

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550026

研究課題名(和文) レポーター遺伝子を用いた胚性幹細胞のDNA修復能

研究課題名(英文) Generation of ES cells to measure DNA repair activity with reporter genes

研究代表者

小林 純也 (KOBAYASHI, Junya)

京都大学・放射線生物研究センター・准教授

研究者番号：30301302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまで考えられている若年性における放射線高感受性を検証するために、本研究では、胎児および新生児の代表として胚性幹(ES)細胞を材料にDNA修復能と増殖・分化能との関係を検証できる実験系の構築を目的として、ES細胞のゲノムDNAの特定座位に相同組み換え(HR)と非相同末端再結合(NHEJ)レポーター遺伝子を導入した細胞を作成した。作成できたES細胞で特異領域に二重鎖切断修復を誘導すると、NHEJ活性を測定でき、また繊維芽細胞への分化能を有していたことから、目的とした実験系の構築に成功したといえる。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate radiosensitivity in children, we generated the system in ES cells to measure the activity of homologous recombination (HR) repair or non-homologous endjoining (NHEJ) repair. We introduce a specific site of genomic DNA to HR or NHEJ reporter construct. As a result, we got several ES cell lines, which could express NHEJ after generation of DNA double-strand break and possess differentiation potency.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA修復 相同組換え 非相同末端結合 放射線 DNA損傷

1. 研究開始当初の背景

放射線生物学のベルゴニー・トリポンドーの法則「細胞の放射線感受性は、細胞分裂頻度が高いほど、将来の分裂回数が多いほど、形態的機能的に未分化なほど大きくなる」に従えば、胎児・小児期の放射線感受性は成人に比べて高くなると予想される。実際、チェルノブイリ原発事故での甲状腺腫瘍や広島・長崎の原爆被爆者の白血病では年少者ほど顕著に高い感受性が見られる。しかし、マウスを用いた発がん実験では、新生仔(10日)にピークが見られるものの、それ以前では感受性は観測できない(Ellender M, Int J Radiat Biol, 2006)。逆に胎児では放射線抵抗性である(Sasaki S, J Radiat Res Suppl. 1991)。ベルゴニー・トリポンドーの法則はラット生殖組織の組織化学的な観察結果であるので、胎児・新生児期の放射線感受性の原因を理解するには、生殖細胞の放射線感受性の分子機構を明らかにする必要がある。

放射線損傷からの修復機構の分子レベルの研究は、非相同末端再結合(NHEJ)遺伝子 Ku70 の 1995 年のクローニングに始まる。その後、多くの相同組換え(HR)修復や損傷応答の遺伝子が単離され、それぞれのノックアウトマウスが DNA 修復の解析に供されて来た。同時に、それぞれの修復能を定量的に測定するレポーター遺伝子の開発が行われ、1999 年に M. Jasin 博士のグループにより相同組換え用の DR-GFP および SCneo 遺伝子、2008 年に J. Dahm-Daphi 博士により非相同末端再結合用の pEJ 遺伝子が報告され、我々もこれらのレポーター遺伝子を用いて修復能を解析した(Tauchi H, Nature, 2002; Sakamoto S, Oncogene 2006)。しかし、これらノックアウトマウス由来細胞および DNA 修復レポーター遺伝子を利用する方法は、SV40 ウイルスなどでトランスフォームしたノックアウトマウス由来、あるいは遺伝子欠損ヒト患者由来細胞を用いて、それらの機能不全遺伝子の、非相同末端再結合と相同組換え修復それぞれへの関与を解析したものであり、正常細胞における HR, NHEJ 修復の寄与割合を反映しておらず、組織特異的細胞でのその寄与度の変化も明らかにできていなかった。また、このようなレポーター遺伝子の研究ではゲノムの導入座位により発現が異なるために異なった細胞株での相互比較が出来ない。このため、特定の部位に修復活性測定コンストラクトを、分化誘導可能な ES 細胞に組み込み、組織特異的な修復活性を測定できる解析系を確立する本研究計画した。

2. 研究の目的

福島原発事故の学校再開基準の放射線線量設定の際に年少者の放射線感受性が社会問題化した。原爆被ばく者の疫学調査研究は被爆時の年齢がゼロ歳であると成人の 2 倍程度の放射線感受性を示すことから、胎児を

含めた年少者の放射線高感受性が一般に受け入れられている。しかし、マウスを用いた研究では、生後直後の感受性は認められず、逆に胎児は成体マウスより放射線抵抗性を示す結果が得られている。放射線感受性は細胞の DNA 修復能力と密接にかかわっている。本研究では、胎児および新生児の放射線高感受性の原因と見なされる分裂能力の最も大きい細胞の代表として胚性幹(ES)細胞を取り上げ、ゲノム DNA の特定座位に導入した相同組み換えと非相同末端再結合レポーター遺伝子を用いて、それぞれの DNA 修復能を分裂能力が低い分化細胞と比較検証する。

3. 研究の方法

(1)修復活性測定 ES 細胞作成用の DNA コンストラクト作成

発現に組織特異性なく発現されている ROSA 遺伝子プロモーター下に HR あるいは NHEJ 修復活性用カセットを組み込んだ DNA コンストラクトを作成するために、ROSA-CAG-loxP-STOP-loxP ベクターに相同組み換えレポーター遺伝子 DR-GFP (HR 修復により蛍光タンパク GFP が発現)あるいは非相同末端再結合レポーター遺伝子 pEJ (NHEJ 修復により GFP が発現)を組み入れた DNA コンストラクトを作製する。

(2)作成コンストラクトのエレクトロポレーションを用いてマウス ES 細胞に遺伝子導入

作成できた DNA 修復活性測定用コンストラクトをエレクトロポレーション法で ES 細胞に導入し、DRGFP コンストラクトではピュロマイシン、pEJ コンストラクトの場合はネオマイシンで薬剤処理することにより、コンストラクトが導入されたクローンのみを選択する。サザンプロット法により、選択されたクローンから、コンストラクトが 1 個のみゲノム DNA に導入された細胞を決定した

(3)ES 細胞における修復活性の測定・分化能の確認

(2)で作成した ES 細胞に制限酵素 I-SceI 発現プラスミドをエレクトロポレーション法で導入して、I-SceI サイトに DNA 二重鎖切断(DSB)を誘導する。2~3 日培養した後、HR あるいは NHEJ 修復により DSB が修復されて、GFP が発現した細胞をフローサイトメーターで測定する。また、分化抑制因子 LIF を除いて培養することにより、ES 細胞が分化能を有するか検討する。

4. 研究成果

(1)修復活性測定 ES 細胞作成用の DNA コンストラクト作成

相同組み換えレポーター遺伝子 DR-GFP コンストラクト(図 1)あるいは非相同末端再結合レポーター遺伝子 pEJ(図 2)を ROSA26 遺伝子プロモーター下に導入するため、ROSA26 エキソン 1 と 2 の間のイント

ロン1の相同な配列を有するカセット(図3)に組み込むこととした。

DR-GFP プラスミド、あるいは pEJ プラスミドをテンプレートとし、PCRをおこない、続いて増幅された DNA 断片をゲルから切り出し、DNA 抽出を行い、抽出した DNA の末端にアデニン付加反応を行い、pGEM-T Easy Vector (プロメガ社)にライゲーション後、大腸菌 DH5α に形質転換を行って得られた大腸菌クローンからプラスミド DNA を抽出して確認し、図3のカセットに組み込むためのコンストラクトの作成に成功した。続けて、作成したコンストラクトを ROSA-CAG-loxP-STOP-loxP ベクターを組み込んだ。さらに ROSA26 イントロン1に存在する制限酵素サイト Xba1 に導入して、ES 細胞へ導入するコンストラクトの作製に成功した。

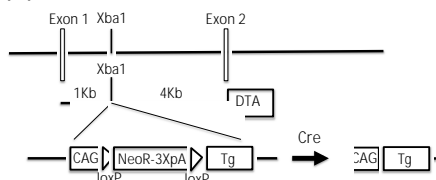
図1 DRGFP レポーター遺伝子



図2 pEJ レポーター遺伝子



図3 ROSA-CAG-loxP-STOP-loxP ベクター



(2)作成コンストラクトのエレクトロポレーションを用いてマウス ES 細胞に遺伝子導入

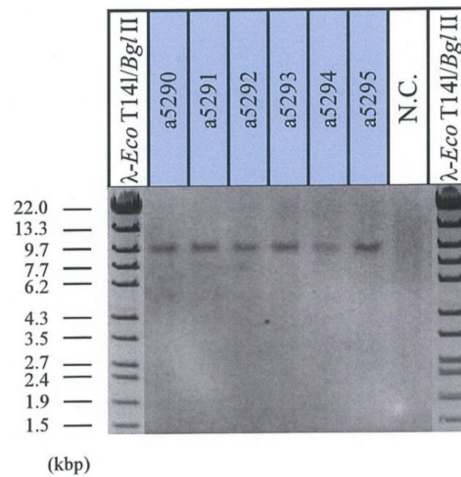
作成したコンストラクトはエレクトロポレーション法(240V、500μF)で G418 耐性 ES 細胞株 KY1.1 へ遺伝子導入した後ポジティブ選択をピュウロマイシン(DRGFP)、あるいはネオマイシン(pEJ)で行い、ランダムにベクターが挿入された細胞はジフテリアトキシン A サブユニット(DTA)の自殺遺伝子(取り込まれると細胞死が生じる遺伝子)の機能で死滅させ(ネガティブ選択)、ROSA26 遺伝子下にコンストラクト導入されたと考えられる細胞クローンが複数、得られた。

それらのクローンについてサザンブロット法およびコンストラクト 5'近傍、3'近傍での PCR を行い、トランスジーン的全長が入り、また1コピーのみ挿入されたクローンを pEJ コンストラクトでは6クローン確認することができた(図4)。

一方、DRGFP コンストラクトをエレクトロポレーションした ES 細胞ではポジティブ

選択、ネガティブ選択後にクローンは得られず、再度、エレクトロポレーションを行ったが、クローンは得られなかった。

図4 サザンブロット解析



(3)ES 細胞における修復活性の測定・分化能の確認

ROSA32 プロモーター下に1個の pEJ コンストラクトのみの導入が確認できた ES 細胞6クローンのうち、4クローンを分化抑制因子 LIF(Leuchemia Inhibitory Factor)を添加した新鮮な培地 DMEM を用いてこれら ES 細胞が分化しないように培養を続けて、分化誘導実験、トランスジェニックマウス作成に利用可能な ES 細胞株4株の樹立に成功した(図5)。

さらにこれら4クローンが pEJ コンストラクトの機能が正常に保持されて GFP が発現し、NHEJ 活性を測定できるかを検討するために、 5×10^6 細胞に I-SceI 発現プラスミド 50μg をエレクトロポレーション法で導入してコンストラクト内に DNA 二重鎖切断を導入して、2日間培養した後、フローサイトメーター-FACSCalibur で GFP を発現して緑色蛍光を発する細胞の割合を測定した。図6に示されるように GFP 蛍光を示す集団が I-SceI プラスミド導入により上方に出現した。樹立した4クローンともに GFP 陽性細胞の割合は約10%であり、これまでの培養細胞で作成された pEJ 細胞での報告と同程度の陽性率であり、NEHJ 活性測定 ES 細胞の作製に成功したといえる。また、分化抑制因子 LIF を除いて培養することにより繊維芽状細胞の出現も確認できた。このことから作製した ES 細胞は分化誘導能を保持していることが確認された。

今後様々な組織細胞に分化させることにより分化細胞の DNA 修復、NEHJ 修復活性の変動を明らかにできることが期待できる。また、これらの ES 細胞を用いてトランスジェニックマウスを作成することも可能であり、in vitro での分化誘導だけでなく、トランスジェニックマウスの組織も利用して、組

織特異的な修復活性を in vivo でも測定可能であり、ES 細胞の多方面での利用が期待できる。

図5 樹立した ES 細胞のうちの一株

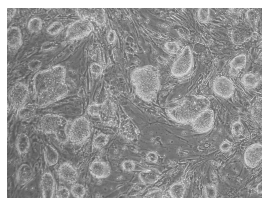
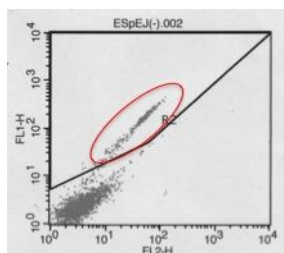


図6 GFP 陽性細胞の出現



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

Ohara M, Funya Y, Ebara S, Sakamoto Y, Seki R, Iijima K, Ohishi A, Kobayashi J, Komatsu K, Tachibana A, Tauchi H. Mutations in the FHA-domain of ectopically expressed NBS1 lead to radiosensitization and to no increase in somatic mutation rates via a partial suppression of homologous recombination. *J. Radiat. Res*, 55, 690-698, 2014. doi: 10.1093/jrr/rru011

Oji Y, Tatsumi N, Kobayashi J, Fukuda M, Ueda T, Nakano E, Saito C, Shibata S, Sumikawa M, Fukushima H, Saito A, Hojo N, Suzuki M, Hoshikawa T, Shimura T, Morii E, Oka Y, Hosen N, Komatsu K, Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1 promotes homologous recombination-mediated DNA damage repair. *Molecular Carcinogenesis*, in press, 2014. doi: 10.1002/mc.22248

Oliveira DV, Kato A, Nakamura K, Ikura T, Okada M, Kobayashi J, Yanagihara H, Saito Y, Tauchi H, Komatsu K. Histone chaperone FACT regulates homologous recombination by chromatin remodeling through interaction with RNF20. *J Cell Sci*, 127, 763-772, 2014. doi: 10.1242/jcs.135855

Saito Y, Takeda J, Okada M, Kobayashi J, Kato A, Hirota K, Taoka M, Matsumoto T, Komatsu K, Isobe T. The proteasome factor Bag101 binds to Rad22 and suppresses homologous recombination. *Scientific Rep*, 3, 2022, 2013. doi: 10.1038/srep02022

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 無

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 純也 (KOBAYASHI, Junya)

京都大学・放射線生物研究センター・准教授

研究者番号：30301302

(2)研究分担者

本田 浩章 (HONDA, Hiroaki)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：40245064

(2)研究分担者

加藤 晃弘 (KATO, Akihiro)

京都大学・放射線生物研究センター・研究員

研究者番号：70423051

(2)研究分担者

小松 賢志 (KOMATSU, Kenshi)

京都大学・放射線生物研究センター・教授

研究者番号：80124577