

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03184

研究課題名(和文) 化学合成DNAを用いた細胞のミスマッチ修復能の蛍光検出

研究課題名(英文) Fluorescence detection of cellular ability of mismatch repair using synthetic DNA

研究代表者

岩井 成憲 (Iwai, Shigenori)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授

研究者番号：10168544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光色素とクエンチャーを付けたミスマッチを有するDNAを用いて、細胞におけるミスマッチ修復の機能を蛍光により検出することを目指した。当初は化学合成したオリゴヌクレオチドをDNAリガーゼでつないだダンベル型のDNAをプローブとする予定であり、100ならびに200塩基対のダンベル型DNAの調製に成功したが、その形のDNAは細胞への導入効率が極めて低いことがわかった。そのため、プラスミド型のプローブを使って検出を試みたが、研究期間内にミスマッチ修復に由来すると考えられる蛍光は観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

100塩基対ならびに200塩基対のダンベル型DNAを調製し、トランスフェクションの条件を変える、あるいは核局在化シグナルペプチドを付けるといった工夫をしたが、この形のDNAは蛍光を検出できるほど細胞に導入されないことがわかった。ただし、ダンベル型DNAのトランスフェクション効率が非常に低いことを発表するには、その原因を究明する必要がある。ミスマッチを有するプラスミドに関しては、簡便な調製法を開発して論文を発表した。この調製法は他の種類の修飾プラスミドにも応用可能である。

研究成果の概要(英文)：This research aimed at fluorescence detection of the mismatch repair in cells using mismatch-containing DNA with a fluorophore and a quencher. In the initial plan, we intended to use dumbbell-shaped DNA prepared by ligation of chemically-synthesized oligonucleotides with DNA ligase as a probe, and we succeeded in the preparation of dumbbell-shaped DNA with 100 and 200 base pairs. Despite our expectation, it was found that the transfection efficiency of this type of DNA was extremely low. Therefore, the probe was changed to plasmid-type DNA. However, we couldn't succeed in the detection of fluorescence emission caused by the mismatch repair by the end of the research period.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ミスマッチ修復 蛍光プローブ プラスミド

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA ポリメラーゼは校正機能を有しているが、DNA 複製の際に誤ったヌクレオチドが取り込まれることがある。この「ミスマッチ」が放置されると突然変異により細胞ががん化する恐れがあるが、通常は「ミスマッチ修復 (MMR)」と呼ばれる修復系により新生鎖の一部が分解除去されて正しい塩基対を有する DNA に修復される。本研究を構想した頃、特にがんの診断や治療において MMR の重要性が高まっていた。例えば、遺伝性非ポリポーシス大腸癌とも呼ばれるリンチ症候群は MMR に必要なタンパク質 (MSH2、MSH6、MLH1 あるいは PMS2) の遺伝子の変異により起こる常染色体優性遺伝形式の疾患で、大腸癌や子宮内膜癌のリスクが非常に高い (1,2)。また、幅広い種類の癌に対する効果が期待される免疫チェックポイント阻害薬の一つである pembrolizumab は MMR が欠損した患者には有効であるが、MMR が正常な場合には効かないことが報告されており (3,4)、MMR は癌免疫療法において重要なバイオマーカーとなっていた (5)。それに加えて、抗がん剤として汎用されている 5-フルオロウラシルの効果が MMR の活性に依存することも報告されていた (6)。

(2) 本研究の申請時には、細胞の MMR 能を調べるスクリーニング法として、MMR が欠損すると CA リピートのようなマイクロサテライトの繰り返し回数が増えることを利用した間接的な方法 (マイクロサテライト不安定性 (MSI) 検査) を用いるのが一般的で (7)、その結果により MSI-H (MSI-high)、MSI-L (MSI-low)、MSS (microsatellite stable) に分類されていた。しかし、MSH6 に変異がある場合には MSI-H を示さないことが多く (8)、MMR タンパク質の不活性化と MSI が一致しない場合も報告されている (9) など、MSI 検査により MMR の異常を検出できないことがあった。それ以外の方法として細胞中の MMR タンパク質を抗体で検出する免疫組織化学 (IHC) 検査があるが、IHC においても特に二量化ドメインの外側に 1 アミノ酸置換を含む不活性な MMR 遺伝子産物では偽陽性の結果となっていた (10)。

(3) DNA 修復の蛍光検出については、モレキュラー・ビーコンで使用された蛍光色素とクエンチャーの系が塩基除去修復の検出に応用された例がいくつかあったが (11-14)、MMR と同様に多数のタンパク質が協調的に機能することにより達成されるヌクレオチド除去修復 (NER) については、研究代表者が 2014 年に報告した一例だけであった (15)。MMR については、蛍光タンパク質遺伝子の発現系を利用した蛍光検出法を研究代表者が報告していた (16)。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、細胞の MMR 能を直接検出する簡便なスクリーニング法を開発することであった。研究代表者は蛍光タンパク質遺伝子の発現系を利用する細胞の MMR 能の蛍光検出法 (16) を発表した。プラスミドの調製に必要な超遠心による DNA の精製は経験者が少ないようで、それがこの方法の普及において大きな課題であった。また、この方法により細胞の MMR を蛍光検出するためには修復と遺伝子発現という二つの生物学的過程が必要であるので、培養細胞では有効であってもリンチ症候群のスクリーニングのように癌組織に直接使用することは困難であることが予想された。そこで本研究は、化学合成オリゴヌクレオチドを DNA リガーゼでつないでクロマトグラフィーで精製するという簡単な調製法により得られるダンベル型の蛍光プローブを用いて細胞の MMR 能を直接検出する方法の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞の MMR 能を検出する蛍光プローブとして、化学合成したオリゴヌクレオチドを DNA リガーゼでつなぐことにより、当初は 100 塩基対の 2 本鎖部分を有するダンベル型 DNA を調製すること考えた。両側の 1 本鎖部分はリン酸ジエステルをフォスフォロチオエートとすることによりヌクレアーゼ耐性をもたせる、中央部分にミスマッチならびに塩基に蛍光色素 (フルオレセイン) およびクエンチャー (ダブルシル) を付けた二つの修飾ヌクレオチドを入れる、ミスマッチがなく波長が異なる蛍光色素とクエンチャー (テトラメチルローダミンとブラックホールクエンチャー) を付けた同じ形の DNA もネガティブ・コントロールとして準備することとした。

(2) これらのプローブを HeLa 細胞に入れ、蛍光顕微鏡で観察することにより MMR に由来する蛍光が検出されることを期待した。すなわち、まずフルオレセインの蛍光が検出され、長時間置くとプローブの非特異的な分解による蛍光 (テトラメチルローダミン) が現れると考えた。その上で、HeLa 細胞と MMR で働く MSH2 を欠損した LoVo 細胞を比較することにより、フルオレセインの蛍光が MMR によるものであることを確認する予定であった。

(3) 期待どおりの蛍光が観察されなかったため、2 本鎖部分を 200 塩基対にする、ループ部分に核局在化シグナルペプチドを付ける、トランスフェクションの方法を変える等の工夫を行ったが改善は認められなかった。そこで、NER の蛍光検出に成功しているプラスミド型の蛍光プローブに変更して、同様の実験を行うことにした。

4. 研究成果

(1) まず、100 塩基対のダンベル型蛍光プローブ (図 1) を設計した。他の修復系の基質とならず MMR により効率的に修復される C/A ミスマッチの近傍に蛍光色素 (F) とクエンチャー (Q) を付けたもので、両末端のループ部分はヌクレアーゼ耐性をもたせるためにリン酸ジエステルをフォスホロチオエートとした。これをそれぞれの 5'末端がリン酸化された 4 本のオリゴヌクレオチドに分けて合成し、DNA リガーゼの反応を行った後、逆相 HPLC により分析した。4ヶ所でつながったことは、4 本のオリゴヌクレオチドをすべて使用した反応液と 55-mer あるいは 57-mer を欠いた反応液を比較することにより確認した。100 塩基対では MMR の基質として短すぎる可能性があったため、200 塩基対のダンベル型蛍光プローブ (図 2) も同様の方法で調製した。これらは最終的にゲル電気泳動により分析し、大きさと純度を確認した (図 3)。

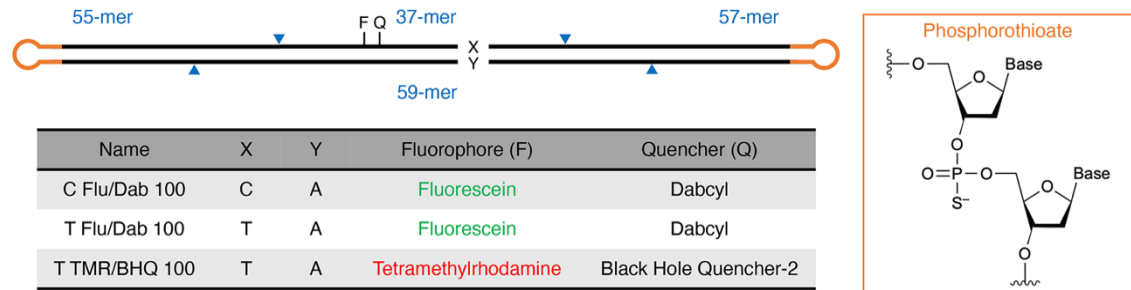


図 1 100 塩基対のダンベル型蛍光プローブ

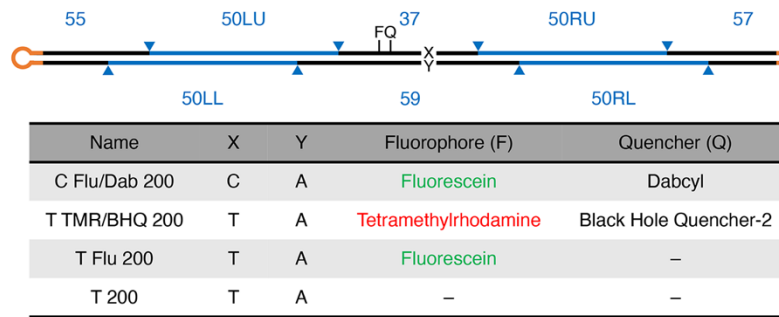


図 2 200 塩基対のダンベル型蛍光プローブ

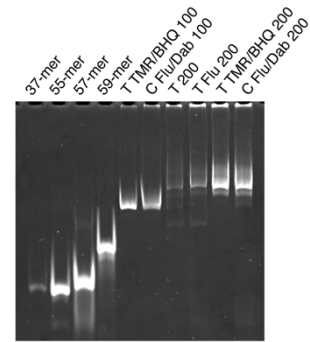


図 3 電気泳動による分析

(2) (1)で調製した蛍光プローブを Lipofectamine 2000 ならびに Lipofectamine 3000 を使って HeLa 細胞に導入し、6、12、24 時間後に蛍光顕微鏡で観察したが、いずれのプローブを使用した場合も蛍光が検出されなかった。そこで、クエンチャーを付けていないもので DNA の挙動を観察したところ、DNA リガーゼでつないでいないオリゴヌクレオチドは問題なく細胞に導入されたものの (図 4A)、ダンベル型 DNA (図 2 の T Flu 200、T 200 は自家蛍光がないことを確認するために使用) の場合には細胞に入っていないことがわかった (図 4B)。細胞導入ならびに核移行を促進させるために、ループ部分の塩基にアミノアルキル基を入れ、SMCC (CAS No.: 64987-85-5) を使って (17) そこに核局在化シグナルペプチド (18) を付けた T Flu 200 を調製した。しかし、それを用いても HeLa 細胞への導入は確認できなかった (図 4C)。DNA を核内に効果的に輸送しトランスフェクションの効率を上げることが期待される補助試薬である Nupherin を加えたり、トランスフェクションの方法をリポフェクションではなくリン酸カルシウム法に変えたりしてみたが、ダンベル型 DNA を細胞に導入することができなかった。

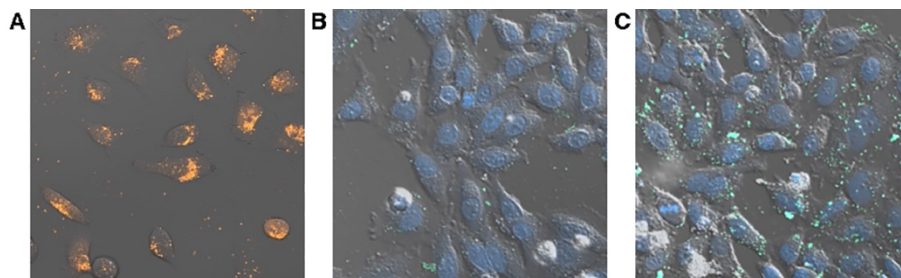


図 4 クエンチャーが付いていない蛍光プローブのトランスフェクション

(A) テトラメチルローダミンが付いた 37 量体オリゴヌクレオチド (B) 図 2 の T Flu 200 (C) T Flu 200 のループ部分に核局在化シグナルペプチドを付けたダンベル型 DNA

(3) 細胞抽出液を使ってダンベル型蛍光プローブで MMR を検出することが可能かどうかを調べるため、Santa Cruz 社と Promega 社の核抽出液を試してみた。プローブとして C Flu/Dab 200、T TMR/BHQ 200 ならびにニッキングエンドヌクレアーゼ Nt.BsmAI で処理した C Flu/Dab 200 を使用し、継時的に蛍光強度を測定したが、MMR に由来すると考えられる蛍光は

検出されなかった。以上の結果からダンベル型蛍光プローブを用いた MMR の検出を断念し、以前に NER の蛍光検出 (15) で使用したものと同様のプラスミド型蛍光プローブ (図 5) に変更して研究を継続することにした。

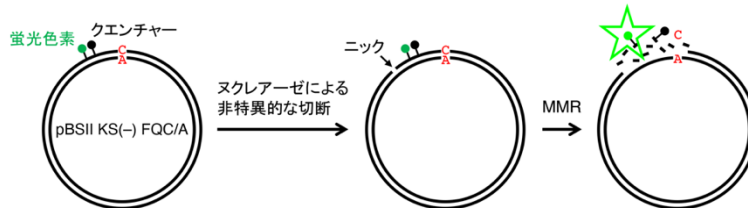


図 5 プラスミド型蛍光プローブ

(4) 従来のプラスミドの調製法は、1 本鎖 DNA を単離して損傷やミスマッチを含む短い相補鎖を貼り付け、DNA ポリメラーゼと DNA リガーゼを使って 2 本鎖とし、超遠心分離法により精製するというものであったが、経費がかかる上に技術的な問題があった。そこで研究分担者は、プラスミドにニックングエンドヌクレアーゼの認識配列を 2ヶ所入れ、その酵素で切り出した断片を入れ替えることによりミスマッチを有するプラスミドを調製する方法 (図 6) を開発した (19)。入れ替わりが起らず元の配列に戻ってしまったプラスミドは制限エンドヌクレアーゼとエキソヌクレアーゼで分解することにより除去され、PCR クリーンアップキットで精製するだけで目的のプラスミドが得られる。この方法で調製された蛍光タンパク質遺伝子を含むプラスミドは、従来法 (16) と同様に細胞の MMR 能の蛍光検出に使用できることが示された (19)。

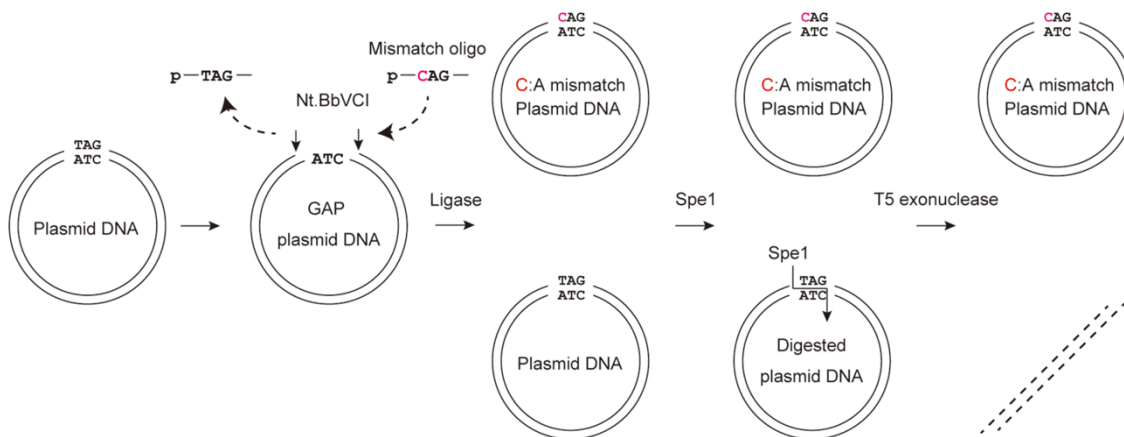


図 6 ミスマッチを有するプラスミドの簡便な調製法

(5) 従来法を使ってミスマッチを入れたプラスミド型蛍光プローブを調製した。コントロールとして完全に相補的で波長が異なる蛍光色素/クエンチャーを付けたプラスミドも調製し、これらを使って HeLa 細胞のトランスフェクションを行った。また、別のコントロール実験としてミスマッチ修復で働く MSH2 遺伝子を siRNA によりノックダウンした HeLa 細胞も使用し、3 時間後と 6 時間後に蛍光顕微鏡による観察を行ったが、ミスマッチ修復によると考えられる蛍光は検出されなかった。複数回の実験で同じ結果となったため、プラスミドが問題なく調製できていることを確認するために、以前に行った NER の蛍光検出の実験 (20) を同じ実験者が試したところ、トランスフェクションの 3 時間後の蛍光顕微鏡による観察で核における蛍光が再現性よく検出された。いずれの修復系の蛍光検出においても蛍光色素としてフルオレセインを使用した。修復の効率が MMR < NER であれば前者の検出が困難である可能性が考えられた。そこで、より明るい蛍光色素とされる Alexa Fluor 488 (ミスマッチがないコントロールでは Alexa Fluor 568) ならびにその発光波長に一致するクエンチャーである BHQ-1 (同 BHQ-2) を付けたオリゴヌクレオチドを調製した (図 7)。しかし、残念ながら研究期間内に蛍光プローブによる細胞の MMR 能の検出には至らなかった。

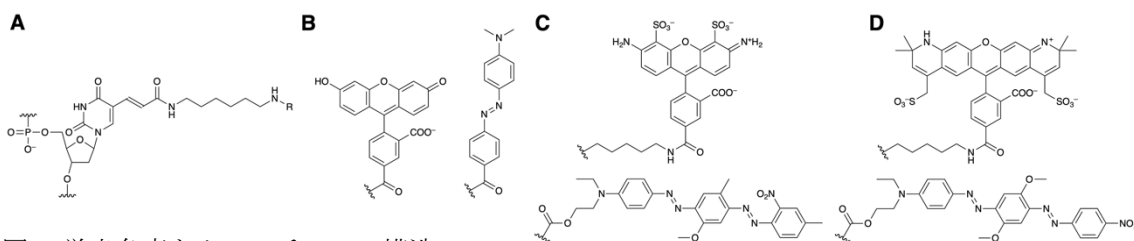


図 7 蛍光色素とクエンチャーの構造

(A) 付加のための修飾ヌクレオチド R が蛍光色素またはクエンチャー (B) fluorescein と tetramethylrhodamine (C) Alexa Fluor 488 と BHQ-1 (D) Alexa Fluor 568 と BHQ-2

<引用文献>

1. Li, S. K. H. and Martin, A. (2016) *Trends Mol. Med.* 22, 274–289
2. Biller, L. H., Syngal, S., and Yurgelun, M. B. (2019) *Fam. Cancer* 18, 211–219
3. Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring, A. D., Skora, A. D., Luber, B. S., Azad, N. S., Laheru, D., Biedrzycki, B., Donehower, R. C., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., Duffy, S. M., Goldberg, R. M., de la Chapelle, A., Koshiji, M., Bhajee, F., Huebner, T., Hruban, R. H., Wood, L. D., Cuka, N., Pardoll, D. M., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Zhou, S., Cornish, T. C., Taube, J. M., Anders, R. A., Eshleman, J. R., Vogelstein, B., and Diaz, L. A. (2015) *N. Engl. J. Med.* 372, 2509–2520
4. Le, D. T., Durham, J. N., Smith, K. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Aulakh, L. K., Lu, S., Kemberling, H., Wilt, C., Luber, B. S., Wong F., Azad, N. S., Rucki, A. A., Laheru, D., Donehower, R., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., Greten, T. F., Duffy, A. G., Ciombor, K. K., Eyring, A. D., Lam, B. H., Joe, A., Kang, S. P., Holdhoff, M., Danilova, L., Cope, L., Meyer, C., Zhou, S., Goldberg, R. M., Armstrong, D. K., Bever, K. M., Fader, A. N., Taube, J., Housseau, F., Spetzler, D., Xiao, N., Pardoll, D. M., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Eshleman, J. R., Vogelstein, B., Anders, R. A., and Diaz, L. A. (2017) *Science* 357, 409–413
5. Zhao, P., Li, L., Jiang, X., and Li, Q. (2019) *J. Hematol. Oncol.* 12, 54
6. Ribic, C. M., Sargent, D. J., Moore, M. J., Thibodeau, S. N., French, A. J., Goldberg, R. M., Hamilton, S. R., Laurent-Puig, P., Gryfe, R., Shepherd, L. E., Tu, D., Redston, M., and Gallinger, S. (2003) *N. Eng. J. Med.* 349, 247–257
7. Peña-Díaz, J. and Rasmussen, L. J. (2016) *DNA Repair* 38, 147–154
8. Barnetson, R. A., Tenesa, A., Farrington, S. M., Nicholl, I. D., Cetnarskyj, R., Porteous, M. E., Campbell, H., and Dunlop, M. G. (2006) *N. Engl. J. Med.* 354, 2751–2763
9. Peltomäki, P. (2016) *Fam. Cancer* 15, 385–393
10. Raevaara, T. E., Korhonen, M. K., Lohi, H., Hampel, H., Lynch, E., Lönnqvist, K. E., Holinski-Feder, E., Sutter, C., McKinnon, W., Duraisamy, S., Gerdes, A.-M., Peltomäki, P., Kohonen-Ccorish, M., Mangold, E., MacRae, F., Greenblatt, M., de la Chapelle, A., and Nyström, M. (2005) *Gastroenterology* 129, 537–549
11. Maksimenko, A., Ishchenko, A. A., Sanz, G., Laval, J., Elder, R. H., and Saparbaev, M. K. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 240–246
12. Liu, B., Yang, X., Wang, K., Tan, W., Li, H., and Tang, H. (2007) *Anal. Biochem.* 366, 237–243
13. Matsumoto, N., Toga, T., Hayashi, R., Sugasawa, K., Katayanagi, K., Ide, H., Kuraoka, I., and Iwai, S. (2010) *Nucleic Acids Res.* 38, e101
14. Li, C., Long, Y., Liu, B., Xiang, D., and Zhu, H. (2014) *Anal. Chim. Acta* 819, 71–77
15. Toga, T., Kuraoka, I., Watanabe, S., Nakano, E., Takeuchi, S., Nishigori, C., Sugasawa, K., and Iwai, S. (2014) *Sci. Rep.* 4, 5578
16. Ito, S., Shiraishi, M., Tsuchihashi, K., Takatsuka, R., Yamamoto, J., Kuraoka, I., and Iwai, S. (2018) *Sci. Rep.* 8, 12181
17. Zanta, M. A., Belguise-Valladier, P., and Behr, J.-P. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 91–96
18. Hodel, A. E., Harreman, M. T., Pulliam, K. F., Harben, M. E., Holmes, J. S., Hodel, M. R., Berland, K. M., and Corbett, A. H. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 23545–23556
19. Takedachi, A., Matsuishi, E., Mizusaki, S., Nagasawa, T., Fujikane, R., Hidaka, M., Iwai, S., and Kuraoka, I. (2022) *Mutat. Res.* 824, 111779
20. Tawarahara, H., Kuraoka, I., and Iwai, S. (2017) *Anal. Biochem.* 526, 71–74

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takedachi Arato, Matsuishi Erina, Mizusaki Shouji, Nagasawa Tomoki, Fujikane Ryosuke, Hidaka Masumi, Iwai Shigenori, Kuraoka Isao	4. 巻 824
2. 論文標題 Novel plasmids for the fluorescence-based evaluation of DNA mismatch repair in human cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 111779 ~ 111779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mrfmmm.2022.111779	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	織田 信弥 (Oda Shinya) (40333372)	独立行政法人国立病院機構（九州がんセンター臨床研究センター）・その他部局等・腫瘍遺伝学研究室長 (87102)	
研究分担者	倉岡 功 (Kuraoka Isao) (60335396)	福岡大学・理学部・教授 (37111)	
研究分担者	中津 可道 (Nakatsu Yoshimichi) (00207820)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------