

令和元年8月30日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2018

課題番号：25340044

研究課題名(和文) DNA二本鎖切断モデルの構築と、それを用いた修復と低線量影響に関する研究

研究課題名(英文) Construction of a DNA double-strand break model and its application to studies of DNA repair and low dose irradiation effects

研究代表者

本間 正充 (Honma, Masamitsu)

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・部長

研究者番号：30250179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：低線量放射線のモデルとして、制限酵素I-SceI部位を利用し、ヒト細胞ゲノム中にたった一つのDSBを発生させる系を構築した。この系により、DSBは組み換え修復(HR)よりも、主に非相同組み換え(NHEJ)により修復され、短いDNAの欠失を主として引き起こすことを明らかとなった。BLMをノックアウト(KO)した細胞を用いて本系を構築し、DSB修復機構を検討した。BLM KO細胞では交差型の遺伝子変換、非交差型の長い遺伝子変換、欠失等の複雑な突然変異が誘発されたことから、BLMの欠損は組み換え中間体であるホリデー構造を不安定化させ、ゲノムの広範囲での欠失や組換えをもたらすものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線はゲノムに対して最も重篤であるDNA二本鎖切断(DSB)を誘発し、それが、がんの主たる要因と考えられているが、放射線はそれ以外の損傷(酸化ストレス、一本鎖切断等)も引き起こすため、DSBの修復機構や、がん化への関与の研究は非常に困難である。本研究では制限酵素に注目し、たった一つのDSBをヒト細胞のゲノム中に発生させる究極の低線量モデルを世界で始めて構築した。これによりDSBには閾値が存在せず、高い確率で突然変異を誘発することを明らかにし、放射線のリスク評価の考えを前進させた。

研究成果の概要(英文)：As a model for low dose radiation, I developed a system that generates only one DNA double-strand breaks (DSB) in the human cell genome using a restriction enzyme I-SceI site. This system revealed that a DSB mainly causes small deletions by non-homologous end joining (NHEJ). Involvement of homologous recombination (HR) was less than 10% of the whole. In addition, in order to elucidate the mechanism of genome integrity, I focused on recombination repair between chromosomes. I constructed BLM knocked out (KO) cells using genome editing technology in the system. In BLM-KO cells, the enhancement of spontaneous HR frequency, cross-type gene conversion, non-cross-type long gene conversion, and deletion were frequently observed. BLM was considered to be involved in the maintenance of Holliday structure, and the defect destabilizes Holliday structure, leading to the deletion and recombination of the genome in a large area.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA修復 放射線防護 低線量モデル 発がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 放射線はゲノムに対して最も重篤である **DNA** 二本鎖切断 (**DSB**) を誘発し、それが、がんの主たる要因と考えられている。一方、放射線はそれ以外の損傷 (酸化ストレス、一本鎖切断等) も引き起こすため、ゲノムにはそれら損傷が混合して影響を与える。そのため、**DSB** のみの影響を評価することは困難である。そこで外来性の放射線を使わず、**I-SceI** 制限酵素に注目し、ゲノム中にたった **1** つの **DSB** を発生させる系を思いついた。

(2) 本系はゲノム中のたった一つの **DSB** の運命を完全にトレースすることができるため、**DSB** 修復機構の研究にも有用であると直感した。ブルーム症候群の原因遺伝子である **BLM** 遺伝子をノックアウトした細胞を作成し、そこでの **DSB** の運命を正常細胞と比較することを思いついた。また、当時、ゲノム編集技術が登場したばかりであり、ノックアウト細胞の作成が容易になったことも研究の背景の一つである。

2. 研究の目的

2011 年 **3** 月 **11** 日の東日本大震災によって引き起こされた、福島第一原発での事故による一般住民への放射線の被曝は、日本国民へ大きなパニックを引き起こし、改めて放射線に対する安全性確保の重要性が叫ばれている。国民の最大の関心事は、福島県を含む北関東全域におよぶ土壤中の低レベル放射線と、農水産物等を介して暴露する可能性のある低レベルの内部被曝による健康影響である。低レベルの被曝であっても **DNA** に損傷を与え、将来的にがんを引き起こすリスクは否定できないとの考えが国民を不安に陥れている。しかしながら、低レベルの放射線のリスク評価は、高レベル放射線での実験結果からの外挿によるものであり、また、研究者によって、低レベル領域では閾値のない一時関数的外挿モデル、修復効率を考慮した閾値モデルなど、リスク評価に大きな影響を与える異なった考えが提唱されている。従って、低線量放射線の **DNA** に対する影響はほとんどわかっていないし、リスク評価も推測の域にある。研究が進まない最大の原因は低線量放射線の生物影響評価が実験レベルでは極めて困難であることによる。生体に数グレイの放射線を照射すると遺伝的影響として、染色体異常や、突然変異の誘発が観察されるが、**0.1** グレイ以下ではほとんど何も観察されない。放射線のような外的因子 **DNA** 損傷は確率的起こるため、低用量での観察は困難である。低線量放射線による **DNA** 損傷の生物影響の研究には、確率的事象に依存しない **DNA** 損傷モデルを用いたブレークスルーが必要である。本研究では

(1) 低放射線モデルとして制限酵素に注目し、メガヌクレアーゼ **I-SceI** 部位をヒト細胞のゲノム中に一つだけ導入し、そこに **DSB** を発生させる。一つの **DSB** は約 **0.05** グレイに相当する。その **DSB** の運命を完全に追跡することにより、その修復メカニズムの解明と、発生する突然変異を定性・定量的に解析することにより放射線のリスク評価に利用することを目的とする。

(2) 低放射線モデルとした開発した系を基本として、ゲノム編集技術により **DSB** 修復遺伝子欠損細胞を作成する。特に組み換え修復に関与する **BLM**、**p53**、**GEN1**、**SLX4** 遺伝子に注目し、それら遺伝子の **DSB** に対するゲノム安定化機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 はチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子のエキソン 4 に点突然変異をもつヘテロ (TK+/-) 体である。この細胞の TK+ アリルのエキソン 5 の上流約 80 ベースに制限酵素 **I-SceI** 部位を導入した TSCE5 細胞 (TK+/-) を樹立した。この細胞から自然変異体 (TK-/-) を単離し、そのうちエキソン 7 に点突然変異を有する TSECR2 (-/-) を得た。Amasa 社の Nucleofector を用い **I-SceI** 発現ベクター (pCBASce) を導入することにより TK 遺伝子内に確実に **DSB** を発生させることができる。この TSCE5 細胞では **I-SceI** 部位での **DSB** が非相同組み換え (NHEJ) による欠失変異体 (TK-/-) を、TSECR2 細胞では TK-アリル間での相同組み換え修復 (HR) による復帰変異体 (TK+/-) を薬剤耐性により検出することができる。これら変異体の遺伝子の配列を解析し、修復機構を定性・定量的に調査した。

(2) TSCE5、および TSECR2 細胞の **BLM** 遺伝子のヘリケースドメインをターゲットとして、Zinc Finger によるゲノム編集技術を用いて **BLM** 欠損変異株 TSCE5-**BLM**、および TSECR2-**BLM** を得た。正常細胞と同様に Amasa 社の Nucleofector を用い **I-SceI** 発現ベクター (pCBASce) を導入し、NHEJ による欠失変異体 (TK-/-) と、HR による復帰変異体 (TK+/-) を薬剤耐性によりクローニングし、TK 遺伝子の配列を解析し、修復機構を定性・定量的に調査した。

4. 研究成果

(1) TSCE5 細胞に **I-SceI** により **DSB** を導入したところ、突然変異頻度は 1 万倍程度誘発された。また TSECR2 細胞に同様に **DSB** を導入したところ、復帰突然変異頻度は 10 万倍以上誘発された。このことは、**DSB** は NHEJ 及び HR の両者によって修復されることを示している。しかしながら、その絶対頻度は NHEJ の方が 10 倍以上も高く、NHEJ の方が主たるメカニズムであるこ

とを示している。このことは、薬剤耐性を利用せず、ランダムクローニングによって得られた変異体解析からも支持された。変異体解析からは、95%以上のDSBは100bp以下の短い欠失を誘発し、大きな欠失や再配列等の大きなゲノム変化は少なかった。しかしながら、大きなゲノム変化には、逆向き配列が入れ子のように連続して出現する配列が観察された。これは、DSBがBreakage-Fusion-Bridge-Cycleによって修復されることを意味している。また、細胞周期におけるNHEJとHRの貢献度を解析したが、HRが主に働く、S期、G2後期においてもNHEJが優先的に働いた。このことはNHEJとHRは競合的に働くのではなく、協力的に働いてゲノムの安定化に寄与していることを示している。

(2) TSCE5細胞と、TSCER2細胞からBLMノックアウト細胞の作成に成功した。これら細胞はSCEと小核頻度が更新していたことからブルーム症候群のモデル細胞と考えることができる(図1)。これら細胞の自然突然変異頻度、HR頻度は正常細胞に比べて10倍以上も高く、このゲノム不安定性が易がん発生と関連していることが示唆された。一方、DSB導入により自然突然変異頻度、自然HR頻度は100倍以上も増加したが、正常細胞とBLMノックアウト細胞の差は顕著ではなかった(図2)。HR組み換え体のTK遺伝子周辺のゲノムを検索した結果、正常細胞では非交差型の短い遺伝子変換が主だったのに対して、BLMノックアウト細胞では、交差型の遺伝子変換、非交差型の長い遺伝子変換、欠失も多く観察された。これらの事実から、BLMヘリカーゼは、ホリデー構造の解離に関与し、その解離の速やかに行うことによりゲノム安定化に寄与しており、その欠損はゲノムの広範囲でのHRや欠失をもたらしLOH型の変異を引き起こすことにより、がん抑制遺伝子の不活化を誘引し、がんを引き起こすものと結論づけた。

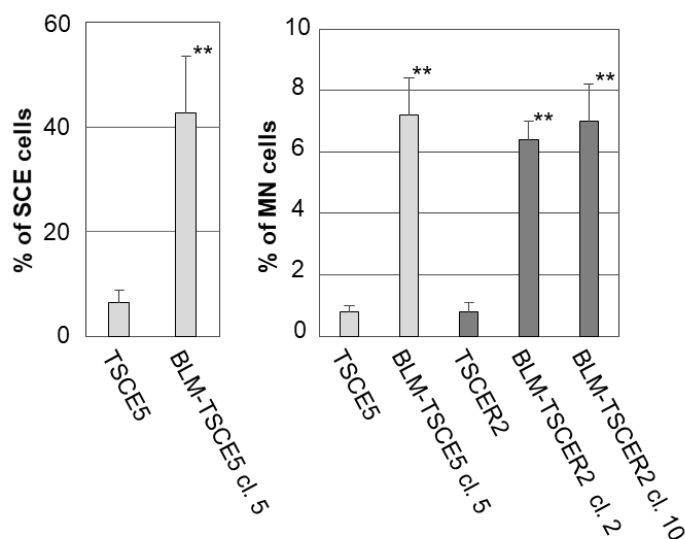


図 1

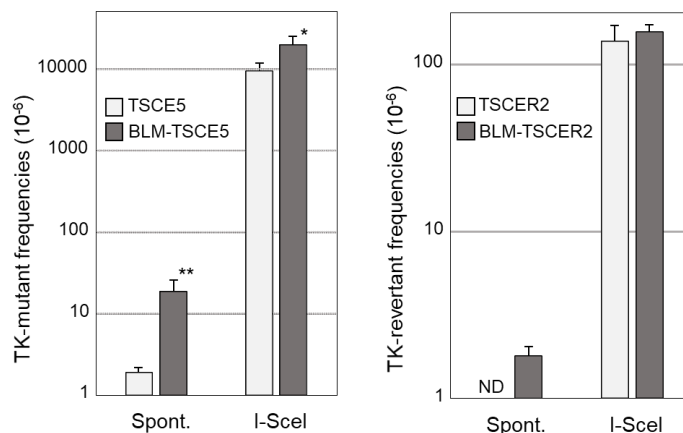


図 2

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Yasui M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T, Honma M., Tracing the fates of

site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. DNA Repair 15, 11-20 (2014)査読有

Sassa A, Suzuki T, Kanemaru Y, Niimi N, Fujimoto H, Katafuchi A, Grúz P, Yasui M, Gupta RC, Johnson F, Ohta T, Honma M, Adachi N, Nohmi T., **In vivo evidence that phenylalanine 171 acts as a molecular brake for translesion DNA synthesis across benzo[a]pyrene DNA adducts by human DNA polymerase κ .** DNA Repair 15, 21-28 (2014)査読有

Sassa, A., Kamoshita, N., Kanemaru, Y., Honma, M., and Yasui, M., Xeroderma Pigmentosum Group A Suppresses Mutagenesis Caused by Clustered Oxidative DNA Adducts in the Human Genome. PLoS ONE 10 ; 11 (2015) 査読有

Kanemaru Y, Suzuki T, Niimi N, Grúz P, Matsumoto K, Adachi N, Honma M, Nohmi T. **Catalytic and non-catalytic roles of DNA polymerase κ in the protection of human cells against genotoxic stresses. Environ Mol Mutagen. 56, 650-662 (2015)査読有**

Keka IS, Mohiuddin, Maede Y, Rahman MM, Sakuma T, Honma M, Yamamoto T, Takeda S, Sasanuma H. Smarcal1 promotes double-strand-break repair by nonhomologous end-joining. Nucleic Acids Res. 43, 6359-72 (2015)査読有

Suzuki T, Yasui M, Honma M. Mutator phenotype and DNA double-strand break repair in BLM helicase-deficient human cells. Mol Cell Biol. 36, 2877-2889 (2016)査読有

Honma M., Science for Genome Safety Science Impact 3:59-61 (2019)査読無

[学会発表](計5件)

Honma M, Yasui M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T: Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. 4th Asian Conference on Environmental Mutagens (2014.12)

Honma M, Suzuki T : DNA Double Strand Break Repair in BLM Deficient Human Cells. 46th Annual Meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society (2015.9)

本間正充:部位特異的損傷をゲノム中に導入したヒト細胞における突然変異誘発機構の研究(日本環境変異原学会学会賞受賞講演).
日本環境変異原学会第44回大会 (2015.11)

Honma M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T*, Yasui M : Tracing the fate of site-specifically introduced oxidative DNA damage in the human genome. 14th International Workshop on Radiation Damage to DNA (2016.3)

Honma M: Mutator Phenotype and DNA Double Strand Break Repair in BLM Deficient Human Cells XXXII Annual Conference of Environmental Mutagen Society of India (EMSI) (2018.1.25)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究分担者:なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名:安井 学

ローマ字氏名:Manabu Yasui

研究協力者氏名:鈴木哲矢

ローマ字氏名:Tetsuya Suzuki

研究協力者氏名:佐々 彰

ローマ字氏名:Akira Sassa

