

DNA二本鎖切断 (DSB) モデル細胞の構築と、DSB修復機構の解明 (I)

I 研究の目的

放射線による主たる遺伝子損傷としてDNAの二本鎖切断(DSB)があり、これが放射線発がんの主たる原因と考えられている。我々が日常的に被爆する可能性のある低線量放射線についてもDSBによる発がんの危険性が予測されるが、低線量の放射線によるDSBのゲノムに対する影響はその検出が困難であることからそのリスク評価については問題点が多い。本研究では、ヒトゲノム中の特定部位にわずか1個のDSBを発生させ、DSBの運命と、それに対する生体反応を完全にトレースする系を構築し、そこで得られた知見を低線量放射線のリスク評価に反映させることを目的とする。

II 研究の概要

1. DNA二本鎖切断モデル細胞の構築

ヒトリンパ芽球細胞株TK6はチミジンキナーゼ(TK)遺伝子をヘテロ(TK+/-)に持つ。このTK+アリルに制限酵素I-SceI部位の導入を試み、クローンTSCE5を得た(図1)。TSCE5はTK遺伝子のエクソン5の約100bp上流に、I-SceI部位をもつ。また、TSCE5より、自然誘発で生じたTK変異体TSCER2を得た。TSCER2はエクソン5に点突然変異をもつコンパウンドヘテロ型(TK-/-)のTK変異体である。両細胞にI-SceI発現ベクター(pCMV3xnl-s-I-SceI)を導入することによりTK遺伝子内に確実にDSBを発生させることができる。TSCE5ではそのDSBが非相同型接合修復(NHEJ)によって修復されると、欠失が生じ、細胞はTK変異体として検出される。一方、TSCER2では相同染色体間で組換え修復(HR)が起きると、野生型TK遺伝子が生じ、細胞はHAT耐性の復帰変異体として検出される(図2)。

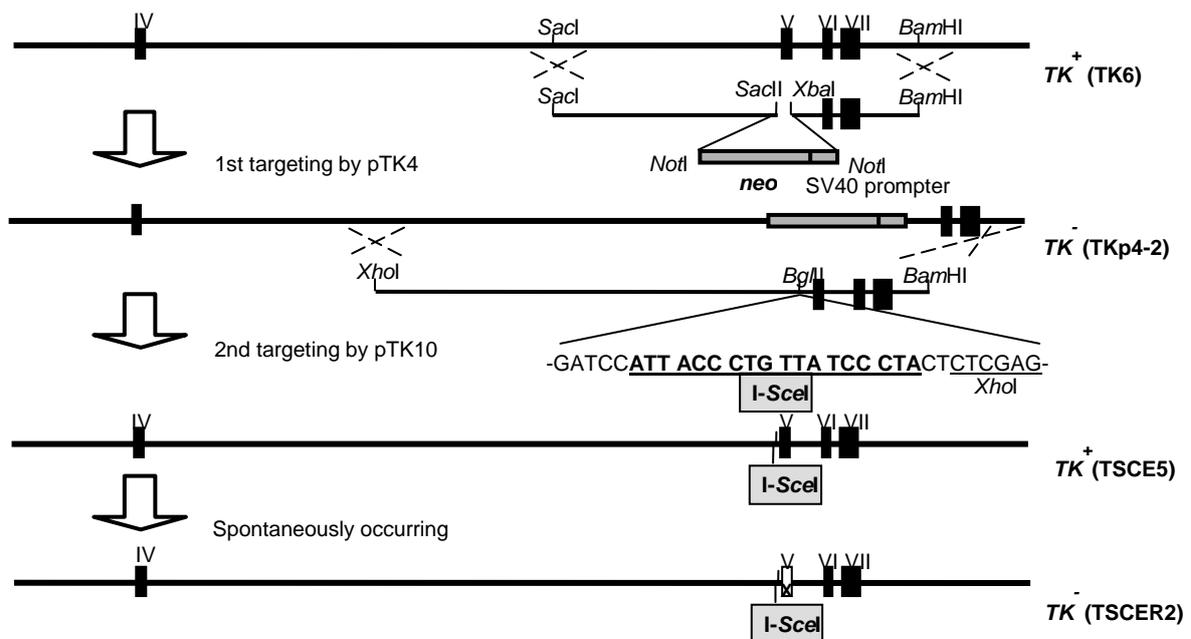


図1 DNA2 本鎖切断モデル細胞の構築

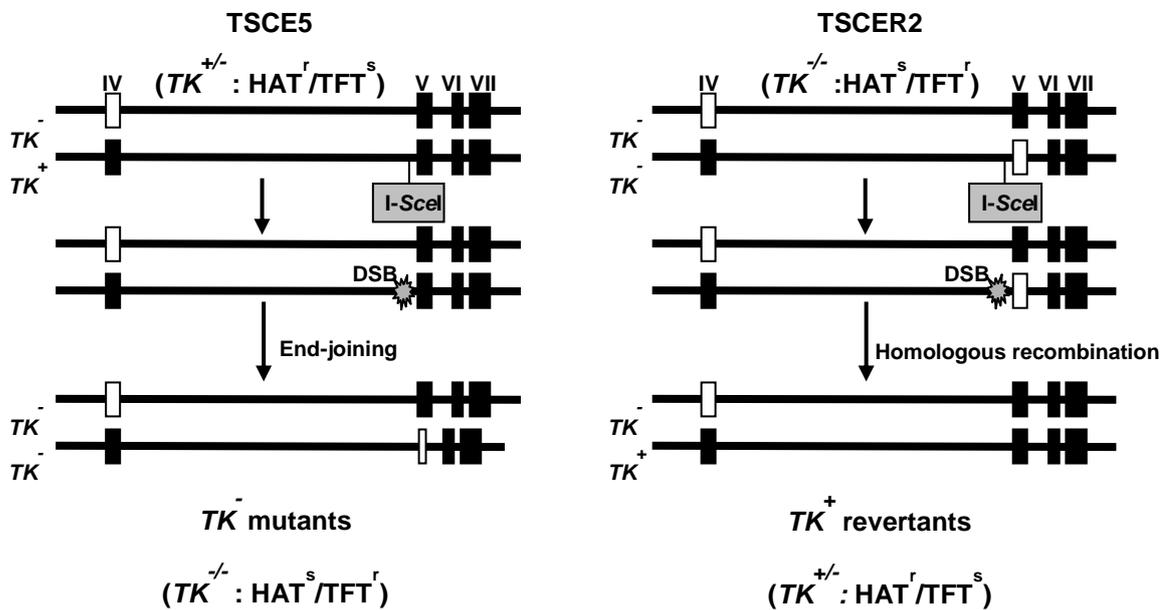


図2 非相同型接合修復（NHEJ）と相同組み換え修復（HR）の検出

2. NHEJ および HR の DSB の修復に対する寄与率

発現ベクターの導入により TSCE5 での変異頻度、TSCER2 での復帰頻度とも 100 倍以上増加し、EJ および HR とも DSB により著しく誘発されることがわかった。しかしながら絶対頻度を比較すると、TSCE5 の変異頻度は TSCER2 の復帰変異頻度の 270 倍であり、DSB のほとんど大部分は EJ によって修復されることが明らかとなった。

3. NHEJ によって引き起こされる遺伝的変化

NHEJ によって修復されたと考えられる TSCE5 由来の 44 の TK 変異クローンを、多型性マーカーにより遺伝子解析を行った(図3)。34 クローン (77%) は TK 遺伝子内にとどまる比較的短い欠失であり、他は大きな欠失や、テロメア末端までのターミナル型の欠失であった。短い欠失型変異に関しては、欠失領域の近傍の塩基配列を解析した。解析した 22 の欠失型変異体のうち 16 クローンは単純な欠失であり、結合領域には 1~6bp のマイクロホモロジーが見られた。このことから、欠失の大部分は Non-homologous end-joining によって生じることがわかった。しかしながら、残り 6 クローンは単純な欠失ではなく、複雑な rearrangement が観察された。これらは、S/G2 期に生じた DSB の一部が姉妹染色体間の EJ によって修復され、その後 breakage-fusion-bridge-cycle によって引き起こされたものと考えられた。放射線照射では姉妹染色体の同じ部位に DSB が生じることはまれであり、このような rearrangement は I-SceI による DSB の特有の変異と考えられる。

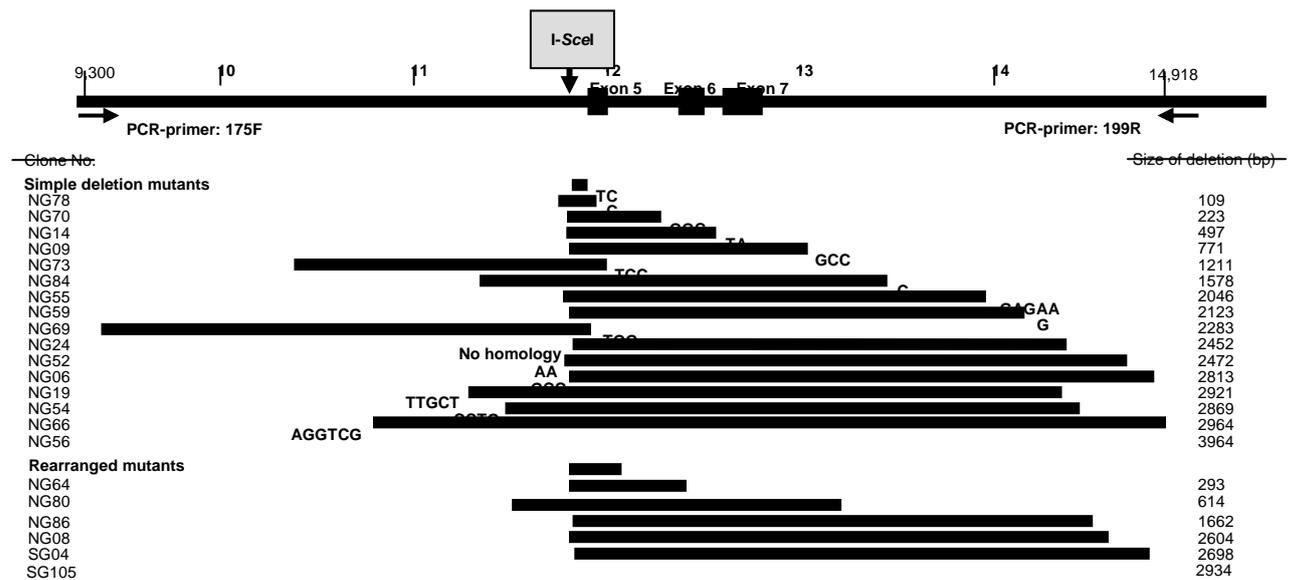


図3 欠失および組換え領域の解析

4. HRによって生じる遺伝的变化

TSCER2より生じた組換え型のTK復帰変異体を同様に遺伝子解析し、組換え領域を決定した。解析した38クローンの復帰変異体の全てはTK遺伝子内に局限した非交差型のgene conversionであった(図3)。

III 結論

制限酵素I-SceI部位をヒト細胞のゲノム中に導入し、ゲノム中にたった1つのDSBを生じさせる超低線量のDSBの運命を解析できるモデル細胞を構築した。ここで生じたDSBの修復様式と、最終的に生ずる遺伝的变化を遺伝子レベルで解析した結果、以下のことがわかった。

- ヒト細胞ゲノム中に生じたDSBの99%以上はEnd-joiningによって修復され、HRの関与は極めて少ない。
- EJによって修復された場合、比較的短いDNAの欠失をもたらす。
- HRの関与はわずかであるが、HRが関与した場合は、比較的短い領域の非交差型のgene conversionによって修復される。

関連論文

- Honma, M., Izumi, M., Sakuraba, M., Tadokoro, S., Sakamoto, H., Wang, W., Yatagai, F., and Hayashi, M. Deletion, rearrangement, and gene conversion; the genetic consequences of chromosomal double-strand breaks in human cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 42, 288-298 (2003)
- Honma, M., Generation of loss of heterozygosity (LOH) and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 162-176 (2005)