

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価のための新戦略法に関する研究

分担研究課題名：バルキーDNA付加体に関わるヌクレオチド除去修復遺伝子の破壊細胞の構築

研究分担者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究要旨

魚肉類の焼け焦げに含まれるヘテロサイクリックアミン類（HCA）は、組織中の DNA と反応し、バルキーDNA 付加体を形成し、発がん性を有するとされている。バルキーDNA 付加体は、ヌクレオチド除去修復機構（NER）によって DNA から除去されることが知られている。しかし、バルキーDNA 付加体のほとんどは NER のうち、グローバルゲノム NER か転写共役型 NER のどちらに進むかは全く不明であり、HCA の発がん作用機序を理解するうえで大きな障害となっている。本研究では CRISPR/Cas9 技術を用いることによって、グローバルゲノム NER および転写共役型 NER に必須の遺伝子である *XPC* および *ERCC6* をそれぞれノックアウト（KO）した細胞を構築し、バルキーDNA 付加体の NER 機構を解明することを目的とする。*XPC* および *ERCC6* の開始コドン部位をターゲットとして遺伝子 KO を試みた結果、*XPC* については開始コドン配列を欠失した細胞が得られ、その *XPC* KO 細胞は紫外線照射に対して高感受性を示した。一方、*ERCC6* の開始コドン部位を欠失させた細胞は分離できなかった。そこで、*ERCC6* を欠損する患者の変異を有するノックイン（KI）コンストラクトを作製し、CRISPR/Cas9 系を用いて KI 細胞を構築した。その *ERCC6* KI 細胞は、紫外線照射に対して感受性を示し、さらに臭素酸カリウムを用いたアルカリコメットアッセイにおいても、その野生株より DNA 修復効率が有意に減少した。以上のことから、*XPC* および *ERCC6* の破壊細胞を構築することができた。それらの細胞を用いることによって、HCA のバルキーDNA 付加体に対するグローバルゲノム NER および転写共役型 NER の研究を進展させることができると思われる。

キーワード:バルキーDNA 付加体, ヌクレオチド除去修復, CRISPR/Cas9

A. 研究目的

食品中の発がん性物質として最も注目され、研究が進んでいるものは、魚肉類の焼け焦げに含まれるヘテロサイクリックアミン類（HCA）である。HCA は、DNA と反応し、バルキーDNA 付加体を形成させ、発がんに至らせる遺伝毒性発がん物質に分類される。事実、焼け焦げに含まれる発

がん性を示す物質として、PhIP, MeIQ, Trp-P-1 などの HCA が同定されており、それらはラットなどの実験動物の臓器にがんを高頻度に形成させることが知られている。その発がん機構に、HCA のバルキーDNA 付加体が強く関与していると考えられる。

バルキーDNA 付加体は、ヌクレオチド除去修復

機構 (NER) によって DNA から除去されることがよく知られている。NER は、大きく分けてグローバルゲノム NER と転写共役型 NER の 2 種類がある。しかし、バルキー-DNA 付加体のほとんどは、そのグローバルゲノム NER が転写共役型 NER のどちらに進むかは全く不明であり、HCA の発がん作用機序を理解するうえで大きな障害となっている。本研究では、グローバルゲノム NER の XPC 遺伝子 (XPC タンパク質)、転写共役型 NER の ERCC6 遺伝子 (CSB タンパク質) が、その修復経路の必須遺伝子であることから、CRISPR/Cas9 技術を用いることによってそれらの遺伝子のノックアウト (KO)、あるいはノックイン (KI) 細胞を構築し、バルキー-DNA 付加体の NER 機構を解明することを目的とする。

B . 研究方法

1 . 細胞培養

ヒトリンパ芽球細胞 TSCER122 は、TK6 細胞株を由来とする細胞である (Honma, M. *et al*, *Environ. Mol. Mutagenesis* **42**, 288-298 (2003), Yasui, M. *et al*, *DNA repair* **15**, 11-20 (2014))。細胞は、10% 馬血清 (JRH Bioscience), 200 µg/mL ピルビン酸ナトリウム (和光純薬工業(株)), 100 U/mL ペニシリン, 100 µg/mL ストレプトマイシン (ナカライテスク(株))を含む RPMI 培地 (ナカライテスク(株)) で培養した (37 度, 5% CO₂)。

2 . XPC 遺伝子 KO 細胞の構築

XPC を KO するために、その開始コドン部位をターゲットとして CRISPR/Cas9 ベクター、そして、ネオマイシンおよびハイグロマイシン薬剤耐性遺伝子を含む各ターゲティングベクターを用意した。次に、それら 3 つのベクター (CRISPR/Cas9 ベクター; 6 µg, 薬剤耐性ターゲティングベクター 2 種; 各 2 µg) を TSCER122 細胞 (5 x 10⁶ cells) に Neon Transfection System (1350 V, 10 mS, 3 pulses) を用いてコトランスフェクションした。その細胞を 20 mL の RPMI 培地で 37 度で 48 時間培養した。細胞を適宜希釈し、様々な

細胞濃度で、96 ウェルマイクロプレート上でさらに 14 日間培養した。その際、G418 (500 µg/mL) とハイグロマイシン (500 µg/mL) の両方を含む培地を用いた。CRISPR/Cas9 による標的配列での DNA 鎖切断と薬剤耐性遺伝子のターゲティングにより、XPC の開始コドン部位に耐性遺伝子が導入されているクローンは、その選択培地でコロニーを形成するため、そのクローン細胞についてジェノタイピングを行った。得られた細胞について、ウェスタンブロットング解析や紫外線照射による感受性試験を行った。

3 . ERCC6 遺伝子 KO, および KI 細胞の構築

ERCC6 を KO するために、その開始コドン部位をターゲットとして CRISPR/Cas9 ベクター、そして、ネオマイシンおよびハイグロマイシン薬剤耐性遺伝子を含む各ターゲティングベクターを用意した。細胞へのコトランスフェクションなどの方法は前述と同様である。

ERCC6 の KI 実験については、ERCC6 (CSB) を欠損する患者において、エキソン 5 で検出される変異 (K337*) を有する KI コンストラクトを構築した (Troelstra *et al*, *Cell* **71**, 939-953 (1992))。この変異を薬剤耐性遺伝子のターゲティングベクターのエキソン 5 に組み込んだ。エキソン 5 の下流をターゲットとする CRISPR/Cas9 ベクターを作製後、前述と同様の方法で細胞へコトランスフェクションし、選択培地を用いてクローニングを行った。

4 . ウェスタンブロットング

対数増殖期の細胞から得られた全細胞抽出物を 10% SDS ポリアクリアミドゲルで電気泳動した。その後、タンパク質を PVDF 膜に移行させ、5% スキムミルクまたは 1% BSA でブロッキングし、Can Get Signal Immunoreaction enhancer solution (東洋紡 (株)) で希釈した抗 CSB モノクローナル抗体 (sc-25370, サンタクルズ (株)), 抗 XPC モノクローナル抗体 (ab6264, アブカム(株)), あるいは抗 α チューブリンモノクローナル抗体

(ab7291, アブカム(株))と共に室温で1時間反応させた。0.05% Tween20を含むPBSで膜を洗浄後、抗マウスIgG ホースラディッシュペルオキシダーゼ(GEヘルスケアバイオサイエンス(株))と反応させ、化学発光によりタンパク質を検出した。

5. 紫外線照射による感受性試験

細胞をフェノールレッドを含まないRPMI培地で洗浄、再懸濁した。ペトリ皿(35 mm x 100 mm)に細胞(2.5×10^6)を5 mL培地で調整し、 2.7 W/m^2 のUV殺菌ランプを用いてUVC(254 nm)を照射した。UVライトの測定は、UV-light meter (Lutron)を用いた。照射後、その細胞を1.6 cells/mLの濃度で96穴マイクロプレートで培養し、細胞生存度を計算した。

6. mRNA発現の解析

対数増殖期の細胞(10^6 cells)を分取し、遠心分離後PBSで洗い、最終的に細胞ペレットとした。RNeasy mini kit (キアゲン(株))を使って、Total RNAを抽出した。次に、Superscript III First strand synthesis system (インビトロジェン(株))を用いて、Total RNA 10 ngから逆転写反応を行った。その反応生成物を用いて、目的遺伝子についてPCRを実施し、アガロースゲルで解析した。

7. コメットアッセイ

臭素酸カリウムを注射用水(株大塚製薬工場)で溶解後、対数増殖期にある細胞に暴露し、4時間振盪培養した。RPMI培地で細胞を洗浄後、DMSO(試薬特級、和光純薬工業(株))10v/v%と20mM EDTA(Sigma)を含む冷却したHBSS(Life Technoligise Co.)で懸濁し、0.45%低融点アガロース溶液(株ロンザジャパン)と混合した。引き続き、1.5%アガロース溶液(Sigma)を塗抹・乾燥したスライドガラスに重層し、これを細胞融解液に浸漬し、冷蔵下で一晩静置した。冷却した精製水でスライドガラスを穏やかに洗浄後、泳動槽に並べ、電気泳動緩衝液(pH>13、約4□)に20分間浸漬した後、300mA・36Vの条件で20分間

電気泳動した。その後、中和液に約10分間浸漬し、自然乾燥してスライド標本とした。SYBR Gold(Life Technoligise Co.)をTE緩衝液で10,000倍希釈した染色液で染色し、CCDカメラ(AVT FireWire CCDビデオカメラ)を装着した落射蛍光顕微鏡(OLYMPUS社、BX-50)を用い、200倍率で観察を行った。観察は100細胞/用量で行い、画像解析システム(Comet Assay IV、Perceptive Instruments Ltd.)を使用した。得られた結果のTail Intensityを指標とし、統計解析(Dunnett検定、Excel統計2010)を行った。

C. 研究結果

1. XPC KO細胞の分離と特性解析

XPCの開始コドン部位をターゲットとして、CRISPR/Cas9系でKOをしたところ、32クローン中19クローン(59%)について、そのターゲットとなる両アレルに薬剤耐性遺伝子が導入されていることを確認した。そのクローン細胞について、ウェスタンブロッティング解析を行うと、野生株ではXPCタンパク質の発現が観察されたが、XPC KO細胞では観察されなかった(図1)。また、紫外線照射による感受性を調べると、XPC KO細胞は、野生株よりも非常に高い感受性を示し、細胞生存率が著しく低下した(図2)。

2. ERCC6 KI細胞の分離と特性解析

ERCC6の開始コドン部位をターゲットとして、CRISPR/Cas9系でKOをしたところ、薬剤耐性となったクローンを単離したが、そのターゲットとなる両アレルに薬剤耐性遺伝子が導入されている細胞を得ることはできなかった。

そこで研究方法で述べた通り、エキソン5で検出される変異(K337*)を導入したERCC6 KI細胞を分離したところ、56クローン中3クローン(5.4%)について、そのターゲットとなる変異(K337*)と両アレルに薬剤耐性遺伝子が導入されていることを確認した。そのクローン細胞について、ウェスタンブロッティング解析を行うと、野生株では全長のCSBタンパク質の発現が観察

されたが、*ERCC6* KI 細胞では観察されなかった (図3)。次に、その mRNA の発現について調べると、野生株では *ERCC6* の発現をはっきりと観察することができたが、*ERCC6* KI 細胞では微量に観察できた (図4左)。それをシーケンス解析すると、目的どおりの配列に改変できていることが分かった (図4右)。この *ERCC6* KI 細胞について、紫外線照射による感受性試験を行ったところ、前述の *XPC* KO 細胞ほどではないが、*ERCC6* KI 細胞は野生株よりも感受性を示すことが分かった (図5)。さらに、臭素酸カリウムを用いてコメットアッセイを実施した。10 mM ~ 0.041 mM の用量設定試験を行い、相対的細胞集団倍加 (RPD) が野生株で 18%、*ERCC6* KI 細胞で 32% となる臭素酸カリウム濃度 (3.3 mM) を本試験に採用することにした。コメットアッセイの結果 (図6)、臭素酸カリウムを処理した直後 (0 min) は、野生株と *ERCC6* KI 細胞の DNA 損傷量 (Tail (%)) に差はなかったが、120 min 後の野生株の DNA 損傷量は *ERCC6* KI 細胞よりも有意に減少することが分かった。

D. 考察

本研究では、グローバルゲノム NER の *XPC* 遺伝子 (*XPC* タンパク質)、転写共役型 NER の *ERCC6* 遺伝子 (*CSB* タンパク質) が、その各修復経路の必須遺伝子であることから、それらの遺伝子の KO、あるいは KI 細胞を構築することを目的とした。なぜなら、バルキー DNA 付加体のほとんどは、そのグローバルゲノム NER か転写共役型 NER のどちらに進むかは全く不明であり、もし、*XPC* と *ERCC6* を破壊した細胞を構築できれば、そのどちらの NER 修復経路が働いているかを容易に判定することができるからである。*XPC* KO 細胞は、CRISPR/Cas9 系と薬剤耐性遺伝子を含むターゲティングベクターを用いて、59% という非常に高効率なターゲティングにより分離することができた。CRISPR/Cas9 ベクターのみを利用したときは、ターゲティング効率は数%程度にしかならず、薬剤耐性遺伝子をターゲティング部

位に導入させ薬剤選択によって、目的の KO 細胞を分離することは非常に有用であることも確認できた。

しかしながら、その CRISPR/Cas9 系と薬剤耐性遺伝子を含むターゲティングベクターを用いる方法であっても、*ERCC6* の KO 細胞を分離することができなかった。それは、欠損させようとした *ERCC6* 遺伝子の開始コドン領域が、CRISPR/Cas9 による切断に対して耐性を示すような立体構造、または DNA 配列を持つなどの可能性が考えられた。すなわち、CRISPR/Cas9 系と薬剤耐性遺伝子を含むターゲティングベクターを用いる方法であっても、遺伝子によって KO できないこともあった。

そこで、*ERCC6* 欠損患者で検出されている変異をコンストラクトに導入し、CRISPR/Cas9 系と薬剤耐性遺伝子ターゲティングベクターを用いて、細胞に形質転換したところ、5.4% のターゲティング効率で KI 細胞を分離することができた。今回の 5.4% という低めのターゲティング効率から推察すると、もし、薬剤耐性遺伝子を用いず、CRISPR/Cas9 ベクターと KI コンストラクトの通常のプロトコールで形質転換したとしても、*ERCC6* KI 細胞は分離できなかったと予想できる。以上のことから、薬剤耐性遺伝子を用いる CRISPR/Cas9 系は、KO 並びに KI 細胞を分離するために必須の方法であることが分かった。

本研究で分離できた *XPC* KO 細胞は、紫外線照射に非常に感受性が高く、良好な表現型を得られたが、*ERCC6* KI 細胞については、少し感受性が高くなっただけであった。そこで、*ERCC6* (*CSB*) 欠損患者の細胞は、紫外線照射だけでなく酸化反応にも感受性を示すことが分かっているため (Waard et al, *DNA Repair* 2, 13-25 (2003))、もう一つのエンドポイントとして、臭素酸カリウムを用いたアルカリコメットアッセイを実施した。野生株の細胞は、臭素酸カリウムを処理した直後 (0 min) から 120 min の間に DNA 損傷量の減少が観察され、これは DNA 修復機構が働くことで DNA 損傷が除去されたと予想できた。一方、今回分離

できた *ERCC6* KI 細胞は、臭素酸カリウムを処理した直後 (0 min) と 120 min の DNA 損傷量に変化が無く、その間に DNA 修復が進んでいないと推測できた。酸化 DNA 損傷に対して CSB が関与していると考えられた (Guo et al, *Nucleic Acids Res.* 41, 7700-7712 (2013))。つまり、*ERCC6* KI 細胞の良好な表現型を確認できたと考えられる。

E. 結論

グローバルゲノム NER の *XPC* 遺伝子、転写共役型 NER の *ERCC6* 遺伝子が、その修復経路の必須遺伝子であることから、それらの遺伝子の KO、あるいは KI 細胞を構築した。これらの細胞を用いることにより、これまで不明だったバルキー DNA 付加体のヌクレオチド除去修復機構の全容が明らかになると期待できる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sassa A, Kanemaru Y, Kamoshita N, Honma M, Yasui M; Mutagenic consequences of cytosine alterations site-specifically embedded in the human genome. *Genes and Environment* **38**:17 (2016)
- 2) Sassa A, Çağlayan M, Rodriguez Y, Beard WA, Wilson SH, Nohmi T, Honma M, Yasui M; Impact of Ribonucleotide Backbone on Translesion Synthesis and Repair of 7,8-Dihydro-8-oxoguanine. *J. Biol. Chem.* **291**, 24314-24323 (2016)

2. 学会発表

1. 佐々彰, Çağlayan M, Beard WA, Wilson SH, 能美健彦, 本間正充, 安井学; DNA 中の酸化リボヌクレオチドが DNA 複製および修復機構に及ぼす影響. 第 45 回日本環境変異原学会, つくば (2016 年 11 月)

2. 鈴木愛, Bonnaud P, 佐々彰, 安井学, 宮本明, 本間正充; 8-oxoG 付加数の異なる DNA に対する修復タンパク hOGG1 の高速化量子分子動力学法による親和性評価. 第 45 回日本環境変異原学会, つくば (2016 年 11 月)

1)

H. 知的所有権の取得状況

なし

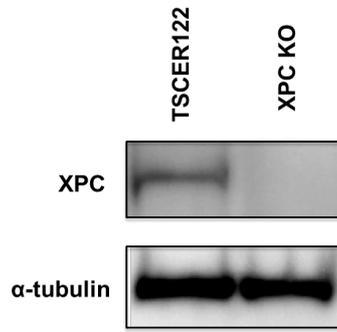


図 1 . *XPC* ノックアウト細胞のウェスタンブロットティング解析

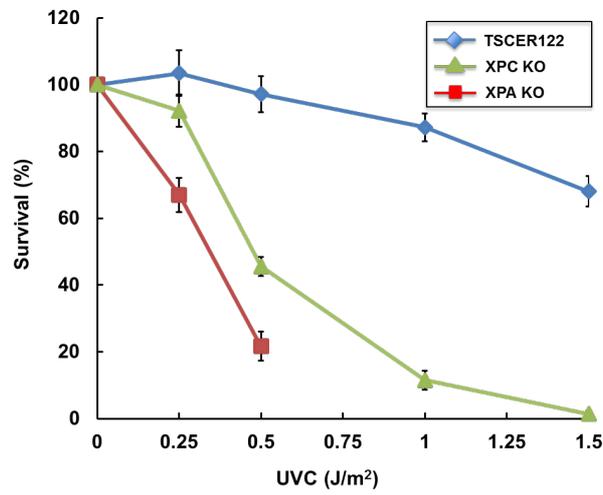


図 2 . 紫外線照射に対する *XPC* ノックアウト細胞の感受性

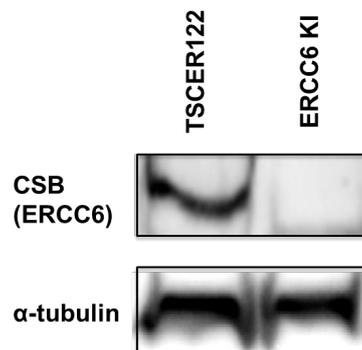


図 3 . *ERCC6* ノックイン細胞のウェスタンブロットティング解析

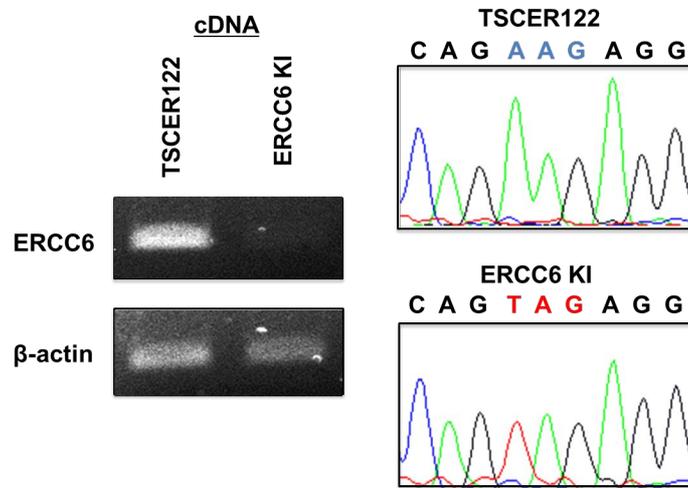


図4 . *ERCC6* ノックイン細胞の mRNA 解析

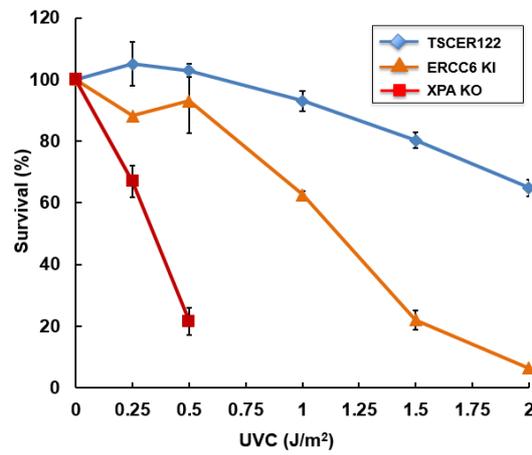


図5 . 紫外線照射に対する *ERCC6* ノックイン細胞の感受性

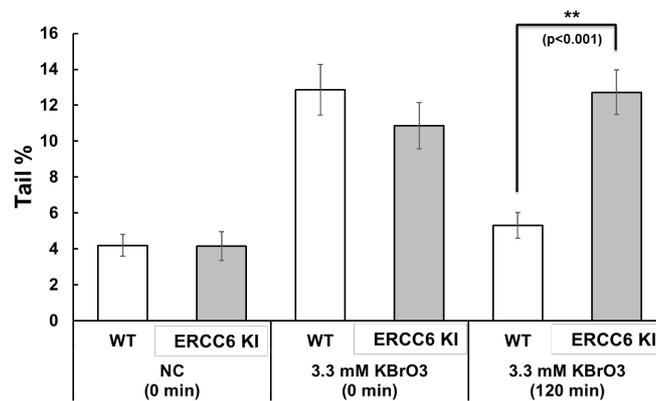


図6 . コメットアッセイを用いた *ERCC6* ノックイン細胞の DNA 修復効率の低下

