

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790600

研究課題名(和文)酸化ストレスによるDNA脱メチル化酵素の発現誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the effects of oxidative stress on DNA methylation and the expression of active DNA demethylation related genes

研究代表者

内匠 正太 (Takumi, Shota)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：80570770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年DNAの能動的脱メチル化に関与することが報告された酵素が、酸化ストレスに対しどのような発現変動を示し、発現誘導された酵素がDNAの脱メチル化に関与するか検討を行った。その結果、酸化ストレス剤であるパラコートがDNA脱メチル化に関与するAidの発現を強く誘導することが明らかになった。また、Aidを過剰発現させた細胞を解析した結果、数種類の遺伝子の発現誘導が認められたことから、これらの遺伝子の活性化にDNAの脱メチル化が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of oxidative stress on DNA methylation and the expression of active DNA demethylation related genes. The results of this study showed that paraquat-induced oxidative stress increased the expression of Aid, which is DNA demethylation related gene. Furthermore, over-expression of Aid increased some genes expression. Taken together, these results may suggest that the oxidative stress-induced activation of Aid is involved in those genes activation through the DNA demethylation. Further analysis of promoter methylation of Aid-activated genes will help to understand the effect of oxidative stress on DNA methylation.

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 DNA脱メチル化 エピジェネティクス DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

近年、DNA のメチル化異常を含めたエピジェネティックな因子による遺伝子発現の変化が、様々な疾患に関与することが報告されている。実際に、がんではゲノム DNA 全体のメチル化量が減少し、特定の癌抑制遺伝子プロモーターが高メチル化されることが報告されており、グローバルなメチル化の低下は、染色体構造の不安定化や転写因子の再活性化を通して、癌の進行を促進しうることが報告されている。エピジェネティック修飾の一つである DNA のメチル化は、遺伝情報の発現抑制機構として遺伝子の突然変異と同様に重要な役割を担っており、DNA のメチル化状態は DNA のメチル化と脱メチル化のバランスにより厳密に制御されていると考えられる。メチル化に関しては、DNA メチル基転移酵素 (Dnmts) が CpG ジヌクレオチドのシトシンの 5 位の炭素にメチル基を付加し、5-メチルシトシン (5-meC) とすることによって起こることが知られている。一方、DNA の脱メチル化に関しては、近年 Ten-eleven translocation (Tet) ファミリーや Activation induced cytidine deaminase (Aid)、apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like (ApoBec) 等の酵素反応により生じた修飾塩基の除去修復を介した DNA の能動的脱メチル化機構の存在が報告されたことから、今後 DNA メチル化異常の誘発メカニズムを解析するうえで、能動的脱メチル化機構の関与を検討する必要があると考えられる。

DNA メチル化異常の誘発要因としては、これまでに老化や慢性炎症、喫煙などが挙げられており、これらの要因は酸化ストレスとの関連が深く、酸化ストレスが DNA メチル化異常誘発に関与することが示唆される。しかし、酸化ストレスが、どのようなメカニズムにより DNA のメチル化異常を誘発するかについては未だ明らかにされていない。そこで本研究では、酸化ストレスが DNA メチル化異常誘発に及ぼす影響について、DNA 脱メチル化機構の関与も含め検討する。

## 2. 研究の目的

近年、Tet ファミリー、Aid 及び ApoBec 等の酵素反応により生じた修飾塩基の除去修復を介した DNA の能動的脱メチル化機構の存在が報告されたが、DNA の脱メチル化が DNA メチル化異常に関与するか否かについては未だ十分に検討されていない。そこで本研究では、DNA メチル化異常の誘発要因と関連が深い酸化ストレスに対し、これらの DNA 脱メチル化関連酵素がどのような発現変動を示し、その発現変動が実際に DNA のメチル化に影響するか否か検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

マウス肝臓由来の Hepa1c1c7 細胞に酸化ストレスを誘発する化学物質である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、tert-butylhydroperoxide (t-BHP)、パラコート及び酸化ストレス応答遺伝子の活性化に関与する Nrf2-ARE シグナル経路を活性化させる tert-butylhydroquinone (t-BHQ) 等を細胞に曝露し、DNA 脱メチル化関連酵素の遺伝子発現解析をリアルタイム PCR により行った。また、特に発現誘導が認められた DNA 脱メチル化関連酵素に関しては、過剰発現を行い、どのような遺伝子の発現が影響を受けるかマイクロアレイにより網羅的解析を試みた。

## 4. 研究成果

まず、どのような酸化ストレスが DNA 脱メチル化に関与する酵素の発現を誘導するか検討するために、酸化ストレスを誘発する化学物質である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、t-BHP、パラコート及び Nrf2-ARE シグナル経路を活性化させる t-BHQ 等を Hepa1c1c7 細胞に曝露し検討を行った。その結果、酸化ストレス剤であるパラコートが能動的脱メチル化に関与することが報告されている Aid 及び ApoBec1 の遺伝子発現を強く誘導することが明らかになった (図 1)。一方、DNA のメチル化を担う Dnmt1、Dnmt3b の遺伝子発現量に変化は認められず、Dnmt3a が僅かに減少したのみであった (図 2)。このことから、Dnmts の発現抑制による DNA メチル化への影響は少ないと考えられた。

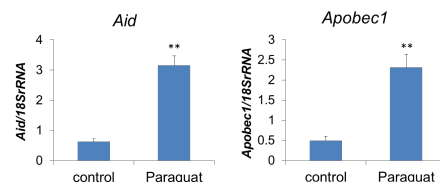


図 1 パラコート曝露による Aid と ApoBec1 の遺伝子発現変化

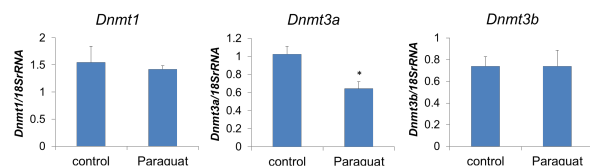


図 2 パラコート曝露による Dnmts の遺伝子発現変化

次に、パラコート曝露がグローバルな DNA メチル化量に与える影響を検討するために、パラコート曝露による Aid の発現誘導が認められた細胞から DNA を抽出し、5-meC 量を LC-ESI/MS 法により厳密に定量解析した。その結果、DNA 中の 5-meC 量は動物組織を用いた解析では安定した値が得られるが、培養細胞では培養ごとに対照群の 5-meC 量が変動し、安定した値が得られなかった。この原因としては、培養細胞の細胞分裂が動物組織に比べ盛んであること等が考えられたが、現

在のところ不明である。そこで、グローバルな DNA メチル化と対応すると考えられている Long interspersed element 1 (L1) の遺伝子発現解析を行ったところ、パラコート曝露による L1 遺伝子の有意な発現増加が認められた。このことから、パラコート曝露によるグローバルな DNA の低メチル化が示唆された。実際に、バイサルファイトシーケンスにより L1 の DNA メチル化状態を解析した結果、パラコート曝露群で L1 のプロモーター領域が低メチル化傾向にあった(図3)。このことから、パラコート曝露による酸化ストレスがグローバルな DNA の低メチル化を誘発していることが示唆された。

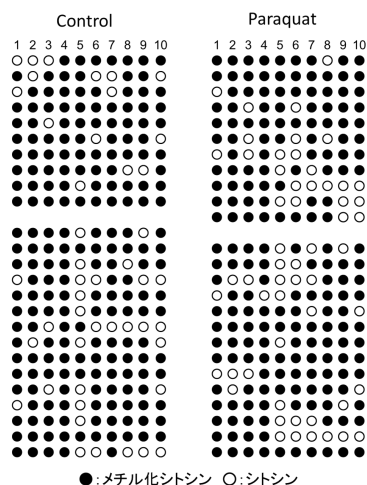


図3 L1のプロモーター領域のメチル化状態

更に、パラコート曝露により誘導された Aid がどのような遺伝子の活性化に関与するか検討するために、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。Aid を過剰発現させた細胞及びパラコート曝露により Aid の発現が誘導された細胞の遺伝子発現解析を行った結果、Aid を過剰発現させた細胞及びパラコート曝露により Aid の発現が誘導された細胞で共通した 12 遺伝子の発現誘導が認められた。このことから、今回活性化が認められた 12 遺伝子が、酸化ストレス剤であるパラコートにより発現誘導された Aid による脱メチル化を受けている可能性が考えられた。今後、活性化が認められた 12 遺伝子の DNA メチル化状態を詳細に解析することで、酸化ストレスが DNA メチル化に及ぼす影響について明らかにされることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Nohara K, Suzuki T, Takumi S, Okamura K. Increase in incidence of hepatic tumors caused by oncogenic somatic mutation in mice maternally exposed to inorganic arsenic and the multigenerational and transgenerational effects of inorganic arsenic. *Nihon Eiseigaku Zasshi*. 査読有, 69(2), 2014, 92-96.

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. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 査読有, 760, 2014, 42-47, doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.12.001.

Suzuki T, Yamashita S, Ushijima T, Takumi S, Sano T, Michikawa T, Nohara K. Genome-wide analysis of DNA methylation changes induced by gestational arsenic exposure in liver tumors. *Cancer Sci*. 査読有, 104(12), 2013, 1575-1585, doi: 10.1111/cas.12298.

Komatsu M, Ichiyama N, Kurimoto T, Takumi S, Shiozaki K, Sugiyama Y, Furukawa T, Ando S, Itonori S, and Saito H. Ceramide Aminoethylphosphonate from Jumbo flying squid *Dosidicus gigas* attenuates the toxicity of cyanotoxin microcystin-LR. *Fisheries Science*. 査読有, 2013, 79, 313-320.

[学会発表](計 4 件)

内匠正太, 岡村和幸, 鈴木武博, 羽野寛, 野原恵子, 柳澤裕之 胎児期ヒ素曝露が標的臓器に及ぼす影響. 第 84 回日本衛生学会学術総会, 2014 年 5 月 26 日(岡山)

Takumi S, Aoki Y, Sano T, Suzuki T, Nohmi T and Nohara K. In Vivo Mutagenicity Assay of Arsenite Using Gpt Delta Transgenic Mice. Society of Toxicology 53th Annual Meeting, 2014 年 3 月 25 日, Arizona, USA

内匠正太, 柳澤裕之, 野原恵子 パラコート曝露による能動的脱メチル化酵素の発現誘導 第 16 回環境ホルモン学会研究発表会 2013 年 12 月 12 日(東京)

内匠正太, 野原恵子 パラコート曝露が能動的脱メチル化関連酵素の発現に及ぼす影響 第 83 回日本衛生学会学術総会, 2013 年 3 月 26 日(金沢)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.jikei.ac.jp/academic/course/14\\_hokeni.html](http://www.jikei.ac.jp/academic/course/14_hokeni.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

内匠 正太 (TAKUMI SHOTA)

東京慈恵会医科大学・

医学部・助教

研究者番号：80570770

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし