

紫外線による細胞老化と光老化を繋ぐ分子基盤の解明

公益財団法人東京都医学総合研究所基礎医学研究分野

笹沼 博之

As we are now facing an era of hyper aging society, maintaining mental and physical youthfulness throughout a lifetime is directly linked to healthy longevity and the quality of life (QOL). Youthful is often assessed by appearance, including signs of aging such as skin blemishes and wrinkles. Therefore, inhibiting these skin aging signs holds immense importance for maintaining QOL. Sunspots and wrinkles are attributed to photoaging, caused by exposure to ultraviolet (UV) irradiation from sunlight. Since the continuous exposure of UV and subsequent photoaging leads to solar keratosis and skin cancer, investigation of molecular mechanism of photoaging and its prevention are necessary for the maintenance of QOL. In this study, we aim to investigate photoaging in terms of genomic alternation by exposure of UV, especially the molecular mechanism underlying cause of photoaging. Our research would help provide fundamental insights for seeking “photoaging scavenger compounds” in future.

1. 緒言

細胞に存在するDNAは、絶えず内的外的要因によって損傷を受ける。内的要因としては活性酸素種が最も多い、一方で、外的要因で最も多いのが紫外線である。紫外線はDNA鎖にぶつかるとそのエネルギーにより塩基間を共有結合により架橋してしまう。架橋された二つの塩基は、転写やDNA複製を行うポリメラーゼによって認識できないため正しい塩基を合成鎖に挿入することができない。こうした架橋塩基は、複数の修復経路によって修復される。Translesion DNA synthesis (TLS) 経路とヌクレオチド除去修復 (NER) 経路は、主要な紫外線損傷経路である。TLS経路では、TLSポリメラーゼが架橋塩基を乗り越えることによってDNA合成を継続する。またNER経路では、架橋塩基を含む周辺の塩基をヌクレアーゼにより除去し、除去された領域をDNAポリメラーゼが合成することで修復する。TLSとNER経路は本研究では、それらに加えてDNA二重鎖切断修復経路である相同組換え (HR) 修復経路の紫外線損傷修復における役割を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2.1. 細胞培養

ヒトBリンパ芽球細胞由来であるTK6細胞を使用した。TK6細胞の培養には、RPMI1640培地に非働化ウマ血清

を10%加えた。さらにL-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン、ストレプトマイシンをそれぞれ、最終濃度2mM、1mM、100U/mL、100mg/mL加えた。細胞培養液は、CO₂濃度5%、湿度100%、37°Cで培養した。

2.2. 遺伝子改変細胞の樹立

2.2.1. RAD18 遺伝子破壊細胞の樹立

TK6細胞のRAD18遺伝子をCRISPR/Cas9技術を使用し、相同組換え法により破壊した。RAD18遺伝子破壊の方法は、2023年9月に出版された『Cosmetology』最新号(第31号)の津田雅貴先生による研究課題「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」に記述されている。

2.2.2. AuxinによるBRCA2 遺伝子発現抑制細胞の樹立

AuxinによるBRCA2遺伝子発現抑制細胞とは、植物ホルモンであるAuxinを培地中に加えることで、AID配列を融合させた標的分子(BRCA2-AID)がプロテアソーム依存的に分解を起こす細胞である^{1,2)}。最初に、F1, 5'-ACTGTGGCATAGAGAGAGGTTAAGCAATTGとR1, 5'-ATGGTAAAACCCAGTCTCTACTAAAAATGCプライマーを用いてヒトゲノムより約2kbの断片を増幅、精製した(AMP1)。AMP1を鋳型として、LeftアームをLeft_F2, 5'-AGGGCGAATTGGAGCTCCCCACTGTGGCATAGAGAGAGGTTAAGCAATTGとLeft_R2, 5'-TTGGCGCCTGCACCGGATCCGATATATTTTTT AGTTGTAATTGTGTCCTGプライマーを使って、またRightアームをRight_F2, 5'-CGAAGTTATTAGGTCCCTCGTGTGTCACAATGAGAAAAGAAATTAGTTTC Right_R2, 5'-GGGAACAAAAGCTGGGGAACCTCTTATGGTAAAACCCAGTCTCTACTAAAAATGCを使って増幅した。増幅したLeftとRightアームを精製し、制



Elucidation of the molecular basis linking UV-induced cellular aging and dermatoheliosis

Hiroyuki Sasanuma

Department of Basic Medical Sciences,
Tokyo Metropolitan Institute of Medical
Science

限酵素 SmaI と EcoNI で消化した pBS-AID ベクターを混ぜた。それぞれの DNA 断片を Seamless kit (Invitrogen, US) によって連結し、ターゲティングベクターを作製した。BRCA2 遺伝子座は、染色体 13 番にある。TK6 細胞の染色体 13 番はトリソミーであるため、全ての BRCA2 遺伝子座に AID タグを挿入するために、3 種類のマーカー遺伝子を持つターゲティングベクターを作製した (図 1)。BRCA 2 遺伝子の終結コドン直前に AID 配列を挿入するために終結コドン直後の 3'UTR を標的とする gRNA (5'-ACCTTTCCAGTTTATAAGAC) を Cas9-gRNA 発現ベクターである pX330 にクローニングした。6 × 10⁶ 細胞に対して、3 種類のターゲティングベクター (Neomycin, Hygromycin, Histidinol) と pX330-gRNA を同時にエレクトロポレーション法 (NEON, Invitrogen, US) により細胞に導入した。エレクトロポレーション後、24 時間抗生物質なしの培地で培養し、96 ウェルプレートに細胞を Neomycin, Hygromycin, Histidinol 入りの培地ともに塗布し、10 日間培養した。コロニーを 2mL 培地で増やし、1 mL から細胞ストック、1 mL からゲノムを抽出した。AID タグが BRCA2 遺伝子の C 末端に導入されたかどうかを次のプライマーを用いて確認した³⁾ (図 2)。

BRCA2_AID_chkR, 5'-CTATTAACCTAAGAAAGTACAAATATTG,

HIS_AID_F, 5'-ATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTT,

HYGRO_AID_F, 5'-CGAGCTGCAAGAACTCTTCCTCACGCGCGT,

NEO_AID_F, 5'-AGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGC

3. 結果

3.1. BRCA2 と合成致死性を示す遺伝子変異のスクリーニングと結果の検証実験

BRCA 2 遺伝子は、相同組換えに重要な役割を果たす。BRCA2 遺伝子変異は、家族性乳がん卵巣がん症候群やファンコーニ貧血を引き起こす。BRCA2-AID 細胞を用いて、BRCA2 遺伝子発現を抑制したときに合成致死性を示す遺伝子変異のスクリーニングを行った。方法は、図 3 に示す通り、ヒトゲノムにコードされているほぼ全ての遺伝子 (約 2 万遺伝子) に対して gRNA を発現するレンチウイルスを Cas9 発現 BRCA2-AID 細胞に感染させた。感染細胞のみを選択するため Puromycin を含む培地で培養した。増殖細胞を 2 つのグループに分け、一つを Auxin 含有培地でもう一つを Auxin 不含有培地で培養した。その結果、約 100 遺伝子変異が BRCA 2 遺伝子発現抑制細胞の増殖能をより悪くすること、約 70 遺伝子変異が逆に BRCA 2 遺伝子発現抑制細胞の増殖能を回復させることがわかった

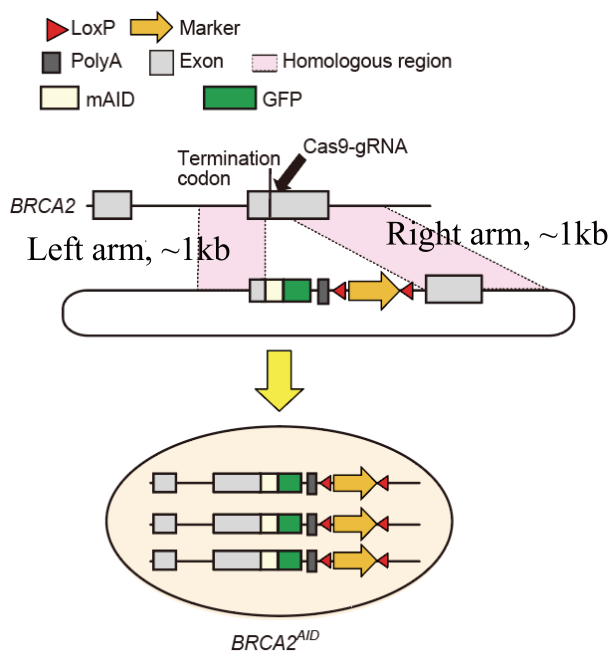


図 1 BRCA2 AID 細胞の作製方法
約 1 kb の Left arm と Right arm を AID タグを挟んでクローニングした。gRNA-Cas9 が終結コドン直後を切断すると、ピンク領域の相同配列間で相同組換えが起こる。相同組換えにより AID タグとマーカー遺伝子がゲノムに挿入される。

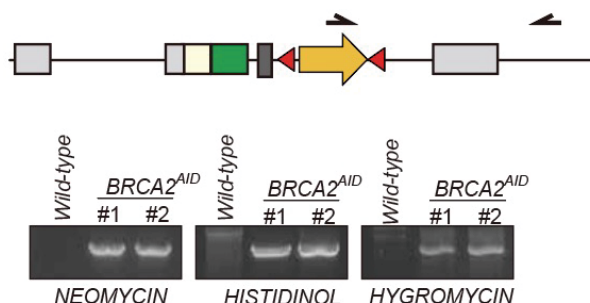


図 2 PCR 増幅による標的組換えの確認
⇐で示すプライマーを使用した。野生型細胞では、→プライマーがアニールする抗生物質耐性遺伝子がないので、予想される位置に増幅断片が検出されない。

(FDR < 0.05)。その中で紫外線損傷修復に非常に重要な役割を果たす XPA 遺伝子変異が見つかった。このスクリーニング結果の再現性を調べる目的で、XPA 遺伝子を標的とする gRNA をクローニングし Cas9-gRNA^{XPA} を発現するウイルスを作製したのち、BRCA2^{AID} 細胞に感染させた (図 4)。BRCA2 と XPA 遺伝子が両方発現している細胞に比べ、XPA 遺伝子単独欠損では、その増殖に違いがなかった。BRCA2 と XPA 遺伝子発現を両方無くした細胞では、増殖能が単独に比べて有意に悪くなることわかった。

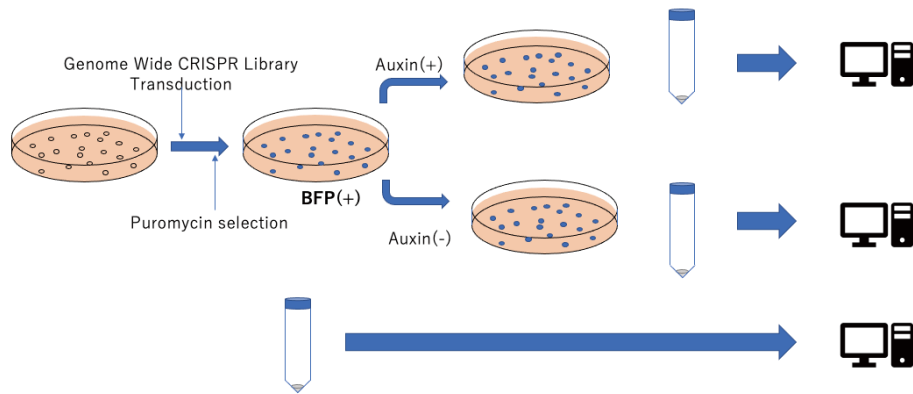


図3 BRCA2 発現抑制細胞を用いた遺伝的スクリーニング概略図
BRCA2 AID細胞にCas9を安定的に発現する細胞株を樹立した。その細胞に約2万遺伝子に対するgRNAを発現するレンチウイルスを感染させた。感染細胞をPuromycinによって選択したのち、生存した細胞を二つに分け、一つをAuxinあり培地でもう一つをAuxinなし培地で5日間培養した。5日間培養したのち細胞からゲノムDNAを抽出し、レンチウイルスに含まれるバーコード配列を含む約200baseを増幅した。増幅した領域をNGSにより配列解読をおこなった。

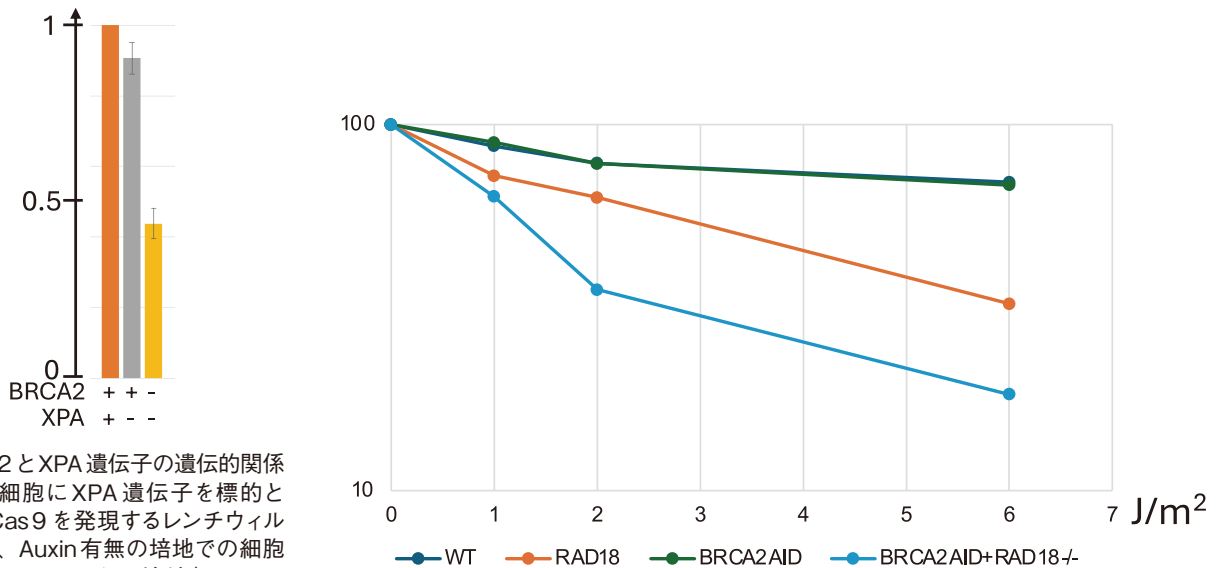


図4 BRCA2とXPA遺伝子の遺伝的關係
BRCA2 AID細胞にXPA遺伝子を標的とするgRNA-Cas9を発現するレンチウイルスを感染させ、Auxin有無の培地での細胞増殖を調べた。Auxinなし培地(BRCA2が発現)かつXPA遺伝子が発現している時の細胞密度を1として、それぞれの細胞密度を相対値として示す。

図5 BRCA2とRAD18遺伝子の遺伝的關係
BRCA2 AID細胞にRAD18遺伝子を破壊した。BRCA2 AID細胞培養液にAuxinを0.1mM加え、BRCA2発現を抑制した。

3.2. TLS経路とHR経路の關係

RAD18遺伝子は TLSポリメラーゼPolηと相互作用し、紫外線によって発生する損傷部位で停止した複製フォークを認識して集積する。RAD18欠損では、TLSポリメラーゼPolηによる損傷部位の乗り越えが起きず、RAD18欠損細胞は紫外線に対して感受性を示す。RAD18とBRCA2との關係を調べるために、BRCA2 AID細胞からRAD18遺伝子を欠損させた。その細胞において、紫外線感受性を調べた(図5)。その結果、BRCA2^{AID}細胞の紫外線感受性は、Auxin存在下で野生型と同程度であった。予想された通り、RAD18遺伝子欠損は、紫外線に対して感

受性を示した。面白いことにBRCA2とRAD18遺伝子を両方なくした細胞では、紫外線に対して単独変異細胞に比べ、より強い感受性を示した。

4. 考察

このことは、紫外線損傷修復経路であるヌクレオチド除去修復(NER)と相同組換え(HR)が細胞増殖能を維持するために重要な役割を果たしていることを示唆した。おそらく細胞では内因性のDNA損傷が絶えず起こっており、それをXPAが関わるNER経路とBRCA2が関わるHR経路が常に修復しているのかもしれない。NER修復や

TLS修復経路は、紫外線の造る損傷（ピリミジンダイマーや64光産物）に重要な役割を果たすことが知られている。近年では、その詳細な分子メカニズムも明らかになっている。今回の結果は、紫外線による損傷修復に重要な役割を果たすNERやTLS経路がなくなった場合に、細胞はその傷をHRによって修復している可能性を示唆する結果を得た。BRCA2発現抑制細胞単独では、紫外線に対して感受性を示さないことから、紫外線によるDNA損傷修復は、まずNERやTLS経路が重要な役割を果たし、その損傷の多くが修復されるが、これらの経路のいずれかが機能不全に陥ると、その傷は相同組換えが必要な損傷、すなわちDNA二重鎖切断に変換されると考えられる。紫外線損傷がどのような過程を経てDNA二重鎖切断に変換されるのかは不明である。

5. 総括

本研究を通して、複数あるDNA損傷修復経路の相補性が明らかとなった。現在の概念では、DNA損傷の種類に対応してNERやTLS、HRといった経路分けがされている。しかし本研究を含め、近年では例えばHR経路の因子がTLSに関与するといった、予期しない報告が相次いでいる⁴⁾。このことは、紫外線によるDNA損傷によってNER経路に関わる因子が活性化されても、結果としてHRや非相同末端結合経路によって修復される可能性を示唆している。紫外線によって発生する光老化をDNA損傷という観点から考えてみると、NER、TLS経路とHR経路のDNA修復能を数値化することができるようになれば、将来の光

老化のリスク評価が可能となり、光老化や皮膚がん予防につながるかと推察される。

(引用文献)

- 1) N. N. Hoa, R. Akagawa, T. Yamasaki, K. Hirota, K. Sasa, T. Natsume, J. Kobayashi, T. Sakuma, T. Yamamoto, K. Komatsu, M. Kanemaki, Y. Pommier, S. Takeda, H. Sasanuma, Relative contribution of four nucleases, CtIP, Dna2, Exo1 and Mre11, to the initial step of DNA double-strand break repair by homologous recombination in both the chicken DT40 and human TK6 cell lines. *Genes Cells* 20, 1059-1076 (2015).
- 2) Nishimura, K., T. Fukagawa, H. Takisawa, T. Kakimoto, M. Kanemaki, An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nat Methods* 6, 917-922 (2009).
- 3) A. Tomita, H. Sasanuma, T. Owa, Y. Nakazawa, M. Shimada, T. Fukuoka, T. Ogi, S. Nakada. Inducing multiple nicks promotes interhomolog homologous recombination to correct heterozygous mutations in somatic cells. *Nat Commun* 14, (2023).
- 4) S. Pathania, J. Nguyen, S. Hill, R. Scully, G. O. Adelmant, J. A. Marto, J. Feunteun, D. M. Livingston. BRCA1 is required for postreplication repair after UV-induced DNA damage. *Mol Cell* 44, 235-251 (2011).