157　組換えによる染色体不安定化の人工的誘導と癌化の解明	松嵜　健一郎

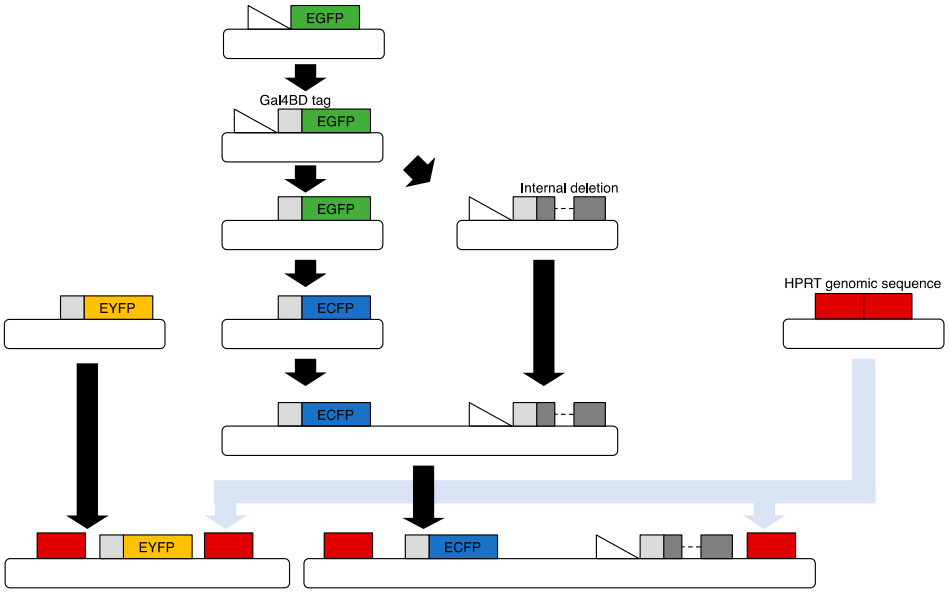
【目的】本研究では、発ガン過程で見られる転座や異所組換えなどの染色体再編をヒト培養細胞内で再現する実験系を確立し、染色体不安定化による発ガンメカニズムの基礎的知見を得ることである。

【方法】蛍光タンパク質 GFP バリアントの EYFP と ECFP を用いて姉妹/相同染色体間の組換え体を検出するヒト細胞株を作製する。EYFP と ECFP は GFP のバリアントであり、その DNA 配列は高い相同性（全体で 97.8%、N 末端と C 末端は 100%）を示す。一方で、励起・発光波長が異なるため FACS（fluorescence activated cell sorting）により検出、分離が可能である。この特性を利用し、姉妹染色体間の組換えが起きた場合 EYFP が、相同染色体間の組換えが起きた場合には ECFP が発現するような細胞株を作製する。また、異所組換え、染色体腕部全体の欠失を検出するために、mCherry を同染色体腕部に導入する。組換え体（交叉型／非交叉型）の違いは制限酵素の多型を用いて区別する。

プラスミド構築の追加点、改善点は以下の通りである。EYFP、ECFP の N 末端、C 末端の相同領域の長さが相同組換えを行うことができる最低限の長さであったため、Gal4-bindig タグを付加することで、左右の相同領域の長さを調整した。DNA 二重鎖切断を誘導した際、単純なライゲーションで修復されてしまうもの、切断されていないもの等を除外するため切断部位に制限酵素配列を付加した。ゲノム DNA への挿入において CRISPR/Cas9 のシステムを用いて挿入を行った。

【結果】今回、GFP バリアントによる組換え体検出システムのプラスミド構築とゲノム DNA への挿入を行った。上述のように実際に想定される副産物等を除外できる改善を行った。ゲノム DNA への挿入では、予想に反して細胞株を得ることができなかったが、CRISPR/Cas9 システムを用いることで目的配列が挿入された細胞株を作製することができた。当初予定していた計画よりも遅れはしたものの、順調に実験系の構築は進んでいる。またゲノム DNA への挿入の実験と同時に CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子破壊、点変異の挿入方法を確立できたので、作製した細胞株を用いた解析にスムーズに移行できると考えられる。

相同／姉妹染色体間の組換えを検出する蛍光蛋白質カセットの構築



157. 組換えによる染色体不安定化の人工的誘導と癌化の解明

松嵜　健一郎

大阪大学 蛋白質研究所 ゲノム染色体機能研究室

Key words：相同組換え，染色体再編

緒　言

本研究では、発ガン過程で見られる転座や異所組換えなどの染色体再編を、ヒト培養細胞内で再現する実験系を確立することで、染色体不安定化による発ガンのメカニズムの解明を目指す。大規模な染色体の再編は、ほとんどのガンで報告されているため、ガンの原因だと考えられている。一般的に染色体再編は、DNA二本鎖が外的・内的要因によって切断される事から始まる。通常、このDNA二本鎖切断は、相同組換えと非相同末端結合という修復経路によって修復される。しかし、修復系路に異常が起きた場合、二本鎖切断は正常に修復されず、染色体再編が起こる。特に、相同組換えは、切断されたDNA配列と似たDNA配列（鋳型）を探し組換えを行うため、鋳型の選び方によっては大規模な染色体再編つながる。現在、このような染色体再編が複数の細胞分裂を経る過程で、他の染色体との結合と再切断を繰り返し、最終的に原癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異／欠失を経てガンになると考えられている。正常な細胞では、染色体再編は低く抑えられているが、生涯でのガンの罹患率（～50％）を踏まえると、何らかの条件で染色体再編が起きてると考えられる。本研究は異なる染色体（姉妹ー相同ー異所）間組換えを検出する新規の実験系を立ち上げることで、相同組換えの鋳型選択メカニズムを明らかにし、ガン細胞で見られるような染色体再編の形成過程を解明することを目指す。また、組換え促進因子だけではなく、染色体構造を維持する遺伝子や染色体上の他反応（複製、転写など）との協調が、染色体再編を引き起こす可能性について検討する。

遺伝子の変異、欠失、重複、転座などを伴う染色体構造の大規模な再編は、ガンや複数の疾患の原因とされている[1]。このような染色体構造の再編の多くは、異なる染色体間の相同組換えによると考えられているため、ヒトにおける相同組換えの分子メカニズムと病理学的相関の解明は、今日の重要な研究課題のひとつである。相同組換えは、相同なDNA配列を利用し、DNA二本鎖の切断の修復を行う。修復に必要な相同なDNA配列（鋳型）は、相同染色体上と複製後の姉妹染色体上、まったく異なる染色体上に存在する3種類に分けることができる。どの染色体を鋳型にするか、最終的な組換え産物がどのようなDNA配列を持つかで、複数の相同組換えの経路があることが予想されている。生体内での組換えが正常に制御されない場合、大規模な染色体再編が起こり、結果として発ガンにつながる。つまりヒトの生体内で姉妹染色体間、相同染色体間、異所組換えの形成メカニズムを解明することは、ガンや染色体再編を伴う疾患の治療方法開発の基盤的な知見になると考えられる。生体内では多様な組換え体が形成される可能性があるが、現在のヒト培養細胞での相同組換えの実験系は、単一組換え体のみを選択的に検出する実験系が一般的に使われており、細胞集団において多種多様な組換え体を検出し頻度を測定するような手法が開発されていない状態である。本研究で作製する実験系は、複数の組換え体を同時に検出可能であり、生細胞集団で起こりうる多様な組換え産物を定量的に解析可能である（研究実施計画を参照）。さらに、組換えを誘導し、特定の組換え産物を持つような細胞を単離可能であるため、発ガン過程での染色体構造異常を人工的に再現・単離・解析することができる。

異なる染色体同士の組換えは、一般的に細胞内で低く抑えられていると考えられている。この仕組みとして、以下の3点が考えらえる。1.過剰な相同組換えの活性化は不適切な染色体再編を引き起こしてしまうため、細胞内で相同組換えは、適切な場所、タイミングで働くように厳密に組換え制御因子により抑制されている。2.細胞内で染色体は、クロマチン構造、コヒージョン、コンデンセーション、染色体内配置により、他の染色体との接触が制限されていると考え

られる。3.染色体上の他の反応（DNA複製、転写など）と相同組換えが同じ場所で同時に起きてしまった際、異なる染色体と組換えが起きないように、複製・転写と時空間的調節が行なわれている可能性が考えられる。以上の3点に注目し、開発した実験系を用いて、組換え体形成への影響を解析することで、相同組換えの高次な制御メカニズムの解明を行う。

方法および結果

1. 蛍光タンパク質 GFP バリアントの EYFP と ECFP を用いて姉妹／相同染色体間の組換え体を検出するヒト細胞株の作製

EYFP と ECFP は GFP のバリアントであり、その DNA 配列は高い相同性（全体で 97.8%、N 末端と C 末端は 100%）を示す。一方で、励起・発光波長が異なるため FACS（fluorescence activated cell sorting）により検出、分離が可能である。この特性を利用し、姉妹染色体間の組換えが起きた場合 EYFP が、相同染色体間の組換えが起きた場合には ECFP が発現するような細胞株を作製する。また、異所組換え、染色体腕部全体の欠失を検出するために、mCherry を同染色体腕部に導入する。組換え体（交叉型／非交叉型）の違いは制限酵素の多型を用いて区別する。

具体的には、プラスミド pEGFP-C2 をもとに、

- プロモーターの除去
- EGFP の EYFP への置き換え
- EGFP の ECFP への置き換え
- EYFP と ECFP で配列の異なる内部領域の除去
- ECFP（promoter deletion）と EGFP（internal deletion）を一つのプラスミド上へ配置
- ヒト HPRT 遺伝子座のゲノム配列のクローニング
- ヒト HPRT のゲノム配列へ ECFP（promoter deletion）+ EGFP（internal deletion）カセットの挿入
- ヒト HPRT のゲノム配列へ EYFP（promoter deletion）カセットの挿入

を行いプラスミドを作製した（図 1）。

当初の予定に加え、以下の改善・追加を行った。

- EGFP の N 末端、C 末端における相同領域が相同組換えを行うことのできる最低限の長さであったことと、左右での長さの違いが大きかったため、Gal4-binding タグを N 末端に挿入することで改善を行った。
- 作製した細胞株において DNA 二重鎖切断を誘導した際に、単純なライゲーションにより修復されたもの、数塩基の欠失を伴ったライゲーション、切断が誘導されなかったもの等を除外するため、制限酵素 FspI の配列を挿入した。
- 最終的な相同組換えの産物を、相同染色体間組換え、姉妹染色体間組換えに区別するため、複数の遺伝子多型を ECFP と EYFP 配列に導入し、制限配列を新たに追加した。

作製した ECFP（promoter deletion）+ EGFP（internal deletion）+ HPRT 相同領域のプラスミドと EYFP（⁻promoter）+ HPRT 相同領域のプラスミドのヒト U2OS 細胞 HPRT 遺伝子座への挿入を行った。ECFP（promoter deletion）+ EGFP（internal deletion）+ HPRT 相同領域のプラスミドにはネオマイシン耐性遺伝子を配置しておりネオマイシンによる選択を行った。また ECFP（promoter deletion）+ EGFP（internal deletion）+ HPRT 相同領域のプラスミドと EYFP（⁻promoter）+ HPRT 相同領域のプラスミドが HPRT 遺伝子座に挿入されると、相同染色体上の HPRT 遺伝子が破壊され 6-チオグアニン耐性になるため、これを利用し選択を行った。

プラスミドの作製は当初の予定通り進んだが、実際に細胞への挿入を試みたところ HPRT 遺伝子座への挿入されたものが得られなかった。ゲノム DNA への挿入を改善するため、CRISPR/Cas9 システムを用い HPRT 遺伝子座を認識するガイド配列を用いたところ複数の細胞クローンを得ることができた（図 2）。現在は同様の手法で全てのプラスミ

ドをゲノム DNA 上に挿入すること試みている。また同時に、得られた ECFP（Δpromoter）の細胞株を用いて姉妹染色体間での組換え頻度の測定を行っている。

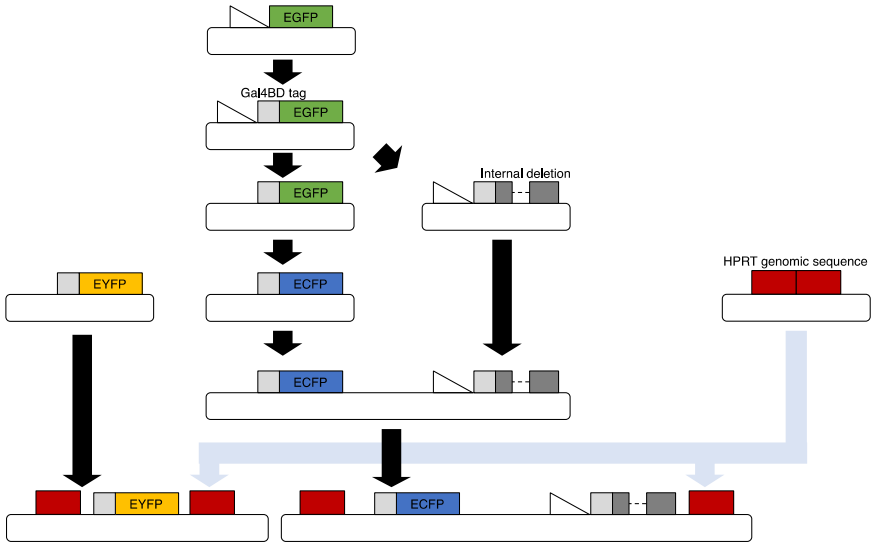


図 1. 相同／姉妹染色体間の組換えを検出する蛍光蛋白質カセットの構築
上流から、Gal4-binding タグの挿入、内部配列の除去、EYFP への置換、ECFP への置換、HPRT 配列のクローニング、EYFP カセットの HPRT 配列への挿入、ECFP カセットの HPRT 配列への挿入を示す。

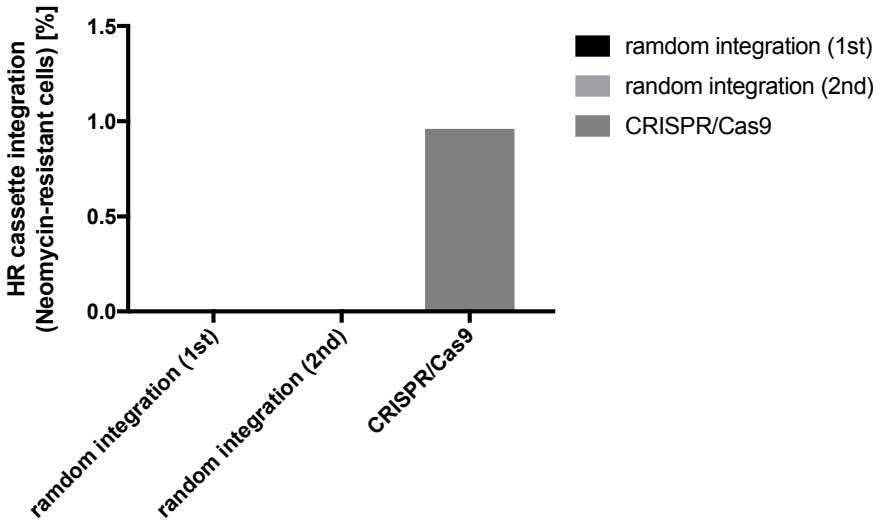


図 2. 蛍光蛋白質カセットのゲノム DNA への挿入
蛍光蛋白質カセットがゲノム DNA に挿入された細胞株（Neomycin 耐性細胞）の獲得効率。2 回のランダム挿入（1st, 2nd）と CRISPR/Cas9 システムを用いた挿入の頻度をそれぞれ示す。

考　察

今回、転座や異所組換えなどの染色体再編を人工的に誘導できる細胞株の作製を行った。姉妹／相同染色体間の組換えを検出する ECFP、EYFP のシステムを構築することができた。また実際の解析で起こりうる組換え副産物を除外し、相同組換えを効率良く行うための改善・追加を行った。細胞株の作製にはプラスミドのトランスフェクションだけで可能であると考えていたが、予想に反し検出カセットの挿入された細胞が得られず、当初よりも時間が掛かってしまった。しかし、CRISPR/Cas9 のシステムを用いることで、この問題点を解決し最終的に検出カセットが挿入された細胞株を得ることができた。今後は、同様の方法で全てのプラスミドをゲノム DNA 上に挿入し最終的な細胞株を作製する予定である。また、今回の実験と同時に CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子破壊、点変異の挿入方法も確立できたため、研究実施計画 2 の相同組換え制御因子、染色体構造因子、複製、転写因子の変異細胞での解析にスムーズに移行できると間得られる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大蛋白質研究所ゲノム染色体機能研究室の篠原彰教授である。

文　献

1）　Kenichiro Matsuzaki, Valerie Borel, Carrie A. Adelman, Detlev Schindler & Simon J. Boulton.FANCJ suppresses microsatellite instability and lymphomagenesis independent of the Fanconi Anemia Pathway. Genes Dev. 2015 Dec 15;29(24):2532-46. doi: 10.1101/gad.272740.115. Epub 2015 Dec 4.