

新規変異評価システムを用いた長波長の紫外線 (UVA) による突然変異誘発機構の解明

広島大学大学院統合生命科学研究科

津田 雅貴

UVA increases the risk of human cancer. One of the mutation patterns, mainly found in cancers derived from tissues directly exposed to UVA, is attributable to misreplication of DNA damage caused by 7,8-dihydro-8-oxoguanine(8-oxoG). However, little is known the mechanism of UVA mutagenesis. I previously developed the piggyBlock system. The system employs the random integration of UV damage (CPD) into the genome of cells using the 'piggyBac' transposon-based vector assay. I measured the mutation rate in human TK6 cells at a chemically synthesized 8-oxoG and CPD integrated into genomic DNA. I transfected the piggyBlock vector carrying CPD into *wild-type*, *RAD18*^{-/-}, and *POLη*^{-/-} cells. I then selected cells with puromycin, PCR amplified nucleotide sequences over the CPD site in individual puror clones. I found that the mutation rate of *RAD18*^{-/-} cells was comparable to that of wild-type. Phenotype of *RAD18*-deficient cells is almost all normal, in rate of the bypass of CPD site, suggesting that some redundant pathways might operate the mutation induced by CPD.

Topoisomerase I (TOP1) resolves DNA topology during replication and transcription. The enzyme forms an intermediate TOP1 cleavage complex (TOP1cc) through transient TOP1-DNA-protein crosslinks. Some anticancer drugs and carcinogen freeze this reaction intermediate. However, it is not known whether UVA generates TOP1cc. Thus, I developed an assay system to estimate the TOP1cc using anti-TOP1 antibody. In future, I will analyze the TOP1cc removal mechanism using this assay system genome editing cells.

1. 緒言

紫外線はDNAに突然変異を引き起こしうる。突然変異は発がんの発生につながる。紫外線は波長により、短波長(UVC: 190-280nm)、中波長(UVB: 280-320nm)、長波長(UVA: 320-400nm)に分類される。多くの研究者が、エネルギーが高いUVCを用いて突然変異誘発機構を調べてきた¹⁾。しかし、UVCは、オゾン層や大気に吸収され地上に到達しないので、人体に突然変異を引き起こす因子とは考えにくい。一方、UVAは、ほとんどのエネルギーが地表に到達している。UVAは、透過力が大きく、ほとんどが表皮を通過し、真皮もしくは皮下組織まで到達する。しかし、UVAはエネルギーが弱いという理由から、突然変異に関して解析されてこなかった。ところが、近年、UVAが突然変異を誘発することが示された²⁾。その原因は、UVAが活性酸素種やラジカルを生成し、7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) というDNA損傷を引き起こすからだと推定されている。本研究の目的は、新規変異評価システム(piggyBlockシステム)を用いて、8-oxoG損傷箇所の突然変異発生を引き起こすDNA合成酵素やその制御因子を見つけ出すことである。

最近、UVCによって生成するシクロブタン型ピリミジ



Elucidation of Mutagenesis Mechanism by UVA Using a Novel Mutagenesis Assay

Masataka Tsuda

Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University

ンダイマー (CPD) というDNA損傷箇所、PDIP38というタンパク分子が変異を促進することを、新規変異評価システム(piggyBlockシステム)とヒトゲノム編集細胞を用いて、明らかになった³⁾。piggyBlockシステムは、これまで使われていた変異評価手法と異なり、人工的に合成したDNA損傷をゲノムDNAに挿入し、ゲノム上で起こる変異の頻度(変異率)とどのような変異が起きるかを直接調べる手法である(図1)⁴⁾。piggyBlockを用いれば、UVAによって生成するDNA損傷箇所での突然変異誘発分子を見つけることが可能である。本研究では、コントロールとして、CPD損傷入りpiggyBlockも解析を行う。

DNAの複製や転写の際に生じるスーパーコイルは、トポイソメラーゼ1(TOP1)という酵素がDNAに一本鎖切断を引き起こすことで解消する⁵⁾。この反応の際に、TOP1は一過的にDNAの3'末端に共有結合する。スーパ

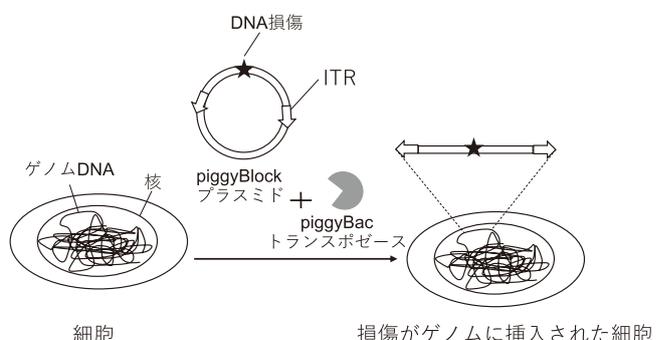


図1 piggyBlockシステムとは?

DNA損傷の両端にITRという配列を入れたプラスミドDNAを用意する。このITRの間の配列がトランスポゼースという酵素によって細胞のゲノムDNAに挿入される。DNA複製後にゲノム抽出をし、損傷箇所の塩基配列を調べ、変異率を算出できる。

ーコイルが解消されると、TOP1はDNA末端から離れ、再結合する。しかし、一部の抗がん剤や環境変異原によって、TOP1はDNA末端にトラップされてしまうことがある。このDNAとTOP1の複合体をTOP1ccという。本研究では、UVAによって発生するDNA損傷がTOP1ccを形成させるのかを検討する。

2. 方法

2.1. 細胞培養

ヒトBリンパ芽球細胞由来のTK6細胞はRPMI1640培地(富士フィルム和光純薬株式会社)に、非働化したウマ血清(Thermo Fisher Scientific)を5%、L-グルタミン(ナカライテスク株式会社)、ピリビン酸ナトリウム(Sigma-Aldrich)を0.2mg/mL、ペニシリン(ナカライテスク株式会社)を100U/mL、ストレプトマイシン(ナカライテスク株式会社)を100mg/mLになるように加え、CO₂濃度5%、37°Cで培養した。

2.2. RAD18/POL η 遺伝子欠損細胞の作製

RAD18遺伝子を破壊する為に、ターゲティングベクターとしてRAD18-HYG^RとRAD18-NEO^Rを作製した。このベクターを作製するために、ゲノムDNAを鋳型に、プライマーとして、5'-GCCAATTGGGTACCGGGCCGTTAATACAGCATAA-3'と5'-CTGGGCTCGAGGGGGGCC TTGGGCAGCGCTTC-3'を用いてレフトアームをPCR増幅した。また、5'-TGGGAAGCTTGTCGACTTAATAAATCAGGTAAAGTAAT-3'と5'-CACTAGTAGGCGC GCCTTAAAGCAACAAAATGAA-3'を用いて、ライトアームをPCR増幅した。レフトアームとライトアームは、DT-ApA/HYG^RベクターおよびDT-ApA/NEO^RのApaIサイトとAflIIにGENEART Seamless Cloningキットを用いてそれぞれ挿入した。また、RAD18遺伝子のエキソン7を標的とするgRNAを発現させるために、pX330ベクターに5'-GAGCATGGATTATCTATTC-3'をライゲーションで挿入し、CRISPR-RAD18を作製した。POL η 遺伝子欠損細胞に、2 μ gのRAD18-HYG^R、2 μ gのRAD18-PURO^R、6 μ gのCRISPR-RAD18をNEONトランスフェクションシステム(1350V, 10msec, 3pulse)で遺伝子導入した。48時間後、ピューロマイシンとハイグロマイシンを加え、細胞を96穴プレートに播いた。7~10日後に、シングルコロニーをピックアップし、候補の細胞のゲノムDNAを抽出した。標的組換えが起きているかを、ゲノミックPCRで確認した。さらに、作製した細胞から、PURO^R遺伝子を取り除くために、Cre組換え酵素を一過性発現させ、ピューロマイシン感受性の細胞を獲得した。

2.3. RAD18/POL η 遺伝子欠損細胞における紫外線損傷(CPD)箇所における変異解析

以前作製した³⁾、CPDが結合したpiggyBlockプラスミド10ngと1 μ gのTransposase発現プラスミドを同時にNEONトランスフェクションでPOL η 遺伝子欠損細胞およびPDIP38遺伝子欠損細胞に導入しに遺伝子導入した。96well plateに細胞を播き、トランスフェクション30時間後にピューロマイシンで、BPDG損傷がゲノムにインテグレーションされた細胞のみをセクションした。10日後、ピューロマイシン耐性コロニーからゲノムDNAを抽出した。

2.4. 塩化セシウム密度勾配遠心法によるゲノムDNAの精製

5.0 \times 10⁷ TK6細胞を900mLのLysisバッファー(10mMリン酸バッファー[pH7.5], 1mM EDTA, RNaseA [20mg], プロテアーゼインヒビターカクテル)で懸濁し、10分間氷上でインキュベートした。サルコシルを終濃度1%になるように添加し、30分間氷上でインキュベートした。ゲノムDNAを剪断する為に、23ゲージの針で20回、通過させ10mMリン酸バッファー[pH7.5]でサンプル全量を9mLとし、9.3gのCsClを混ぜ、694,000 \times gで17時間遠心した。遠心後、500mLずつ分取し、ゲノムDNAが含まれるフラクションを回収し、アガロースゲル電気泳動で調べ、10mMリン酸バッファー[pH7.5]、1mM EDTAが含まれたバッファーで透析した。もう一度、塩化セシウム密度勾配遠心法を行った。ゲノムDNAが含まれるフラクションを回収し、10mMリン酸バッファー[pH7.5]、1mM EDTAが含まれるバッファーで3時間透析し、これを2回行った。さらに、2M NaCl, 10mMリン酸バッファー[pH7.5]、1mM EDTAが含まれるバッファーで3時間透析し、これを2回行った。最後に、MilliQ水で3時間透析し、これを2回行った。遠心濃縮を用いてサンプルボリュームを減らした。ナノドロップを用いて、260nmの波長でDNA濃度を測定した。

2.5. ウェスタンブロットを用いたTOP1ccの検出

2.4.の方法で精製したゲノムDNAを30mg用意し、10mMのTris-HCl(pH7.6)、25mMのMgCl₂、0.5mMのCaCl₂を含むDNaseIバッファーに溶かし、全量が33mLになるように3ユニットのDNaseI(New England Biolabs)で37°C、2時間インキュベートした。サンプルをレムリサンプルバッファー(BIO-RAD)で変性させ、7.5%のSDS-PAGEゲルで分離させた。その後Trans-Blot Turbo(BIO-RAD)を用いてメンブレンに写し取り、1次抗体として、抗TOP1抗体および抗マルチユビキチン抗体を用い、HRP標識二次抗体で反応させた。ECLで化学

発光させ、ChemiDocイメージングシステムで検出した。

2. 6. スロットプロットを用いたTOP1ccの検出

2. 4. の方法で精製したゲノムDNAを2mg用意し、ECLニトロセルロースメンブレン (GE Healthcare) にスロットプロットを用いて吸着させた。ゲノムDNAを吸着したメンブレンをTrisバッファーで洗浄した。抗TOP1抗体および抗TOP1cc抗体を用いて、ウェスタンブロットと同様の方法で検出した。

3. 結果

3. 1. CPD損傷箇所における突然変異解析

CPD損傷入り piggyBlock プラスミドをPOL η /RAD18 遺伝子欠損細胞に遺伝子導入し、ピューロマイシン耐性クローンを獲得した。これらのクローンは、CPD損傷が挿入された親細胞のワトソン鎖およびクリック鎖のどちらかを受け継ぎ、クローン内でモザイク状となる。従って、このアッセイにおいて、エラーフリーのテンプレートスイッ

チか損傷乗り越えによる複製ブロックの解除は、区別することができる。TLSが起きるとApA (正確なTLS) か他の塩基が挿入 (不正確なTLS, 突然変異) され、ダブルピークとして検出される (図2A左)。テンプレートスイッチによる解除では、CPD損傷箇所ではGpCが挿入され、シーケンス解析ではGCのシングルピークとして検出される (図2A右)。

この原理に基づいて、TLSとテンプレートスイッチの発生頻度を調べた。POL η の遺伝子欠損により、TLSの頻度は、4.7%から11.6%に増加した (図2B)。突然変異の正体である、不正確なTLSの頻度は、0%から3.6%に増加した (図2C)。一方、RAD18 遺伝子の欠損により、TLSの頻度および不正確なTLSの頻度は野生型と同じであった。POL η /RAD18 遺伝子欠損細胞は、TLSの頻度はPOL η 遺伝子欠損細胞とほぼ同じであったが、不正確なTLS (突然変異) は5.8%に上昇した。従って、RAD18は、POL η が存在しない状況では、正確なTLSを促進する。

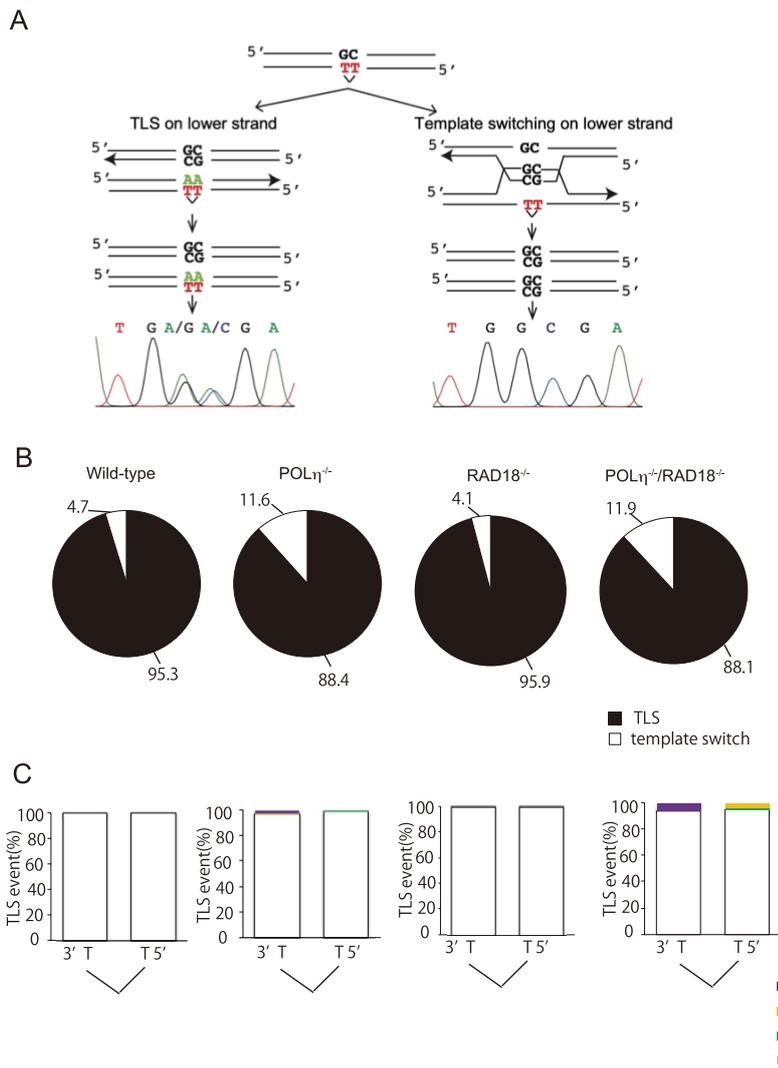


図2 piggyBlock解析の結果

3. 2. TOP1ccの定量

細胞内のTOP1ccを正確に定量するために、塩化セシウム密度勾配遠心法を2回繰り返し、細胞抽出液からDNAが結合していないTOP1とTOP1ccを分離した。その後、精製したゲノムDNAにDNaseIを添加しゲノムDNAを分解し、ウェスタンブロットでTOP1ccの検出を試みた。メンブレンに転写した後、抗TOP1抗体を用いて検出した。CPTを処理した細胞のTOP1ccは、予想されるTOP1のバンドの位置 (TOP1 = 91kDa) より高分子側に、スメアなシグナルとして検出され、このシグナルは処理したCPTの濃度依存的に強くなった (図3, 左のパネル)。TOP1ccのバンドよりも高分子側に検出されたシグナルは、翻訳後修飾が起こった可能性が高い。そこで、同じサンプルを抗マルチユビキチン抗体で調べたところ、CPTの処理濃度依存的に、ポリユビキチン化の量が増えていた (図3, 右のパネル)。CPTはTOP1のポリユビキチン化を促進することはすでに報告されている。従って、TOP1ccはCPTの処理によってポリユビキチン化を受けている可能性がある。このようにウェスタンブロットによる分析では、TOP1ccはスメアとして検出されるので、バンドの定量は難しい。そこで、DNaseIを使用せず、スロットブロットした。スタンダードのTOP1タンパク質と

2 μ gのゲノムDNAをスロットブロットし、シグナルを検出した (図4A, B)。その結果、TK6細胞にCPTを0.4、1.9、7.1mM処理した場合、それぞれ、ゲノムDNA 10⁷bpに当たりTOP1ccが102、297、469個生成していたことが分かった。細胞内にある全TOP1タンパク質の内、TOP1ccの割合を計算する為に、ウェスタンブロットを用いて細胞内の全TOP1タンパク量を求めた。CPTを0.4、1.9、7.1mM処理した細胞内の全TOP1の量はそれぞれ5.5 \times 10³細胞あたり13.5、12.7、9.3ngであった (図4)。従って、細胞内の全TOP1タンパク分子の内、TOP1cc分子の割合は、CPTを0.4、1.9、7.1mM処理した細胞でそれぞれ0.8、1.2、1.7%であった。

3. 3. TOP1cc修復の各ステップの除去動態を個々に計測する方法の確立

本研究では、エピトープの異なる2つの抗体 (抗TOP1抗体と抗TOP1cc抗体) を用いて、TOP1cc修復の各ステップの除去動態を個々に計測できると考えた。これまでの実験で用いた抗TOP1抗体は、TOP1タンパク質の表面を認識する。このエピトープはプロテアソームによるタンパク質分解を受けるので、TOP1cc修復の1段階目を評価できる。一方、抗TOP1cc抗体は、TOP1活性部位前後

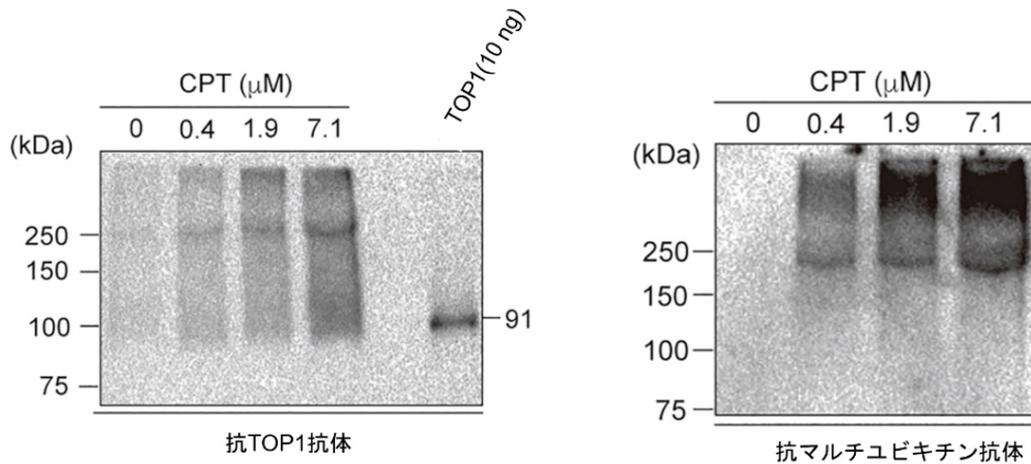


図3 CPT処理した野生型細胞のゲノムDNAを用いたウェスタンブロット解析

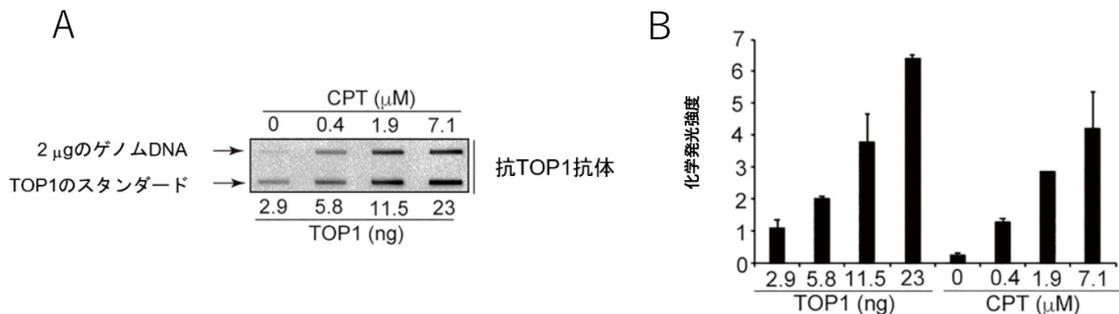


図4 CPTによって生成するTOP1ccの定量

15 アミノ酸とホスホチロシン結合を認識する抗体である⁶⁾。この抗体のエピトープは、TOP1cc修復における2段階目で除去される箇所である。従って、この抗体を用いれば2段階目の修復動態を評価できる。実際に、私は、これらの抗体が、報告されているエピトープを認識するかを検証する為に、CPTで処理した野生型細胞から精製したゲノムDNAを用いて、スロットプロットで分析した。このサンプルをプロテイナーゼK (ProK) およびV8プロテアーゼで消化し、ニトロセルロース膜にスロットプロットし、抗TOP1抗体および抗TOP1cc抗体で検出した。ProKは、脂肪族アミノ酸と芳香族アミノ酸のC末端側のペプチド結合を切断する。従って、両抗体の認識箇所は消化される。実際、いずれの抗体においてもシグナルは検出されなかった。一方、V8プロテアーゼは、アンモニウムイオン存在下でグルタミン酸のC末端側のペプチド結合を切断し、抗TOP1抗体のエピトープは消化されるが、抗TOP1cc抗体のエピトープは消化されない。実際、抗TOP1抗体ではシグナルは検出されなかったが、抗TOP1cc抗体ではシグナルが検出された。これらの結果から、抗TOP1抗体および抗TOP1cc抗体を用いて、TOP1cc修復の1段階目および2段階目を区別して除去動態を評価できることが分かった。

4. 考 察

POL η はCPD損傷箇所における正確な損傷乗り越えを行う。これは、今回行った実験結果とも一致する。野生型細胞にRAD18遺伝子を欠損させた場合、この損傷乗り越えの頻度および変異スペクトラムに変化は見られていない。しかし、POL η 遺伝子にRAD18遺伝子を欠損させた場合、不正確なTLS(突然変異)は上昇した。RAD18は、ユビキチンライゲースE3として知られており、PCNAのモノユビキチン化を引き起こす⁷⁾。このモノユビキチンにポリメラーゼ η (Pol η) がリクルートされる⁸⁾。試験管内でPol η は、紫外線損傷箇所を鋳型にDNA合成でき、正確な塩基を挿入する(例:チミン二量体を形成している場合、AAが挿入)。従って、Rad18を欠損させた場合、Pol η がリクルートされないの、紫外線損傷箇所を鋳型として正確にDNA合成できず、変異が誘発されると考えられる。本研究結果から、POL η はRAD18の有無に関わらず、紫外線損傷箇所のTLSには影響を与えないことが分かった。POL η とRAD18のどちらも存在しない時は、不正確なTLSが増加したことから、損傷乗り越えポリメラーゼであるPol ι , Pol κ , Rev1等が突然変異を誘発している可能性がある。また、TOP1ccを検出する実験系を構築することができた。今後は、UVA暴露で誘発するTOP1cc修復を、ゲノム編集細胞を用いて解析していく予定である。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Ikehata H, Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res.* 2011;52 (2) : 115-25. Epub 2011/03/26. doi: 10.1269/jrr. 10175. PubMed PMID: 21436607.
- 2) Kucab JE, Zou X, Morganella S, Joel M, Nanda AS, Nagy E, et al. A Compendium of Mutational Signatures of Environmental Agents. *Cell.* 2019; 177 (4) : 821-36. e16. Epub 2019/04/16. doi: 10.1016/j. cell. 2019. 03. 001. PubMed PMID: 30982602; PubMed Central PMCID: PMC6506336.
- 3) Tsuda M, Ogawa S, Ooka M, Kobayashi K, Hirota K, Wakasugi M, et al. PDIP38/PolDIP2 controls the DNA damage tolerance pathways by increasing the relative usage of translesion DNA synthesis over template switching. *PLoS One.* 2019; 14 (3): e0213383. Epub 2019/03/07. doi: 10.1371/journal. pone. 0213383. PubMed PMID: 30840704; PubMed Central PMCID: PMC6402704.
- 4) Hirota K, Tsuda M, Mohiuddin, Tsurimoto T, Cohen IS, Livneh Z, et al. In vivo evidence for translesion synthesis by the replicative DNA polymerase δ . *Nucleic Acids Res.* 2016; 44 (15): 7242-50. Epub 2016/05/18. doi: 10.1093/nar/gkw439. PubMed PMID: 27185888; PubMed Central PMCID: PMC6509730.
- 5) Pommier Y, Sun Y, Huang SN, Nitiss JL. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016; 17 (11): 703-21. Epub 2016/10/21. doi: 10. 1038/nrm. 2016. 111. PubMed PMID: 27649880; PubMed Central PMCID: PMC6509248348.
- 6) Patel AG, Flatten KS, Peterson KL, Beito TG, Schneider PA, Perkins AL, et al. Immunodetection of human topoisomerase I-DNA covalent complexes. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44 (6): 2816-26. Epub 2016/02/27. doi: 10. 1093/nar/gkw109. PubMed PMID: 26917015; PubMed Central PMCID: PMC6504824114.
- 7) Geng L, Huntoon CJ, Karnitz LM. RAD18-mediated ubiquitination of PCNA activates the Fanconi anemia DNA repair network. *J Cell Biol.* 2010; 191 (2): 249-57. Epub 2010/10/13. doi: 10.1083/jcb. 201005101. PubMed PMID: 20937699; PubMed Central PMCID:

PMCPMC2958487.

8) Watanabe K, Tateishi S, Kawasuji M, Tsurimoto T, Inoue H, Yamaizumi M. Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction

and PCNA monoubiquitination. *Embo j.* 2004; 23(19) : 3886-96. Epub 2004/09/11. doi: 10. 1038/sj. emboj. 7600383. PubMed PMID: 15359278; PubMed Central PMCID: PMCPMC522788.