

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390166

研究課題名(和文) 環境化学物質が酸化ストレスを介してエピジェネティック変化を誘導する機序の解明

研究課題名(英文) Involvement of oxidative stress in the epigenetic changes induced by environmental chemicals

研究代表者

野原 恵子 (Nohara, Keiko)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・室長

研究者番号：50160271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円、(間接経費) 3,930,000円

研究成果の概要(和文)：多くの有害環境化学物質の毒性への関与が報告されている酸化ストレスに着目し、酸化ストレスとDNAメチル化変化との関連について探索した。メチル欠乏食を投与したマウス肝臓では、酸化ストレス誘導性遺伝子の発現や酸化的DNA損傷増加から酸化ストレス誘導が示され、また5meC量の低下が検出された。そのメチル化低下の主要な機序として、最近明らかにされた能動的DNA脱メチル化経路で働く脱メチル化酵素や塩基除去修復酵素の誘導による能動的脱メチル化経路の活性化という新規の機序が示唆された。またgpt deltaマウスを用いた研究で、無機ヒ素が酸化的DNA損傷誘導性の変異を増加させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is implicated in the toxic effects of various environmental chemicals. This study aimed to explore the linkage between oxidative stress and DNA methylation changes. Feeding a methyl-deficient diet induced oxidative stress-responsive genes and DNA damage in the mouse liver, indicating induction of oxidative stress. The methyl-deficient diet also reduced DNA methylation. As a promising causation of the lowered DNA methylation, the results of this study indicated the induction of genes involved in the active DNA demethylation pathways, suggesting induction of the active DNA demethylation by oxidative stress. We also clarified in the gpt delta transgenic mice that arsenite induces G:C to T:A transversions and the mutation is suggested to be caused through oxidative-stress-induced 8-OHdG formation. This is the first report on in vivo mutagenicity of arsenic in vivo.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：酸化ストレス エピジェネティクス DNAメチル化 メチル欠乏食 無機ヒ素 突然変異

1. 研究開始当初の背景

環境中に存在する化学物質の作用機序として、エピジェネティック作用が大きな関心を集めている。近年では、各種化学物質がエピジェネティック作用をもつことを示唆する報告が増加している。一方で、各種化学物質のエピジェネティック作用に関しては、解析法が不十分であったり、研究ごとに異なる結果が得られるなど、統一的な結論に至っていない例が多い。各種化学物質のエピジェネティック作用を理解するためには、化学物質がいかにエピジェネティック変化を誘導するかという具体的な機序を明らかにすることが必要と考えられるが、現在十分な知見が得られていない。

2. 研究の目的

多くの有害環境化学物質の毒性発現において、酸化ストレスの関与が示唆されている。酸化ストレスによって DNA 損傷がおけると DNA 修復酵素群が損傷部位にリクルートされる。また、酸化ストレスは各種の転写因子・核内受容体を活性化する。

本研究では、「化学物質による酸化ストレス誘導を発端として、DNA 修復酵素群や転写因子・核内受容体が DNA 周辺でエピジェネティクス関連因子と相互作用し、エピジェネティック変化を誘導する」という仮説を設定し、分子機序を検討する。また、化学物質が誘導する酸化ストレスや DNA 損傷、エピジェネティック変化の性差についても検討を行う。

3. 研究の方法

1) マウスへの無機ヒ素またはメチル欠乏食投与実験：

C57BL/6 マウス肝臓に酸化ストレスを誘導することが報告されている無機ヒ素(亜ヒ酸ナトリウム 50 ppm)またはメチル欠乏食を1または3週間投与し、肝臓の酸化ストレス誘導性遺伝子発現、酸化的 DNA 損傷、グローバル DNA メチル化変化 (5-methyl cytosine (5meC)量)、DNA メチル基転移酵素 (Dnmts)・脱メチル化酵素(Tet family)・DNA 損傷修復酵素などの遺伝子発現、転写因子 Nrf2 の関係を検討した。

遺伝子発現は real-time PCR 法、酸化的 DNA 損傷である 8-OHdG は HPLC-ECD 法で検討した。5meC 量は安定同位体ラベルしたサロゲートを合成して内部標準とし、LC/ESI-MS 法で精密測定した。Nrf2 の活性化は肝臓組織より核画分と細胞質を分離し、核への局在を Western blotting 法によって検討した。

2) *gpt delta* マウスを用いた突然変異と DNA メチル化変化の関連解析：

in vivo突然変異解析が容易に行える *gpt delta* トランスジェニックマウスに無機ヒ素を投与し、肝臓での点突然変異の頻度および変異パターンの解析を行った。また *gpt* 遺伝子の CpG サイトのシトシンメチル化を Bisulfite シークエンス法によって測定した。

4. 研究成果

1) 酸化ストレスが DNA メチル化変化を誘導する機序

マウス肝臓における酸化ストレス、酸化的 DNA 損傷、DNA メチル化の解析と、DNA メチル化誘導の機序

メチル欠乏食を投与した雄マウスの肝臓では、酸化ストレス誘導性遺伝子の大きな誘導と、酸化的 DNA 損傷である 8-OHdG の増加が検出され、酸化ストレスが強く誘導されることが示された。一方、ヒ素ではこれらの変化が検出されなかったことから、以降の実験は主としてメチル欠乏食投与とマウスで行った。

5meC 量の LC/ESI-MS 法による精密測定の結果、メチル欠乏食によって程度は大きくはないものの 5meC の低下が検出された。DNA メチル化を担当する Dnmt 酵素については、メチル欠乏食によって Dnmt1 と Dnmt3a の発現はむしろ増加していたが、最近能動的 DNA 脱メチル化経路で働くことが明らかにされた Tet2, Tet3 の発現増加が検出された。また酸化的 DNA 損傷の修復に関与し、やはり能動的 DNA 脱メチル化に関与することが明らかにされた塩基除去修復酵素 Tdg, Ape1 が有意に増加することをみいだした。

以上の結果から、メチル欠乏食が酸化ストレスの誘導を介して、能動的脱メチル化経路を活性化して DNA メチル化を低下させるという新規の機序が示唆された。

酸化的損傷塩基の DNA 低メチル化への関与の検討

CG 配列の G の酸化的損傷により生成した 8OHdG が、Dnmt3a の結合を阻害し隣接する C のメチル化を阻害することが in vitro の研究で報告されている。そこでマウス肝臓の 5meC と 8OHdG 含量の精密分析の結果を解析した。

その結果、メチル欠乏食群では対照群と比較して 8OHdG がグアニン 10⁷ 塩基あたり 2 塩基多いのに対して 5meC の低下はシトシン 10³ 塩基あたり 2 塩基で、5meC の変化量は 8OHdG の変化量の約 1 万倍であった。

この結果から、5meC の減少に対する 8OHdG の生成を介した Dnmt3a の結合阻害の寄与は大きくないことが示唆された。

メチル欠乏食による DNA メチル化変化の性差

メチル欠乏食を投与した雌マウスの肝臓では、グローバル DNA メチル化低下と DNA 損傷修復酵素の誘導の程度が雄と比較して弱いことが観察された。このことから、雌では能動的脱メチル化経路の活性化が弱いことが雌の DNA メチル化低下耐性に関与する可能性が考えられた。

メチル欠乏食による Nrf2 の活性化

Nrf2 は酸化ストレスに反応して活性化し、核移行して各種遺伝子の転写を誘導する転写因子である。メチル欠乏食を投与した雄の肝臓では、Nrf2 の核での増加が認められ、メチル欠乏食投与による酸化ストレスが Nrf2 を活性化すると考えられた。

メチル欠乏食で発現増加した Tet3 のプロモーター領域には Nrf2 結合配列が存在し、Nrf2 による Tet の直接的な制御の可能性も示唆された。

2) *gpt delta* マウスを用いた突然変異と DNA メチル化変化の関連解析

突然変異の検出

gpt delta マウスを用いて無機ヒ素の突然変異誘導能を検討した結果、全変異についての誘導頻度は高くないものの、酸化的 DNA 損傷に伴って現れる変異 (GC to TA transversion) が対照群の肝臓と比較して 10 倍以上増加することが明らかとなった (表 1)。

この実験系によってヒ素による酸化的 DNA 損傷を高感度に検出できることが示唆された。また、ヒ素は発癌性を示すが、変異原性についてはこれまで細菌や哺乳類細胞での *in vitro* 試験が行われているのみで、変異原性はない、またはごく弱いと考えられていた。本研究の結果から、ヒ素による酸化的 DNA 損傷を介した突然変異の増加が発癌に関与する可能性が明らかとなった。

gpt 遺伝子のメチル化解析

上述のように *gpt* 遺伝子内に無機ヒ素投与で突然変異が誘導される配列が見つかったが、*gpt* 遺伝子内の CpG はほぼメチル化されていた。このため変異と DNA メチル化の間に関係はみいだせなかった。

表 1 . 肝臓の *gpt* 遺伝子の変異

変異タイプ	対照群		ヒ素群	
	数	%	数	%
塩基置換				
Transition				
G:C A:T	12	67	5	18
A:T G:C	2	11	2	7
Transversion				
G:C T:A	1	5	13	46
G:C C:G	2	11	0	0
A:T T:A	0	0	1	4
A:T C:G	0	0	2	7
欠失				
-1	1	5	3	11
>2	0	0	2	7
合計	18	100	28	100

以上の結果から、酸化ストレスが Tet および Tdg を含む能動的脱メチル化経路を活性化し、DNA メチル化低下を誘導するという新規の機序が示唆された。多くの化学物質の毒性発現に酸化ストレスが関与することが示唆されており、本研究でみいだされた酸化ストレスと能動的脱メチル化の関連は、多くの化学物質のエピジェネティック作用の機序となることが示唆された。

また無機ヒ素の作用として、酸化的 DNA 損傷を介した突然変異を誘導することを *in vivo* 実験系で明らかにするという成果が得られた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Takumi S, Aoki Y, Sano T, Suzuki T, Nohmi T, Nohara K. *In vivo* mutagenicity of arsenite in the livers of *gpt delta* transgenic mice. *Mutation Res.* 760, 42-7, 2014. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.12.001 査読有

Nohara K, Tateishi Y, Suzuki T, Okamura K, Murai H, Takumi S, Maekawa F, Nishimura N, Kobori M, Ito T. Late-onset increases in oxidative stress and other tumorigenic activities and tumors with a *Ha-ras* mutation in the liver of adult male C3H mice gestationally exposed to arsenic. *Toxicol. Sci.*

129, 293-304, 2012. DOI:10.1093/toxsci/kfs2038 査読有

Nohara K, Baba T, Murai H, Kobayashi Y, Suzuki T, Tateishi Y, Matsumoto M, Nishimura N, Sano T : Global DNA methylation in the mouse liver if affected by methy deficiency and arsenic in a sex-dependent manner. *Arch. Toxicol.* 85, 653-661, 2011 査読有

[学会発表](計 37件)

Takumi S, Aoki Y, Sano T, Suzuki T, Nohmi T, and Nohara K. (2014) In vivo mutagenicity assay of arsenite using gpt delta transgenic mice, Society of Toxicology 53rd Annual Meeting, Phoenix, USA (March 26, 2014)

内匠正太、青木康展、佐野友春、鈴木武博、能美健彦、**野原恵子**: *gpt* delta マウスを用いた無機ヒ素による *in vivo* 突然変異解析 日本環境変異原学会第41回大会、静岡、平成24年11月

内匠正太、佐野友春、野原恵子: メチオニン・コリン欠乏食投与によるDNA低メチル化における能動的脱メチル化の関与 第82回日本衛生学会学術総会、京都、(平成24年3月)

内匠正太、佐野友春、野原恵子: メチル欠乏食及びヒ素投与に伴うDNA低メチル化における酸化DNA損傷とDNAメチル基転移酵素の関与 第5回日本エピジェネティクス研究会年会、熊本、(平成23年5月)

[図書](計 1件)

鈴木武博、野原恵子: 2.6 環境因子によるエピジェネティック制御 **毒性の科学**、東京大学出版会、p49-52, 2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野原 恵子 (Nohara Keiko)
独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・室長
研究者番号: 50160271

(2) 研究分担者

佐野 友春 (Sano Tomoharu)
独立行政法人国立環境研究所・環境計測研究センター・
主任研究員
研究者番号: 10178808

研究分担者

青木 康展 (Aoki Yasunobu)
独立行政法人国立環境研究所・環境リスク

研究センター・センター長
研究者番号: 20159297

(3) 連携研究者

内匠 正太 (Takumi Shota)
独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・特別研究員 (現: 東京慈恵会医科大学・環境保健医学講座・助教)
研究者番号: 80570770

(4) 協力研究者

能美 健彦 (Nohmi Takehiko)
独立行政法人医薬基盤研究所・創薬支援戦略室・コーディネーター
研究者番号: 30150890

岡村 和幸 (Okamura Kazuyuki)
筑波大学大学院持続環境学専攻・大学院生

鈴木 武博 (Suzuki Takehiro)
独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・主任研究員
研究者番号: 60425494