

**非相同組換え修復欠損細胞における標的遺伝子特異的な  
遺伝子破壊法の開発**  
**Gene targeting on the mutants**  
**that defect on DNA repair of non-homologous end joining**

プロジェクト代表者：田中 秀逸（理工学研究科・助教授）

Shuuitsu Tanaka (Graduate School of Science and Engineering)

生物に導入されたDNA断片がゲノム内に挿入されるには、DNA修復機構のDNA二本鎖切断修復と同様のメカニズムが働くと考えられる。この修復機構には、相同組換えと非相同末端結合（非相同組換え）の2つが存在する。標的遺伝子特異的な遺伝子破壊、すなわち遺伝子ターゲティングには、標的遺伝子と相同な配列を持った導入DNA断片とゲノムの遺伝子との間でその相同部において相同組換えが起きることが必要である。我々は、非相同末端結合修復能が欠損したアカパンカビにおいて、遺伝子ターゲティング効率が飛躍的に高まることを見いだした。この遺伝子ターゲティング法の最適化と他の生物への応用を目指しこの研究プロジェクトを行った。当初、非相同組換え能の欠損に $ku$  ( $ku70$ または $ku80$ ) 遺伝子破壊を用いたが、KUタンパク質がテロメアの維持機構等にも関わる為、その欠損が生物種によってはゲノム不安定性等をもたらす事が予想される。そこで、 $ku$ と同様に非相同組換えに関わる $lig4$ 遺伝子の破壊株における遺伝子ターゲティングについても検討したところ、 $ku$ 遺伝子破壊株以上の有効性を見いだした。論文となる研究成果は今のところアカパンカビに留まってしまった。他の生物への応用が可能かどうかの見極めは重要な知見であるので、継続して研究を進めている。

## 1. アカパンカビ非相同組換え能欠損株における標的遺伝子特異的な遺伝子破壊

### a. $ku$ 遺伝子破壊株を用いた研究

相同配列長2 kbpにおいて、 $ku$ 遺伝子破壊株における標的遺伝子特異的な遺伝子破壊すなわち相同組換え (HR) 頻度は100%であった。また、 $ku$ 遺伝子破壊株では、野生株に比べ HR 個体数が上昇した。このことから、 $ku$ 欠損等で非相同末端結合 (NHEJ) が機能しないとき、HR の機能が高まることが示唆された。相同配列長を 50 bp で用いるとHR頻度は 0% となり、形質転換率は激減した。これは  $ku$ 遺伝子の欠損により NHEJ が行われず、また相同配列長が短いため HR もできないためと考えられる。しかし形質転換体はごくわずかであるが得られた( $0.1 \times 10^{-6}$ )。これは遺伝子組み込みに関し HR, NHEJ 以外の経路の存在を示唆する。出芽酵母では末端の数塩基の相同配列による結合機構 (microhomology-mediated end joining ; MMEJ) の存在が報告されており、アカパンカビにおいてもMMEが機能すると考えられる。

### b. $lig4$ 遺伝子破壊株を用いた遺伝子破壊実験

アカパンカビのデータベースを用いて、ヒト $lig4$ 遺伝子のホモログを探し、その遺伝子破壊株を作製した。この破壊株は、変異原であるMMS, BLMに対して明らかな感受性を示すが

、紫外線も含め他の変異原には野生株と同等の感受性しか示さない事等、*ku*遺伝子破壊株と同じ特徴を示した。またエピスタシス解析により*lig4*が非相同組換えに関わる事が示唆された。そこで、この破壊株を用いて遺伝子破壊実験を行ったところ、*ku*遺伝子破壊株と同様、100%の確率で標的遺伝子破壊がおこる事が判った。しかも、*ku*遺伝子破壊株に比べ、形質転換頻度は下がるもののより短い相同配列（1-2 kbp に対し 0.3-0.5 kbp）を持たせた遺伝子破壊用DNA断片を用いても標的遺伝子特異的破壊が行える事が判った（図1）。また*lig4*破壊株では非相同組換え能が完全に失われた。この事は、標的遺伝子特異的破壊には、*ku*遺伝子破壊株より*lig4*遺伝子破壊株を用いる方がより有効である事を示している（図2）（Ishibashi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006）。

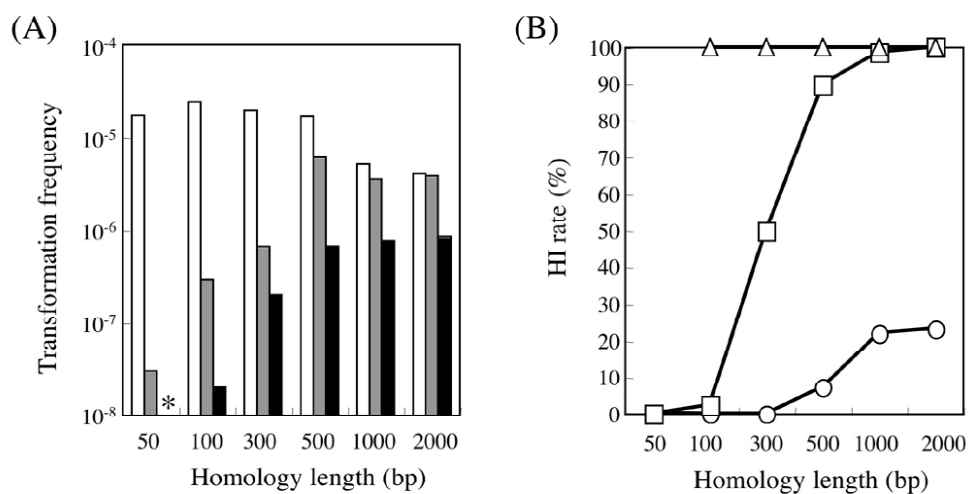


図1 アカパンカビにおける導入DNA断片長に依存した形質転換頻度 (A) とその時の遺伝子ターゲッティング率 (B) (A)棒の色: 白, 野生株; 灰, *ku80*破壊株; 黒, *lig4*破壊株、(B)マーク形: ○, 野生株; □, *ku80*破壊株; △, *lig4*破壊株

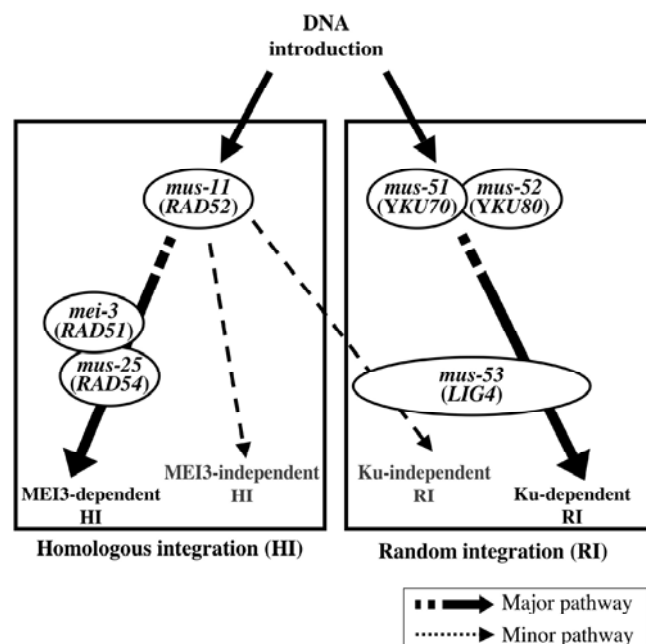


図2 アカパンカビにおけるゲノムへのDNA挿入機構

## 2. 非相同組換え能欠損シロイヌナズナ細胞における遺伝子破壊実験

### a. RNAiによりKU量を抑制した野生型細胞を用いた実験

理化学研究所より野生型細胞の懸濁培養系を入手した。その細胞にプラスミドを用いて $ku70$ 遺伝子の最上流コード領域を転写させることで、 $ku70$ -RNAiにより $ku$ 遺伝子破壊株と同様の細胞を得ようとした。目的のプラスミドを作製し、電気穿孔法によりその細胞内導入を試みた。しかし、電気穿孔法による導入ではどの条件でも選択マーカー(ピアラフォス耐性)陽性の細胞が得られず、 $ku$ 発現抑制細胞は得られなかった。

### b. $ku$ 遺伝子破壊株より得たカルス細胞を用いた実験

ABRCより入手したシロイヌナズナの $ku70$ 遺伝子破壊株と予想される株から得た種子を播種し、子葉段階まで育てた後、カルスを誘導した。成長させた後、カルスの一部から、DNA及びRNAを単離し、PCRにより $ku70$ の発現が認められない株を選別した。花芽形成に關与するAG遺伝子を遺伝子破壊の標的として選び、野生型シロイヌナズナ細胞のゲノムDNAからAGの配列約5 kbpをクローニングした。形質転換用コンストラクトは完成したが上述の理由により $ku$ 破壊株の利用から $lig4$ 破壊株の利用に切り替えた。

### c. $lig4$ 遺伝子破壊株より得たカルス細胞における遺伝子破壊実験

作製した花芽形成に關与するAG遺伝子を標的遺伝子とした選択マーカー $bar$ 遺伝子を含む遺伝子破壊用DNA断片を、電気穿孔法でシロイヌナズナの培養細胞に導入する事を試みたが、この植物は電気穿孔に対する感受性が高いようでこの方法に不向きな事が判った。そこで、遺伝子導入法に關し遺伝子銃を用いる方法に変えるとともに、シロイヌナズナに關しても $ku$ 遺伝子ではなく、 $lig4$ 遺伝子の破壊株を用いる事にした。ABRCより得たシロイヌナズナの $lig4$ 遺伝子破壊株と予想される株から得た種子からカルスを誘導し、PCRにより $lig4$ の発現が認められない株を選別した。コントロールと $lig4$ 破壊株カルスについて、遺伝子銃による遺伝子導入を行い、 $bar$ 抵抗性により遺伝子を導入された細胞の選択を進めている。

## 3. アカパンカビ以外の菌類における $ku$ 遺伝子破壊を用いた遺伝子破壊実験

本研究の基盤であるアカパンカビにおける $ku$ 遺伝子破壊株による標的遺伝子破壊については、すでに全アカパンカビ研究者の国際会議 (2004, 3) 及びPNAS誌 (Ninomiya *et al.*, 2004) で発表された。アカパンカビにおいては、この方法をベースにした全遺伝子破壊のプログラムがFGSCを中心に進められている。麴カビ *Aspergillus fumigatus* においては、このシステムの応用が可能であることが報告された (*Eukaryot. Cell.*, 2006)。

### a. 他の菌類における $ku$ 遺伝子破壊株を用いた遺伝子破壊実験

麴かび $Aspergillus nidulans$  (東北大・阿部先生に協力を委託) に関しては、その $ku70$ 破壊株および $lig4$ 破壊株で標的遺伝子破壊頻度があがることか示された。病原性カビモチ菌 (東洋大・藤村先生に協力を委託) ではホモで $ku70$ が破壊された株が得られず、その有効性を明らかにする事はできなかった。担子菌に関しては、ほぼゲノム情報が解明されている上に、分生子の単離が容易である事から、*Phanerochaete* を実験材料に用いる事にした。この担子菌で

*ku*, *lig4*遺伝子のDNA配列が特定できたので、この菌でのハイグロマイシン耐性によるスクリーニング系を組み立てながら両遺伝子破壊を進めている。

## 謝辞

この研究は、「埼玉県地域結集型共同研究事業（埼玉バイオ）」における研究テーマ（代表：井上弘一）と重複して進められた。

## 参考文献

K. Ishibashi, K. Suzuki, Y. Ando, C. Takakura, and H. Inoue, Nonhomologous chromosomal integration of foreign DNA is completely dependent on MUS-53 (human Lig4 homolog) in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **103**, 14871-14876 (2006).