

46 ニックが誘導する体細胞での相同染色体間相同組換え	中田 慎一郎
----------------------------------	--------

【目的】 相同組換えは、細胞分裂過程において発生する DNA2 本鎖切断の修復機構である。ホモロジーが高い DNA 配列を修復鋳型として、その配列を読み取りながら DNA 合成し、DNA 損傷を修復する。体細胞分裂時にも減数分裂時にも機能する。体細胞では姉妹染色分体を鋳型として修復される。生殖細胞の減数分裂では、相同染色体間で組換えが起こる。体細胞でも、相同染色体を相同組換えの修復鋳型として用いることは可能である。しかし、その頻度は非常に低い。また、体細胞で相同染色体間相同組換えが起きた場合、ヘテロ接合性の喪失が起こるため、その頻度が低いことはゲノム恒常性維持の観点では合理的である。実際にゲノムに DNA2 本鎖切断を発生させ、相同染色体間組換え頻度を解析したところ、非同末端結合 DNA 修復によるヌクレオチド欠失が多発し、相同染色体間相同組換えはほとんど起こらなかった。我々は、これまでの研究において、ゲノムに発生させたニックは、ホモロジー配列を持つプラスミドとの間で相同組換えを起こし、修復されることを示していた。これは、細胞内に多コピーのプラスミドが存在することが原因だと考えられた。一方、相同染色体は細胞内に 1 ペアしか存在しないが、頻度が低いながらもニックの修復において相同染色体を鋳型として修復される場合があると予想される。そこで、ニックにより相同染色体組換えが起こることを検証するための研究を行った。

【方法】 チミジンキナーゼ遺伝子 (*TK1* 遺伝子) の Exon 4 に 1 ヌクレオチド挿入変異を持つリンパ芽球 TK6 細胞において、Cas9 を用いて Exon 5 に変異を発生させ、複合ヘテロ接合体変異とした細胞を作製した。この細胞では TK 活性が失われており、DNA 合成においてチミジンを利用したサルベージ経路が機能しない。*TK1* 遺伝子の変異部位が野生型に上書きされることにより、TK 活性は回復し、HAT 培地中で細胞増殖が可能となる。この仕組みを利用し、コロニー形成能により、相同染色体間相同組換え効率を測定した。

【結果】 Cas9 D10A ニッカーゼを用いてニックを発生させることにより、相同染色体間組換えを 5%程度 of 細胞で発生させることに成功した。野生型 Cas9 をもちいた手法では TK 活性回復に目的外のヌクレオチド欠失が 96.3%検出されたのに対し、ニックでは 0.0%であった。また、DNA 修復に関与する既知遺伝子 *NHHA* (仮称) のノックアウトにより、組換え頻度は大きく低下した。これにより、ニックによる相同染色体間組換えの分子機構の一端が明らかとなった。

相同染色体間相同組換えによる *TK1* 遺伝子のニック修復

