

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
サブテーマリーダー：(独) 理化学研究所、上席研究員、○柴田 武彦 (○:小テーマ代表者) 研究従事者：(財) 埼玉県中小企業振興公社、雇用研究員、Lin Waka、廣田 耕志 (財) 埼玉県中小企業振興公社、雇用技術員、中村 晃歩、升岡美恵子、小泉 文乃 (独) 理化学研究所中央研究所、客員主管研究員、太田 邦史 (株) カイオム・バイオサイエンス、研究員、瀬尾 秀宗 埼玉大学大学院理工学研究科、教授、井上 弘一、准教授、田中 秀逸、講師、畠山 晋 博士前期課程、石橋 和真、高倉 千裕、荻原 杏子
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要：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、進化の加速機構である。有性生殖の原理を用いた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い、遺伝子を高速進化させる技術を開発する。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● その一例として、よく似てはいるが多様化した単位の繰り返し配列（偽遺伝子）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かたち型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獲得免疫系に注目する。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もつモノクローナル抗体分子を迅速に作製するシステムを確立し、診断・試験・治療用のモノクローナル抗体試薬の高速創製技術を提供する。</li> <li>● 減数分裂期におこるRIPは、2つ以上の同じ塩基配列が存在すると高頻度標的突然変異がおこる赤パンカビ特有な遺伝現象である。RIPを普遍的な高頻度標的変異導入技術として利用することを目的として、RIPに関わる遺伝子の同定と機能解析を行う。また、外来DNAは、染色体DNAと相同性があっても、そのほとんどが非相同末端結合（NHEJ）で不定箇所に取り込まれてしまう。そこで、NHEJを抑え、相同組換えを活性化して塩基配列相同性で指定したゲノムの特定遺伝子座へ組み込む技術を開発する。特にNHEJに働く遺伝子Ku70、Ku80、Lig4、LiF1、Lif2のそれぞれの破壊株を作成し、相同DNA組換え率を高め、高速遺伝子進化の効率化を図る。</li> </ul> <p>②研究の独自性・新規性：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 抗体遺伝子座における相同組換えの活性化を図り、自在かつ高速に抗体をデザインする手法（国際特許出願中）は、世界においても類例を見ない。さらに、超高頻度相同DNA組換えを人為的に誘導・抑制制御することを核にした産業技術としても最初のものである。</li> <li>● 体細胞では、相同DNA組換えの1000倍も高い頻度でおこり、相同DNA組換えの結果をマスクしてしまうNHEJ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効率化するという技術は世界で初めてである。</li> </ul> <p>③研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 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1）ニワトリBリンパ球細胞DT40細胞の組換え頻度を数十倍増大させ、全細胞集団の50%以上を組換え体にする技術を確立する。 （フェーズ2）上記により多様化した抗体遺伝子を持つ細胞群から、任意の抗原に対して特異的に結合性を示すモノクローナル抗体(IgM)を1-2週間で入手する手法を確立する。 （フェーズ3）抗体産生細胞株の安定化や、ヒトやマウスIgG型への転換を通じ、事業化に向けた要素技術を確立する。また、病原体中和活性などの生理機能を有する抗体を作製する。</li> <li>● アカパンカビでの高頻度突然変異、相同組換え誘導： （フェーズ1）RIPに関わる遺伝子の同定と、非相同組換え機構の破壊による相同組換え依存遺伝子ターゲット法の開発を行う。 （フェーズ2）この系を、任意に操作する技術を探る。非相同組換えを抑えた株を使うことで、遺伝子破壊や遺伝子の置換など、随意に細胞内の遺伝子を操作する技術を開発する。</li> </ul>
<p>研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 抗体生産では、基本計画通りか、またはそれ以上の進捗が見られた。当初設定した研究目標はほぼ全て達成し、事業化への展開や、新たな技術シーズの獲得など、予想以上の進展が得られた。</li> <li>● 赤パンカビでは、RIPの解析については進まず、中断したが、NHEJに関わるとされる遺伝子のほとんど全てを同定、分離し、突然変異株を作成し、相同DNA組換えによる遺伝子ターゲット効率を測定した。それらの全てにおいて遺伝子ターゲット効率が著しく高くなることを確認した。</li> </ul>

主な成果

具体的な成果内容：

- 抗体生産では、ニフトリDT40細胞の抗体遺伝子シャプリングのTSA処理による活性化系を用いて、迅速な生体外モノクローナル抗体作製技術(ADLib法)を構築した。従来は抗体の獲得が困難であった脂質や種間で保存されたタンパク質などに対するモノクローナル抗体の作製に成功した。ある種の中和活性を示す抗体の獲得にも成功した。
- HDAC2遺伝子を破壊することで、TSA処理とは異なるパターンの抗体遺伝子の多様化に成功。
- 耐熱性制限酵素を用いた相同組換え活性化系についても、特許出願や実用化への展開を行った。
- 赤パンカビを含む糸状菌で、KUなどのNHEJ関連遺伝子を破壊し、その株を宿主とすることで遺伝子ターゲット効率が実用レベルまで上昇することを確認した。アカパンカビにおける研究結果が広く他の糸状菌に応用できたことでモデル生物としての価値を高めた。

特許件数：11件 論文数：10件 口頭発表件数：26件

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

- 抗体生産については、ADLibシステムは世界に先駆けて本邦で開発された新世代の生体外抗体作製技術である。この技術は欧米で開発された従来法に比べ、作製にかかる期間が1/10、必要とされる抗原量も1/10程度ですむ。また、生体外抗体作製系であるため、個体自身の抗原と類似しているため免疫寛容により抗体ができにくい抗原や、毒性をもつ抗原などにも適用可能などの、多数のメリットを持つ。2006年Invitrogen-Nature Biotechnology Award (Venture部門)、平成18年東京都ベンチャー技術大賞優秀賞、平成19年文部科学大臣表彰科学技術賞を受賞している。
- 赤パンカビで成功した相同DNA組換えによる遺伝子ターゲットの頻度を実用レベルまで引き上げる技術は、国内外で種々の糸状菌で試され成功例が報告された。発表論文の引用回数は50を超えつつある。いくつかのポストゲノムのプロジェクトがこの研究結果を受けて行われている。

2 実用化に向けた波及効果

- ADLibシステムについては、従来の抗体作製法でカバーできなかった抗原への適用や、迅速性などの特長を生かし、(株)カイオム・バイオサイエンスを通じて事業化が既に進んでいる。売り上げ実績は、累計で3千万以上となっており、今年度は5千万円レベルに到達する予定。
- 耐熱性制限酵素を用いた組換え活性化システムについては、エネルギー増産に関わる技術開発に関する大手企業との共同研究に発展している。
- アカパンカビで開発したNHEJ抑制による高率遺伝子ターゲット方法を使って、コウジカビなどでは、ゲノム改変の研究が進んでおり、この技術を用いた品種改良などが行われている。

残された課題と対応方針について

- 抗体生産では、ライブラリーのさらなる多様化を行うことで、抗体作製の成功率が向上できると予測される。そのためには、抗体遺伝子の再編成機構についてもさらに解析を行い、その基礎研究成果をふまえてさらなる技術改良を行う必要がある。
- 赤パンカビでは、MRX複合体（2本鎖切断の最初の修復ステップで働くタンパク質複合体）が相同、非同相組換えで働くのか、また遺伝子ターゲットにどのような効果があるのかの解明が残っている。また、キノコが同じ仕組みでターゲット効率を上げられるかどうかの研究が残されている。現在、*Ustilago*及び*Phanerochaete*を用いて遺伝子ターゲットのための仕組みを構築中である。

	J S T 負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合 計
	H 14	H 15	H 16	H 17	H 18	H 19	小計	H 14	H 15	H 16	H 17	H 18	H 19	小計	
人件費		16,600	17,676	17,099	13,725	4,341	69,441	493	9,711	9,750	12,850	6,750	1,267	40,821	110,262
設備費							0							0	0
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)		6,002	8,534	14,930	20,618	8,266	58,350		8,150	10,000	14,900	15,500	5,000	53,550	111,900
旅費		324	253	447	330	54	1,408				50	20		70	1,478
その他		876	918	1,300	1,302	470	4,866	24,338	582	582	1,163	1,163	873	28,701	33,567
小 計	0	23,802	27,381	33,776	35,975	13,131	134,065	24,831	18,443	20,332	28,963	23,433	7,140	123,142	257,207

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む] 特記するもの無し。

※複数の研究課題に共通した経費については按分する。