

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550030

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いたゲノム損傷マッピング

研究課題名(英文)Genomic mapping of radiation damage using a next generation sequencer

研究代表者

井出 博(Hiroshi, IDE)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30223126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNA-タンパク質クロスリンク(DPC)は、放射線や架橋性抗がん剤で生成する普遍的なゲノム損傷である。本研究では、ゲノム全体にわたるDPC損傷の分布を解析するための手法を検討した。DNAにクロスリンクしたタンパク質をビオチン標識し、アビジンビーズを用いてpull downすることによりDPCを含むDNA断片(DPC-DNA)を選択的に濃縮する方法を確立した。さらに、塩基配列解析のために、DPC-DNAにアダプターDNAを付加しPCRを行うことにより、DPC-DNAが増幅できることを確認した。

研究成果の概要(英文)：DNA-protein cross-links (DPCs) are major DNA lesions induced by ionizing radiation and anticancer drugs. However, it remains elusive whether some regions of the genome are more vulnerable with respect to DPC formation than others when cells are exposed to DNA damaging agents. In the present study, we developed a method for genomic mapping of radiation-induced DPCs. Mouse SCCVII tumors were irradiated with X-rays and DNA was purified. Proteins present in DPCs were labeled with biotin and DNA fragments containing DPCs (DPC-DNA) were specifically pulled down using avidin-beads. A synthetic adaptor was ligated at both ends of DPC-DNA. The resulting DNA was subjected to PCR. Analysis of reaction products with agarose gel electrophoresis showed that DPC-DNA was successfully amplified by PCR.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 DNA損傷

1. 研究開始当初の背景

全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) は、次世代シーケンサーを用いた主要な研究手法の一つであり、特定の DNA 結合タンパク質の DNA 結合部位をゲノム全体にわたり同定し高分解能でマッピングすることができる (1)。その初段階で、DNA 結合タンパク質と DNA を人為的に架橋し DNA-タンパク質クロスリンク (DPC) を形成させ、抗体により目的タンパク質-DNA 複合体を選択的に濃縮する。

一方、DPC はゲノム損傷を誘発する放射線や変異原物質でも生成する。申請者は、これまでに DPC の修復および複製・転写影響を調べるとともに DPC の新規な定量法を開発した (2)。さらに、後者の研究から、fluorescein isothiocyanate などの標識化合物をクロスリンクタンパク質に付加することにより、単一の抗体 (抗 FITC 抗体) で全 DPC を検出できることが示唆された。したがって、ChIP-Seq において、人為的に架橋した DNA-タンパク質複合体の代わりに、適切な標識付加した DPC-DNA (損傷 DNA) を試料として pull down を行えば、選択的に DPC-DNA を濃縮できると考えた。さらに、濃縮した DPC-DNA の塩基配列を高速シーケンサーで解析すれば、DPC 形成部位のゲノム全体における分布に関する知見が得られると考えた。

2. 研究の目的

(1) 放射線照射した細胞からゲノム DNA を単離精製し、適切な標識 (ビオチン) をクロスリンクタンパク質に付加することにより、選択的に pull down し、DPC-DNA を濃縮する方法を確立する。

(2) 濃縮した DPC-DNA の塩基配列を高速シーケンサーで解析するための PCR 増幅条件を検討する。

(3) DPC-DNA の塩基配列の解析から、DPC 形成部位のゲノム全体における分布に関する知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 照射と DNA 精製

低酸素状態にしたマウス SCCVII 移植腫瘍を、X 線で 40 Gy 照射した。照射後、腫瘍を摘出し、ホモジェナイズした。ホモジェナイズ試料を CsCl 密度勾配超遠心で 2 回分画し、DNA を精製した。

(2) DNA 標識と pull down

DNA を succinimidyl-6-(biotinamido) hexanoate (NHS-LC-Biotin) とインキュベートし、DPC に含まれるクロスリンクタンパク質をビオチン標識した。DNA をエタノール沈殿により精製し、制限酵素処理 (RsaI, HinfI) により適当なサイズに消化した。得られた DNA の一部を、T4 polynucleotide kinase および ^{32}P -ATP とインキュベートし ^{32}P 標識した。 ^{32}P 標識 DNA を、ビオチンと可逆的に結合する BcMagTM Monomeric avidin Magnetic Beads

(BcMag) あるいは MagCaptureTM Tamavidin®2-REV (MagCapture) とインキュベート後、非結合 DNA を洗浄除去し、Beads に結合した DNA を 2 mM ビオチンで溶出した。各分画に含まれる DNA 量は、 ^{32}P の放射活性から求めた。

(3) 原子力間顕微鏡観察

ヒストン等 (11-15 kDa) の低分子タンパク質はサイズが小さいため、原子力間顕微鏡 (AFM) でも直接観察しにくい。低分子タンパク質を含め網羅的に DPC を観察するために、ビオチン標識した DPC にアビジン (53 kDa) を付加した。この目的で、BcMag 磁気ビーズで濃縮した DNA (RsaI 処理, ^{32}P 未標識) を、アビジンとインキュベート後、遊離アビジンをスピнкаラムで除去し DNA を精製した。DNA をマイカ基板上に滴下し、AFM で観察した。

(4) PCR

BcMag 磁気ビーズで濃縮した DPC-DNA (RsaI 処理, ^{32}P 未標識) を、アダプター (二本鎖 22-mer DNA) および T4 DNA ligase とインキュベートし、DNA の両末端にアダプター配列を付加した。スピнкаラムで DNA を精製し、アダプター配列をプライマーとして PCR を行い、生成物をアガロース電気泳動で分析した。

4. 研究成果

(1) DPC-DNA の濃縮

ビオチン標識した DNA を制限酵素処理 (RsaI, RsaI + HinfI) し、アガロース電気泳動で分析した結果を図 1 に示す。未照射 (0 Gy) および照射 (40 Gy) いずれの場合も、RsaI 処理では平均サイズが 500 bp、RsaI + HinfI 処理では平均サイズが 200 bp の DNA 断片が得られた。

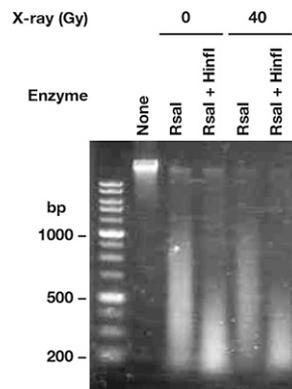


図 1 制限酵素処理した DNA のサイズ分析

制限酵素処理したビオチン標識 DNA を BcMag および MagCapture で濃縮した結果を図 2 に示す。BcMag で pull down した場合は、未照射 DNA (0 Gy) の回収率は約 0.5%、照射 DNA (40 Gy) の回収率は約 2%であった。両者の間に照射の有無に依存した回収率の差が認められたことから、ビオチン標識を付加した DPC-DNA が回収されていることが示唆され

た。また, BcMag による DNA の回収率は, DNA のサイズ (RsaI, RsaI + HinfI) に依存しなかった。一方, MagCapture で pull down した場合は, DNA の回収率は BcMag に比べ 1/100 に減少し, 照射の有無に依存した明確な回収率の差は認められなかった。以上の結果から, DPC-DNA の濃縮には, BcMag が適していると考えた。BcMag はアビジンモノマー, MagCapture はアビジン様タンパク質 (Tamavidin 2 の改変体) を固定化した磁気ビーズであり, 通常のアビジン 4 量体とは異なり可逆的にビオチン標識分子と結合する。アビジン 4 量体の解離定数は 10^{-15} M であるが, アビジンモノマーは 10^{-8} M, Tamavidin 2 改変体は 1.5×10^{-5} M である。このことから, MagCapture の DNA 回収率が低かったのは, ビオチン標識 DPC-DNA に対する結合が弱かった可能性が考えられる。

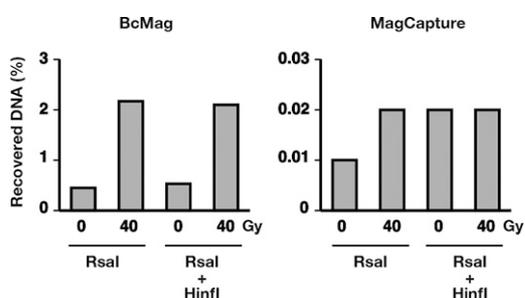


図 2 BcMag および MagCapture によるビオチン標識 DNA の回収

(2) DPC-DNA の AFM 観察

BcMag 磁気ビーズで濃縮した DPC-DNA の DPC をアビジン標識し, AFM で観察した結果を図 3 に示す。40 Gy 照射したサンプルでは, クロスリンクタンパクが付随した DNA が多く認められた (図 3)。一方, 未照射のサンプルでは, クロスリンクタンパクが付随した DNA の割合は低かった。未照射のサンプルで認められた DPC は, 内在性の DNA 損傷因子により生成した可能性が考えられる。以上の結果から, BcMag 磁気ビーズにより DPC-DNA が濃縮されていることが直接確認された。

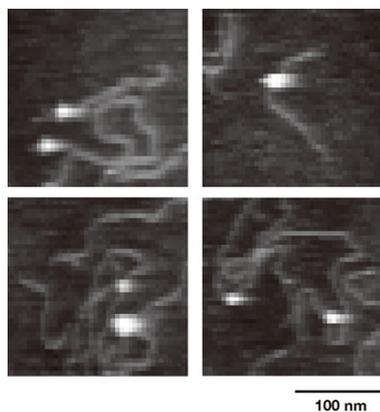


図 3 磁気ビーズで濃縮した DPC-DNA の AFM 観察。DNA ファイバー上の輝点がアビジン標

識したクロスリンクタンパク質

(3) PCR

付加したアダプター配列をプライマーとして DPC-DNA の PCR を行い, 生成物をアガロース電気泳動で分析した結果を図 4 に示す。DNA は, PCR のサイクル数に依存して増幅された (図 4A)。アダプター配列を付加していない DNA では, 非特異的な増幅は起こらなかった。また, DNA 増幅効率は, プロテアーゼ未処理 DPC-DNA と処理した DPC-DNA でほとんど差がなかった (図 4B)。プロテアーゼ処理により, DPC はペプチドクロスリンクに変化する。DPC およびペプチドクロスリンクいずれの場合も, 損傷を含む鋳型鎖上の合成は損傷部位で止まり全長 DNA は合成されない。一方, 損傷を含まない鋳型鎖では全長 DNA が合成される。その結果, 損傷を含まない鎖からの増幅が起こったと考えられる。

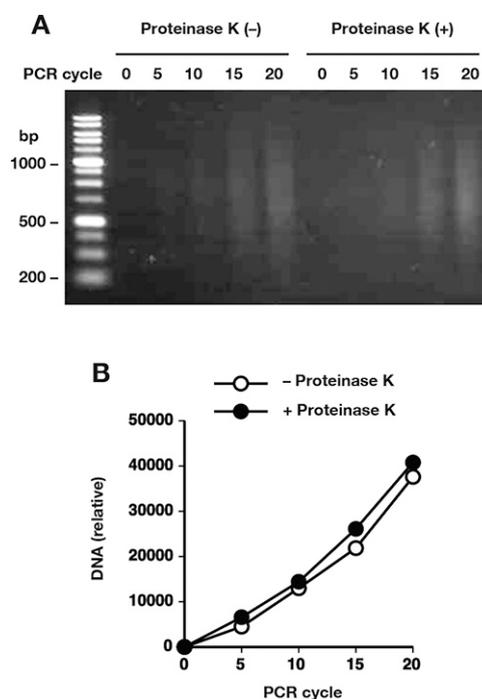


図 4 DPC-DNA の PCR 増幅。(A) PCR 産物のアガロースゲル電気泳動分析, (B) 鋳型 DNA のプロテアーゼ処理の影響

本研究では, DPC-DNA を選択的に濃縮し, さらに PCR 増幅する方法を確立することができた。今後, この手法を用いて得られた増幅 DNA 断片を高速シーケンサーで解析すれば, DPC 形成部位のゲノム全体における分布に関する知見が得られると考えられる。

<引用文献>

- ① Furey TS. ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nat. Rev. Genet.*, 13(12):840-852 (2012)
- ② Shoukamy MI et al. Detection of

DNA-protein crosslinks (DPCs) by novel direct fluorescence labeling methods: distinct stabilities of aldehyde and radiation-induced DPCs. *Nucleic Acids Res.*, 40(18):e143 (2012)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Xie M, Shoukamy MI, Salem AHM, Oba S, Goda M, Nakano T, Ide H. Aldehydes with high and low toxicities inactivate cells by damaging distinct cellular targets. *Mutat. Res.*, 786, 41-51 (2016) DOI:10.1016/j.mrfmmm.2016.02.005 査読有
- ② Tokuyama Y, Furusawa Y, Ide H, Yasui A, Terato H. Role of isolated and clustered DNA damage and the post-irradiating repair process in the effects of heavy ion beam irradiation. *J. Radiat. Res.*, 56 (3), 446-455 (2015) DOI:10.1093/jrr/rru122 査読有
- ③ Nakano T, Mitsusada Y, Salem A, Shoukamy M, Sugimoto T, Hirayama R, Uzawa A, Furusawa Y, Ide H. Induction of DNA-protein cross-links by ionizing radiation and their elimination from the genome. *Mutat. Res.*, 771, 45-50 (2015) DOI:10.1016/j.mrfmmm.2014.12.003 査読有

[学会発表] (計9件)

国際会議

- ① Ide H et al., Induction of DNA-protein cross-links by ionizing radiation and their repair in cells. 14th International Workshop on Radiation Damage to DNA, Melbourne, Australia, 2016. 3. 20-23 招待講演
- ② Ide H, Repair mechanism of DNA-protein cross-link damage. 5th US-Japan DNA Repair Meeting, Naruto, Tokushima, Japan, 2014. 10. 28-31 招待講演
- ③ Ide H, Formation and repair of DNA-protein cross-link damage. 13th International Workshop on Radiation Damage to DNA, Cambridge, MA, USA, 2014. 6. 14-18 招待講演

他2件

国内学会

- ① 瀬畑敬文, 井出博, 他, DNA-タンパク質クロスリンク損傷の新規な定量法, 第38

回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会, 神戸国際展示場, 神戸, 2015. 12. 1-4

- ② 久保山政弥, 井出博, 他, 種々のDNA傷害因子が誘発するDNA-タンパク質クロスリンク損傷の解析, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会, 神戸国際展示場, 神戸, 2015. 12. 1-4

他2件

[図書] (計1件)

- ① Ide H, Nakano T, Shoukamy MI, Salem AHM. Formation, repair, and biological effects of DNA-protein cross-link damage. In *DNA Repair* (Chen C. ed.), pp. 43-80, InTech, Rijeka, Croatia (2015) DOI:10.5772/59683

[その他]

ホームページ

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/genechem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井出 博 (IDE, Hiroshi)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 30223126