

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651063

研究課題名(和文) DNA修復を利用したエピミュータジェンのスクリーニング

研究課題名(英文) Screening of epimutagens using DNA repair system

研究代表者

八木 孝司 (YAGI, Takashi)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80182301

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

研究成果の概要(和文)：エピジェネティックな形質発現変化は遺伝子プロモーター領域のメチル化の変化を伴う。エピジェネティックな変化を起こす外来化学物質をエピミュータジェンという。本研究では脱メチル化を起こすエピミュータジェンをスクリーニングする新規アッセイ系の作製を試みた。メチル化によってO6-メチルグアニン修復遺伝子(MGMT)の発現が抑制されている癌細胞に5-アザシチジンを処理して、MGMTの発現を緑色蛍光およびメチルニトロソウレア(MNU)耐性出現で検出する系を作製した。出現したMNU耐性細胞のMGMT発現をmRNAおよびタンパク質発現で確認した。本アッセイ系を用いて環境中のエピミュータジェンを検出できる。

研究成果の概要(英文)：Abnormality of epigenetic changes is a cause of carcinogenesis and teratogenesis in the higher animals. Epigenetic changes in traits accompany the change in cytosine methylation patterns of the promoter region of the responsible genes. Exogenous chemicals causing the epigenetic changes are called epimutagens. In this study, the assay methods to screen chemicals causing demethylation of 5-methylcytosine were tried to establish. We constructed the method in which the 5-azacytidine (5azaC)-induced demethylation can be detected by green fluorescence or formation of methyl nitrosourea (MNU)-resistant colonies using HeLaMR tumor cells lacking expression of O6-methylguanene-DNA methyltransferase (MGMT). Expression of MGMT mRNA and protein in the 5-azaC-induced MNU-resistant cells were confirmed. Using this method, epimutagens would be detected among various chemicals in the environment.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：エピジェネティクス エピミュータジェン シトシンメチル化

### 1. 研究開始当初の背景

形質の変異は DNA の塩基配列の変化に起因し、次世代へ伝達される。しかし DNA 配列の変化を伴うことなく、DNA への後天的な作用により形質変異が生じる機構も発見されている。この学問領域をエピジェネティクスといい、今世界中で最も活発な生物学研究領域の1つである。この機構は2つ存在する。1つは DNA 塩基 (シトシンの5位) のメチル化、もう1つはヒストンのメチル化・アセチル化・リン酸化など、化学修飾による遺伝子発現の変化である。この2つの機構は密接に関連して起きており、高等動物の発生や発癌に大きく関わっている。エピジェネティックな変化は外来の化学物質によっても起こると考えられており、DNA の塩基配列に変化 (突然変異) を起こす物質を **mutagen** (ミュータジェン) と呼ぶのに対応して、**epimutagen** (エピミュータジェン) と最近呼ばれるようになった。代表的なエピミュータジェンとして **5-azacytidine (AzaC: 5-アザシチジン)** が知られる。AzaC は不活化された遺伝子プロモーターのシトシンのメチル化を解消し、遺伝子発現を活性化する。エピミュータジェンは他にも存在すると考えられるが、多くの化学物質の中からエピミュータジェンを探し出す簡便な方法はまだ開発されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、5-メチルシトシンの脱メチル化を起こし、不活化していた遺伝子を発現させる化学物質 (エピミュータジェン) をスクリーニングできるバイオアッセイ法の樹立を目指した。さらに申請者が樹立したアッセイを用いて、エピミュータジェンを既知化学物質や環境試料中から探索することを本研究の目的とした。そのため、多くの癌細胞でメチル化によって発現が抑制されている DNA 修復酵素 **O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyl transferase (MGMT)** の活性回復を利用したアッセイ系の作製を試みた。

### 3. 研究の方法

(1) 緑色蛍光タンパク発現プラスミド pCMV-EGFP1 を用いたエピミュータジェン検出系の検討

MGMT を欠損したヒト HeLaMR 細胞に、メチルニトロソウレア (MNU) による DNA 損傷 (O<sup>6</sup>-メチルグアニン) により不活化したプラスミド EGFP 遺伝子を MGMT 欠損細胞へ導入すると EGFP が発現しない。しかしその細胞をエピミュータジェン (AzaC など) で処理し HeLaMR 細胞の MGMT 遺伝子が活性化すると、プラスミドの O<sup>6</sup>-メチルグアニンが修復されて EGFP が発現するようになると考え、この原理に従ってアッセイ系を樹立した。そのための MNU 至適濃度と処理時間、AzaC 濃度、MGMT 発現時間、至適 MGMT 免疫蛍光染色条件などを検討した。

(2) 細胞に処理する化学物質のエピミュータジェニック作用を検出する細胞遺伝学的検出系の確立

HeLaMR 細胞は MGMT を欠損し、MNU に高感受性であるが、エピミュータジェン (AzaC など) で処理して脱メチル化が起これば、MGMT を発現し、MGMT 抵抗性となると考え、この原理に従ってアッセイ系を樹立した。そのための AzaC 濃度と処理時間、MGMT 発現にかかる培養期間、MNU 至適濃度と処理時間、MNU 抵抗性コロニー出現頻度などを検討した。

### 4. 研究成果

(1-1) pCMV-EGFP1 の MNU 処理濃度と細胞の MGMT 発現の有無 (HeLaS3 および HeLaMR 細胞) による EGFP 発光の違いの検討

pCMV-EGFP1 に 0.1~2 mM の MNU を処理し精製後、HeLaS3 細胞 (MGMT<sup>+</sup>) および HeLaMR 細胞 (MGMT<sup>-</sup>) に導入し、1~3 日後に細胞の発する緑色蛍光量を Tali imaging cytometer で測定した。その結果、MNU 濃度 0.1~0.5 mM、培養期間 2 日が、細胞の DNA 修復を反映する適当な実験系であることがわかった。

(1-2) MGMT 欠損細胞 (HeLaMR) の 5-AzaC 処理による、MNU 処理 pCMV-EGFP1 の緑色蛍光発光回復の検討

HeLaMR 細胞に 5-AzaC または 5-AzaCdR を 10 μM 処理しその後 10 日間培養後、1 mM MNU を 1 時間処理して、MNU 抵抗性コロニーを選択した。その細胞に 0.1~0.5 mM MNU 処理 pCMV-EGFP1 を導入し 2 日後に細胞の緑色蛍光を Tali imaging cytometer で測定した (図 1)。5-AzaC または 5-AzaCdR 処理によって得た MNU 抵抗性細胞は pCMV-EGFP1 にできた DNA 損傷 (O<sup>6</sup>-メチルグアニン) を修復し、蛍光を回復させることがわかった。この結果は簡便なエピミュータジェン検出法の作製につながると考えられる。

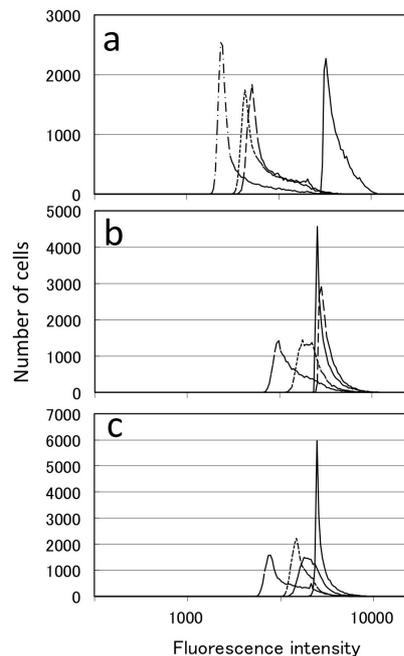


図 1. 実線 無処理；破線 0.1 mM；点線 0.2 mM；鎖線 0.5 mM MNU 処理した pCMV-EGFP1. a HeLaMR 細胞；b 5-AzaC 処理による MNU 抵抗性 HeLaMR 細胞；c 5-AzaCdR 処理による MNU 抵抗性 HeLaMR 細胞。

(2-1) MGMT 発現細胞 (HeLaS3) と欠損細胞 (HeLaMR) の MNU 感受性の比較と MNU 抵抗性 (MGMT 発現) 細胞を選択する MNU 至適濃度の決定

HeLaMR に 5-AzaC または 5-AzaCdR を 10  $\mu$ M 処理しその後 10 日間回復培養後、播種し直して MNU 感受性をコロニー形成法で求めた (図 2a)。その結果 5-AzaC または 5-AzaCdR 処理によって細胞が MNU に対してやや抵抗性を示すことがわかった。また 5-AzaC または 5-AzaCdR を 10  $\mu$ M 処理しその後 10 日間培養後、播種し直して MNU 抵抗性コロニーを選択・増殖させ、その細胞の MNU 感受性をコロニー形成法で求めた。その結果それらの細胞は HeLaS3 細胞と同程度に MNU 抵抗性になっていることがわかった (図 2b)

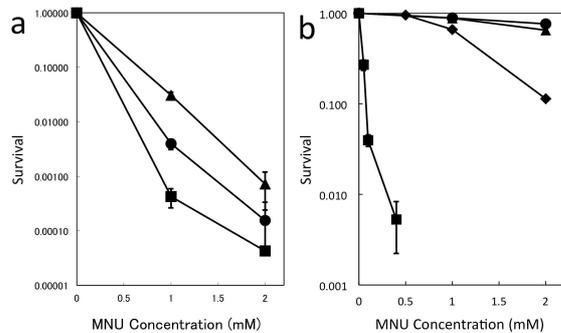


図 2. (a) HeLaMR に 5-AzaC または 5-AzaCdR を 10  $\mu$ M 処理しその後 10 日間培養後、播種し直して得た MNU 感受性；(b) 同様に処理し、得られた MNU 抵抗性コロニーの MNU 感受性。■HeLaMR；●5-AzaC 処理 HeLaMR；◆5-AzaCdR 処理 HeLaMR 細胞；●HeLaS3 細胞。

(2-2) MGMT 欠損細胞 (HeLaMR) のエピミュタジェン (5-AzaC および 5-AzaCdR) 処理による MNU 抵抗性細胞の出現頻度の増加

HeLaMR 細胞に 2~20  $\mu$ M の 5-AzaC および 5-AzaCdR 処理することによって濃度依存的に MNU 抵抗性コロニーが出現した (図 3)。

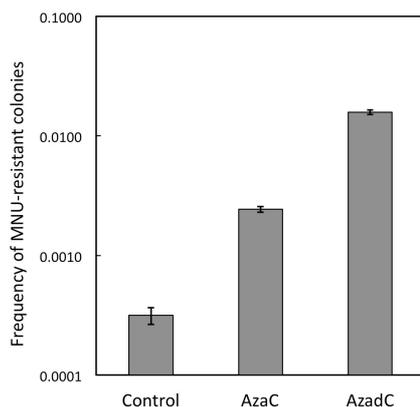


図 3. HeLaMR 細胞に 10  $\mu$ M の 5-AzaC および 5-AzaCdR 処理することによって出現した MNU 抵抗性コロニーの頻度。

(2-3) エピミュタジェン処理によって出現した MNU 抵抗性細胞の MGMT 発現の確認

HeLaMR 細胞に 10  $\mu$ M の 5-AzaC および 5-AzaCdR 処理することによって出現した MNU 抵抗性コロニー細胞の MGMT の発現を、抗 MGMT 抗体の免疫蛍光染色によって調べた。その結果、MNU 抵抗性細胞で MGMT が有意に多く発現していた。

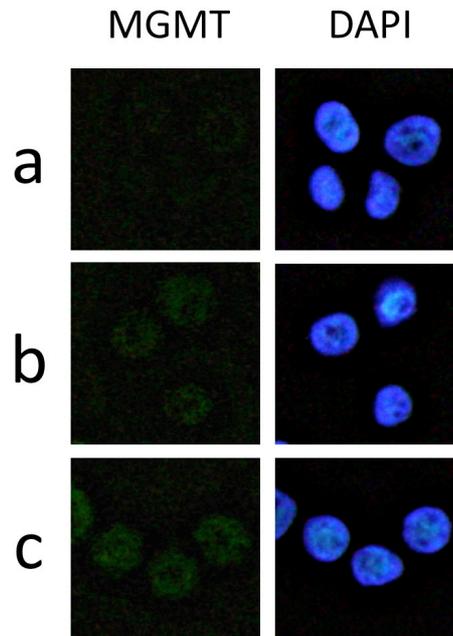


図 4. 10  $\mu$ M の 5-AzaC および 5-AzaCdR 処理することによって出現した MNU 抵抗性細胞における MGMT の免疫蛍光染色。a HeLaMR 細胞；b 5-AzaC で出現した MGMT 抵抗性細胞；5-AzaCdR で出現した MGMT 抵抗性細胞

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① M. Kawanishi, Y. Fujikawa, H. Ishii, H. Nishida, Y. Higashigaki, T. Kanno, T. Matsuda, T. Takamura-Enya, T. Yagi. Adduct formation and repair, and translesion DNA synthesis across the adducts in human cells exposed to 3-nitrobenzanthrone. *Mutat. Res.* 2013; 753 (2): 93-100. doi: 10.1016/j.mrgentox.

[学会発表] (計 2 件)

① 谷口美由紀、川西優喜、八木孝司。HeLaMR 細胞におけるシトシンメチル基転移酵素阻害剤による O<sup>6</sup>-メチルグアニン修復活性の回復。日本環境変異原学会第 42 回大会。2013 年 11 月 29 日。岡山市コンベンションセンター。

② 東垣由夏、川西優喜、高村岳樹、八木孝司。紫外線照射下のフェナレノンが誘発する DNA 損傷と突然変異の解析。日本環境変異原

学会第 41 回大会。2012 年 11 月 29 日。静岡市グランシップ。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 孝司 (YAGI Takashi)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：80182301

(2) 研究分担者

川西 優喜 (KAWANISHI Masanobu)

大阪府立大学・大学院理学系研究科)・准教授

研究者番号：70332963