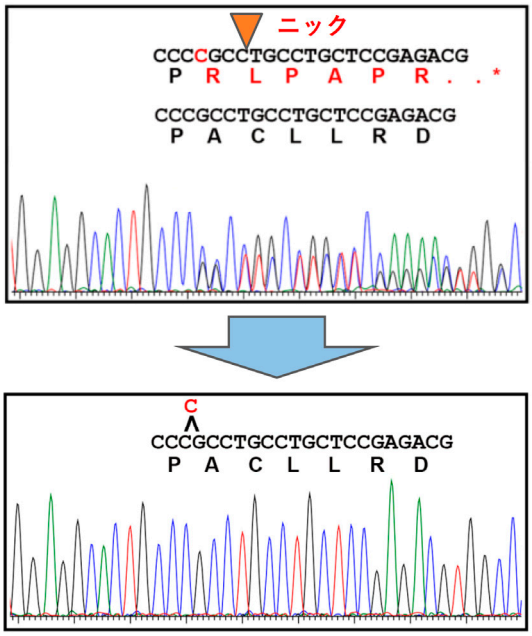
46　ニックが誘導する体細胞での相同染色体間相同組換え	中田　慎一郎

【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、非相同末端結合 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%程度の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 *NIHA*（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



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

大阪大学 大学院医学系研究科 協力講座 細胞応答制御学

Key words：相同組換え，相同染色体，ニック

緒　言

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が、その分子機構と生物学的意義は両者で大きく異なる。体細胞の場合、染色体上に発生した DNA 損傷は、隣接して存在する姉妹染色分体を鋳型として修復される。姉妹染色分体は完全に同一の DNA 配列を持つため、損傷した DNA 配列は完全に復元される。一方、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。DNA2 本鎖切断は Spo11 により計画的に作られ、離れた位置にあった相同染色体が接近し、そして接合する。相同染色体は、父親由来・母親由来で DNA 配列が異なるため、組換え後、父親由来・母親由来ゲノムがつなぎ合わされた形の染色体が完成する。この機構により、配偶子の多様性が生み出される。体細胞でも、相同染色体を修復鋳型として相同組換えを起こすことは可能である。しかし、その頻度は非常に低い。我々は、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、非相同末端結合 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。DNA2 本鎖切断と異なり、DNA1 本鎖切断であるニックでは、ヌクレオチドの欠失や挿入が起こりにくく、多くの場合、正確に修整される。これは、切断されていない DNA 鎖にアニールし、場合によってはこれを鋳型として切断を修復できるためである。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［1］。これと類似した成果は他の研究者によっても報告されている［2, 3］。そこで我々は、ニックの修復において、相同染色体を鋳型として、ニックが修復される可能性があると考え、これを実証するための研究を行い、ニックにより相同染色体間相同組換えが誘導されることを示した。この時、ニックを入れた部位では、ヌクレオチドの挿入欠失は発生しなかった。減数分裂特異的に発現する遺伝子の過剰発現ではこの組換えの頻度は上昇せず、減数分裂時の組換えとは異なる機構が機能していると予想された。一方、DNA 修復に関与する既知遺伝子 *NIHA*（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。

方　法

1.　相同染色体間組換え測定法

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。この細胞ではサルベージ経路による DNA 合成が障害されているため、アミノプテリンによるデノボ DNA 合成を停止すると、ヒポキサンチン、チミジンを供給（HAT メディウム中で培養）しても細胞増殖が起こらない。変異が修正されると HAT 培地中で増殖する。この細胞に Cas9 D10A ニッカーゼ（DNA2 本鎖切断ではなくニックを発生させる Cas9 の変異体）を用いて、ニックを発生させた（プラスミドを用いない手法も併せて研究した）。ニッカーゼおよびガイド RNA は、両者および EGFP を発現するベクターを Neon Electroporation システムを用いて細胞に導入した。2 日以後、セルソーターを用い、ベクターの導入に成功した細胞（EGFP 陽性細胞）をソートし、実験に用いた。1 週間の培養後に 96well

プレートに 1～200 cells/well として HAT 培地中で培養し、コロニー形成数を測定し、普通培地中でのコロニー形成数との比較により相同組換え効率を測定した。

2. 正確性の検証

HAT メディウム中で増殖したコロニーのゲノム DNA を抽出し、Intron 3～Intron 4 の領域を PCR 増殖した後、サンガーシーケンス法で解析した。

3. ニックによる相同染色体間相同組換えの機能解析（1）

SYCP3、HOP2-MND1、DMC1 といった減数分裂時組換えに特異的分子の過剰発現による相同染色体間相同組換えの誘導に関与する分子を過剰発現した上で、1. の実験を実施した。この時、過剰発現させる遺伝子に P2A 配列を介して *mCherry*、*tagBFP* などの蛍光タンパク遺伝子をつないだ発現ベクターを作製し、蛍光タンパクの発現が陽性の細胞のみをセルソーターでソートした上で実験を行った。

4. ニックによる相同染色体間相同組換えの機能解析（2）

TK1 遺伝子を複合ヘテロ接合体変異とした TK6 細胞細胞において、*NIHA*（仮称）遺伝子に対する gRNA と Cas9 を発現させ、*NIHA* ノックアウト細胞（NIHA 欠損疾患を参考として、遺伝子変異誘導部位を決定した）を作製した。これらの細胞において、1.の実験を行い、相同染色体間相同組換え効率を測定した。

結果および考察

1. 相同染色体間組換え測定法

ニッカーゼ発現量、Exon 4 の変異部位に対するニック発生位置、エレクトロポレーション条件、細胞数など様々な条件下において実験を実施した。多様な条件下において、TK 活性の回復により HAT 培地中でコロニー形成する細胞が得られた。好条件である場合、この回復頻度は 2～3%に達していた。その後、改良を重ね、約 5%の細胞で TK 活性回復を誘導することに成功した。

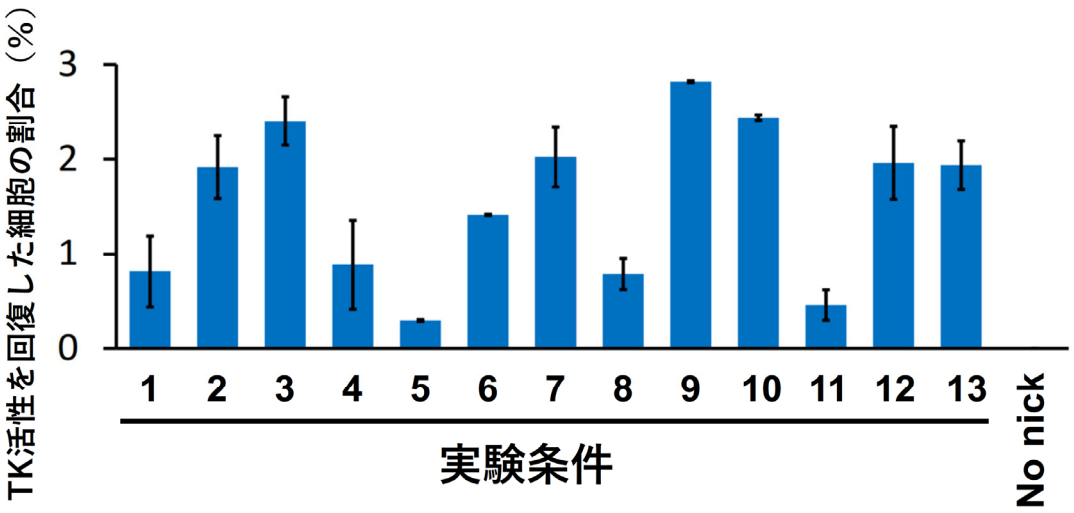


図 1. 代表的な実験条件により TK 活性を回復した細胞の割合

方法 1 に記載した方法で、TK 活性を回復した細胞の割合を測定した。3 回の実験結果の平均および標準偏差を示した。特定の遺伝子を標的としたガイド RNA を発現させなかった（ニッカーゼ等は発現させた）陰性コントロールには No nick と記載した。陰性コントロールにおいて、TK 活性を回復した細胞は 1 つも存在せず、TK 活性陽性細胞が自然発生することがないことが示された。

2. 正確性の検証

TK6 細胞の *TK1* 遺伝子 exon 4 には“C”の 1 ヌクレオチドの挿入が起こっており、フレームシフトにより premature termination が起こっていた（図 2 の最上段）。これと異なるアリルは野生型であり、PCR-サンガーシーケンスでは C 挿入部位から波の重なりが確認できた。ニックの発生により、TK 活性を獲得したクローンにおいて、*TK1* 遺伝子 Exon 4 の PCR-サンガーシーケンスを行ったところ、200 以上のクローン全てが野生型シーケンス（100%）となっていることが確認された（図 2 中段）。一方、野生型 Cas9 により DNA2 本鎖切断を発生させ、TK 活性を回復した細胞では、標的とした左 “C” ではなく、DNA2 本鎖切断直近の 1 ヌクレオチド欠失が発生したもの（図 2 最下段が代表例）が 82 クローン中 79 クローン（96.3%）であった。

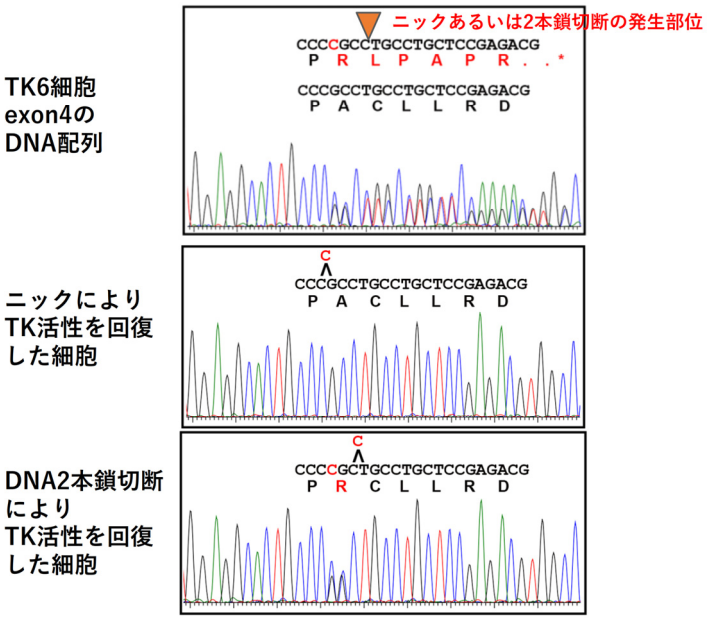


図 2. *TK1* 遺伝子 Exon 4 の DNA シーケンス解析
上段より、実験前の細胞、ニックを発生させた後に HAT 耐性となった細胞、DNA2 本鎖切断を発生させた後に HAT 耐性となった細胞。

項目 1、2 の結果を総合すると、野生型 Cas9 を用いて DNA2 本鎖切断を発生させた場合には、非相同末端結合によるヌクレオチド欠失が発生し、このうち 1 ヌクレオチド欠失により in frame となり、TK 活性を回復した細胞が発生すると考えられる。一方、ニックの場合には相同染色体間相同組換えにより、正確に遺伝子の上書きが行われ、TK 活性が回復したと考えられる。

3. ニックによる相同染色体間相同組換えの機能解析（1）

SYCP3、*HOP2-MND1*、*DMC1* 等の遺伝子を過剰発現させた細胞において、TK 活性の回復の割合の増加は認められなかった。このことから、減数分裂期の相同染色体間組換えを一部模倣しても、ニックによる相同染色体間相同組換え効率を上昇させることはできないことが示された。しかし、減数分裂期の相同染色体間相同組換えに関与する全ての遺伝子を発現さえた場合に、体細胞における相同染色体間相同組換えを強く誘導できる可能性は否定できない。

4. ニックによる相同染色体間相同組換えの機能解析（2）

Cas9 を用いた indel 型 *NIHA* ノックアウト細胞クローンを作製した。*NIHA* ノックアウト細胞（2 クローン）において、2 パターンのニックを発生させ、TK 活性回復効率を測定した。パターン 1 の場合、*NIHA* ノックアウト細胞とオリジナル細胞とは同等の TK 回復効率を示した。一方、パターン 2 の場合、*NIHA* ノックアウト細胞では TK 回復効率がオリジナル細胞と比較して大きく低下した。これまで、*NIHA* 遺伝子はニックの修復において機能することは報告されておらず、ニック修復において、相同染色体間相同組換えにおいて特異的に機能すると考えられる。

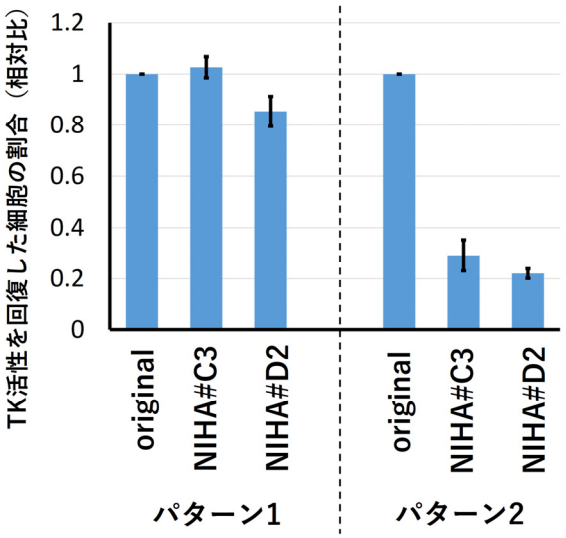


図 3. *NIHA* ノックアウト細胞におけるニック誘導型相同染色体間相同組換えの割合
パターン 1、2 それぞれ original 細胞での相同組換えの割合を 1 としたときの相対的な相同染色体間相同組換えの割合を示した。NIHA#C3、NIHA#D2 はそれぞれ *NIHA* 遺伝子のノックアウト細胞クローン

減数分裂時には相同染色体が接合するため、相同染色体間で組換えが起こることは理解しやすい。一方、体細胞では相同染色体が空間的に離れた位置に存在する上、本来相同組換えを誘導しないニックによって体細胞での相同染色体間相同組換えが高頻度に起こるという事実は、驚くべき発見である。この修復機構は DNA1 本鎖損傷修復機構のバックアップ機構として機能すると予想される。まれにしか起こらない DNA2 本鎖切断と異なり、ニックは生細胞において多発することが知られている。細胞における相同染色体間相同組換えは、ヘテロ接合性の喪失（対立遺伝子の欠失ではなくホモ型）の原因となる可能性も考えられる。ヘテロ接合性喪失は、ゲノム不安定性により癌化を誘導する可能性があり、注目に値する。また、ニックではヌクレオチド挿入欠失が起こりにくいため、この修復機構を今後ヘテロ接合体変異の遺伝子修正へと応用していくことが期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院医学系研究科細胞応答制御学研究室の富田亜希子である。

文　献

1） Nakajima K, Zhou Y, Tomita A, Hirade Y, Gurumurthy CB, Nakada S. Precise and efficient nucleotide substitution near genomic nick via noncanonical homology-directed repair. Genome Res. 2018 Feb;28(2):223-230. Epub 2017 Dec 22. PMID:29273627 doi: 10.1101/gr.226027.117.

2） Chen X, Janssen JM, Liu J, Maggio I, 't Jong AEJ, Mikkers HMM, Gonçalves MAFV. In trans paired nicking triggers seamless genome editing without double-stranded DNA cutting. Nat Commun. 2017 Sep 22;8(1):657. PMID:28939824 doi: 10.1038/s41467-017-00687-1.

3） Hyodo T, Rahman ML, Karnan S, Ito T, Toyoda A, Ota A, Wahiduzzaman M, Tsuzuki S, Okada Y, Hosokawa Y, Konishi H. Tandem Paired Nicking Promotes Precise Genome Editing with Scarce Interference by p53. Cell Rep. 2020 Jan 28;30(4):1195-1207.e7. PMID:31995758 doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.064.