

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12214

研究課題名(和文)細胞内DNase I制御による画期的エピミュータジェンスクリーニング系の構築

研究課題名(英文)Construction of screening method of epi-mutagens based on control of intracellular DNase I

研究代表者

伊吹 裕子 (Ibuki, Yuko)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：30236781

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)：界面活性剤が、細胞骨格アクチンからDeoxyribonuclease I (DNase I)をリリースし、核内に移行させ、DNAを切断することを見出し、この現象を化学物質曝露によるクロマチン構造変化の評価へ応用することを試みた。最適な側鎖長を有する界面活性剤の使用により、効果的にアクチンからDNase Iを遊離させ、弛緩したクロマチンDNAが切断された。厳密な濃度制御によりヒストンH2AXのリン酸化を指標にクロマチン構造変化の評価ができる可能性が示された。また、熱も同様のメカニズムでDNAを切断する可能性が示され、今後の検討により、界面活性剤よりも効果的な方法を構築できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We found that some kinds of surfactants like nonylphenol polyethoxylates and linear alkylbenzene sulfonates induced phosphorylation of histone H2AX (γ-H2AX) via release of free deoxyribonuclease I (DNase I) with filamentous actin disruption. DNase I was translocated from the cytosol to the nucleus of cells after treatment with surfactants, and generated DNA strand breaks. The surfactant-induced generation of γ-H2AX increased relative to the acetylation caused by the treatment with histone deacetylase inhibitor, suggesting that the change of chromatin structure induced by environmental chemicals might be detectable by surfactant-induced γ-H2AX. On the other hand, we also found that heat stress induced similar release of DNase I and generation of γ-H2AX. This might be useful to establish the evaluation method for chromatin structure.

研究分野：毒性学

キーワード：エピジェネティクス DNase I 界面活性剤 ヒストン クロマチン構造 熱 γ-H2AX

1. 研究開始当初の背景

環境中には膨大な数の化学物質が存在し、我々は日常的にそれらの化学物質に曝露されている。化学物質の曝露は多様なエピジェネティックな変異を誘発し、遺伝子発現を攪乱する可能性があると考えられる。世代を超えて継続する安定性と、環境に応じて変化する可塑性の両方を兼ね備えたエピジェネティック変異の性格は、化学物質の経世代影響、低濃度長期間曝露影響において、新しい角度からの重要なリスク評価対象となるが、これまで化学物質曝露によるエピジェネティックな変異の解析はほとんどなされていない。それというも、化学物質毎に影響を与えるエピジェネティック変異が異なり、例えばヒストン修飾においては、ヒストン修飾の種類、修飾部位が多様であり、膨大な数が存在する化学物質では解析が困難であるためである。また、ジェネティックな異常を引き起こす化学物質(ミュータジェン)と比較して、エピジェネティックな異常を引き起こす化学物質(エピミュータジェン)として知られているものが圧倒的に少ないのも、効率の良い、簡便な検出系がほとんどないためである。

2. 研究の目的

我々は、一定以上の長さのアルキル側鎖を有する界面活性剤が、細胞骨格アクチンからDeoxyribonuclease I (DNase I)をリリースし、核内に移行させ、DNAを切断することを見出したことから、この現象をクロマチン構造変化のスクリーニングに応用することを思いついた。DNase Iは弛緩したDNAクロマチン部位を積極的に切断するため、濃度にもよるがその切断量はクロマチン構造に依存する。クロマチン構造は遺伝子の転写やDNA損傷修復などを制御しており、化学物質曝露はそれを変化させると考えられる。本研究では、界面活性剤を使って、生きた細胞核内へのDNase Iの移行を制御し、DNAを切断させ、その切断量から化学物質曝露によるクロマチン構造変化を評価する新しい系を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト培養細胞株(A549 肺上皮細胞、MCF7 ヒト乳がん細胞)に界面活性剤作用を行い、一定時間で培養した後、Western blottingおよび免疫染色法により、 γ -H2AX誘導変化を解析した。また、DNase Iの核移行、actin変化を免疫染色法、遠心法分画後のWestern blottingにより解析した。

実験を進めるうちに、熱作用が界面活性剤と同様にDNase Iを遊離することが考えられた。熱作用後のDNA損傷も γ -H2AX誘導を指標に検討した。熱は40~52℃を1時間以内で作用した。

Western blotting: γ -H2AXの解析は次の様に行った。細胞を回収後、ヒストン(核画分)を抽出、15%ゲルでSDS-PAGEを行い、PVDF膜に転写した。一次抗体は、Rabbit anti-phospho-histone H2AX (Ser139) IgG (Merck Millipore Co.)を用いた。二次抗体を反応後、ECL+ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用いて検出した。DNase Iの核移行は、高張液により核画分と細胞質画分を分離後、DNase Iならびにアクチン抗体を使い、Western blottingにより解析した。

免疫蛍光染色法: 35mm ガラス底ディッシュに細胞を播種し、培養後、各種界面活性剤、化学物質等を作用した。6%ホルマリンで固定、2% Triton X-100で透過処理した。一次抗体に Mouse anti-phospho-histone H2AX (Ser139) IgG, (Merck Millipore Co.)、Rabbit anti-DNase I polyclonal IgGを使用した。アクチンは、Anti-stain TM555 fluoresceine phalloidin (Cytoskeleton Inc.)で染色し、蛍光顕微鏡 (IX70, Olympus Co., Japan)で撮影を行った。

4. 研究成果

(1) 界面活性剤による γ -H2AX誘導とクロマチン構造評価への応用

各種界面活性剤によるDNA損傷を γ -H2AX誘

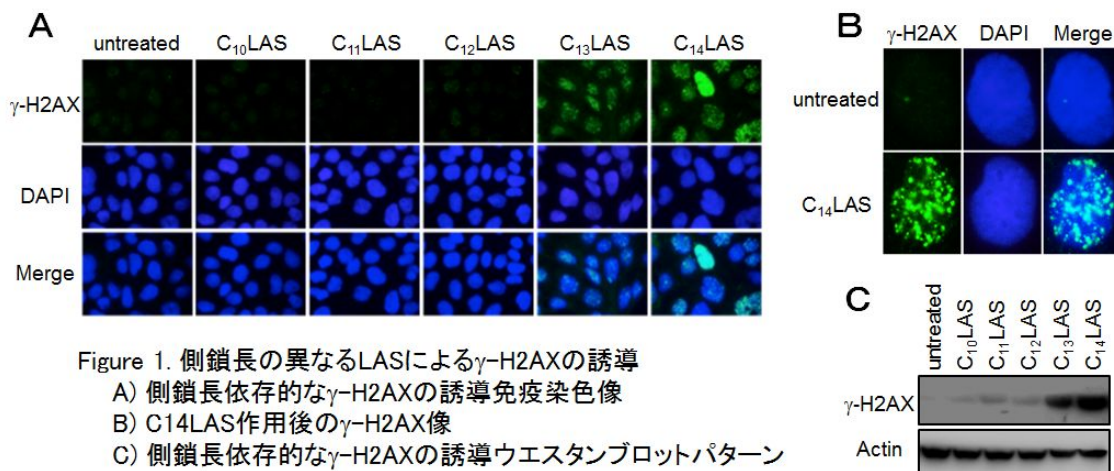


Figure 1. 側鎖長の異なるLASによる γ -H2AXの誘導

A) 側鎖長依存的な γ -H2AXの誘導免疫染色像

B) C₁₄LAS作用後の γ -H2AX像

C) 側鎖長依存的な γ -H2AXの誘導ウエスタンブロットパターン

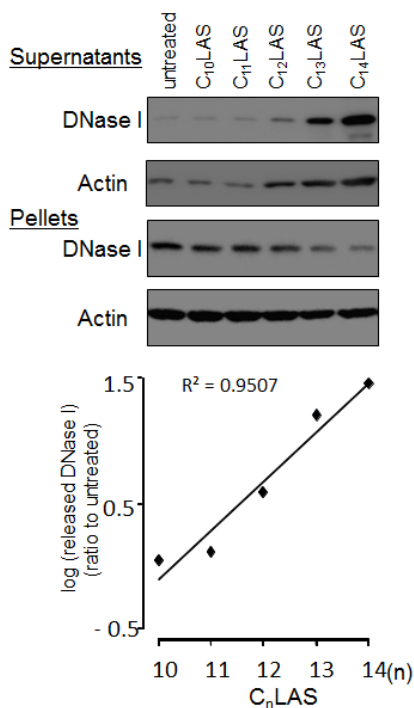


Figure 2. 側鎖長の異なるLASによるDNase Iのアクチンからの遊離
側鎖長依存的にアクチンは崩壊し、同時にDNase Iはアクチンから遊離している。

導を指標に検討した。非イオン界面活性剤である Nonylphenol polyethoxylate, Tween 20, Triton X-100, Nonidet P-40、陰イオン界面活性剤である Linear alkylbenzene sulfonate (LAS)により、 γ -H2AX が検出された。本報告書では、LAS の結果を中心に説明する。Fig. 1 に側鎖長の異なる LAS を作用後の γ -H2AX の誘導パターンを示す。側鎖 13 以上の LAS で有意な γ -H2AX の誘導が認められた。この γ -H2AX の誘導は、DNA 二本鎖切断が起因になっていることがパルスフィールドゲル電気泳動法により確認された(データ示さ

ず)。

一方、LAS を作用した際、LAS の側鎖依存的にアクチンが崩壊し、核画分に DNase I が移行していた(Fig. 2)。また、LAS 作用時に、DNase I の阻害剤である EGTA や $ZnCl_2$ を作用させると γ -H2AX の誘導が阻害された(データ示さず)。よって、LAS 作用時、アクチンと結合している DNase I が遊離し、DNA を切断している可能性が考えられた。実際に免疫染色法で LAS 作用時の DNase I の挙動を確認した場合にも、DNase I の核移行、 γ -H2AX の誘導、アクチンの崩壊が観察された(Fig. 3)。以上の結果から、界面活性剤を使用することにより、アクチンから DNase I を遊離させ、弛緩したクロマチンを切断することが可能であることが考えられクロマチン構造変化の評価に使用できる可能性が示された。

そこで、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いて、クロマチン構造を弛緩させた状態にし、その際、界面活性剤を作用させ、通常状態との γ -H2AX 誘導の差を検討した(Fig. 4)。その結果、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である sodium butyrate を作用させると、LAS による γ -H2AX 誘導が亢進することが示された。

また、今回は LAS の結果を示したが、側鎖長の異なる NPEO でも同様の結果が確認された。NPEO では側鎖長が 10~15 において作用後 γ -H2AX の誘導が効果的に認められ、アクチンの崩壊、DNase I の遊離が確認された。

以上の結果より、界面活性剤による DNase I 遊離による DNA 切断の検出という新しい考え方により、クロマチン構造の状態を評価できる可能性が考えられた。一方、様々な界面活性剤を使用して検討するうちに、界面活性剤作用濃度が厳密でなければならず、作業により γ -H2AX 誘導に差ができることが明らかになった。本法をクロマチン構造の状態を評価する方法として用いる場合、誰が作業しても同じ結果が得られなければ評価系としては適さない。そこで、同様の原理でアクチン

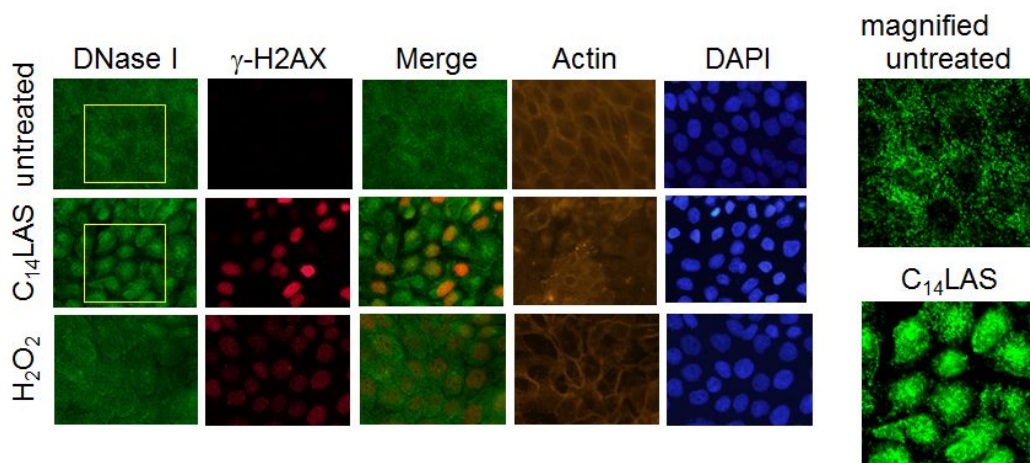


Figure 3. LASによるDNase Iの核内移行

LAS作用により、DNase Iが核内に移行した。同時に γ -H2AXが誘導され、アクチンが崩壊しているのが認められる。

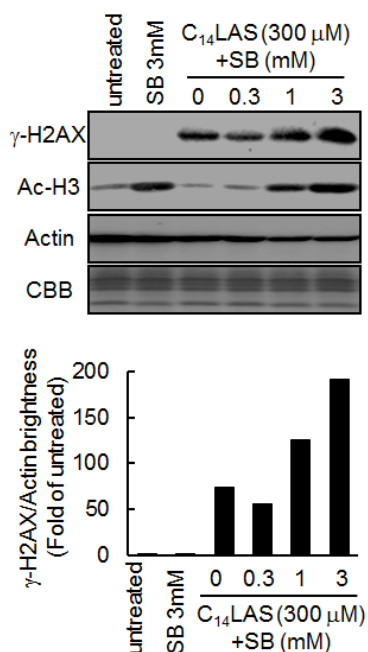


Figure 4. クロマチン構造変化とLASによるDNA損傷誘導

Sodium butyrate作用後、LASによる γ -H2AX誘導は有意に上昇した。

から DNase I を遊離できる方法を模索した結果、熱作用がアクチンから DNase I を遊離させるのではないかと考えた。

(2) 熱ストレスによる γ -H2AX 誘導

培養細胞に熱ストレス (40, 42, 45, 48, 52) を1時間かけ、さらに1時間培養後における γ -H2AX 誘導パターンを Figure 5 に示す。2 種の細胞どちらにおいても、45~48 において、顕著な γ -H2AX 誘導が認められた。その誘導は 5 mM の H₂O₂ 作用時と同程度であった。また、データは示さないが、この γ -H2AX 誘導は、界面活性剤と同様に、DNase I の阻害剤である EGTA や ZnCl₂ により阻害されたことから、界面活性剤と同じように、熱によりアクチンからの遊離が引き起こされ、核移行して DNA 損傷を引き起こし、 γ -H2AX が誘導さ

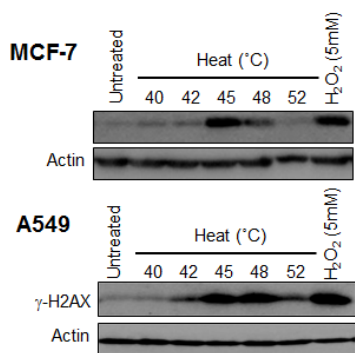


Figure 5. 熱ストレスによる γ -H2AXの誘導
各細胞において、45~48°Cの熱ストレスは顕著な γ -H2AX誘導を示した。

れたことが予想された。熱ストレスの曝露は、界面活性剤のような精密な濃度制御、時間などが要求されないため、誰が行っても同じ損傷を誘導できる評価系構築の方法として適していると考えられる。よって、今後、熱ストレスを利用して、クロマチン構造の評価に利用できないかどうかを検討していく予定である。

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 3件)

1. 伊吹裕子 化学物質によるヒストン修飾と遺伝毒性 Bio Clinica 31(5) 93-96 (2016). 査読無
2. X. Zhao, G. Yang, T. Toyooka, Y. Ibuki. New mechanism of γ -H2AX generation: Surfactant-induced actin disruption causes deoxyribonuclease I translocation to the nucleus and forms DNA double-strand breaks. Mutat Res. 794, 1-7 (2015). doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.09.006. 査読有
3. X. Zhao, T. Toyooka, T. Kubota, G. Yang, Y. Ibuki. γ -H2AX induced by linear alkylbenzene sulfonates is due to deoxyribonuclease-1 translocation to the nucleus via actin disruption. Mutat Res. 777, 33-42 (2015). doi: 10.1016/j.mrfmmm.2015.04.006. 査読有

[学会発表](計 4件)

1. 伊吹裕子: ヒストン H2AX リン酸化を指標とした光毒性評価法 フォトダイナミックセラノスティクス研究会(静岡) 2017年1月21日.
2. 荻野真宏, 豊岡達士, 伊吹裕子: DNA 損傷能を有さない熱ストレスがなぜ γ -H2AXを誘導するか? 富士山麓アカデミック&サイエンスフェア(富士), 2015年12月11日.
3. 荻野真宏, 豊岡達士, 伊吹裕子: 熱ストレスによるヒストン H2AX のリン酸化とその機構. 第44回日本環境変異原学会(福岡) 2015年11月26日.
4. Yuko Ibuki: Histone modifications induced by chemicals and change of sensitivity to UV. 15th International Conference of Radiation Research (Kyoto), May 26, 2015.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://sweb.u-shizuoka-ken.ac.jp/~photo/bio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊吹 裕子 (IBUKI YUKO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：30236781

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()