

DNA 二本鎖切断修復と遺伝子ターゲティング

DNA double strand break repair and Gene Targeting

大学院理工学研究科生命科学部門 井上 弘一

【緒言】

DNA, DNA 損傷, DNA 修復

生きとし生けるものはすべからず DNA を持っている。いわゆる「遺伝子」とは DNA そのものであり、遺伝子の DNA 配列はタンパク質を構成するアミノ酸配列の暗号となっている。さらに DNA には「遺伝子」のように生き物の活動を司る情報のほかにも、それを制御するための配列情報も含まれている。よって DNA は生命維持の設計図を満載した図書館のようなものであり、それ故これらの情報は損なわれることなく、適正に保持されなければならない。

ところが、この正確であるべき DNA の情報は、常にそれが変化させられるような危機に晒されている。例えば、太陽光線に含まれる紫外線は、DNA の成分であるピリミジン塩基に架橋を形成し、これが直されずに放置されると、遺伝情報が書き換えられてしまう危険がある。また、ほとんどの生物細胞がそうであるように、細胞は分裂して増殖する際に DNA のコピーを正確に作製して、分裂時にそれを分配する。この DNA のコピーをとるために働く DNA ポリメラーゼという酵素の機能は完璧ではなく、ごく僅かな割合で間違った情報を含んだコピーを作製してしまう。

DNA の情報を正確に維持するためには、様々な機構が細胞の中で働いている。DNA が受けた障害を取り除くために働いている機構を DNA 修復機構と呼び、多くの機構によって DNA の障害は修復され、細胞は遺伝情報を正確に保持しようと努めている。DNA の障害には前述のように DNA の塩基が架橋したもの他に、DNA に対して官能基が結合したもの、DNA の二本鎖の溝に嵌って傷のように振る舞うものもある。さらに、DNA が物理的に切断されるケースもある。それが DNA の一本鎖切断であり、二本鎖切断(図1)である。

DNA の二本鎖が切断されるような障害はガンマ線や電離放射線の照射によって直接的に、あるいはある種のアルキル化剤によって間接的に生じることもある。さらに、自然な状態でも、ヒトの細胞1個について1日に10個もの DNA 二本鎖切断が生じていると考えられている。この DNA 二本鎖切断の発生は、DNA 複製の際に機能するトポイソメラーゼの関与も考えられている。

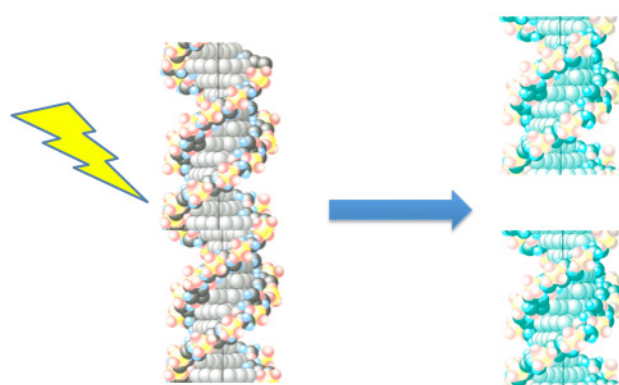


図 1. DNA 二本鎖切断

DNA 二本鎖切断修復

生じた DNA 二本鎖切断が修復できないことは細胞にとっては重大な損害を招く。それは細胞の異常や死につながるからである。ヒトの場合 DNA 二本鎖切断の修復に関わる機能が遺伝的に欠損している場合には、家族性乳がんや卵巣がんのようながん化、もしくは早期老化現象(ロスマントームソン症候群、ナイミーヘン症候群など)が見られる。このような事実からも DNA 二本鎖切断修復機構の重要性が示唆される。

DNA 二本鎖切断修復の分子機構は、その全てが明らかになった訳ではないが、主要な二つの機構と、主要ではないが機能するいくつかの機構が存在することが考えられている。主要な二つの機構とは、(相同)組換え修復と非相同末端結合である。組換え修復は、障害を受けたDNAの修復のために相同DNAを用いる。一方、非相同末端結合は切断部位を直接結合させようとする。その際に、若干のDNA鎖のプロセッシング(削り込み、付加)を伴うために、切断が起こった部分に突然変異が導入されやすい。酵母類を除く真核生物では、非相同末端結合が優先して起こっていると考えられている。

我々はDNA二本鎖切断修復機構と遺伝子標的化の間にある密接な関係があることを予想し、それに基づいて遺伝子標的化の効率化についてのアイデアを実現化した。本報告では、この経緯について述べる。

【相同組換えと遺伝子標的化】

遺伝子の標的化とは、標的とする遺伝子(DNA)を別のDNAと置換えることである。これによって、遺伝子の一部の改変、遺伝子そのものの欠失、あるいは、遺伝子発現の方式の変更を可能とする技術である。この技術により、遺伝子の機能を解析する基礎研究分野や、遺伝子治療のような応用分野の発展が見込まれる。図2で示しているのは、一般的な遺伝子標的化の概念である。標的とする遺伝子(もしくはそれに隣接する配列部分)の相同な領域を持たせた配列と、マーカー遺伝子(薬剤耐性遺伝子など)を持たせたコンストラクトを導入することによって、染色体の遺伝子をまるごと置換える様子を表している。

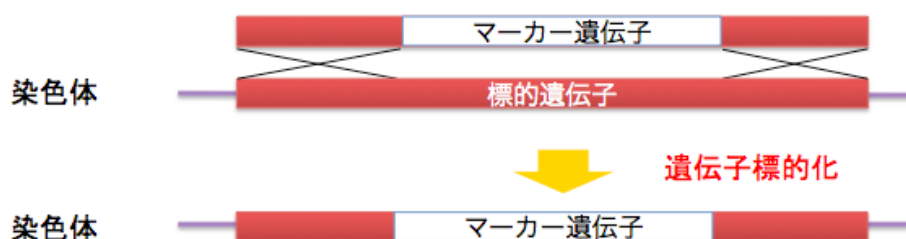


図2. 遺伝子標的化の概念図

遺伝子の標的化は、例えば、6000塩基対のコンストラクトをヒトのゲノムに組込むことを考えた場合、30億塩基対のDNAに対して、そのターゲットは50万分の1以下ということになり、非常に困難であるように思われる。しかしながら、導入されたコンストラクトは、その相同配列が検索され、50万分の1よりは、いくぶん高い効率で置換えられる。特に、酵母においてその効率は著しく高い(表1)。その理由としては、酵母類において、相同組換えの機構が優先して機能するために、標的化の効率がよいと考えられているのである。一方、酵母以外の他の真核生物ではその効率は著しく低い。低いながらも、僅かな頻度によって、標的化された細胞が生じる(標的化されない細胞は、コンストラクトが任意の場所に組込まれている。後述)。よって、時間と労を惜しまずに、ひたすらその細胞を選抜する努力を払えば、遺伝子が標的化された目的とする細胞を得ることができる。

表1. モデル生物における遺伝子標的化効率

モデル生物における遺伝子標的化効率			
	相同長 (kbp)	標的化効率(%)	文献
出芽酵母	0.06	93	Takita <i>et al.</i> (1997)
分裂酵母	0.08	80~90	Bahler <i>et al.</i> (1998)
コウジ菌	1.27	5.4	Bird and Bradshaw (1997)
アカパンカビ	2	3~5	Handa <i>et al.</i> (2000)
<i>Cryptococcus</i>	1	65	Chelsey <i>et al.</i> (2006)
タバコ	2	0.2	Lee <i>et al.</i> (1990)
ヒト細胞 (HCT116)	3	0.1	Bertolini <i>et al.</i> (2009).

遺伝子標的化効率を上げるために、様々な試みが行なわれてきた。その一例として、相同組換えに関わるタンパク質を過剰に発現させ、つまり相同組換え頻度を上昇させようとした。その結果、数倍程度の効率の上昇が可能となったが、遺伝子標的化細胞の選抜の労が軽減される訳ではなく、この手法は遺伝子標的化のためのブレイクスルーとはなり得なかった。

【テスター系の構築】

この研究を開始した当初、我々は、様々な DNA 修復についての欠損変異株において、遺伝子標的化効率が変わるか否か、について素朴な興味を抱いていた。そこで、これを解析するテスター系をまず構築したのである。

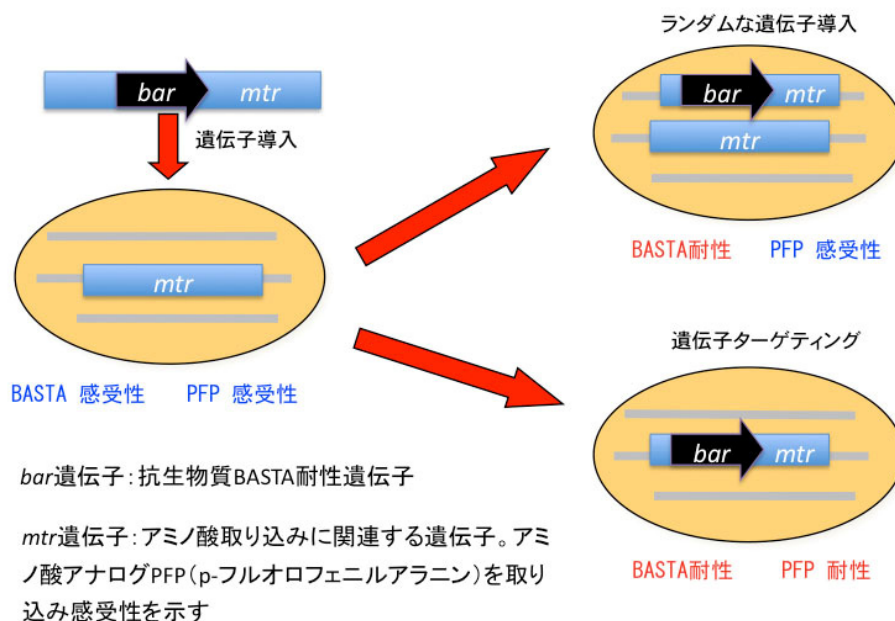


図3. 遺伝子標的化効率のテスター系

アカパンカビにおける遺伝子標的化効率を測定するテスター系の概念図を図3に示した。これはアカパンカビの内在遺伝子 *mtr* 遺伝子を標的としている。*mtr* 遺伝子は、特定のアミノ酸の取り込みに関わる遺伝子であり、この遺伝子が正常であるとき、毒性のあるアミノ酸の類似物(メチルトリプトファンやパラフルオロフェニルアラニンなど)が取り込まれ、その結果、毒性のあるアミノ酸類似物を含む培地では生存できない。解析のためのコンストラクトは、*mtr* 遺伝子の配列の中に *bar* 遺伝子(BASTA 耐性遺伝子)を挿入している。このコンストラクトをそれぞれの株に導入したときに、*mtr* 遺伝子が標的化されてコンストラクトと置き換わった場合には、生じる形質転換体は、パラフルオロフェニルアラニンに抵抗性であり、かつBASTAに抵抗性となる。一方、*mtr* 遺伝子が標的化されずに、コンストラクトが染色体の任意の位置に取り込まれた場合には、正常な *mtr* 遺伝子が内在するために、パラフルオロフェニルアラニンに感受性であり、BASTA に抵抗性となる。具体的な遺伝子標的化の効率測定は、コンストラクトを導入して生じた BASTA 抵抗性の形質転換体を得て、スポットテストによる感受性試験により、形質転換体のパラフルオロフェニルアラニン抵抗性の割合を測定することになる。

【組換え修復と非相同末端結合】

前述のテスター系を用いて、我々は様々な変異株についての遺伝子標的化の効率を解析してきた。その解析を通じて、ひとつの着想に至った。緒言でも述べたように、DNA 二本鎖切断には主要な二つの機構、相同組換え、非相同末端結合が機能し、それぞれ修復の様式が異なっている。遺伝子導入の際には、相同的組換えを期待して、導入コンストラクトには標的遺伝子の相同領域を持たせるのであるが、要は、細胞が、相同組換えを優先して

起こすような状況にすることで、遺伝子ターゲティングの効率が上昇する、というアイデアである。DNA二本鎖切断の主たる機構の一つである相同組換えを優先的に起こすには、もう一つの主たる機構である、非相同末端結合を欠損させればよいのではないか？(図4)

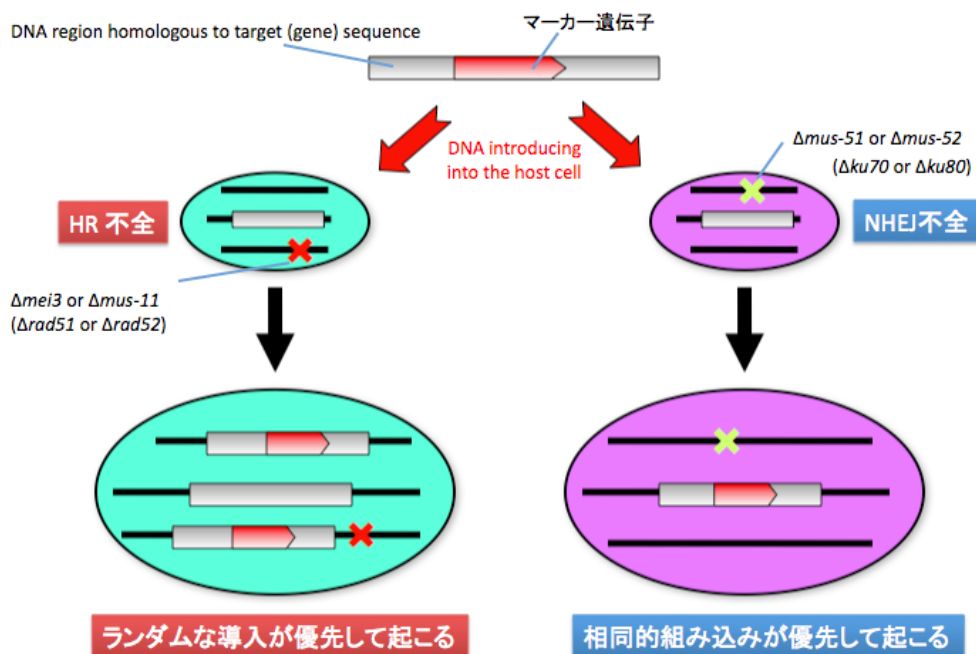


図4. 遺伝子標的化効率上昇のアイデア

このアイデアを確認するために、非相同末端結合に関わる遺伝子、つまり、*ku70* 遺伝子または *ku80* 遺伝子のアカパンカビホモログである *mus-51* 遺伝子または *mus-52* 遺伝子を欠損した変異株を作製した。この遺伝的背景において遺伝子標的化効率を測定した結果が、表2である。

表2. DNA二本鎖切断修欠損株における復遺伝子標的化

Strains	BASTA Resistant	PFP Resistant	Targeting efficiency
Wild type	238	38	16%
NHEJ Deficient strains			
$\Delta ku70(mus-51)$	168	168	100%
$\Delta ku80(mus-52)$	275	275	100%
HR Deficient strains			
$\Delta rad51(mei-3)$	93	3	3%
$\Delta rad52(mus-11)$	65	0	0%

Ninomiya et al. ProNAS (2004) 101:12248-12253

Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining
 Yusaku Ninomiya, Keiichiro Suzuki, Chizu Ishii, and Hirokazu Inoue*
 Department of Regulative Biology, Faculty of Science, Saitama University, 25 Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama City 338-8570, Japan
 Edited by David S. Parkin, Stanford University, Stanford, CA, and approved June 24, 2004 (received for review April 28, 2004)

Nonhomologous chromosomal integration of foreign DNA is completely dependent on MUS-53 (human Lig4 homolog) in *Neurospora*
 Kazuma Ishibashi, Keiichiro Suzuki, Yoshinori Ando, Oshiro Takakura, and Hirokazu Inoue*
 Laboratory of Genetics, Department of Regulative Biology, Faculty of Science, Saitama University, Shimo-ohkubo 25, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan
 Edited by David S. Parkin, Stanford University, Stanford, CA, and approved August 14, 2004 (received for review May 21, 2004)

表2に示すように、非相同末端結合を欠損した株(NHEJ deficient strains; $\Delta ku70(mus-51)$, $\Delta ku80(mus-52)$)では、標的化効率(Targeting efficiency)が野生株に比べて飛躍的に上昇し、100%という驚異的な数字を示した。一方、相同組換えに欠損した株(HR deficient strains; $\Delta rad51(mei-3)$, $\Delta rad52(mus-11)$)では、予想通り、著しく標的化効率が減少したのである。

【*ku* 変異株の形質, その他の生物での効果】

アカパンカビにおける、非相同末端結合の欠損株である、*ku-70(mus-51)*変異株、*ku-80(mus-52)*変異株は高い遺伝子標的化を達成した。この株は、DNA二本鎖切断を起こす薬剤であるメチルメタンサルホン酸や、物理的にDNAを切断するX線に対して、野生株よりも感受性を示した。しかしながら、変異原処理をしないかぎり、この変異株は野生株と同様の生育を示すために、生存には致命的な影響は与えない。

アカパンカビの成果を受けて、その他の糸状菌において、次々と非相同末端結合を欠損することによる遺伝子標的化の高効率化が行なわれた。糸状菌の研究分野においてブレイクスルーとなり、コウジカビ(*Aspergillus oryzae*, etc…), 植物病原菌(*Magnaporthe*, etc…), 医真菌(*Cryptococcus*, etc…)などにおいて有効であるとの報告が提出された。しかしながら、同じ糸状菌である担子菌類(きのこなど)について、*ku* 変異株の作成が試みられているものの、困難であるようである。非相同末端結合の欠損が生育に対して何らかの不全を示すか、遺伝子導入機構において、未だ不明の要因により、*ku* 変異株の作成が不可能となっている可能性も考えられる。

より、高等な真核生物であるほ乳動物では、どうであろうか?もともと*ku*遺伝子は、その変異が重篤な免疫疾患(severe combined immunodeficiency; *scid*)に関与することが明らかとなっており、生存にとって欠くことのできない遺伝子である。実際にこの遺伝子の欠損はマウスでは胚性致死となる。さらに、KUタンパク質はテロメアの維持にも関わっていること、さまざまな細胞内タンパク質と会合していることが分かっていることから、アカパンカビのように*ku*遺伝子を欠損させることによって、遺伝子標的化の効果が上昇するという事は、個体レベルでは期待できないということになる。

【展望】

遺伝子の標的化には、相同DNA鎖を検索し、それを置換える機構が働く。その機構とは、すなわち、相同組換え修復機構であることが示唆されている。しかしながら、遺伝子の導入における分子モデルは全くと言っていいほど不明な部分が多い。そもそも、遺伝子、DNAがなぜ染色体に組込まれるのであろうか?導入されたDNAや、ある種のウィルスのゲノムは、染色体の不特定の場所に取り込まれる。能動的に染色体を飛び回るトランスポゾン存在も不思議である。しかし、その詳細はいまだ明らかになっていない。遺伝子組込みのメカニズムを解明することは、遺伝子標的化のみならず、上記のような基礎的な分野における様々な現象の分子メカニズムを明らかにし、さらにこの基礎的知見により、遺伝子治療などの応用分野の発展に寄与できるに違いない。

【最後に】

我々の研究室では、DNA修復と突然変異についての研究を続けてきた。そのための遺伝子発現解析、遺伝子探索、遺伝子配列決定には、ラジオアイソトープ実験施設を大いに利用してきた。現在、この施設は科学分析支援センターに統合され、生命科学の研究分野においてもアイソトープに取って替わる実験手法が発展し、遺伝子発現解析、タンパク質の解析には質量分析装置、共焦点レーザー顕微鏡などの新たな機器を利用した研究が可能となってきている。このように、研究のニーズに応じて、共同利用の場と機器をご提供いただく科学分析支援センターは発展を続けている。時代の荒波に負けず、今後も埼玉大学の科学研究が活発になるように、ますますの機器とシステムの充実を願ってやまない。最後に、心からの謝意を表し、拙稿を閉じさせていただく。