

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26740026

研究課題名(和文) 組み換え修復関連遺伝子のノックアウト細胞株を用いた遺伝毒性物質の評価に関する研究

研究課題名(英文) Assessment of genotoxic agents by using recombination-associated protein-deficient cells

研究代表者

鈴木 哲矢 (Suzuki, Tetsuya)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・助教

研究者番号：20573950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNAヘリカーゼやDNAリゾルベースはDNA鎖切断修復において重要な役割をしている。本研究では、DNAヘリカーゼのWRN、RECQL5及びDNAリゾルベースのGEN1、SLX4の欠損細胞の、遺伝毒性物質に対する致死感受性を調べた。

WRN及びRECQL5ノックアウト細胞は、ヒドロキシ尿素に対して、GEN1ノックアウト細胞は、トポイソメラーゼ阻害剤に対して、SLX4ノックアウト細胞は、アルキル化剤に対して、それぞれ高い致死感受性を示した。これらの結果は、細胞致死感受性が変化した組み合わせでは、これらのタンパク質が遺伝毒性にも影響すると考えられ、閾値の形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：DNA helicases and DNA resolvases are believed to play important roles in DNA strand break repair. In this study, we established cell lines deficient in a DNA helicase (WRN/RECQL5) or a DNA resolvase (GEN1/SLX4) and examined their cytotoxic sensitivities toward various genotoxic agents.

WRN- and RECQL5-deficient cells displayed higher sensitivity to hydroxyurea than wild-type cells. GEN1-deficient cells displayed higher sensitivity to topoisomerase inhibitors than wild-type cells. SLX4-deficient cells exhibited higher sensitivity to alkylating agents. These results suggest that the knockout of each protein have cytotoxic effects on various genotoxic agents and the proteins may play important role for the practical threshold for genotoxicity.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA二本鎖切断 相同組換え DNAヘリカーゼ DNAリゾルベース

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝毒性を示す化学物質の発がん作用には閾値がないものとして行政的な規制が行われ、耐容一日摂取量 (TDI) や許容一日摂取量 (ADI) は設定されない。しかし、ヒトには防御機能が備わっており日常的にばく露されるような低用量であればその遺伝毒性作用は抑制され「事実上の閾値」が形成されることが予想される。様々なアプローチにより遺伝毒性の閾値についての研究が行われているが、閾値については議論の残るところであり、遺伝毒性誘発および生体防御メカニズムに基づいて低用量域での影響を調べ、閾値形成機構を明らかにすることが重要である。

(2) ヒトのゲノムは、様々な遺伝毒性物質にばく露されることにより損傷を受ける。このような DNA 損傷の中でも DNA 鎖切断は、欠失や転座といったヘテロ接合性の喪失 (loss of heterogeneity; LOH) の原因となるため、重篤な DNA 損傷の一つである。DNA 鎖切断は、非相同性末端再結合または相同組換えにより修復される。

(3) 相同組換えにおいて、DNA ヘリカーゼや DNA リゾルベースは、相同組換え修復時に形成される中間体であるホリデイジャンクションの運命を左右する重要な因子である。DNA ヘリカーゼは、ホリデイジャンクション構造を解きほぐすことにより解消する。一方、DNA リゾルベースは、ホリデイジャンクション構造を切断して解消するため、切断される箇所によっては LOH の原因となる。また、ホリデイジャンクションが解消されない場合も、ゲノムのリアレンジメントなどの原因となると考えられる。このように、DNA ヘリカーゼや DNA リゾルベースは、DNA 鎖切断を誘発する化学物質による遺伝毒性の閾値形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

(4) ヒトの相同組換え修復に関わる DNA ヘリカーゼには BLM、WRN、RECQL5 などが、DNA リゾルベースには SLX4、GEN1 などがあり、これまでにいくつかの研究が行われている。しかし、細胞内での遺伝毒性物質に対する役割の違いやどのような DNA 損傷の修復に必要ななどについては不明であった。

2. 研究の目的

DNA ヘリカーゼ (WRN、RECQL5) と DNA リゾルベース (GEN1、SLX4) をノックアウトした細胞を作製し、トポイソメラーゼ阻害剤、複製ストレスを誘発する化学物質、活性酸素種を産生する化学物質など異なる作用によって DNA 鎖切断を誘発する複数の化学物質の遺伝毒性の用量-反応性を調べることによって、異なる機序によって誘発される DNA 鎖切断の遺伝毒性の閾値形成におけ

る相同組換え修復関連遺伝子の役割を検討する。どのように誘発される DNA 鎖切断に、どの遺伝子が関与し、どのような遺伝毒性を引き起こすのかを明らかにし、遺伝毒性物質の閾値形成機構について検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

細胞は、TK 遺伝子の変異を指標として遺伝子突然変異を検出することができるヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた。

WRN、RECQL5、GEN1、SLX4 のノックアウト細胞は Cas9 ニッカーゼ (D10A) を利用したダブルニッキング法により作製した。WRN、RECQL5、GEN1、SLX4 遺伝子をそれぞれ標的とする guide RNA を 2 種類 (センス鎖とアンチセンス鎖) 設計し、Cas9 (D10A) と guide RNA を同時に発現するプラスミドを調製した。

ヒト TK6 細胞にエレクトロポレーション法により Cas9 (D10A) と guide RNA を発現するプラスミドを導入し、限界希釈法によりシングルセルをクローニングした。クローニングした細胞からゲノム DNA を抽出し、各遺伝子の標的配列近傍を PCR により増幅し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるヘテロ二本鎖移動度分析により変異が導入されたクローンのスクリーニングを行った。変異が導入されたクローンについて、シーケンス解析を行い、各遺伝子の両アレルに読み枠にずれが生じる変異が導入されたクローンをスクリーニングした。

WRN、RECQL5、GEN1、SLX4 のノックアウトはウェスタンブロットングにより確認した。

WRN、RECQL5、GEN1、SLX4 ノックアウト細胞の細胞増殖速度は、24 時間ごとに細胞を計数し算出した。また、TK 遺伝子突然変異頻度は、トリフルオロチミジンに対する耐性を指標に検出した。

遺伝毒性物質に対する致死感受性は、WST-8 試薬を用いて測定した。野生型および各ノックアウト細胞を、遺伝毒性物質存在下で 48 時間培養後、WST-8 試薬を添加し、細胞生存率を測定した。遺伝毒性物質として、ヒドロキシ尿素、カンプトテシン、エトポシド、マイトマイシン C、プレオマイシン、メタンスルホン酸エチル、1-メチル-1-ニトロソ-3-ニトログアニジン、4-ニトロキノリン-1-オキシドを用いた。

4. 研究成果

(1) 各遺伝子のノックアウト細胞の樹立

Cas9 (D10A) と guide RNA を発現するプラスミドを導入した細胞について、各標的遺伝子の配列解析を行い、両アレルに読み枠にずれが生じる変異が導入された細胞を得た。これらの細胞について、ウェスタンブロ

ッティングにより標的とするタンパク質の発現を確認した結果、発現が確認されなかったことから、各遺伝子のノックアウト細胞が得られたと考えた(図1)。

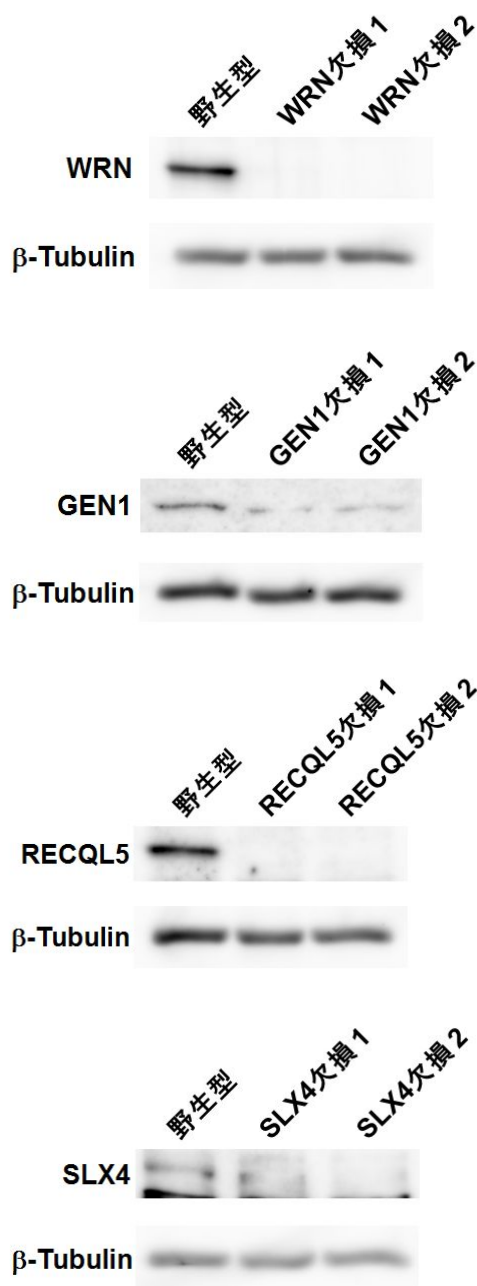


図1. ウェスタンブロットによる各遺伝子のノックアウトの確認.

(2) 各遺伝子のノックアウト細胞の表現型の解析

WRN、RECQL5、GEN1、SLX4 ノックアウト細胞の細胞増殖速度は、野生型の細胞と比較して顕著な差は見られなかった。また、TK 遺伝子自然突然変異頻度は、点突然変異やフレームシフト変異等に由来する normal growth の変異頻度に差は見られなかったが、large deletion や相同染色体間での組換えな

どによる LOH に由来する slow growth の変異頻度は GEN1 と RECQL5 のノックアウト細胞で高い傾向が見られた(表1)。

表1. 野生型と各ノックアウト細胞の TK 遺伝子突然変異頻度

	TK突然変異頻度 (x 10 ⁻⁶) NG変異体	TK突然変異頻度 (x 10 ⁻⁶) SG変異体	TK突然変異頻度 (x 10 ⁻⁶) Total
野生型	1.3 ± 0.98	2.9 ± 0.76	4.4 ± 1.7
WRN欠損	0.67 ± 0.38	2.2 ± 0.20	3.0 ± 0.25
GEN1欠損	0.21 ± 0.04	5.3 ± 0.42*	5.6 ± 0.40
RECQL5欠損	1.2 ± 0.24	5.0 ± 1.1*	6.4 ± 1.2
SLX4欠損	1.7 ± 1.1	1.3 ± 0.47	3.0 ± 1.6

NG: Normal growth, SG: Slow growth
*P < 0.05 (vs 野生型, Dunnett's test)

(3) 遺伝毒性物質に対する致死感受性

様々な遺伝毒性物質に対する致死感受性を調べた結果、WRN 及び RECQL5 ノックアウト細胞は、ヒドロキシ尿素に対して高い感受性を示した。GEN1 ノックアウト細胞は、カンプトテシン、エトポシド、マイトマイシン C に対して高い致死感受性を示した。SLX4 ノックアウト細胞は、マイトマイシン C、メタンスルホン酸エチル、1-メチル-1-ニトロソ-3-ニトログアニジンに対して高い致死感受性を示した。また、RECQL5 と SLX4 ノックアウト細胞は、プレオマイシンに対して耐性を示した。これらの結果は、細胞致死感受性が変化した組み合わせでは、誘発された DNA 損傷の修復に各遺伝子が必要であることを示しており、遺伝毒性にも影響すると考えられるため、その閾値形成にも関与している可能性が示唆された。

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0件)

[学会発表](計2件)

1. 鈴木哲矢, 紙谷浩之: DNA ヘリカーゼ及び DNA リゾルベース欠損細胞の遺伝毒性物質に対する細胞毒性感受性の比較. 日本環境変異原学会第 45 回大会 (2016 年 11 月 18 日、つくば)

2. 鈴木 哲矢, 紙谷 浩之: DNA 鎖切断修復関連蛋白質を欠損した細胞の抗がん剤に対する細胞毒性感受性の比較. 日本薬学会第 137 年会 (2017 年 3 月 25 日、仙台)

[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〕
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

鈴木 哲矢 （SUZUKI Tetsuya）

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・助教

研究者番号：20573950