

サブテーマ名：B 相同組換えによる高速ゲノム進化法の開発

小テーマ名：B1 相同組換えの頻度増大と高速ゲノム進化への応用

フェーズ I<2-a>

[概要]

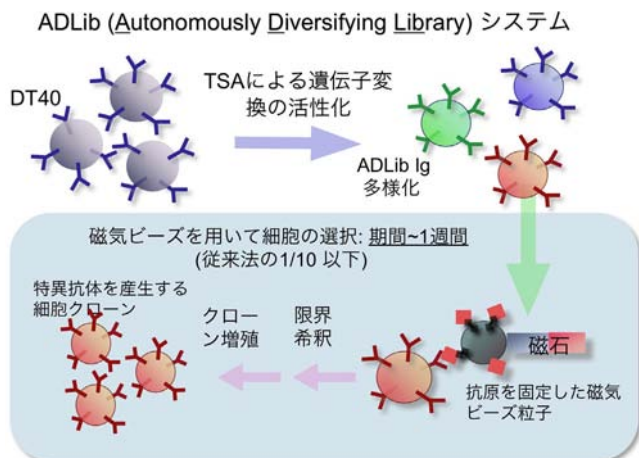
有性生殖は相同組換えによる遺伝情報再編成過程であり、突然変異とともに進化の重要な機構である。生体において、有性生殖の原理を用いた人為的ジーンコンバージョン型相同的組換えの超高頻度誘導で、突然変異などで多様化した DNA 配列間のシャッフルを行う。この手法で遺伝子を高速進化させる技術を開発することに成功した。

(1)人為的ジーンコンバージョン型相同的組換えの超高頻度誘導による遺伝子高速進化の一例として、よく似てはいるが多様化した単位の繰り返し配列群のそれぞれの部分を抗体可変領域遺伝子座へ写し取る形のジーンコンバージョンですべての抗原に対する抗体の

産生が行われるニワトリの系に注目した。そのBリンパ球細胞由来の株化細胞DT40の抗体遺伝子座におけるジーンコンバージョンを活性化して抗体遺伝子の多様化を促すことにより、任意の抗原に対する特異性を保持するモノクローン抗体分子を迅速に作製するADLibシステムを確立した。ADLibシステムにより、診断・試験・治療用のモノクローン抗体試薬の高速創製技術の中核を提供した。

(2)アカパンカビを実験材料として、非相同的DNA末端結合(NHEJ)を抑制することで細胞外から導入したDNAのゲノムDNAへの非特異的組み込みを抑制することで、相同DNA組換えによる遺伝子ターゲットを実現する目的で、相同組換え、非相同組換えに経路制御に関係する遺伝子の単離と機能解析を行った。その結果を基に、高速遺伝子進化のより効率化を図った。

(3)減数分裂期におこるRIP(Repeat induced point mutations)は高頻度標的突然変異導入ができる赤パンカビ特有な遺伝現象である。それに関わると考えられる遺伝子の同定と機能解析を行う試みをおこなったが、次の遺伝子ターゲット技術開発が軌道に乗ったので、この課題は中断した。



[フェーズ I の研究成果] :

(1)ニワトリ B リンパ球細胞由来の株化細胞 DT40 による特異抗体作製システム :

これまでの基礎的な研究成果をベースに、ニワトリ B 細胞由来の培養細胞 DT40 をヒストン脱アセチル化阻害剤トリコスタチン A (TSA) で処理する実験を行ったところ、25 個のタンデムに整列する偽抗体遺伝子群と抗体遺伝子座間で生じる組換え (ジーンコンバージョン) が数十倍以上に顕著に促進されることを見出した。この処理を数週間行くと、抗体産生細胞はほぼ 100% 近く多様化を起し、また抗体遺伝子座の配列解析の結果、それぞれの多くが異なる配列を持つことが明らかになった。次に、このような *de novo* に獲得されたレパートリーを持つ抗体産生細胞群をライブラリーとして利用し、任意の抗原に対するモノクローナル抗体作製技術の開発を進めた。DT40 細胞は細胞表面に膜結合型 IgM を発現しており、これを介して目的抗原を結合した磁気ビーズで選択を行うと、特異的モノクローン抗体が迅速に (1 週間程度) 得られることが判明した (*Nature Biotech.*, 2005; *Nature Protocols*, 2006) (上図参照)。

本技術は、抗体医薬などで重用されるモノクローナル抗体の作製期間を従来の 10 分の 1 程度まで短縮化できる上、これまで入手困難な抗体の獲得も可能になるなど多くの利点がある（右表参照）。本技術は理研ベンチャーである株カイオム・バイオサイエンスを通じて事業化が進められており、既に種々の企業・大学に製品を提供している。本技術は国内外の各方面から高い評価を受けており 2007 年度 Invitrogen-Nature Biotechnology 賞（ベンチャー部門）、同年の東京都ベンチャー技術大賞優秀賞、平成 19 年度文部科学大臣表彰・科学技術賞（研究部門）などの賞を受けている。

	ADLib system	従来方法 マウス・ モノクローナル抗体	ファージディスプレイ 法
● 抗原量 (含ELISA用)	100-10 μ g	mg-100 μ g	数百 μ g
● スピード	1-2週間	2-6ヶ月	>10週間
● 高付加価値化	自己抗原・毒素など困難抗原へ適用可	不可	自己抗体、 抗毒素抗体が可能
● 抗体の形状	完全抗体(IgM) (入手後B細胞内で自在に加工可能)	完全抗体	ファージ粒子
● 自動化	可能	不可	可能
● 施設・設備	通常実験室で十分	動物飼育施設が必要	組換えDNA実験可能な実験室

耐熱性制限酵素を用いて、ゲノムワイドに相同組換えを活性化するシステムを構築した。

(2)アカパンカビでの相同組換え誘導、及びRIP現象を利用した高頻度突然変異誘導

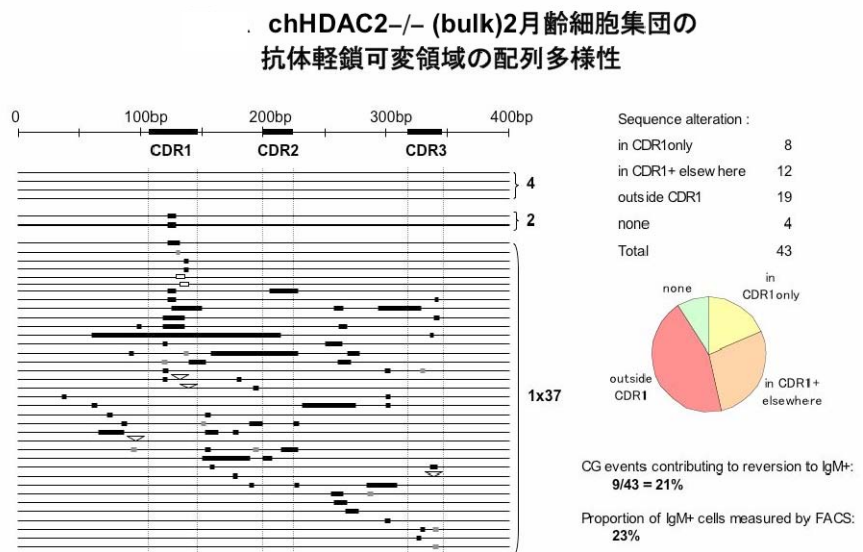
減数分裂期に起こるRIP (Repeat Induced Point mutation) 現象は、ゲノム中に同じ塩基配列が2つ以上存在した時に、その塩基配列相同性をもとに、両方に塩基配列のシトシンに高頻度メチル化がおり、そのメチル化シトシンが脱アミン化されることでAT⇒GC型の変異が高頻度におこり、その配列が含まれる両方の遺伝子の機能を失わせるアカパンカビ特有の遺伝現象である。この利用で、標的遺伝子に高頻度突然変異を導入できる。これを制御できれば特定の遺伝子に高頻度で突然変異を誘導でき、高速進化に応用できる。そこでRIPに働く可能性のあるゲノム中の4個のシチジンデアミナーゼ遺伝子の内2個を破壊し、RIPに対する効果を調べた。ところが、これらとRIP現象との関係を確認する事はできなかった。残りの2個の解析を行なうことで、RIPに必要なシチジンデアミナーゼを明らかにできる可能性が残っていたが、NHEJ抑制による遺伝子ターゲット技術実現の見通しがついた時点でそちらに集中するためにこの課題は中断した。

一方、NHEJに関わるKU遺伝子破壊株を作製し、相同的組換え頻度の増加を狙った。その結果、KU遺伝子破壊株は野生型と比較して、著しく高い相同組換え頻度を示した。この結果より、非相同末端結合を抑制する事によって、相同組換え依存の標的組換え体が得られるという新しい技術を実現する事ができ、今後ゲノムシャフリング等への応用が期待できると考えフェーズIIでさらなる展開を図った。

[フェーズ II の研究成果]:

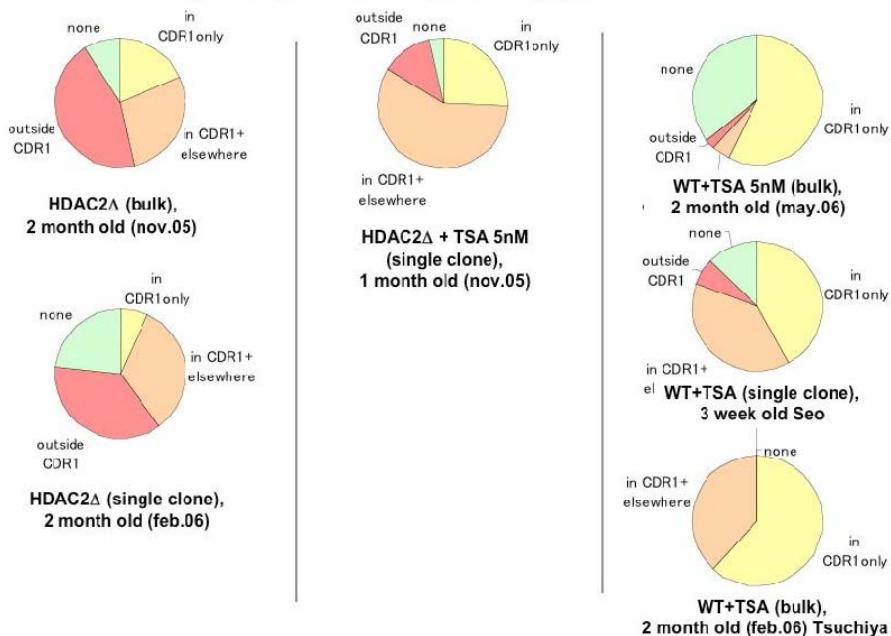
(1)ニワトリBリンパ球細胞による特異抗体作製システム:

フェーズIIでは、上記のADLibシステムの課題を克服した新たな技術開発を進めた。これまでの解析から、トリコスタチンA処理では、抗体可変領域の一部(超可変領域1; CDR1)にのみ選択的にジーンコンバージョンが生じ、超可変領域2 (CDR2)



や超可変領域3 (CDR3) については、ジーンコンバージョンがほとんど観察されないという課題が存在することが判明していた。3つ存在する超可変領域の全てで配列が変化していた方が、

chHDAC2^{-/-}、chHDAC2^{-/-} + TSA、野生型 + TSA細胞集団における配列多様化部位の各超可変領域での比率



より多様なレパートリーの拡大効果が得られ、抗体の特異性や親和性の向上をもたらすと推測される。そこで、トリコスタチンA処理以外の方法を併用することで、抗体遺伝子座における体細胞ジーンコンバージョンの起きる範囲を拡大し、より多様なレパートリー拡大を図った。

具体的な方法としては、ヒストン脱アセチル化酵素の一つであるHDAC 2に着目し、DT40細胞の持つ特質である高頻度遺伝子ターゲティングを用いて、この遺伝子のノックアウト株を作製し、これによる抗体遺伝子の多様化を図った。この方法では、従来のTSA処理とは異なり、CDR2やCDR3の領域にも遺伝子配列の変異が導入できるようになった(前頁の図)。また、この方法で多様化を行ったDT40細胞ライブラリーを用いて、ADLibシステム同様の磁気ビーズを用いた工程を行うと、抗体が作製できることも確認した。

西垣グループと共同で、ゲノムプロファイリング手法を用いて、抗体遺伝子座の多様化を迅速にモニターする系のプロトタイプを構築した。また、保存抗原や糖脂質、ペプチドや低分子化合物に対するモノクローナル抗体をADLibシステムで作製した。また、免疫染色が可能な抗体の作製や、中和活性を持つ抗体の作製にも成功し、ADLib法で作成した抗体が、従来法で得た抗体と遜色なく利用できることを実証した。

抗体は、安全性が高い医薬として期待されている。その利用目的には、得られたトリ型抗体をヒト型にする必要がある。そこで、カイオム・バイオサイエンスでは、抗体のFc部分をマウスIgGに置き換えて、IgG型キメラマウス抗体に転換する技術を開発した。また、独自にヒト化や高親和性技術開発も行った。

(2)アカパンカビでのNHEJ抑制を利用した遺伝子ターゲット技術

DNA二本鎖切断の修復過程は相同組換えと非同源末端結合 (NHEJ) の2つの機構からなる。相同組換えも非同源末端結合も共にMRXタンパク質複合体が切断部位に結合する過程から出発するがその後はそれぞれの系に独自のタンパク質が修復過程を進行させる(右図)。相同組換えに関わるRad51タンパク質は種々の生物で高度に保存されており、出芽酵母では

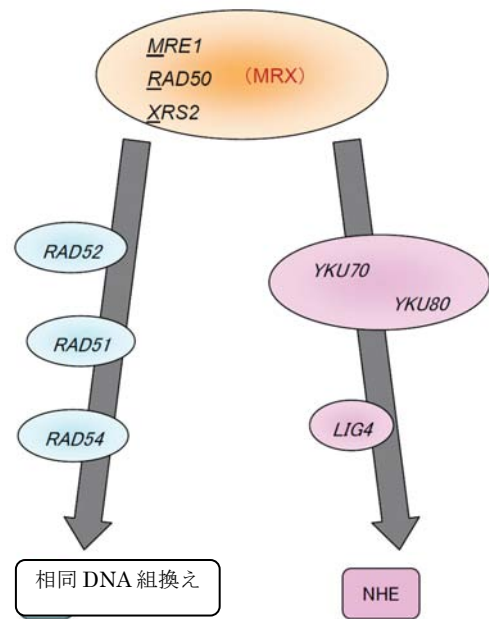
ゲノムに相同配列を持つDNAを外部から導入すると、Rad51を介した機構によって、そのDNAはゲノムの相同部分へ非常に効率よく挿入される。従って酵母において遺伝子破壊法は極めて容易である。一方、他の真核生物の多くはRad51を持っているにも関わらず、細胞外からのDNAのゲノムへの相同的な挿入は極めて低い頻度でしか起きない。実験に使ったアカパンカビでも数%から10%程度でしか相同部分への組み込みが起らない事が確認されている。遺伝子ターゲットの効率化を狙った多くの実験は、相同組換えに働くRad51、Rad52などのタンパク質の過剰発現によって相同部分への組み込みの頻度を上昇させること期待したが、思うような成果は得られていない。

我々は逆に非相同組換えで働くタンパク質の活性を抑えることで相同組換え機能が活かせるのではないかと考え、この機構に関わるKu70、Ku80タンパク質のアカパンカビのホモログ遺伝子を破壊した株を作製し、これを宿主として遺伝子導入実験を行った。結果は驚くべきことに100%が相同

部分へ組み込まれていた。ターゲット対象として様々な遺伝子を使った実験でも同じ結果が得られた。また遺伝子ターゲットに用いたDNAの相同長は当初約2 kbであったが、さらに検討した結果1 kbでも十分であり、数百bpではターゲット効率は著しく低下した。

さらに有効な実験系を作成するため、やはり非相同末端結合でのみ働くLig4の遺伝子を破壊し同様な実験を試みた。その結果、100bpほどの相同領域を持ったDNAでも、形質転換頻度は著しく低下するものの、相同部分への組み込みの割合は100%の効率であった。さらに他の非相同末端結合に関わる遺伝子、XRCC4/Lif1、Lif2などの破壊も同様の結果を示した。

このように非相同組換えを抑えることで遺伝子ターゲット効率を飛躍的に上げる試みは、我々の研究結果が発表されて以降、様々な生物で行われてきた。特にコウジカビの仲間での実験は応用と結びついているため国内、国外で盛んに試みられ、多くの論文としての成果が現れ始めている。ゲノム解析が終了した今日、予想される遺伝子の機能の解析にはこの遺伝子ターゲットによる遺伝子破壊は最も期待される実験法の一つである。



[今後の展開] :

(1)ニワトリBリンパ球細胞による特異抗体作製システム :

実際に創薬ターゲットになる抗原に対する抗体を獲得し、製品化に結びつくようなシーズを獲得することが重要である。現在この点については、文部科学省の都市エリア研究のサポートや、域内の医療機関や研究期間の支援を受け、本事業の第3フェーズ研究としての展開を見せている。

(2)アカパンカビでの相同組換え誘導、及びRIP現象を利用した高頻度突然変異誘導

アカパンカビでの実験はさらに、他の遺伝子による置換、また標的点突然変異導入、ある遺伝子群の一括削除などに利用できる。アカパンカビはモデル生物であり、すぐ事業と結びつかないが、この方法がカビの研究一般に多大の貢献をしている。この遺伝子ターゲット技術の基本は二本鎖切断修復機構の解明からきている。コウジカビでの実験ではKu破壊による遺伝子ターゲット率は不安定である。共同研究者の五味（東北大学）によれば、Lig4変異株（コウジカビではLigD）を使えば、ほぼ100%成功するという。一方、高等植物、動物での非相同末端結合破壊株での効率のよい遺伝子ターゲット成功の報告はない。現在、担子

菌でも非相同末端結合関連遺伝子の破壊を試みている。これからは基礎的な実験はアカパンカビで、事業化を考える実験はコウジカビあるいは担子菌という方向で研究を進める予定である。