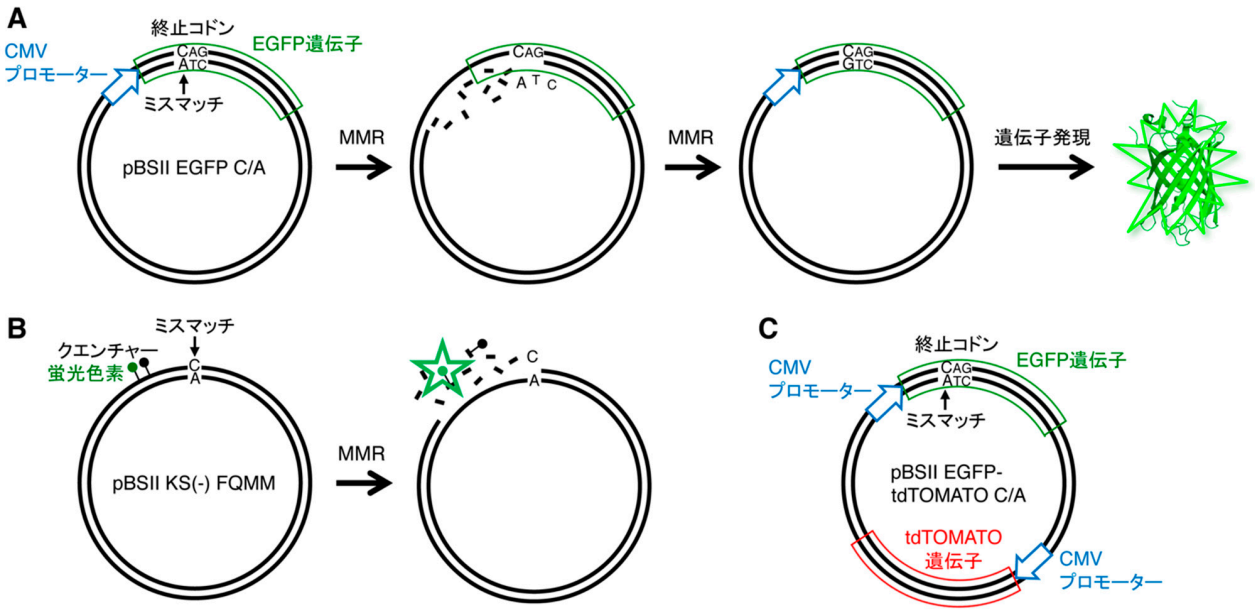
24　細胞のミスマッチ修復能の蛍光検出法の開発	岩井　成憲

【目的】DNA 複製時の誤ったヌクレオチドの取り込みにより生じるミスマッチは突然変異を引き起こし細胞の死やがん化の原因となるが、ミスマッチ修復（MMR）により修復され遺伝情報が正しく維持される。本研究では、MMR の欠損により起こるリンチ症候群の診断のためのスクリーニングに応用することを最終的な目標とし、蛍光色素とクエンチャー（消光剤）を付けたミスマッチを含むプラスミドを蛍光プローブとして用いる細胞の MMR 能の蛍光検出法を開発することを当初の目的とした。しかし、期待どおりの実験結果が得られなかったため、既に成功している蛍光タンパク質遺伝子の発現系を用いた MMR の検出法を改良して、より確実な方法とすることを新たな目的とした。

【方法】2 本鎖を形成させた時に 1 ヶ所にミスマッチが生じる配列を有し蛍光色素（フルオレセイン）とクエンチャー（ダブシル）を塩基部に付けたオリゴヌクレオチドをプライマーとし、1 本鎖環状 DNA にハイブリダイズさせて DNA ポリメラーゼと DNA リガーゼにより図 B に示すプラスミドを作製した。Lipofectamine 2000 を使ってこれを HaLa 細胞ならびに MMR が欠損した LoVo 細胞に入れ、蛍光顕微鏡で観察した。遺伝子発現系を用いる蛍光検出においては、偽陰性の結果が出ることを防ぐために、図 A の EGFP（緑色蛍光タンパク質）遺伝子発現プラスミドに tdTOMATO（赤色蛍光タンパク質）遺伝子発現系を入れ（図 C）、HaLa 細胞ならびに LoVo 細胞での遺伝子発現を調べた。

【結果】以前の報告と同様の方法で pBSII KS(-) FQMM（図 B）を調製し、超遠心により精製した。これを HeLa 細胞と LoVo 細胞に入れて蛍光顕微鏡で観察したが、HeLa 細胞において期待された MMR による蛍光が検出されず、実験を複数回繰り返したが結果は同じであった。期待どおりの結果が得られない原因として、蛍光色素とクエンチャーが MMR で働くエキソヌクレアーゼ I（Exo I）による分解を阻害したかもしれないので、プライマーとして用いたそれらが付いたオリゴヌクレオチドを Exo I で処理したが、分解による蛍光が検出されたためその可能性は否定された。それ以外にも可能性がいくつか考えられるがいずれも検証に時間を要するため、蛍光タンパク質遺伝子の発現系を用いた MMR の検出法（図 A）を改良することにした。この方法で問題となるのはトランスフェクションの失敗のため MMR が正常な細胞において蛍光が検出されない場合があることで、tdTOMATO 遺伝子の発現によりトランスフェクションを確認することができるプラスミド（図 C）を作製し、HaLa 細胞と LoVo 細胞を使ってその有用性を示した。

ミスマッチ修復の蛍光検出法



24. 細胞のミスマッチ修復能の蛍光検出法の開発

岩井　成憲

大阪大学 大学院基礎工学研究科 物質創成専攻 機能物質化学領域

Key words：DNA，ミスマッチ修復，蛍光プローブ，蛍光タンパク質，大腸がん

緒　言

細胞が分裂する前にDNAは複製されなければならない。真核生物ではDNAポリメラーゼαが複製を開始し、DNAポリメラーゼδ、εがそれぞれラギング鎖、リーディング鎖を合成する。δとεはヌクレオチド取り込みの間違いを防ぐ校正機能を有するが、それでも 10^6 ヌクレオチドに1つ程度の誤った塩基対（ミスマッチ）を生じる［1］。しかし、生物にはミスマッチ修復（MMR）と呼ばれる修復系が備わっており、ミスマッチが原因で起こる突然変異を防いでいる。真核生物の場合、MSH2とMSH6のヘテロ二量体であるMutSαがミスマッチを認識し、MLH1とPMS2のヘテロ二量体であるMutLαがMutSαに結合する。MutSαはATP依存的にDNA上を移動し、ニックが入っている方の鎖が新生鎖と判断されてMutLαがその鎖を切断する。この切断箇所からエキソヌクレアーゼIによりDNA鎖が分解され、DNA修復合成により正常な塩基対となる。

DNA修復能の欠損を原因とするいくつかの病気が知られているが、ミスマッチ修復の場合にはリンチ症候群［2］（遺伝性非ポリポーシス大腸がん）がその代表例である。リンチ症候群は*MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、*PMS2*という4つのMMR関連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、大腸がんや子宮内膜がんのリスクが非常に高い。その診断にはマイクロサテライト不安定性（MSI）や免疫組織化学（IHC）の検査が使われるが［3］、いずれも間接的な方法でありMMRの欠損を断定するものではない。例えば、MSIでは*MSH6*の変異の大部分はMSI-highを示さず［4］、IHCでは特に二量体化ドメインの外側での単一のアミノ酸置換によるMMRの欠損を検出することはできない［5］。

本研究では、細胞のMMR能を検出する蛍光プローブを開発することを当初の目的とした（図1）。我々は以前に、紫外線損傷に対するヌクレオチド除去修復（NER）をヒトの培養細胞で蛍光により検出する方法を報告している［6］。これは紫外線損傷を有し蛍光色素（フルオレセイン）とクエンチャー（ダブシル）をその近傍の塩基部に付けたプラスミドを蛍光プローブとするもので、細胞内でNERにより切り出された紫外線損傷を有するDNA断片がヌクレアーゼで分解されることにより蛍光が検出されるという原理である。また、蛍光タンパク質遺伝子の発現を利用して細胞のMMR能を検出する方法も開発しているが、その場合にはMMRと遺伝子発現という2つの過程が必要であるため、NER型の蛍光プローブとすることにより生検等により得られたがん細胞を使った検査が可能となることが期待された。しかし、研究を進めて行く中で期待どおりの実験結果が得られなかったため、既に成功している蛍光タンパク質遺伝子の発現系を用いたMMRの検出法を改良して、より確実な方法とすることを新たな目的とした。

方　法

1. pBSII KS(-) FQMMの調製

d(AGGCTTGGCCXTYTCGTCAGCATCTTCATCATACAGT)(X = Glen Research 10-1056；Y = Glen Research 10-1058)または d(AGGCTTGGCCXTYTCGTCAGCATCTCCATCATACAGT)(600 pmol)を pBS II KS(-)UV+9 ssDNA［6］(29 μg)と混合し、10×T4 DNAポリメラーゼバッファーと水を加えて200 μlの溶液とした。各チューブを70°Cで5分間、37°Cで30分間、室温で20分間インキュベートした後、それぞれに水（168 μl)、10×T4 DNAポリメラーゼバッファー（30 μl)、0.1 % BSA（50 μl)、10 mM dNTP mix（25 μl)、PrimeSTAR Max DNA polymerase

（タカラバイオ）（20 µl）、100 mM ATP（2.5 µl）、T4 DNA ligase（タカラバイオ）（5 µl）の混液を加えた。各反応液を 37°C で 6 時間インキュベートした後、75°C で 10 分間加熱した。

DNA 溶液（500 µl）、1.58 g/ml CsCl 水溶液（1352 µl）、10 mg/ml ethidium bromide（148 µl）を混合し、Polypropylene Bell-top Quick-Seal Centrifuge Tubes（BECKMAN COULTER）に移して 90,000 rpm、18°C で 27 時間超遠心を行った後、シリンジを用いて目的物のバンドを 1.5 ml チューブに抜き取った。これに 250 µl の水飽和ブタノールを加えて振とう・遠心し、有機層を取り除いた。これを 4 回繰り返して ethidium bromide を除去した後、NAP-5 カラムを用いて CsCl を除去し、溶出液を濃縮した。アガロースゲル電気泳動によって蛍光プローブが単一バンドに精製されていることを確認し（図 2A）、*Apa* LI および *Kpn* I による切断を調べた（図 2B）。

2. pBSII EGFP-tdTOMATO C/A ならびに pBSII EGFP-tdTOMATO C·G の調製

wtTDP43tdTOMATOHA （Addgene, plasmid #28205）と d（CCCCTCGAGCCACCATGGTGAGCAAGGGAG）、d（GGGGGATCCTACTTGTACAGCTCGTCCATG）を用いて PCR を行い、tdTOMATO 遺伝子を含む断片を得た。これを 1%アガロースゲル電気泳動により精製し、*Bam* HI と *Xho* I で切断した。pEGFP-N1 ベクター（タカラバイオ）を *Bam* HI と *Xho* I で処理して tdTOMATO 遺伝子の断片と混ぜ、DNA ligation mix（タカラバイオ）により pEGFP-N1-tdTOMATO を得た。このプラスミドに対して d（GGGGGATCCTACTTGTACAGCTCGTCCATG）と d（CCCGGATCCGACTCTAGATCATAATCAGCC）をプライマーとして PCR を行い、*Bam* HI で処理して DNA ligation mix でつなぐことにより EGFP 遺伝子を除いた pCMV-tdTOMATO とした。pCMV-tdTOMATO に対しては d（AAAGAACATATCGATGCGTTACATAACTTA）と d（TTTGCTCACGATATCTAAGATACATTGATG）、以前に調製した EGFP 遺伝子発現プラスミド（pBSII EGFP）に対しては d（CCCGATATCGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA）と d（CCCATCGATATGTTCTTTCCTGCGTTATCC）をプライマーとして PCR を行い、両方の断片を混合して In-fusion HD Cloning Kit（Clontech）により pBSII EGFP-tdTOMATO とした（図 3）。

pBSII EGFP-tdTOMATO を含むコロニーを単離して LB Amp（4 ml）中 37°C で一晩培養し、M13K07 ヘルパーファージ（400 µl）を加えて室温で 30 分間インキュベートした。これを LB Amp（400 ml）中 37°C で一晩培養し、9,000 rpm で 15 分間遠心して大腸菌を除いた後、上清に DNase I（50 units）と RNase A（0.4 mg）を加えて 37°C で 1 時間インキュベートした。この溶液に polyethylene glycol 6000（25 g）と NaCl（15 g）を溶解し、4°C で一晩置いた。15,000 rpm で 20 分間遠心することにより 1 本鎖 DNA を集め、フェノール抽出による精製の後、エタノールで沈殿させた。この DNA（50 µg）を d（TGCCGTTCTTCTACTTGTCGGCCAT）（pBSII EGFP-tdTOMATO C/A）あるいは d（TGCCGTTCTTCTGCTTGTCGGCCAT）（pBSII EGFP-tdTOMATO C·G）（0.6 nmol）と混合し、T4 polynucleotide kinase で 5'-リン酸化した後、70°C で 5 分間、37°C で 30 分間、室温で 20 分間インキュベートした。それぞれの溶液に T4 DNA polymerase（100 units）と T4 DNA ligase（1750 units）を加えて 37°C で一晩インキュベートし、1.58 g/ml CsCl 水溶液（1.35 ml）と 10 mg/ml ethidium bromide（0.15 ml）を加えて 90,000 rpm で 25 時間の超遠心により DNA を単離した。ethidium bromide はブタノール抽出、CsCl は Amicon Ultra-4 centrifugal filter unit（Merck Millipore）により除去した。

3. 細胞への導入と蛍光顕微鏡での観察

HeLa S3 細胞には L-glutamine、phenol red および sodium pyruvate が入った D-MEM（high glucose）（和光純薬）、LoVo 細胞には Ham's F-12 培地（和光純薬）を用い、CO_2 インキュベーター中、37°C で一晩培養した。培養容器として、pBSII KS(-) FQMM の実験では 96 ウェルプレート、pBSII EGFP-tdTOMATO C/A の場合には TF1205M マイクロスライドガラス（松浪硝子工業）を使用した。pBSII KS(-) FQMM とそれに相当するミスマッチのないプラスミドは 4 µg を Opti-MEM（Thermo Fisher Scientific）10 µl に溶解し、Opti-MEM 8µl と Lipofectamine 2000（Invitrogen）2 µl の混液を加えて培養液に添加し、37°C で 3 時間培養して Olympus IX171 蛍光顕微鏡システムにより観察した。pBSII EGFP-tdTOMATO C/A と pBSII EGFP-tdTOMATO C·G は 0.5 µg を Opti-MEM（Thermo Fisher Scientific）5 µl に溶解し、Opti-MEM 4.5 µl と Lipofectamine 2000（Invitrogen）0.5 µl の混液を加えて培養液に添加し、37°C で一晩培養して蛍光を観察した。

結果および考察

1. プラスミド型蛍光プローブの調製

MMR が起こると蛍光を発するプローブとして、以前に NER で使用したプラスミド［6］を応用することにした。以前に作製した pBSII KS(-) UV+9 をヘルパーファージを使って 1 本鎖とし、塩基部に蛍光色素（フルオレセイン）とクエンチャー（ダブシル）を付けたオリゴヌクレオチドをプライマーとして DNA ポリメラーゼと DNA リガーゼにより 2 本鎖（pBSII KS(-) FQMM）とした（図 1）。当初はこのオリゴヌクレオチド中に新生鎖の目印となるリボヌクレオシドを入れる予定であったが、プライマーが長くなりすぎたためかプラスミドの調製に成功しなかった。遺伝子発現系を利用した MMR の蛍光検出では細胞中で非特異的に生じたニックにより MMR が起こったと考えられたので、本研究においてもそれを期待して蛍光色素が付いた鎖を選択的に分解させる工夫はせず、従来の長さのプライマーを用いることにした。コントロールとして使用するミスマッチを含まないプラスミドも同様に調製し、超遠心により精製した後（図 2A）、制限エンドヌクレアーゼにより両方のプラスミドが正しく得られたことを確認した（図 2B）。

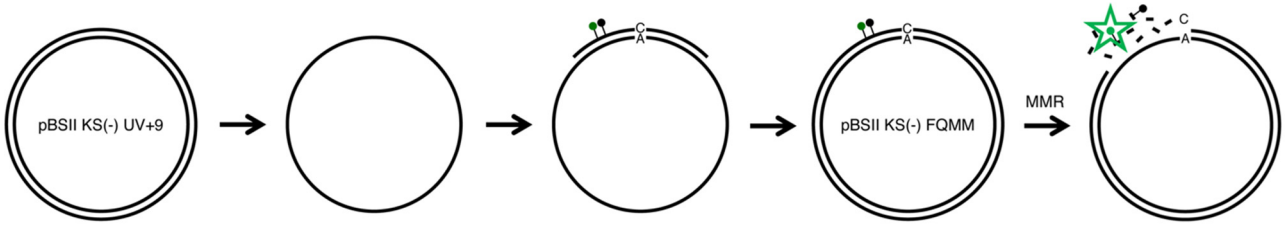


図 1. pBSII KS(-) FQMM の調製と MMR の蛍光検出の原理

以前の研究［6］で作製した pBSII KS(-) UV+9 から 1 本鎖 DNA を調製し、蛍光色素とクエンチャーが付いたプライマーとハイブリダイズさせて DNA ポリメラーゼと DNA リガーゼにより 2 本鎖とした。pBSII KS(-) FQMM が細胞内で MMR により分解されると蛍光が検出されることを期待した。

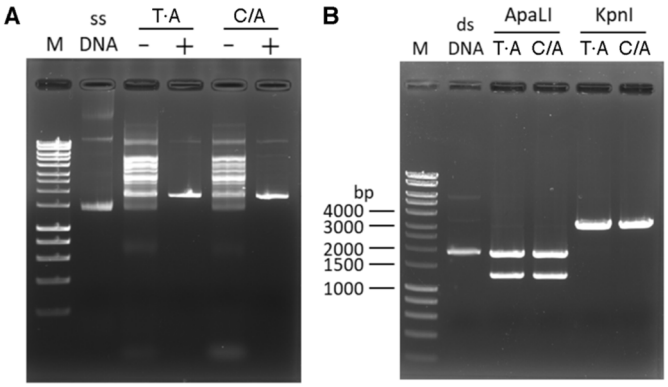


図 2. pBSII KS(-) FQMM ならびにミスマッチを含まないプラスミドの作製

（A）精製前後の DNA サンプルの 0.8% アガロースゲル電気泳動による分析。－と＋は精製の前と後を示す。C/A が pBSII KS(-) FQMM、T·A はコントロールとして使用するミスマッチのないプラスミドである。（B）制限エンドヌクレアーゼによる切断の確認。目的のプラスミドは 2 ヶ所の *Apa* LI 認識配列と 1 ヶ所の *Kpn* I 認識配列をもつ。

2. 細胞のトランスフェクション

pBSII KS(-) FQMM ならびにミスマッチを含まないプラスミドを用い、MMR が正常な HeLa 細胞と MMR を欠損した LoVo 細胞の Lipofectamine 2000 によるトランスフェクションを行った。この方法は今回のミスマッチの部分に紫外線損傷塩基を入れたプラスミドを使った細胞の NER 能の蛍光検出［6, 7］において実施した操作と全く同一であり、その場合には HeLa 細胞においてトランスフェクションの 3 時間後に再現性良く蛍光が検出されている。しかしながら、今回は HeLa 細胞と pBSII KS(-) FQMM の組合せにおいて期待した蛍光は検出されなかった。一つの相違点と

して、NER では切り出された紫外線損傷ならびに蛍光色素／クエンチャーを含む DNA 断片に対してエンドヌクレアーゼとエキソヌクレアーゼの両方が働く可能性があるが、MMR ではエキソヌクレアーゼのみが DNA の分解を行う。そのため、塩基部に付けた蛍光色素やクエンチャーがエキソヌクレアーゼによる分解を阻害する可能性を考え、プライマーとして使用したオリゴヌクレオチドを exonuclease I で処理してみたが、処理後に蛍光強度が大きく増加したためその可能性は否定された。その他の原因として、蛍光色素やクエンチャーがミスマッチを認識する MutSα の結合を阻害する可能性や、MMR の開始に必要なニックが蛍光色素の 5'側（ミスマッチの反対側で蛍光色素が付いた鎖）で生じる確率が位置特異性をもたせた場合の 1/4 であるため NER の場合より発生する蛍光量が少ないことが考えられた。前者についてはミスマッチと蛍光色素／クエンチャーの間隔を長くしたプラスミドを系統的に作製して実験する必要があり、後者については本研究で成功しなかったプラスミド中にリボヌクレオシドを導入する方法を検討しなければならない。いずれもかなりの時間を要することが予想されたため、これらはいずれあらためて続けることとし、既に成功している蛍光タンパク質遺伝子の発現系を用いた MMR の検出法を改良してより確実な方法とすることを目指した。

3. 蛍光タンパク質遺伝子発現系を用いた MMR 検出法の改良

我々は緑色蛍光タンパク質（EGFP）遺伝子の発現系を利用した細胞の MMR 能の検出に成功している。EGFP 遺伝子の中に終止コドンを入れてその部分をミスマッチとした発現プラスミドを使用し、MMR が起これば正しいコドンに戻って全長の EGFP が産生され蛍光が検出されるという原理である。この方法には、プラスミドがうまく細胞に入らなければ MMR が正常な細胞でも EGFP の蛍光が検出されない、すなわち「偽陰性の結果」が得られる可能性があるという問題があった。そこで、このプラスミドに赤色蛍光タンパク質（tdTOMATO）遺伝子の発現系を共存させ、形質転換が成功すれば赤色蛍光が検出されるようにした。図 3 に従って pBSII EGFP-tdTOMATO を作製し、図 1 と同様の方法で EGFP 遺伝子の中にミスマッチを生じさせた pBSII EGFP-tdTOMATO C/A とした。ミスマッチを含まない正常な EGFP 遺伝子をもつ pBSII EGFP-tdTOMATO C·G も同様に作製し、HeLa 細胞ならびに LoVo 細胞を形質転換したところ、tdTOMATO の赤色蛍光は常に検出され、pBSII EGFP-tdTOMATO C/A を使った場合の EGFP の緑色蛍光は HeLa 細胞では検出されたが、LoVo 細胞では検出されなかった（図 4）。このとき検出された EGFP の蛍光量は tdTOMATO 遺伝子がないプラスミドを使った実験と比較して少なかったが、それはプラスミドの大きさが元の 1.5 倍であるため MMR の開始に必要なニックが適切な位置に入りにくくなったためではないかと考えられる。

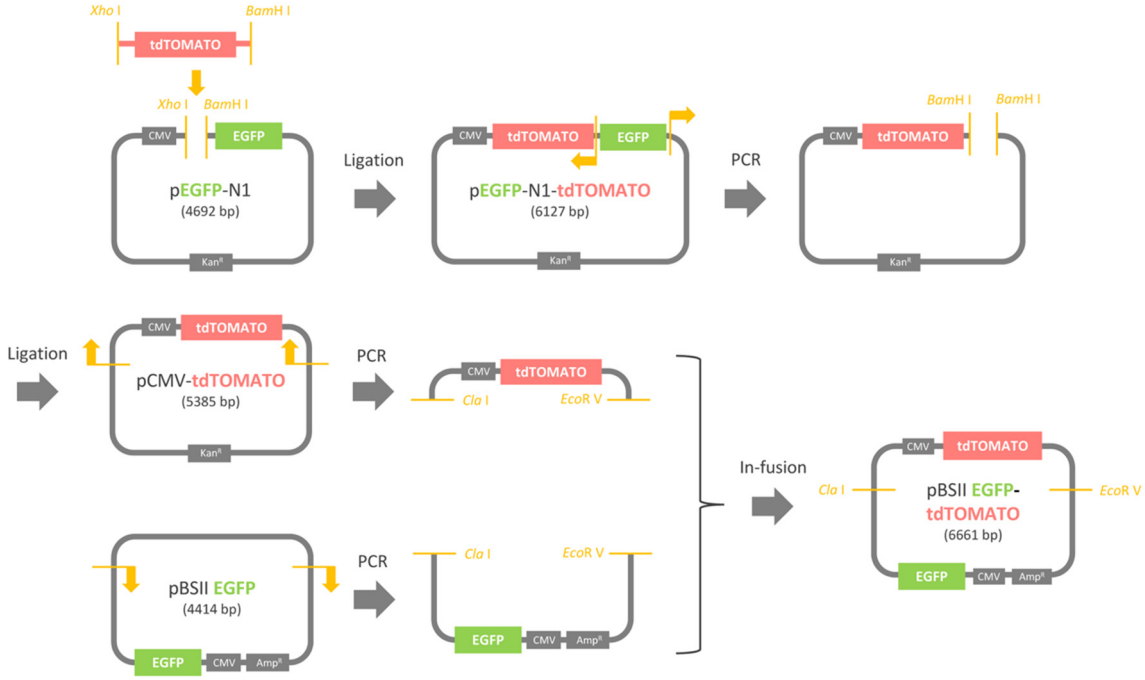


図 3. pBSII EGFP-tdTOMATO の作製

詳細は「方法」に記載されている。

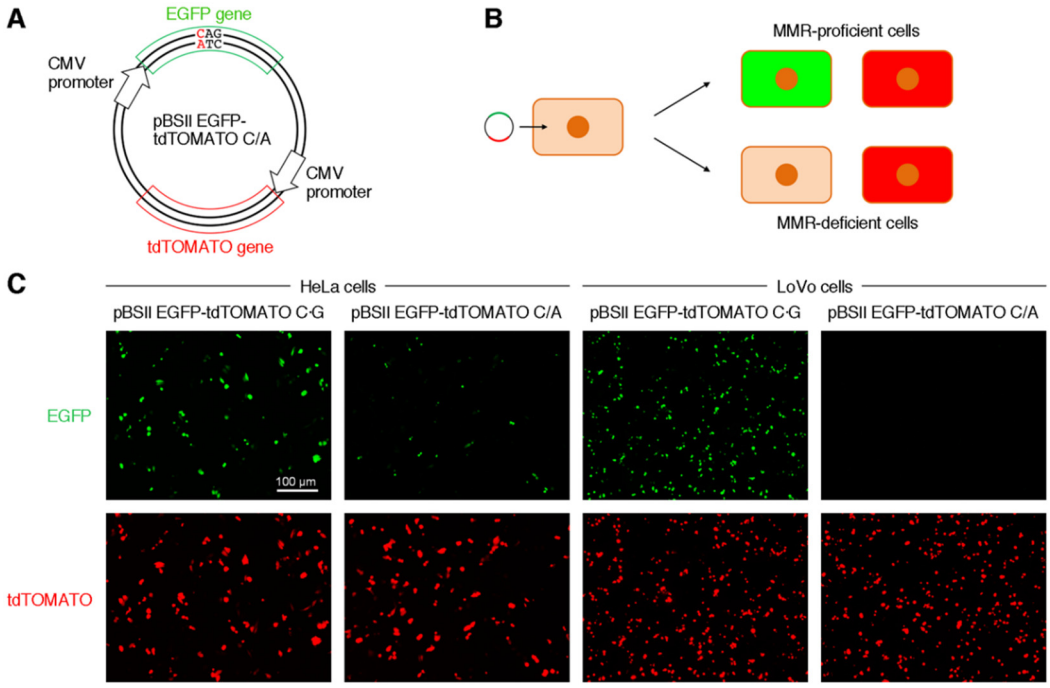


図 4. 遺伝子発現系を用いた MMR 検出法の改良

(A) 本研究で作製したプラスミド。(B) 本研究で期待される結果。(C) 形質転換された細胞の蛍光顕微鏡像。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院基礎工学研究科の倉岡功准教授（現、福岡大学理学部教授）である。

文　献

1) Kunkel TA. Evolving views of DNA replication (in)fidelity. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2009;74:91-101. Epub 2009 Nov 10. PMID: 19903750 PMCID: PMC3628614 DOI: 10.1101/sqb.2009.74.027

2) Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. Nat Rev Cancer. 2015 Mar;15(3):181-94. Epub 2015 Feb 12. PMID: 25673086 DOI: 10.1038/nrc3878

3) Peña-Diaz J, Rasmussen LJ. Approaches to diagnose DNA mismatch repair gene defects in cancer. DNA Repair (Amst). 2016 Feb;38:147-54. Epub 2015 Dec 8. PMID: 26708048 DOI: 10.1016/j.dnarep.2015.11.022

4) Barnetson RA, Tenesa A, Farrington SM, Nicholl ID, Cetnarskyj R, Porteous ME, Campbell H, Dunlop MG. Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer. N Engl J Med. 2006 Jun 29;354(26):2751-63. PMID: 16807412 DOI: 10.1056/NEJMoa053493

5) Raevaara TE, Korhonen MK, Lohi H, Hampel H, Lynch E, Lönnqvist KE, Holinski-Feder E, Sutter C, McKinnon W, Duraisamy S, Gerdes AM, Peltomäki P, Kohonen-Ccorish M, Mangold E, Macrae F, Greenblatt M, de la Chapelle A, Nyström M. Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. Gastroenterology. 2005 Aug;129(2):537-49. PMID: 16083711 DOI: 10.1016/j.gastro.2005.06.005

6) Toga T, Kuraoka I, Watanabe S, Nakano E, Takeuchi S, Nishigori C, Sugasawa K, Iwai S. Fluorescence detection of cellular nucleotide excision repair of damaged DNA. Sci Rep. 2014 Jul 4;4:5578. PMID: 24993089 PMCID: PMC4081890 DOI: 10.1038/srep05578

7) Tawarahara H, Kuraoka I, Iwai S. Facile preparation of a fluorescent probe to detect the cellular ability of nucleotide excision repair. Anal Biochem. 2017 Jun 1;526:71-74. PMID: 28366639 DOI: 10.1016/j.ab.2017.03.023