

解明していくための有用な *in vitro* の解析ツールとなり、プリオン病研究のさらなる発展に寄与することが期待される。

- 1) Iwamaru, Y., Takenouchi, T., Ogihara, K., Hoshino, M., Takata, M., Imamura, M., Tagawa, Y., Hayashi-Kato, H., Ushiki-Kaku, Y., Shimizu, Y., Okada, H., Shinagawa, M., Kitani, H., & Yokoyama, T. (2007) *J. Virol.*, 81, 1524–1527.
- 2) Takenouchi, T., Iwamaru, Y., Imamura, M., Kato, N., Sugama, S., Fujita, M., Hashimoto, M., Sato, M., Okada, H., Yokoyama, T., Mohri, S., & Kitani, H. (2007) *FEBS Lett.*, 581, 3019–3026.
- 3) Heppner, F.L., Prinz, M., & Aguzzi, A. (2001) *Prog. Brain Res.*, 132, 737–750.
- 4) Baker, C.A., Martin, D., & Manuelidis, L. (2002) *J. Virol.*, 76, 10905–10913.
- 5) Vilette, D. (2007) *Vet. Res.*, 39, 10.
- 6) Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., & Di Virgilio, F. (2006) *J. Immunol.*, 176, 3877–3883.
- 7) Ostlund, P., Lindegren, H., Pettersson, C., & Bedecs, K. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 36110–36115.
- 8) Sandberg, M.K., Wallen, P., Wikstrom, M.A., & Kristensson, K. (2004) *Neurobiol. Dis.*, 15, 143–151.
- 9) Takenouchi, T., Ogihara, K., Sato, M., & Kitani, H. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, 1726, 177–186.
- 10) Parvathenani, L.K., Tertysnikova, S., Greco, C.R., Roberts, S. B., Robertson, B., & Posmantur, R. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 13309–13317.
- 11) Franke, H., Gunther, A., Grosche, J., Schmidt, R., Rossner, S., Reinhardt, R., Faber-Zuschratter, H., Schneider, D., & Illes, P. (2004) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 63, 686–699.
- 12) McLarnon, J.G., Ryu, J.K., Walker, D.G., & Choi, H.B. (2006) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 65, 1090–1097.
- 13) Choi, H.B., Ryu, J.K., Kim, S.U., & McLarnon, J.G. (2007) *J. Neurosci.*, 27, 4957–4968.

竹之内 敬人¹, 岩丸 祥史², 横山 隆², 木谷 裕¹

(¹ 独立行政法人農業生物資源研究所

遺伝子組換え家畜研究センター,

² 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構

動物衛生研究所 プリオン病研究チーム)

Establishment and characterization of prion-infected microglial cells

Takato Takenouchi¹, Yoshifumi Iwamaru², Takashi Yokoyama², and Hiroshi Kitani¹ (¹Transgenic Animal Research Center, National Institute of Agrobiological Sciences, Ohwashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan, ²Research Team for Prion Diseases, National Institute of Animal Health, Kannondai 3-1-5, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan)

投稿受付：平成 19 年 10 月 17 日

X ファミリー DNA ポリメラーゼの進化と機能

1. 序 論

真核生物の DNA ポリメラーゼ (以下, 種類を示すときは Pol と略す) は, ゲノムプロジェクトの進行に伴って, 酵素種が多数存在することが急速に分かってきた。現在, 少なくとも 14 種類 (Pol α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι , κ , λ , μ , ν , π) あり, さらに鋳型 DNA を必要としないターミナルデオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) やデオキシシチジルトランスフェラーゼである Rev1 も含めて数えると 16 種類になる。これら多数の酵素種はアミノ酸配列の類似性から, A (Pol γ , θ , ν , π), B (Pol α , δ , ϵ , ζ), X (Pol β , λ , μ , TdT), Y (Pol η , ι , κ , Rev1) の四つのファミリーに分類されている¹⁾。DNA ポリメラーゼは, 5' から 3' の方向に鋳型鎖と相補的なポリヌクレオチドを合成していく酵素である。さらに, いくつかの酵素種は, 別の酵素活性も持ち合わせている。例えば, Pol γ , δ , ϵ , π は 3'-5' エキソヌクレアーゼ活性を持ち, ミスペアの塩基を除去する。また, Pol β , γ , λ は dRP (5'-deoxyribose phosphate) 部位を切断する活性を持つ。

X ファミリー DNA ポリメラーゼ (以下 PolX と略す) は, DNA 修復系酵素としてよく知られ, その構造と機能が独特であるため, 多くの研究者に注目されている。Pol β と TdT は昔からよく知られる一方, Pol λ と Pol μ は比較的最近同定された¹⁾。PolX は, 極端に DNA 鎖伸張能が低い (一度の DNA 結合反応において 1~数塩基しか伸張できない)。その時, 必ずマグネシウムやマンガンイオンなどの二価陽イオンを要求する。さらに構造的な特徴を述べると, PolX のうち, Pol β 以外はアミノ末端側に BRCT (BRCA1 C-terminal) ドメイン, 中央付近に DNA 結合ドメイン, カルボキシ末端側に DNA 合成活性を担うドメインを持っている。それに対して Pol β は, BRCT ドメインを含むアミノ末端側が欠けた構造をしている (図 1)。興味深いことに, 哺乳類組織におけるそれぞれの酵素の存在様式が大きく異なる。Pol β が脳及び生殖系組織, TdT は免疫系組織に存在する。また, Pol λ と Pol μ は比較的普遍的に存在するが生殖系組織と免疫系組織にそれぞれ多く存在している²⁻⁵⁾。

このレビューでは, PolX の各生物種における分布に着

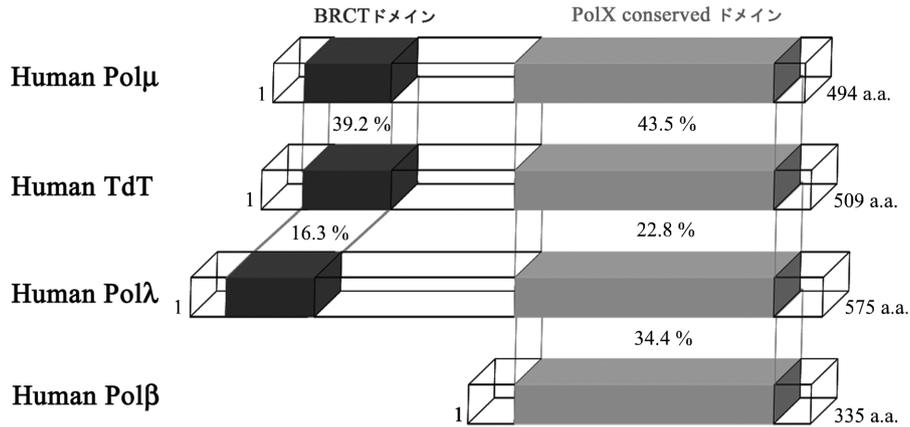


図1 ヒト Xファミリー DNA ポリメラーゼの構造の比較
 アミノ末端側の box は BRCT ドメインを、カルボキシル末端側の box は PolX conserved ドメインを示している。%で表示している数字はそのドメインのアイデンティティーを示している。

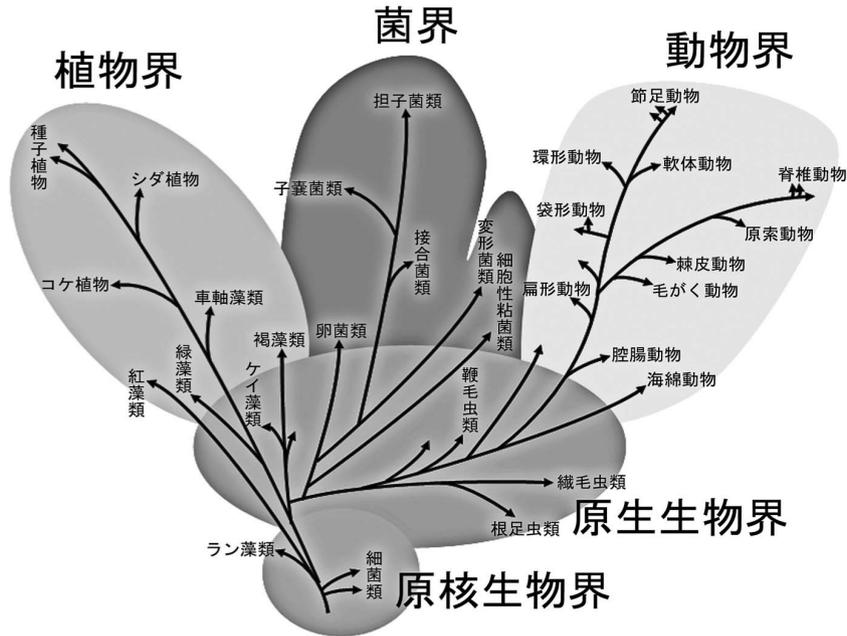


図2 Whittaker の 5 界説に基づく進化系統樹

目し、それをもとに機能について推測してみようと思う。

2. 真核生物における PolX の分布

図2は Whittaker の 5 界説に基づく進化系統樹である。これは全ての生物種を、植物界、菌界、動物界、原生生物界、原核生物界の五つに分類し、さらに動物界を旧口動物と新口動物に大きく分ける。原生生物界や原核生物界に属するいくつかの生物からも PolX は発見されているが、ここでは真核生物 3 界 (植物界、菌界、動物界) における

PolX の分布について主に触れる。

植物界：イネ、シロイヌナズナでは共に、PolX の遺伝子は 1 コピーの Pol λ しか存在しない⁶⁾。より下等な単細胞藻類のクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) のデータベース (JGI Chlamy v3.0) でも同様である (fgenes1_pg_C_scaffold_54000012) ため、植物界には一般に Pol λ しか存在しないものと思われる。

菌界：私たちは、担子菌であるヒトヨタケから二つの、それぞれ Pol λ と Pol μ の相同遺伝子を単離した。さらに、

それらの組換えタンパク質は、ヒトの Pol λ 、Pol μ と同様の生化学的性質を示した⁷⁾。また、子囊菌類であるアカパンカビ (*Neurospora crassa*) にも2種類の PolX が存在する (XP_961407, XP_963912)。一方、細胞性粘菌類のキイロタマホコリカビ (XM_001134542) や酵母 (Pol4) にはそれぞれ1種類の PolX しか存在せず、それらは Pol λ と最も類似度が高い。これらのことから、菌界には Pol β や TdT の相同遺伝子は存在しない可能性が高い。

動物界：哺乳類は4種類の PolX を持っている¹⁾。魚類のゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) も同様である (Pol β : NP_001003879, Pol λ : NP_998408, Pol μ : NP_956542, TdT: NP_001014817) ことから、全ての脊椎動物の種が4種類の PolX を持っている可能性が高い。また、興味深いことに、棘皮動物であるウニ (*Strongylocentrotus purpuratus*) のゲノムに Pol β (XP_787665) と Pol λ (XP_785226)、そして Pol μ と TdT のいずれに対しても同程度の類似性を示すタンパク質 (Pol μ /TdT と記す, XP_796033) がコードされていることが分かった。脊椎動物の Pol μ と TdT は、棘皮動物の出現以後に Pol μ /TdT から分岐したのかもしれない。一方、旧口動物門の節足動物であるショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 及び袋形動物である線虫 (*Caenorhabditis elegans*) のゲノム中には、PolX の相同遺伝子が存在しない。特に、Pol β 遺伝子は新口動物では生存に必須であり、塩基除去修復 (base excision repair; BER) 機構で中心的な役割を担っているが、旧口動物には存在し

ない。さらに旧口動物には Pol β の機能を代行するような他の PolX さえない、という事実は驚くべきことである。キイロショウジョウバエにおいて、B ファミリーに属する Pol ζ が BER に似た機構で DNA 修復を行っている可能性を、最近、私たちは見出した⁸⁾。おそらく、旧口動物では他のファミリーの DNA ポリメラーゼが BER 類似の修復系において Pol β の機能を代行していると思われる。

以上のことから、私たちは進化系統樹において旧口動物と新口動物の分岐点付近に位置する腔腸動物が PolX を持っているのか興味を持った。私たちは、山形大学の半澤直人教授と山形県鶴岡市立加茂水族館の協力を得て、腔腸動物のミズクラゲから PolX の cDNA の単離を試み、Pol β 相同遺伝子の全長 cDNA と Pol λ 相同遺伝子の cDNA の一部を単離することに成功した [Kodera *et al.* in preparation]。ところで、Pol λ に対する類似性は、Pol β よりも Pol μ /TdT の方が低い。腔腸動物が Pol β を持っているということは、それよりも前に分岐した Pol μ /TdT も存在するはずであると思われる。現在、Pol μ 、TdT についても探索中である。

菌類の Pol μ は、動物界の Pol μ や TdT とおそらく同じ祖先から分岐したのではなく、菌界の Pol λ から分岐したと考えられる。なぜなら、担子菌や子囊菌類では Pol λ 、Pol μ の2種存在するが、細胞性粘菌などには Pol λ 型が1種しか存在しないからである (図3)。細胞性粘菌類は菌界と動物界の分岐点近くに位置するので、菌類の Pol μ

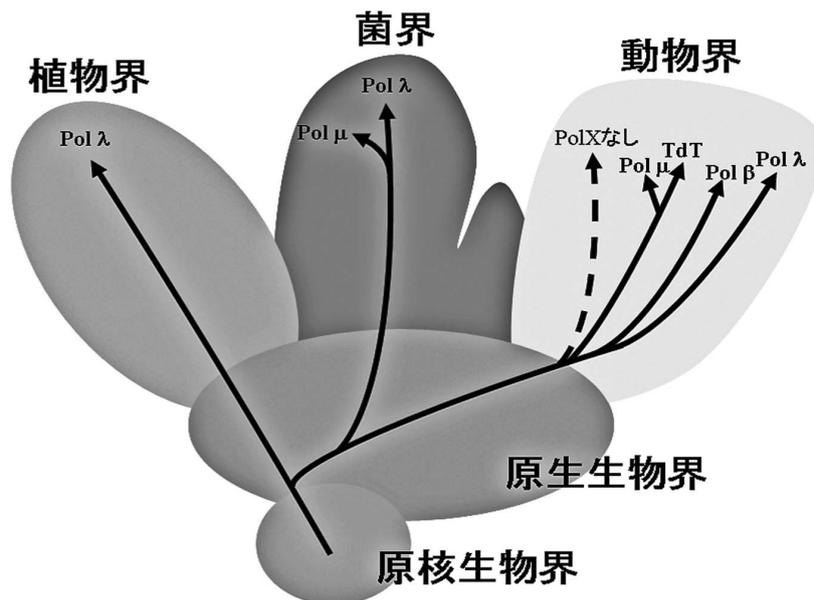


図3 それぞれの界における X ファミリー DNA ポリメラーゼの分化のイメージ

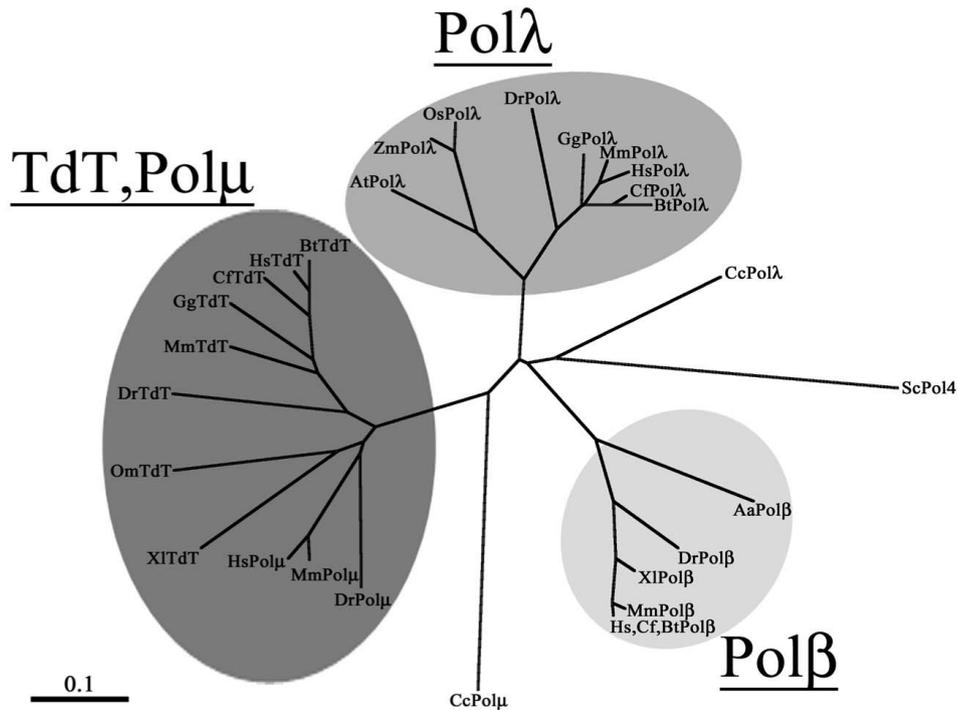


図4 PolX conserved ドメインのDNA合成活性中心のアミノ酸配列を元にCLUSTALWプログラムを用いて作成した系統発生解析の結果

バーは1残基当たり0.1アミノ酸置換を示している。Hs: *Homo sapiens*, Mm: *Mus musculus*, Bt: *Bos taurus*, Cf: *Canis familiaris*, Gg: *Gallus gallus*, Xi: *Xenopus laevis*, Dr: *Danio rerio*, Om: *Oncorhynchus mykiss*, Aa: *Aurelia aurita*, Os: *Oryza sativa*, Zm: *Zea mays*, At: *Arabidopsis thaliana*, Cc: *Coprinus cinereus*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*.

は、新口動物門群のPol μ やTdTとは全く別の由来であると考えべきだろう。図4に示すように、アミノ酸配列の類似度も低い。一方、旧口動物において、Pol β 、Pol λ 、Pol μ 、TdTの遺伝子全てが同時に失われるということは考えにくい。Pol β 、Pol μ 、TdTを持たなかったある種の動物からPol λ が失われ、旧口動物が分岐したと考えるのが自然だろう。私たちは、腔腸動物の中にPolXを失った種が現在でも存在するのではないかと考えている。

以上をまとめると、PolXは、植物界で1種(Pol λ)、菌界で1種または2種(Pol λ 、Pol μ)、動物界では、腔腸動物では少なくとも2種(Pol β 、Pol λ)、棘皮動物では3種(Pol β 、Pol λ 、Pol μ /TdT)、そして脊椎動物では4種(Pol β 、Pol λ 、Pol μ 、TdT)存在している(図3)。一方、今のところ、旧口動物においてPolXは見つかっていない。Pol β は動物界の一部にしか存在せず、どの真核生物界にも存在するのはPol λ の相同タンパク質のみである。よって全てのPolXの祖先はPol λ 型であると考えられる。

3. PolXの原型の役割

PolXの祖先は元来どのような機能を持っていたのだろうか？脊椎動物のPol λ はXRCC4(X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4)/DNAリガーゼIV複合体と協調してnon-homologous end-joining(NHEJ)時に生じるDNA鎖のギャップを埋める役割を担っていることが示されている⁹⁾。また、私たちは、植物(イネ)のPol λ がXRCC4と複合体を形成して機能することを確認した[Uchiyama *et al.* unpublished]。植物のXRCC4もNHEJで機能することから、植物細胞内でもPol λ はNHEJに関与すると思われる。また、子囊菌類の酵母による研究では、Pol λ オルソログのPol4がNHEJにおいて効果的に機能していることが示されている¹⁰⁾。もちろん、これらの例のみでは決定的なことは言えないが、Pol λ は元来NHEJに関わっていたという印象を受ける。その一方で、他のPolXとそれらに関与する機構(BERやV(D)J組換え)は新口動物が現在の形に進化するのに重要な役割を担ったということ想像させる。

4. Short-patch BER の存在

Pol λ しか存在しない植物には Pol β が必須の short-patch BER (spBER) は存在しないのだろうか？ イネとシロイヌナズナのゲノム上には、哺乳類の spBER で Pol β と協調して機能する DNA リガーゼ III (Lig3) の相同遺伝子も存在しない¹¹⁾。Lig3 は spBER の最終段階で作用し、修復された DNA 鎖ニックを塞ぐ酵素である。さらに、哺乳類の spBER では、Pol β と XRCC1 タンパク質が直接結合し、協調して機能することが必要であるが¹²⁾、植物の XRCC1 の構造は哺乳類のそれと大きく異なる。植物の XRCC1 は Pol β との結合に必要な N 末端領域のおよそ半分が失われている [Uchiyama *et al.* in press: *Planta* (2008)]. すなわち、もし植物の Pol λ が哺乳類の Pol β のように機能していたとしても、XRCC1 と直接結合することはできず、これらが協調して機能することはない可能性を示している。この他の BER 因子、DNA グリコシラーゼ、AP エンドヌクレアーゼ (3 種)、ポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP) (2 種) はイネゲノム上にコードされており、また long-patch BER (lpBER) に関わる Pol δ 、PCNA、FEN-1、DNA リガーゼ I (Lig1) など極めて高く保存されていることから¹¹⁾、植物の BER 機構は lpBER のみであるか、または、spBER が存在していたとしても、脊椎動物で考えられているモデルとは相当異なっていることになる。PolX を全く持たないショウジョウバエは未だ spBER 機構の存在は確認されていない。一方、酵母では XRCC1 や PARP が存在せず、spBER 機構が哺乳類と異なっていることが分かっている¹³⁾。

現在よく知られている spBER 機構は Pol β を持つ新口動物の中で誕生した新口動物特有の機構である可能性があり、哺乳類が spBER によって修復している DNA 損傷を新口動物以外の生物がどのように修復しているのか大変興味深い。

5. 中枢神経系と Pol β の存在

4 種の PolX のノックアウトマウスでは、Pol β の欠損のみが中枢神経系の形成異常を引き起こし、マウスは誕生とともに呼吸不全で致死になる¹⁴⁾。しかしながら、哺乳類の培養細胞の生存には Pol β の欠損は影響しない。つまり、Pol β は形態形成時のみに必須のようである。Pol β 欠損マウスの脳では、アポトーシスが頻繁に起きている像が観察される。実際に脳組織では、主に spBER によって修復される AP サイトがゲノム上に高頻度に生じているとの報告

もある¹⁵⁾。また Pol β は生殖組織に次いで、脳で発現量が多いことが知られている²⁾。このように、脳組織細胞における Pol β の詳細な分子機構は未だ不明であるが、中枢神経系の発生に重要な役割を果たしている可能性がある。

では、中枢神経系と Pol β の関わりはどういったものなのだろうか？ 脳は個体の生存に非常に重要であるが、ニューロンは基本的には再生されない。そのために DNA に蓄積するダメージを最小限に抑えるために Pol β が関与する DNA 修復機構 (BER など) が活性化されている可能性が考えられる。実際に、Pol β 抗体染色法を用いてマウス脳内の Pol β の分布を詳しく見てみると、大脳や小脳の皮質にも Pol β の存在を確認できた。不思議なことに、特に小脳のプルキンエ細胞にも大量の Pol β が存在することが分かった [Sakaguchi *et al.* unpublished]。脳組織において Pol β の分布が一樣でないのは DNA 損傷の蓄積度合いが細胞によって異なる可能性も考えられるが、私たちは、中枢神経系の発生及び維持において、Pol β が DNA 修復とは違った役割をしているのではないかと予想している。

各生物界において PolX の分布が異なるという事実と対照的に、(おそらく) 全ての真核生物のゲノムに染色体 DNA 複製に関わる 3 種類の DNA ポリメラーゼ (Pol α 、Pol δ 、Pol ϵ) はコードされていると思われる。これは細胞増殖に不可欠な染色体複製機構に関わる酵素に比べ、様々な経路を持つ DNA 修復機構に関わる酵素の遺伝子には変異が蓄積されやすいためであるように思われる。その中でも特に PolX は多様性に富んでいる印象を受ける。これは変異が蓄積し多様化が進む中で、それぞれが別々の新たな機能を獲得したためであるかもしれない。その過程で哺乳類の Pol β は DNA 修復以外の中枢神経系の発生と維持に関わる機能を獲得したのではないだろうか。

6. 結 論

各生物種における PolX の分布から、それらの祖先は Pol λ 型であった可能性が高い。それは本来 NHEJ を役割としており、一部の動物や菌類で遺伝子の重複から他の PolX が出現し、新たな DNA 代謝機構 (BER や V(D)J 組換えなど) が誕生したのかもしれない。Pol μ 、TdT の出現は獲得免疫機構の誕生に、Pol β の出現は中枢神経系の発達に大きく貢献しているのかもしれない。

謝辞

山形大学理学部生物学科の半澤直人教授と山形県鶴岡市立加茂水族館のご好意により、PolX 遺伝子の単離に用い

たミズクラゲを提供していただきました。ここに深く感謝いたします。

- 1) Burgers, P.M., Koonin, E.V., Bruford, E., Blanco, L., Burtis, K.C., Christman, M.F., Copeland, W.C., Friedberg, E.C., Ha-naoka, F., Hinkle, D.C., Lawrence, C.W., Nakanishi, M., Oh-mori, H., Prakash, L., Prakash, S., Reynaud, C.A., Sugino, A., Todo, T., Wang, Z., Weill, J.C., & Woodgate, R. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 43487-43490.
- 2) Hirose, F., Hotta, Y., Yamaguchi, M., & Matsukage, A. (1989) *Exp. Cell Res.*, **181**, 169-180.
- 3) Nourrit, F., Coquilleau, I., D'Andon, M.F., Rougeon, F., & Doyen, N. (1999) *J. Mol. Biol.*, **292**, 217-227.
- 4) Dominguez, O., Ruiz, J.F., de Lera, L.T., Garcia-Diaz, M., Gonzalez, M.A., Kirchhoff, T., Martinez-A, C., Bernad, A., & Blanco, L. (2000) *EMBO J.*, **19**, 1731-1742.
- 5) Nagasawa, K., Kitamura, K., Yasui, A., Nimura, Y., Ikeda, K., Hirai, M., Matsukage, A., & Nakanishi, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 31233-31238.
- 6) Uchiyama, Y., Kimura, S., Yamamoto, T., Ishibashi, T., & Sakaguchi, K. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2799-2807.
- 7) Sakamoto, A., Iwabata, K., Koshiyama, A., Sugawara, H., Yanai, T., Kanai, Y., Takeuchi, R., Daikuhara, Y., Takakusagi, Y., & Sakaguchi, K. (2007) *Chromosoma*, **116**, 545-556.
- 8) Takeuchi, R., Ruike, T., Nakamura, R., Shimanouchi, K., Kanai, Y., Abe, Y., Ihara, A., & Sakaguchi, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 11577-11585.
- 9) Lee, J.W., Blanco, L., Zhou, T., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Wang, Z., & Povirk, L.F. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 805-811.
- 10) Wilson, T.E. & Lieber, M.R. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 23599-23609.
- 11) Kimura, S. & Sakaguchi, K. (2006) *Chem. Rev.*, **106**, 753-766.
- 12) Dianova, I.I., Sleeth, K.M., Allinson, S.L., Parsons, J.L., Breslin, C., Caldecott, K.W., & Dianov, G.L. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2550-2555.
- 13) Alseth, I., Osman, F., Korvald, H., Tsaneva, I., Whitby, M.C., Seeberg, E., & Bjoras, M. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, 1123-1131.
- 14) Sugo, N., Aratani, Y., Nagashima, Y., Kubota, Y., & Koyama, H. (2000) *EMBO J.*, **19**, 1397-1404.
- 15) Nakamura, J. & Swenberg, J.A. (1999) *Cancer Res.*, **59**, 2522-2526.

内山 幸伸, 武内 亮, 小寺 啓文, 坂口 謙吾
(東京理科大学理工学部応用生物科学科)

Evolution and functions of X-family DNA polymerases in eukaryotes

Yukinobu Uchiyama, Ryo Takeuchi, Hirofumi Kodera, and Kengo Sakaguchi (Department of Applied Biological Science, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan)

投稿受付:平成 19 年 10 月 23 日

ヒト細胞を用いた遺伝子ターゲティング

はじめに

DNA の相同組換え反応を利用した遺伝子ターゲティング技術がマウス ES 細胞に応用されたことで、任意の遺伝子を改変したマウスを作製することが可能になった。この功績が認められ、2007 年、Mario Capecchi 博士、Oliver Smithies 博士、Martin Evans 博士にノーベル医学生理学賞が授与された (http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/)。これまでに 10,000 を超える遺伝子のノックアウトマウスが作製されており¹⁾、特に個体レベルでの遺伝子機能解析のツールとして世界中で広く利用されている。しかし、種差を考慮すると、必ずしもノックアウトマウスで得られた研究成果をそのまま創薬、医療に応用できるとは限らない。ヒトの場合、疾患モデル個体の作製は不可能であるがゆえに、遺伝子ノックアウト細胞株を作製し、細胞レベルで解析することの意義は大きい。現在、遺伝子ノックアウトによるヒト遺伝子機能解析には、主に繊維芽肉腫細胞株 HT1080、大腸がん細胞株 HCT116、ブレ B 細胞株 Nalm-6 の 3 種の細胞株が利用されている。HT1080 細胞は、Andrew Porter 博士が遺伝子ターゲティング研究に使用している細胞株である²⁾。一方、HCT116 細胞は、がん抑制遺伝子研究のパイオニアである Bert Vogelstein 博士らが *p53* 遺伝子や *p21* 遺伝子のノックアウトに使用したという経緯もあり³⁾、その認知度は高い。我が国でも、白澤専二博士が 1993 年に遺伝子ターゲティングに成功しており⁴⁾、現在でも東京大学の宮川清博士や放射線医学研究所の塩見忠博博士らを中心として広く用いられている。1998 年、南カリフォルニア大学の Michael Lieber 博士らにより Nalm-6 細胞を用いた遺伝子ターゲティングの成功例が報告された⁵⁾。彼らがノックアウトした遺伝子は *LIG4* 遺伝子のみであったが、我々は最近、この細胞を用いて遺伝子ターゲティングによるノックアウト細胞の作製を効率良く行えるシステムを開発した。本稿では、ヒト Nalm-6 細胞を用いた遺伝子ノックアウト実験の実際(ターゲティングストラテジーの立案法から組換え体の単離法まで)について、我々の近年の成果を例に概説する。