

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06849

研究課題名(和文) ゲノムDNA上に生じた一分子の付加体の測定方法の開発

研究課題名(英文) Development of a method to identify single molecule adducts generated on genomic DNA

研究代表者

椎崎 一宏 (Shiizaki, Kazuhiro)

東洋大学・生命科学部・准教授

研究者番号：20391112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：発がんに関与しているDNA付加体はよく知られている。第3世代のシーケンシング技術によって、DNA上の付加体形成を同定することが可能となった。我々は1塩基のDNA付加体を持ったオリゴヌクレオチドを用いて、シーケンシング解析を行ったところ、DNA付加体の位置でポリメラーゼ伸長反応の遅延が観察された。次に我々は、ゲノムDNA中に存在するDNA付加体の量は非常に少ないことから、免疫沈降法を用いて付加体を含むDNA断片の濃縮を行った。これらの方法を組み合わせることにより、付加体形成と重要な部位での突然変異との関係が明らかになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is well documented that DNA adducts are associated with carcinogenesis. The 3rd generation of sequencing technology will enable us to determine formation of adducts on DNA molecule. We synthesized an oligonucleotide harboring one base of DNA-adduct, and performed sequencing analysis. Polymerase elongation delay was observed at the site of DNA adducts. Next, we enriched DNA fragments including adducts by using immuno-precipitation method because the amount of DNA adducts occurring in the genomic DNA was limited. By combining these methods, the relationship between adduct formation and mutations at critical positions would be clarified.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：DNA付加体 変異原物質 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

我が国の平均寿命は、この半世紀で男女とも10年以上も伸びたが、一方で1981年以来、死亡原因のトップは継続してがんである。これは平均寿命の伸びによって高齢者のがん患者が増加し、死亡率を上昇させていることが主な原因である。今後、必ず訪れる高齢化社会において、がん患者のさらなる増加は必至であり、先制医療につながる発がん予測や発症前診断に関する新しい取り組みは必要不可欠である。

細胞のがん化には遺伝子の変異が深く関わり、がん原性化学物質の多くはゲノムDNAと付加体を形成し、ドライバー遺伝子変異を引き起こす。これまでDNA付加体は、ポストラベル法や質量分析計による解析で定量や分類が行われてきた。化学物質一分子による一つのDNA付加体が、ドライバー遺伝子変異を生じさせ、それが最初のがん細胞発生の原因となると考えることは理論上可能であるが、この「一分子発がん仮説」と、従来の動物や培養細胞へ大量の化学物質を曝露した後に、DNA付加体を総量で検出する実験的検証との間には大きな隔りがある。また、近年では変異シグネチャーと呼ばれる化学物質特異的な変異パターンが存在することも明らかとなったが、これが配列による付加体形成効率によるものか、修復等によるバイアスで生じた結果なのか知るためには、ゲノムDNA上の付加体形成部位を一分子のゲノムから特定することが必要である。

近年、次世代型DNAシーケンサーにより、DNA配列解析の高速化と大容量シーケンス解析が可能となったが、さらに第三世代シーケンシング技術と呼ばれる「リアルタイムDNAシーケンシング」という新規配列決定方法が開発され、一分子のゲノムDNAのシーケンスについても可能となった。本方法では、付加体を持つDNAが鋳型となった場合には、DNAポリメラーゼによる新生鎖合成において障害となり伸長反応時間(inter-pulse duration; IPD)が遅延する。我々は、アルキル化によるDNA付加体が本シーケンシング方法ではどのように計測されるかについて、PacBio社RSIIシーケンサーを用いて検討を行った。その結果、O6-カルボキシメチルグアニンの導入箇所において、IPDの遅延が認められたことから、ゲノム上の一分子付加体の検出を、このリアルタイムDNAシーケンシング法により検出できる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

がん原性化学物質によって引き起こされる発がんは、一つのDNA付加体で起こりうる。DNA付加体をリアルタイムDNAシーケンシング法により一分子のゲノムから検出し、定性評価する方法の開発を目指すことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 付加体付き合成オリゴDNAによる解析方法の樹立

O6-methyl-deoxyguanosine (O6-MeG)、O6-carboxymethyl-deoxyguanosine(O6-CMG)、C8-PhIP-dGを1塩基含むオリゴヌクレオチドを用いて、PacBio RSIIシーケンサーによる配列解析を行う過程でのIPDの遅延効果を調べた。IPDは平均値で算出されるが、付加体によって定性的な解析が可能かを調べるために個々のリードでのIPDの分布を解析した。

(2) 付加体DNAの検出感度の同定

O6-CMG導入オリゴヌクレオチドを用い、これを非修飾オリゴヌクレオチドと混ぜて解析を行うことで、検出可能なテンプレート中の付加体DNA比率を求めた。また、PacBio RSIIシーケンサーのウェル(ZMW)は1セルあたり15万程で、個別のリード毎のinsilico解析には膨大なデータを扱う必要がある。このため、解析の至適パラメーターを検討することで、検出限界の改良を図った。検出限界の値から、付加体検出のためのシーケンサーに供するサンプルの最少量を算出した。

(3) 付加体DNA抗体による免疫沈降Adduct-DNA Immunoprecipitation (A-DIP)と標的遺伝子のキャプチャー法の確立

O6-CMGおよびO6-MeG導入オリゴヌクレオチドを用いて、付加体特異的抗体を用いた免疫沈降による濃縮を試みた。定量的評価のため、リアルタイムPCR法にて濃縮率の解析を行い、方法を最適化した。また、発がんに関与するドライバー遺伝子に形成された付加体を選択的に解析するために、目的遺伝子の相補配列を持つビオチン化キャプチャーオリゴヌクレオチドを用いた、ハイブリッド形成による濃縮法を試みた。

(4) 一本鎖DNA断片からの二重鎖シーケンシングテンプレート作成方法の樹立

抗体を用いた付加体付きDNAの免疫沈澱および特定配列のキャプチャーでは目的DNA断片は一本鎖DNAとして回収される。シーケンシング反応に供する鋳型DNAは二重鎖化と共に、ループアダプターを接続したダンベル構造を作成することが必要である。このため、DNA断片にlonelinkerを付加する方法、およびフェノールエマルジョン法(PERT)を用いて再会合による二重鎖化を用いたシーケンシングテンプレートの作成について検討を行った。

(5) 化学物質曝露後の各種DNAをテンプレートに用いた解析

化学物質を曝露したプラスミドDNAおよび培養細胞のゲノムDNAから、付加体を持つゲノムDNA断片の濃縮および特定遺伝子断片の濃縮を行うとともに、リアルタイムDNAシーケンシング法による付加体部位の同定を行った。目的遺伝子として、APC、 β -カテニン、k-ras、p53についてキャプチャーを行った。

4. 研究成果

(1) 付加体付き合成オリゴ DNA による解析方法の樹立

O6-MeG, O6-CMG, 8-oxo-dG を含むオリゴヌクレオチドでは、DNA 付加体部位ポリメラーゼ伸長反応の遅延が IPD の増加として観察された。C8-PhIP-dG では伸長反応が完全にストールしてしまうことから、バルキーな付加体では検出が出来ないことが分かった。O6-CMG 付加体塩基での伸長速度遅延は平均で正常塩基の伸長速度の 100 倍程度であったが、O6-CMG での伸長速度遅延の値には、大きな差は見られなかった (表 1)。

表1 付加体塩基と周辺塩基での IPD の遅延

Feature	IPD	location
TGCA <u>G</u> CG*	1.73	46
GCA <u>G</u> CG*A	17.18	47
CAG <u>G</u> *AC	14.59	48
AGC <u>G</u> *ACA	121.52	49

さらに各リードの個別解析集計結果により、伸長速度遅延は 120 倍付近をピークとして 20 倍から 200 倍の間で正規分布しており、常に一定の遅延を示すわけではない事が分かった (図 1)。これらの実験結果により、第 3 世代シーケンサーによる DNA 付加体検出が可能であることが分かったが、同時に付加体の種類の同定には不向きであることが予想された。

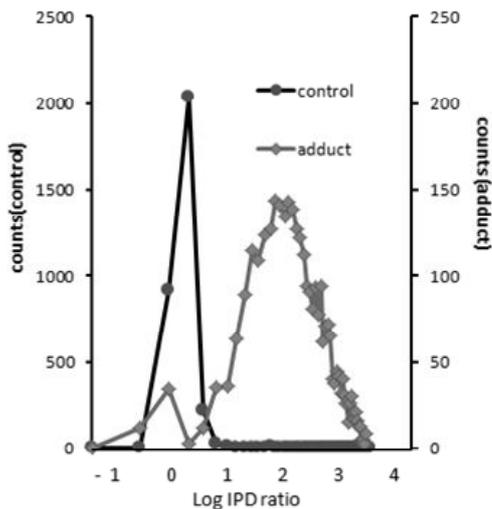


図1. 付加体塩基でのIPD比の分布

(2) 付加体 DNA の検出感度の同定

次に、この方法での検出感度を検討するために、付加体を持つ DNA フラグメントを通常の DNA フラグメントと混合して検出を試みたところ、検出限界は一割以上、付加体付き DNA が存在していないと検出ができないことが分かった (表 2)。検出感度の低さの原因はハードウェア側ではなく、付加体を持つ DNA

の解析結果がカバレッジの低さなどの理由で解析から自動排除されている可能性が考えられた。このため、各種解析パラメーターをチューニングしたところ、1%前後の混合比であれば付加体部位を解析することが可能であった。しかし、ゲノム中の DNA 付加体の形成割合は 10^{-7} 程度であり、これを検出するためには DNA 付加体の濃縮方法の開発が必要であることが分かった。

表2 付加体DNAの希釈率と各リードのIPDの分布

Dilution	Total read	class of IPD ratio		
		~5	5~10	10~
0 (control)	4081	4074	6	1
1 (adduct)	253	48	0	205
1/10	3664	3632	12	21
1/100	3786	3776	8	2
1/1000	3839	3830	6	3

(3) 付加体 DNA 抗体による免疫沈降 Adduct-DNA Immunoprecipitation (A-DIP) と標的遺伝子のキャプチャー法の確立

O6-CMG オリゴ DNA を p53 遺伝子 exon5 DNA 断片に連結した DNA フラグメント作成し、p53 遺伝子断片のみと混ぜ、O6-CMG 抗体によって免疫沈降後、Q-PCR によって存在比を算出した。その結果、 10^{-6} に希釈したサンプルから 0.72%まで濃縮できることが確かめられた (表 3)。本結果から、シーケンズ解析に必要な 10 μ g の DNA を得るために 1 mg の DNA を要することになる。また、この O6-CMG を含んだ p53 遺伝子断片を calf thymus DNA に様々な比で混ぜ、ビオチン化 p53 オリゴ DNA によりキャプチャーしたところ、最大で約 15%程度の回収が可能であった。

表3 A-DIPによるO6-CMGオリゴDNAの濃縮率

dilution	copy number DNA (Q-PCR)			content (%)
	total	O6-CMG oligo - antibody	O6-CMG oligo + antibody	
1	4.29×10^{10}	3.07×10^8	4.52×10^{10}	(105)
10^{-4}	3.77×10^9	7.29×10^3	2.30×10^8	6.10
10^{-5}	8.92×10^7	9.10×10^2	5.52×10^5	0.62
10^{-6}	1.18×10^6	N.D.	8.50×10^5	0.72

(4) 一本鎖 DNA 断片からの二重鎖シーケンステンププレート作成方法の樹立

一本鎖 DNA として回収された鋳型 DNA を二重鎖化し、シーケンステンププレートとするために、あらかじめ相補的でない粘着末端を持つ lonelinker を結合させてから A-DIP を行い、回収後に 1 サイクルのポリメラーゼ反応を行うことでほとんどの DNA の二重鎖化に成功した。また、PERT 法では、ランダムに切断された DNA を初期サンプルに用いた場合での

二重鎖化効率が極めて悪く、制限酵素切断断片では数%の再会合率にとどまった。

(5) 化学物質曝露後の各種 DNA をテンプレートに用いた解析

potassium diazoacetate (KDA) をプラスミド DNA に作用させて O6-CMG 付加体を形成させた後、超音波処理で断片化してテンプレートを作成した。シーケンス解析の結果、大腸菌 dam methylase による配列特異的な N6-methyldeoxyadenosine が優先的に検出されるため、O6-CMG は検出できなかった。*E. coli* HST04 dam-/dcm-株で調整したプラスミドを用いた場合には、カバレッジの低下が見られるサンプルが含まれていることが分かったが、read 数の差から解析から除外されていると考えられた。また、培養細胞に KDA を曝露し抽出したゲノム DNA を A-DIP にて濃縮したところ、回収率が低く、解析に必要な DNA 量を得るためには大量の曝露細胞からスタートすると共に、現実的でない抗体の量が必要であることが分かった。

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 2 件)

1) Nozomi Akiba, Kazuhiro Shiizaki, Yoshitaka Matsushima, Osamu Endo, Kazuho Inaba, Yukari Totsuka. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis* 2017 May 17 Volume 32 Issue 4 p455-462 査読有り

2) Kazuhiro Shiizaki, Masanobu Kawanishi; Takashi Yagi. Modulation of benzo[a]pyrene-DNA adduct formation by CYP1 inducer and inhibitor. *Genes and Environment* (2017) 39:14 p1-8 査読有り

[学会発表](計 4 件)

1) 前迫 侑也、善家 茜、エルザワハリ アスマ、古川 英作、加藤 護、白石 航也、河野 隆志、椎崎 一宏、戸塚 ゆ加里「次世代シーケンサーと DNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索」日本環境変異原学会第 46 回大会(2017 年)

2) 神尾 翔真、斎藤 春五、渡邊 昌俊、椎崎 一宏、戸塚 ゆ加里「生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立」日本環境変異原学会第 46 回大会(2017 年)

3) 椎崎 一宏「DNA 付加体形成部位の同定に関する新規アプローチ」16 回 分子予防環境医学研究会シンポジウム(2017 年)

4) 前迫 侑也、善家 茜、古川 英作、加藤 護、椎崎 一宏、中釜 斉、戸塚 ゆ加里「職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析(アダクトーム解析)」日本環境変異原学会第 45 回大会(2016 年)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椎崎 一宏 (SHIIAKI Kazuhiro)

東洋大学・生命科学部・准教授

研究者番号: 20391112

(2) 連携研究者

戸塚 ゆ加里 (TOTSUKA Yukari)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号: (40373401)