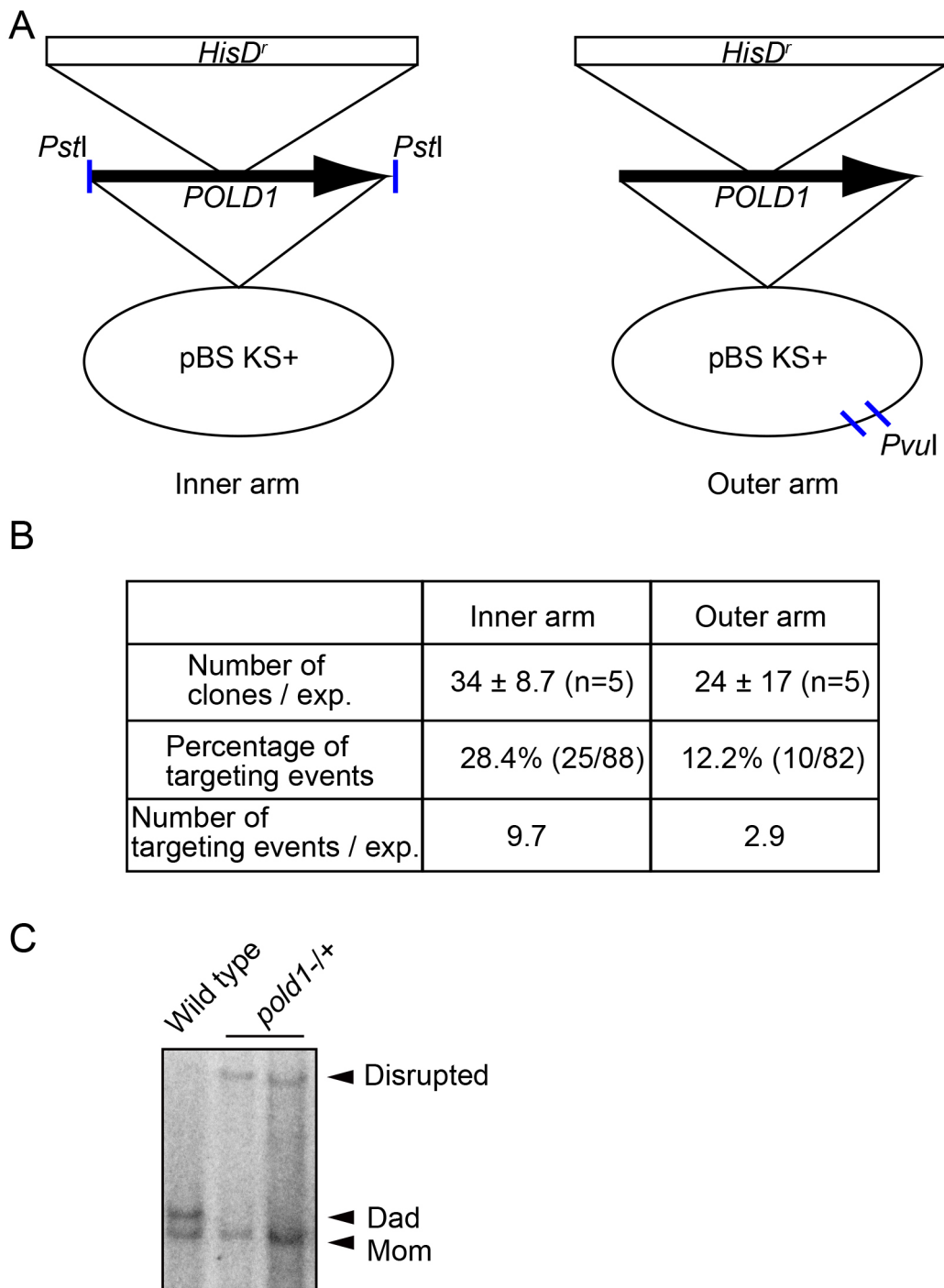


図2. ニワトリ DT40 細胞での遺伝子標的コンストラクトの切断部位の違いによる標的率への影響.

A) *POLD1* 遺伝子を標的破壊するコンストラクトを相同配列の末端で切断する場合 (左) とプラスミド中で切断する場合 (右). B) 切断法の違いによる遺伝子破壊率 (%) と破壊効率 (events/exp). C) サザンブロットによる遺伝子破壊の確認.

3. 酵母の標的コンストラクト末端から開始される標的組換えの新機構に関わる分子のスクリーニング

酵母では、今回発見した標的組換えの新機構の寄与が極めて大きかった。そこで、酵母でこの機構に関わる因子のスクリーニングを企画した。分裂酵母株から、*ura4-D18* を作製した (作製した細胞はウラシルの要求性となる)。この細胞をニトロソグアニジンで処理し、ランダムに変異を導入し、変異体ライブラリーを得た。このライブラリーに対し

て、*leu1* 遺伝子の破壊コンストラクト (図1) を導入した。遺伝子が標的破壊されるとロイシン要求性となり、ロイシンを加えない培地上でコロニーを形成しない。野生型では 97% が遺伝子破壊されるため、ほとんどのコロニーはロイシンを添加しない培地に移すとコロニーを形成できない。コロニーを形成したクローンを回収し保存した。次に全てのクローンについて、末端から始まる標的組換えのみが不良となっているのか調べるために、*leu1* 遺伝子を破壊するための別のマーカー遺伝子 (*Kan-MX*: カナマイシン耐性遺伝子) をもつコンストラクトを形質転換し、末端で切断した時 (図1 A 左) のみ標的が不良となっているが、プラスミド中で切断 (図1 A 右) した時は野生型細胞と同程度であるものを選択した (図3 にスクリーニング戦略を説明)。

現在上記のスクリーニングを継続中である。標的組換え不良の変異体は、3 回の戻し交雑により変異を絞りこみ、最終的には次世代シーケンサーを用いて変異している遺伝子を同定する予定である。

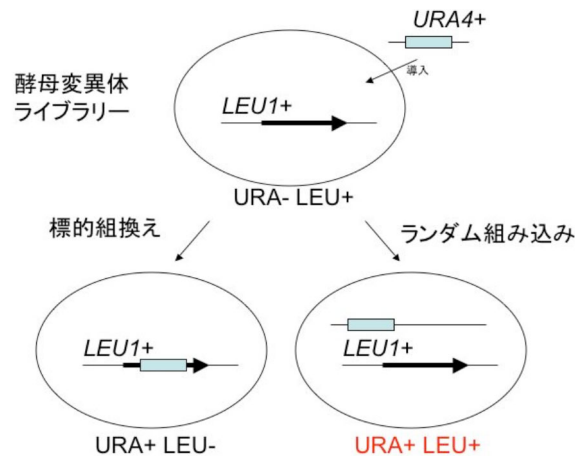


図3. 酵母型標的組換え機構に関わる因子のスクリーニング戦略.

ランダムな変異を持つ酵母細胞ライブラリーから、相同アーム末端で切断した時の標的組換えのみが不良となる変異体を探索し、次世代シーケンサーにより、原因遺伝子を同定する。

考 察

従来、遺伝子の標的組換えはゲノム中の DNA 損傷の修復過程で、導入した遺伝子破壊コンストラクトをドナー配列に使用して修復するとき、ドナー中のマーカー配列ごとコピーして損傷修復を実行した結果、ゲノム配列の加工が行われると考えられてきた。偶発的に損傷が狙った位置で起こる可能性は事実上 0 に近いため、標的組換え実験は困難であった。近年開発された TALEN などの人工ヌクレアーゼを用いることで、標的組換えが上昇することは、この事実と一致している。今回の研究で発見した、DNA コンストラクトの DNA 2 重鎖切断から開始される、新規の組換え経路の全貌が将来解明できれば、遺伝子組換え技術を革新することができる。また、本研究で明らかにした新規組換え経路を用いた、ニワトリ細胞用の遺伝子 flip-in システムを構築し、公開した³⁾。

文 献

- 1) Buerstedde, J. M. & Takeda, S. : Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell*, **67** : 179-188, 1991.
- 2) Hirota, K., Yoshikiyo, K., Guilbaud, G., Tsurimoto, T., Murai, J., Tsuda, M., Phillips, L. G., Narita, T., Nishihara, K., Kobayashi, K., Yamada, K., Nakamura, J., Pommier, Y., Lehmann, A., Sale, J. E. & Takeda, S. : The POLD3 subunit of DNA polymerase δ can promote translesion synthesis independently of DNA polymerase ζ . *Nucleic. Acids Res.*, **43** : 1671-1683, 2015.
- 3) Kobayashi, K., Fujii, T., Asada, R., Ooka, M. & Hirota, K. : Development of a targeted flip-in system in avian DT40 cells. *PLOS ONE*, **10** : e0122006, 2015.