

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., Hanaoka, F., Hinkle, D.C., Lawrence, C.W., Nakanishi, M., Ohmori, 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 Kadera, 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。

1. ヒト Nalm-6 細胞

Nalm-6 細胞は、急性リンパ性白血病 (ALL) 男性患者の末梢血から樹立されたプレ B 細胞株である⁶⁾。国内では、東北大学の医用細胞資源センターから入手できる。染色体には 1 箇所の相互転座 t(5;12) (q33.2;p13.2) が認められるが、偽二倍体の核型を安定に維持している⁷⁾。常染色体上の遺伝子をノックアウトする際には、ターゲティングベクター (以下、ベクターと記す) の導入と組換え体のスクリーニングが少なくとも 2 回必要なため、二ヶ月間以上培養を継続しなければならないが、これまでに我々が取得したノックアウト細胞で核型異常が認められたケースはない。また、ミスマッチ修復遺伝子 *MSH2* の発現を消失しているが⁸⁾、*p53* を正常に発現していることが確認されている⁹⁾。Nalm-6 は浮遊細胞であるため、細胞の回収や継

代の際にトリプシン処理を必要としない。これは、組換え体のスクリーニングの過程において百個以上のクローンを扱う際に大きな利点となる。我々は軟寒天培地 (0.15% アガロース) 中でコロニー形成を行っているが、通常の限界希釈法によるコロニー形成も可能であり、いずれの場合も 80% 以上のコロニー形成率を示す¹⁰⁾。

2. ターゲティングストラテジーの立案とターゲティングベクターの構築

細胞を入手し、培養条件を整えたあとにまず行うべきことは、ノックアウトしたい遺伝子が Nalm-6 細胞で発現しているかどうかの確認である。我々は Nalm-6 細胞の遺伝子発現解析データをもとに判断しているが⁸⁾、解析リストにない遺伝子やデータベース上に登録されていない遺伝子については RT-PCR により発現の有無の確認を行う必要が

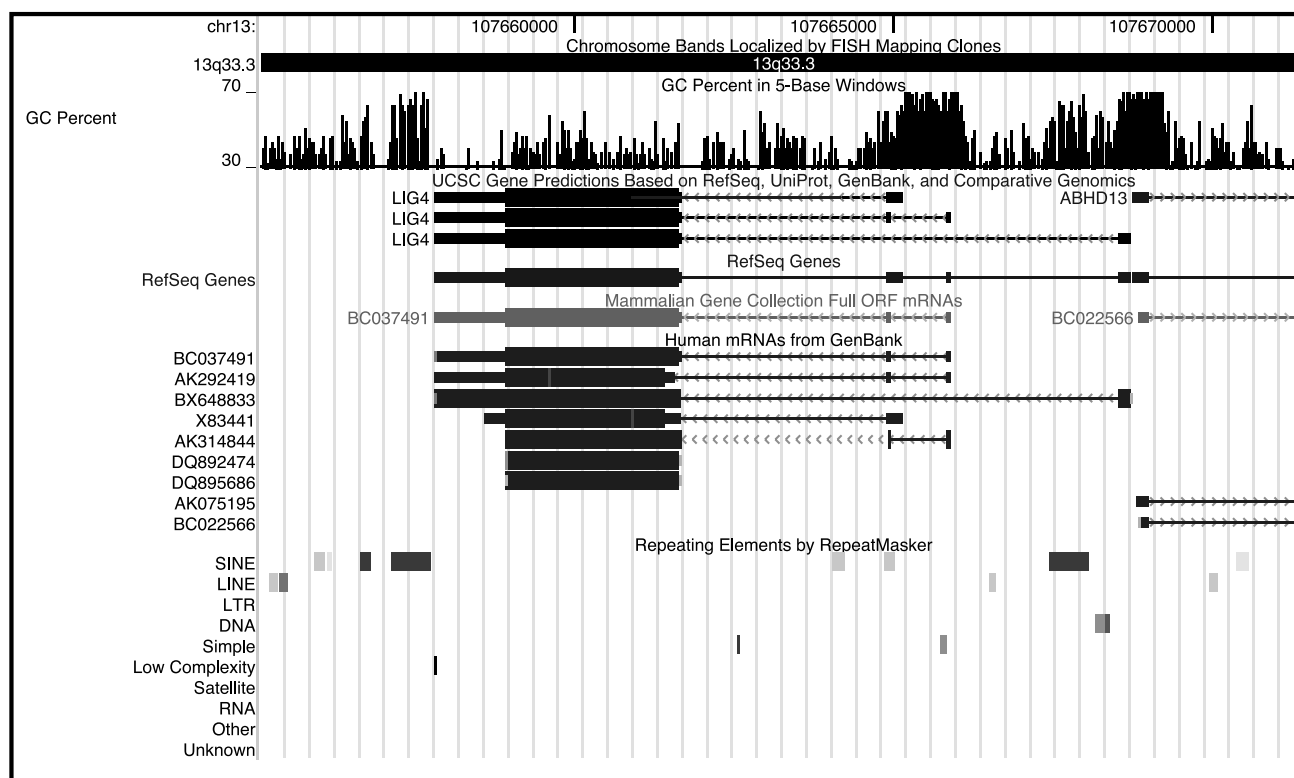


図 1A

図 1 UCSC Genome Browser と Ensembl Genome Browser で取得できる遺伝子構造に関する情報

(A). DNA ligase IV (*LIG4*), (B). ブルーム症候群原因遺伝子 (*BLM*) の UCSC Genome Browser レポート画面 染色体上の位置、領域中の GC 含有率、各種データベースに登録されている遺伝子の一覧、GenBank に登録されている mRNA の一覧、RepeatMasker により検出された反復配列の分布などが表示される。snoRNABase や miRBase に登録されている non-coding RNA や偽遺伝子なども必要に応じて表示させることができる。(C). *BLM* 遺伝子のエクソン/イントロン構造に関する Ensembl Genome Browser レポート画面 各エクソンに対応するアミノ酸領域と、SMART や Pfam などのドメインデータベースに登録されている機能ドメインとの相関がわかる。

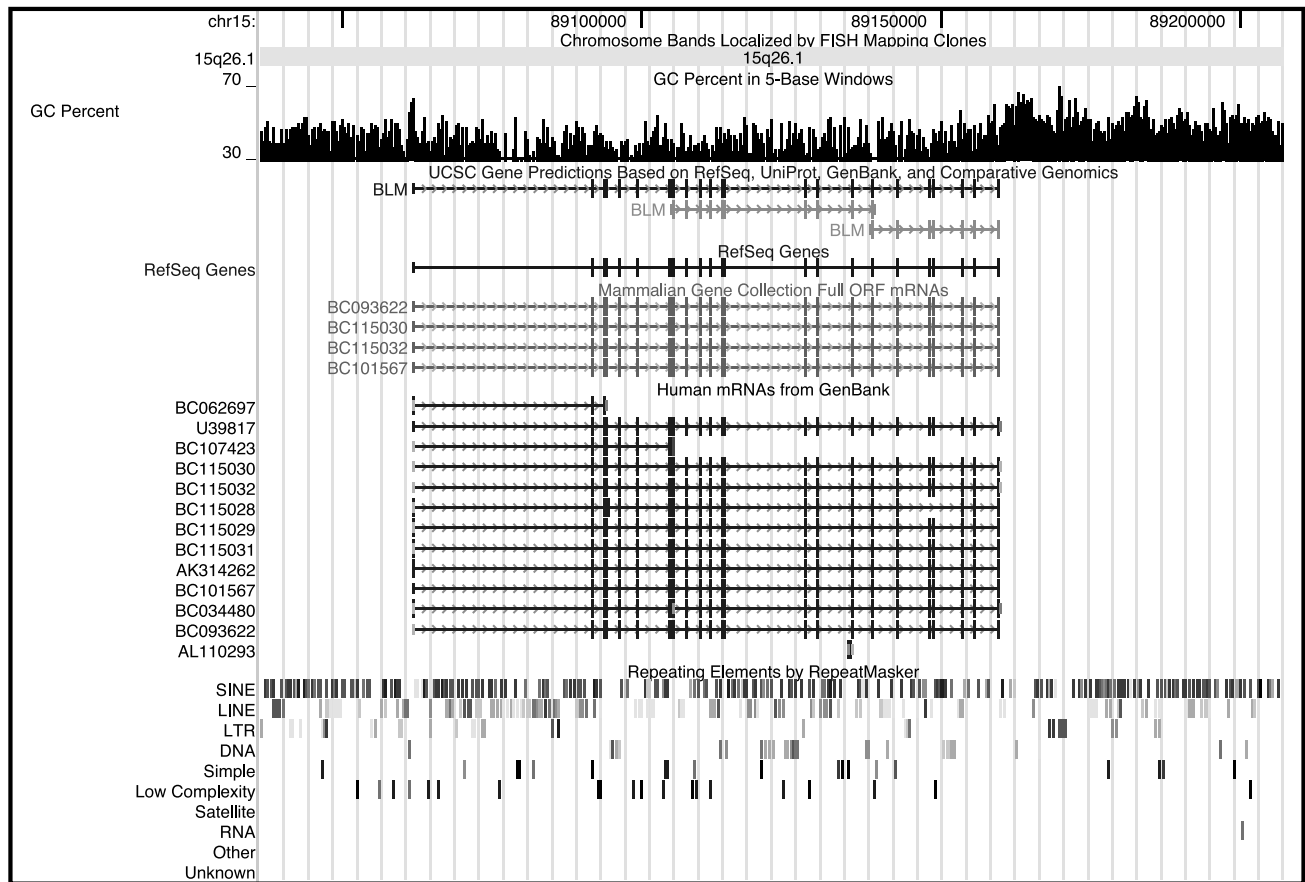


図 1B

ある。次に、ターゲティングストラテジーの立案を行う。HCT116 細胞実験で汎用されているプロモーターレス法も非常に有効であるが⁸⁾、本稿では一般的なポジティブ&ネガティブ選択法により、データベースに登録された既知の遺伝子をノックアウトする方法について述べる。

ストラテジー立案の上で必要となる遺伝子構造に関する情報は、カリフォルニア大学サンタクルーズ校 (UCSC) の Genome Browser (いわゆる Golden Path; <http://genome.ucsc.edu/>) から入手できる。このデータベースの長所は、遺伝子のエクソン/イントロン構造、ORF 領域、バリエーションの種類と構造、遺伝子領域内の GC 含有率や反復配列分布を一目で把握できる点にある (図 1A, B)。特に、反復配列をマーキングする機能はベクターの 5'側および 3'側相同領域 (アーム) を PCR 増幅する際のプライマー設計にたいへん役立つ。また、画面上のゲノム領域の DNA 塩基配列もこのサイトから簡単に入手できる。

遺伝子ターゲティングによってゲノム上のどの領域を破

壊するか (すなわち、どこに薬剤選択マーカーを挿入するか) を検討することは実験上最も重要なステップであるといっていよう。破壊したい遺伝子の開始コドンを除くする方法が最も確実そうだが、ヒトゲノム上の遺伝子の多くは 1 kb に満たない距離で別の遺伝子と隣接しているため¹¹⁾、隣接遺伝子にも少なからず影響を与えてしまう可能性を無視できない。また、ベクターの 5'アームがプロモーター領域にかかりやすくなる (一般に GC 含有率が高いため PCR 増幅が困難である) ことも考えるとあまり好ましい方法とはいえない。遺伝子全体を完全に除去する方法もあるが、未知の non-coding RNA や発現調節領域の存在を考慮すると、必要以上に長い領域を取り除いてしまうのは危険かもしれない。以上の理由から、我々は、ターゲティングによって除去するゲノム領域の長さを 10 kb 以下にし、プロモーター領域近傍のエクソンを取り除かないようにしている。図 1A に示した *LIG4* 遺伝子のように単一エクソンにコードされている遺伝子を標的とする場合は、

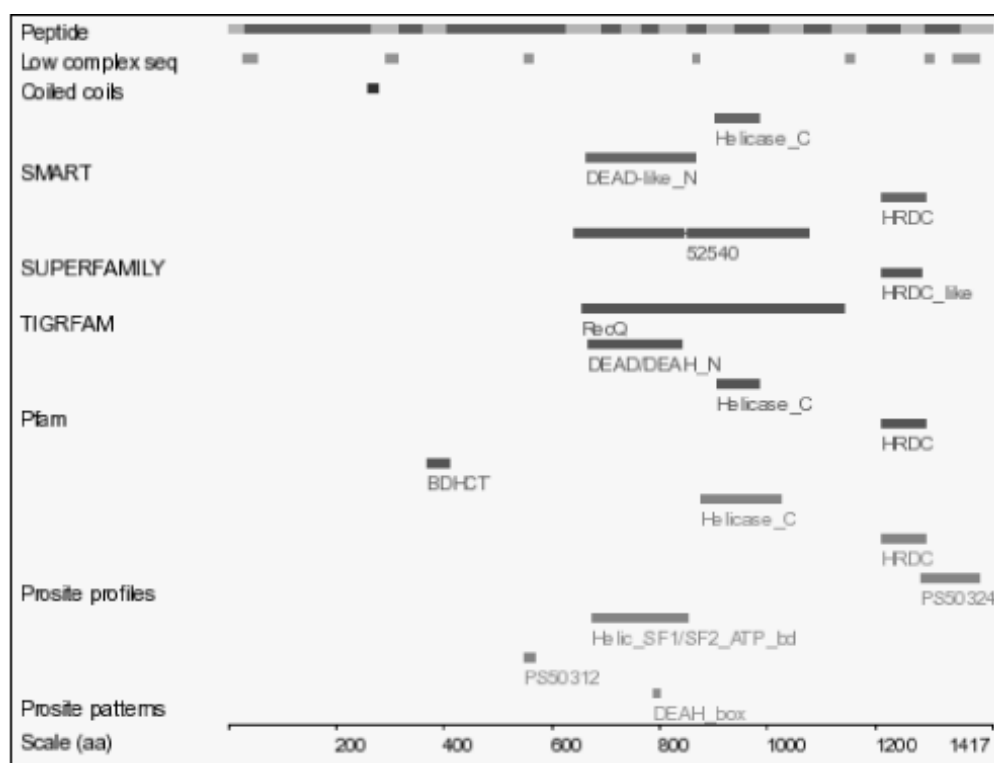


図 1C

ORF のほぼ全長 (*LIG4* の場合, 約 4kb) を除去するのは容易である。しかし, このような構造をとる遺伝子はあまり多くなく, 図 1B に示した *BLM* (ブルーム症候群の原因遺伝子) のように, 遺伝子全長が 100 kb ないしそれ以上に及び, 多数のエクソンが散在している遺伝子のほうがより一般的であろう。こうした遺伝子を効率良くノックアウトするためには, 取り除くゲノム領域を最小限に抑えつつ, 遺伝子機能を完全に損なわせる必要がある。我々はこのような場合, 機能ドメインに相当するエクソンを除去する戦略を採用しており, Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/>) を使ってエクソンと機能ドメインの関係を把握するようにしている。たとえば *BLM* のレポート画面を見ると, 8~12 番目のエクソンにヘリカーゼドメイン (DEAD/DEAH box と記載されている) がコードされていることが一目でわかる (図 1C)。実際, 我々はこうした情報に基づき, エクソン 11~12 をゲノム上から取り除けるよう 5'/3'アームの位置を設定してベクターを構築し, *BLM* 機能を完全に欠損したヒト *BLM* 変異細胞株の作製を行った¹²⁾。

ベクターの両側のアームの長さでターゲティング効率の関係については, アームが長いほど高いターゲティング効

率が期待できると考えられてきたが, それを否定する結果も報告されている (引用文献¹³⁾を参照のこと)。いずれにせよ, 表 1 に示すように, Nalm-6 細胞では 5'/3'アームがともに 2~3 kb 程度の短いベクターでもパーセントオーダーでのターゲティング効率が期待できる。その他, ストラテジーの立案に関して留意すべき点については図 2A にまとめた。

ストラテジーが決まったら, 次にベクター構築を行う。ヒトゲノム配列がウェブ上に公開される以前は, ゲノム DNA 断片のクローニングやマッピングなどの煩雑な作業に多大なる労力と時間を要したが, 現在では PCR により簡便かつ迅速に遺伝子断片を取得することが可能になった。また, 極端に GC 含有率が高い領域でない限り, PCR 増幅に失敗することは極めて稀である。プライマー設計においては反復配列を避けることが肝要であり, 前述した UCSC Genome Browser の RepeatMasker 機能が大変便利である。我々は, PCR による 5'/3'アーム増幅後, 制限酵素処理やライゲーションステップなしに 1 週間前後でベクターを作製している。この手法に関する詳細は発表論文^{10,13)}を参照されたい。

表1 ヒト Nalm-6 細胞における遺伝子ノックアウトのまとめ

遺伝子名	遺伝子産物	ターゲティングベクター				ターゲティング効率(%) [★]		発表論文
		相同領域の長さ (kb)		薬剤選択マーカー		1 st	2 nd	
		5'アーム	3'アーム	1 st	2 nd			
APRT	Adenine phosphoribosyltransferase	3.4	3.3	Hyg	—	6.3 (11/175)	—	So et al., (2006) <i>Genes Cells</i> .
ARTEMIS	Artemis	1.0	2.4	Puro	—	1.0 (1/96)	—	Kurosawa et al., (2007) <i>DNA Cell Biol</i> .
		3.0	3.1	—	Hyg	—	0.33 (1/305)	Kurosawa et al., (2007) <i>DNA Cell Biol</i> .
APTX	Aprataxin	2.6	2.3	Puro	Hyg	1.4 (2/145)	0.65 (1/155)	Unpublished
BLM	Bloom syndrome protein	6.7	2.9	Hyg	His	8.3 (14/168)	1.8 (5/274)	So et al., (2004) <i>J. Biol. Chem</i> .
FANCB [*]	Fanconi anemia complementation group B	3.0	3.0	Puro	—	1.6 (3/192)	—	Nomura et al., (2007) <i>Genes Cells</i> .
HPRT [*]	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	3.8	5.1	Hyg	—	11 (11/100)	—	So et al., (2004) <i>J. Biol. Chem</i> .
INO80	INO80	1.0	2.1	Puro	—	2.6 (2/78)	—	Unpublished
KU70	Ku70	3.9	4.1	Hyg	—	3.8 (3/80)	—	Uegaki et al., (2005) <i>DNA Repair</i>
KU86	Ku86 (Ku80)	2.8	2.3	Hyg	—	8.3 (7/84)	—	Uegaki et al., (2005) <i>DNA Repair</i>
LIG1	DNA ligase I	2.6	3.5	Hyg	—	0.82 (2/243)	—	Unpublished
LIG3	DNA ligase III	3.5	5.0	Hyg	—	1.9 (2/102)	—	Unpublished
LIG4	DNA ligase IV	2.2	2.0	Puro	Hyg	3.4 (3/87)	0.85 (1/118)	Iizumi et al., (2006) <i>Biotechniques</i>
		1.3	1.3	Neo	Puro	1.6 (2/124)	5.0 (1/20)	Grawunder et al., (1998) <i>Mol. Cell</i>
MUS81	MUS81 endonuclease	3.1	2.5	Puro	Hyg	7.0 (7/100)	3.0 (4/132)	Nomura et al., (2007) <i>Genes Cells</i> .
POL β	DNA polymerase β	2.3	5.2	Hyg	Puro	4.2 (3/72)	1.2 (1/86)	Unpublished
RAD54	RAD54	2.5	3.6	Puro	Hyg	3.8 (4/105)	1.5 (2/137)	In preparation
TOP1	DNA topoisomerase I	2.9	4.7	Hyg	—	0.5 (1/187)	—	In preparation
TOP2 α	DNA topoisomerase II α	2.5	4.3	Hyg	—	8.3 (6/72)	—	In preparation
TOP2 β	DNA topoisomerase II β	3.2	4.0	Hyg	Puro	10 (13/126)	1.4 (4/283)	In preparation
TP53	p53	11	0.9	Neo [†]	Hyg [†]	11 (1/9)	7.8 (9/116)	Adachi et al., (2006) <i>DNA Cell Biol</i> . So et al., (2007) <i>DNA Cell Biol</i> . Bunz et al., (1998) <i>Science</i>
WRN	Werner syndrome protein	2.7	2.3	Hyg	Puro	1.6 (2/129)	1.1 (3/282)	In preparation
XRCC3	X-ray repair cross complementing protein 3	1.5	3.0	Neo [†]	—	17 (1/6)	—	Adachi et al., (2006) <i>DNA Cell Biol</i> . Yoshihara et al., (2004) <i>EMBO J</i> .
53BP1	p53 binding protein I	2.3	2.4	Hyg	—	0 (0/120)	—	Unpublished

* X染色体上の遺伝子

† プロモーターレス

* サザン陽性クローン数/解析したクローン数



(A). 遺伝子ターゲティングの模式図. DT-A; ジフテリアトキシン A 遺伝子, *Puro^r*; ピューロマイシン耐性遺伝子, *Hyg^r*; ハイグロマイシン耐性遺伝子を示す. (B). 遺伝子ノックアウトの手順 (左) とスケジュールの一例 (右).

細胞に導入（トランスフェクション）する。我々は、島津製作所の GTE-1（現在市販されていない）や Amasa 社の Nucleofector II 等の遺伝子導入装置を用いて、効率良くト

構築したベクターは、エレクトロポレーション法により

ランスフェクションを行っている。トランスフェクション後、選択薬剤を含む培地中でコロニー形成させ、2~3 週間後にコロニーをピックアップしている（我々の培養条件下では液体培地中での Nalm-6 細胞の倍加時間は約 20 時間）。上述の方法で作製したベクターを用いることでパーセントオーダーでのターゲティング効率が期待できるため、100~200 個のクローンをスクリーニングすればノックアウト株を取得できるケースがほとんどである。各クローンからゲノム DNA を抽出し、まずゲノミック PCR によって組換え体のスクリーニングを行う。すなわち、5' ないし 3' アームの外側の遺伝子領域中に設計したプライマーと、ベクターの *loxP* 配列の外側に設定したユニバーサルプライマーを用いて PCR を行うと（図 2A）、ベクターがゲノム中のランダムな位置に挿入されたクローンでは増幅が起こらず、ターゲティングされたクローンでのみ増幅が起こる。ただし、全ての PCR 陽性クローンで正しくターゲティングされているとは限らないため、さらにそれらクローンについてサザンおよびウェスタン解析を行い、きちんとターゲティングされていることを確認する必要がある。図 2B に一例を示したように、我々は、ベクター作製からここまでの過程を、最短 2 ヶ月間以内で行っている。ベクター中の薬剤選択マーカーは *loxP* 配列で挟んであるため、細胞中で Cre リコンビナーゼを一過性に発現させることで容易に除去できる。ダブルないしトリプルノックアウト株の作製を目指す場合には、この操作を行っておけば同じ薬剤選択マーカーを再利用することができる。トランスフェクションやコロニー形成、スクリーニング法に関する詳細については発表論文^{10,13)}を参照されたい。

お わ り に

近年、ノックアウトに代わりうる簡便な遺伝子機能解析ツールとして RNA 干渉法が大変重宝されている。しかしながら、RNA 干渉法では標的遺伝子の機能を完全に抑制することは不可能であり、遺伝学的に疑いようのないデータを得られるノックアウト実験は今後も遺伝子機能解析におけるスタンダードな手法であり続けるだろう。

DT40 細胞の逆遺伝学で著名な京都大学の武田俊一博士らは、2003 年に編纂した著書において「10 年以内にヒト細胞株でもニワトリ DT40 細胞のように遺伝子ノックアウトが容易にできるようになる」と述べている¹⁴⁾。本稿で紹介したヒト Nalm-6 細胞は、現時点では認知度や汎用性において DT40 細胞には及ばないものの、数年後には「ヒト遺伝子ノックアウト実験のモデル細胞」として世の中に広

く認知されているかもしれない。無論そのためには、本稿で概説したノックアウトシステムをさらに整備・改良し、より汎用性を高めていく必要があるだろう。また、ヒト細胞の逆遺伝学とその医療応用という観点からも、Nalm-6 という特定の細胞だけでなく任意のヒト細胞に適用可能な簡便で高効率な遺伝子ターゲティング技術の開発が急務の課題である。

本稿で紹介した Nalm-6 を用いた遺伝子ターゲティング法は、小山秀機博士（前横浜市立大学教授）および、曾彩玲博士（現テキサス大学サウスウエスタン医学センター研究員）をはじめとする多くの大学院生らの尽力のもとにしが得たものである。この場を借りて深い感謝の意を表したい。

- 1) Grimm, D. (2006) *Science*, **312**, 1862-1866.
- 2) Yanez, R.J. & Porter, A.C. (1999) *Gene Ther.*, **6**, 1282-1290.
- 3) Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., & Vogelstein, B. (1998) *Science*, **282**, 1497-1501.
- 4) Shirasawa, S., Furuse, M., Yokoyama, N., & Sasazuki, T. (1993) *Science*, **260**, 85-88.
- 5) Grawunder, U., Zimmer, D., Fugmann, S., Schwarz, K., & Lieber, M.R. (1998) *Mol. Cell*, **2**, 477-484.
- 6) Hurwitz, R., Hozier, J., LeBien, T., Minowada, J., Gajl-Peczalska, K., Kubonishi, I., & Kersey, J. (1979) *Int. J. Cancer*, **23**, 174-180.
- 7) Wlodarska, I., Aventin, A., Ingles-Esteve, J., Falzetti, D., Criel, A., Cassiman, J.J., Mecucci, C., Van den Berghe, H., & Marynen, P. (1997) *Blood*, **89**, 1716-1722.
- 8) Adachi, N., So, S., Iiizumi, S., Nomura, Y., Murai, K., Yamakawa, C., Miyagawa, K., & Koyama, H. (2006) *DNA Cell Biol.*, **25**, 19-24.
- 9) So, S., Adachi, N., & Koyama, H. (2007) *DNA Cell Biol.*, **26**, 517-525.
- 10) Adachi, N., Kurosawa, A., & Koyama, H. (2008) *Methods Mol. Biol.*, **435**, 17-29.
- 11) Adachi, N. & Lieber, M.R. (2002) *Cell*, **109**, 807-809.
- 12) So, S., Adachi, N., Lieber, M.R., & Koyama, H. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 55433-55442.
- 13) Iiizumi, S., Nomura, Y., So, S., Uegaki, K., Aoki, K., Shibahara, K., Adachi, N., & Koyama, H. (2006) *Biotechniques*, **41**, 311-316.
- 14) 柴田武彦, 武田俊一, 花岡文雄編 (2003) ゲノム修復と組換え, pp. 97-108, シュプリンガー・フェアラーク.

飯泉 晋, 足立 典隆

(横浜市立大学大学院国際総合科学研究科)

Gene targeting in cultured human cells

Susumu Iiizumi and Noritaka Adachi (International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University, 22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0027, Japan)