

Press Release

報道解禁：日本時間 2024 年 6 月 18 日 18 時・19 日朝刊

文部科学記者会・科学記者会 同時発表

2024 年 6 月 18 日
横浜市立大学

相同組換えに依らない新たなゲノム編集メカニズムを発見

横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 分子生物学研究室の足立典隆教授と斎藤慎太助教は、これまで知られていなかった新たなゲノム編集メカニズムを発見し、その特性と制御機構の一端を明らかにしました。本研究の成果は、今後のゲノム編集研究や DNA 修復研究に重要な示唆を与えるだけでなく、医療上有用なヒト細胞における正確かつ効率的なゲノム編集につながることで期待されます。

本研究成果は、国際科学雑誌「Nature Communications」に掲載されます。(日本時間 2024 年 6 月 18 日 18 時)

研究成果のポイント

- 相同組換えに依存しない遺伝子ターゲティング機構が存在する。
- この反応は、DNA 配列の相同性が 100% でなくても起こる。
- 相同組換えと異なり、この反応は細胞周期を通じて起こる。

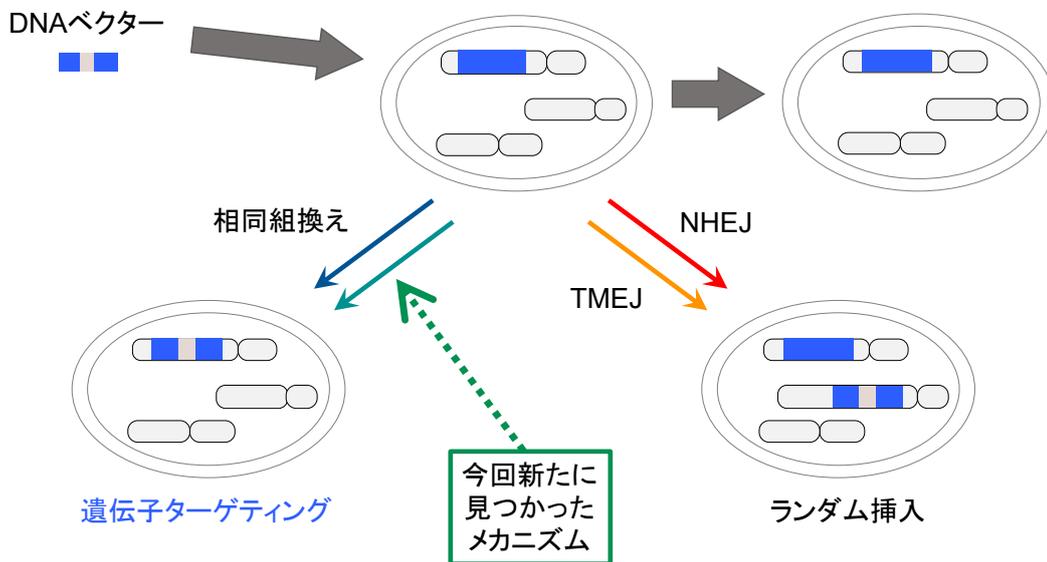


図1 DNAベクターを細胞に導入した際に起こる反応

細胞にベクターを導入すると NHEJ または TMEJ によって稀にランダム挿入が起こる。DNA の相同性を介した遺伝子ターゲティング反応はさらに低い頻度でしか起こらない。

Press Release

報道解禁：日本時間 2024 年 6 月 18 日 18 時・19 日朝刊

研究背景

DNA ベクターを細胞に導入すると、ゲノム中のランダムな場所に挿入されることがあります [1]。こうしたランダム挿入反応にはエンドジョイニングと呼ばれる機構（NHEJ と TMEJ）が関わっており、いずれも DNA 配列の長い相同性を必要としません [1, 2]。一方、ゲノム DNA と相同な配列をもつベクターを細胞に導入すると、効率はとても低いものの、相同な DNA 配列を利用した組換えによりゲノム DNA 中の狙った位置にベクターを挿入することができます。これを遺伝子ターゲティングと呼び、目的とする遺伝子を破壊・改変したり、強制発現させたい遺伝子をロックインすることができます。

これまで遺伝子ターゲティングは Rad51 というタンパク質に依存した相同組換えによってのみ起こると考えられてきました。相同組換えは細胞周期の S 期～G2 期（つまり DNA 複製後）でしか機能しないため、非増殖細胞で遺伝子ターゲティングを行うのは不可能と信じられてきました。また、遺伝子ターゲティング反応は DNA の相同性に依存しており、DNA 配列間に少しでもミスマッチがあると著しく頻度が低下するという技術的な問題もありました。

研究内容

今回、足立教授と斎藤助教は、相同組換えを欠損したヒト細胞で稀に起こる遺伝子ターゲティング反応の存在を明らかにし、(1) この反応が Rad51 非依存性であること、(2) Rad52 と呼ばれるタンパク質が関わっていること、(3) ゲノム DNA と相同な配列をもつ DNA ベクターに変異を入れても全体の 5% のミスマッチであれば許容する（つまり、20 塩基対ごとに 1 箇所ミスマッチが存在していても頻度が低下しない）ことを突き止めました。また、特殊な CRISPR/Cas9 システム（DNA 中の狙った場所を切断できる）を構築して解析を行ったところ、相同組換えとは異なり、Rad51 非依存性の遺伝子ターゲティングは細胞周期の G1 期、つまり DNA 複製前の状態の細胞でも起こることがわかりました。実際、増殖スピードがとても遅い細胞でも遺伝子改変が可能であり、この反応は Rad51 非依存性でした。

遺伝子ターゲティングに 2 つの異なるメカニズムが存在することがわかったため、足立教授と斎藤助教は、これらが細胞内でどのように制御されているのかを引き続き解析しました。その結果、これまで遺伝子ターゲティングの促進因子として知られていた「① ゲノム DNA 中のターゲット部位での切断」、「② BLM と呼ばれる DNA 巻き戻し酵素の阻害」のいずれもが Rad51 依存性・非依存性反応の双方を促進していることが判明しました。さらに、Rad51 非依存性反応の頻度は通常とても低いものの、上記の①、②および別の "リミッター" を外す（つまり Msh2 タンパク質を除去する）ことで、その頻度が Rad51 依存性反応と同レベルにまで上昇することが明らかになりました。

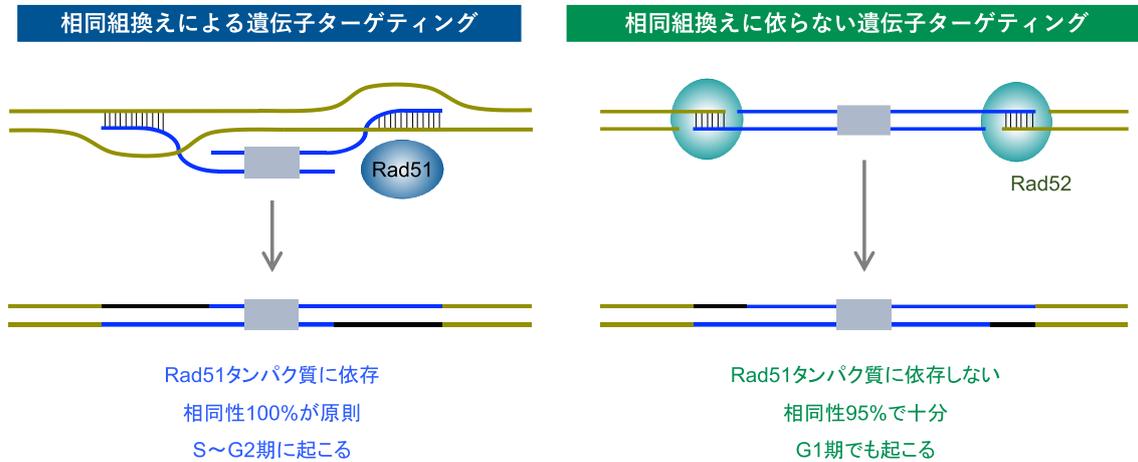


図2 Rad51 依存性および非依存性遺伝子ターゲティングの特徴の比較

今後の展開

ゲノムを自在に改変する技術はさまざまな面で脚光を浴びており、その注目度や科学的重要性の高さは 2020 年のノーベル化学賞 (CRISPR/Cas9) や 2007 年のノーベル医学生理学賞 (遺伝子ターゲティングとノックアウトマウス) からもうかがい知ることができます。とはいえ、遺伝子ターゲティングにはまだまだわかっていないことが多く、それは今回の発見すなわち第 2 のメカニズムの発見まで 30 年以上もかかったことから明らかです。今後の研究により、遺伝子ターゲティングのメカニズムや制御機構の全貌が明らかになれば、さらなる効率化と医療への応用が可能になっていくものと期待されます。

研究費

本研究は、JSPS 科研費 (JP18K19407、JP19H01151、JP21K15069、JP22K19382) と横浜市立大学第 5 期戦略的研究推進事業「研究開発プロジェクト」の支援を受けて実施されました。

論文情報

タイトル： Characterization and regulation of cell cycle-independent noncanonical gene targeting

著者： Shinta Saito & Noritaka Adachi

掲載雑誌： Nature Communications

DOI： 10.1038/s41467-024-49385-9

Press Release

報道解禁：日本時間 2024 年 6 月 18 日 18 時・19 日朝刊



参考文献

[1] Saito S, Maeda R, Adachi N. Dual loss of human *POLQ* and *LIG4* abolishes random integration. *Nature Communications*. 2017 Jul 11;8:16112. DOI: 10.1038/ncomms16112.

[2] Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2017 Aug;18(8):495-506. DOI: 10.1038/nrm.2017.48.