

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：33919

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25550036

研究課題名(和文)発がん物質による立体的遺伝子損傷：ゲノムワイド解析による配列特異性と脆弱性の解明

研究課題名(英文)A picture of whole DNA modification induced by carcinogens: Whole-genome analysis for sequence specificity and vulnerability

研究代表者

岡本 誉士典 (OKAMOTO, YOSHINORI)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：50512323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、化学発がん物質によるゲノム遺伝子の塩基損傷を立体的要因も考慮し、全体像を把握することとした。まず初めに、タバコ煙中に含まれる発がん物質ベンゾ(a)ピレン(BaP)が生成する遺伝子損傷産物(N2-(-)trans-BPDE-dG、またはN2-(+)trans-BPDE-dG)ならびに紫外線曝露により生成するシクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)の解析を進めた。また、今回の課題から派生して得られた成果として、遺伝子のエピジェネティックな修飾であるシトシンメチル化に関する結果も得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to take a whole picture of DNA damage induced by chemical carcinogens. I investigated benzo(a)pyrene which is containing in tobacco smoke and known as a potent carcinogen, and cyclobutane-pyrimidine dimer which is formed by UV exposure. In addition, this project achieved a great success in epigenetic analysis of mouse preimplantation zygote, in which methylcytidine was measured using a high-performance liquid chromatograph-triple quadrupole mass spectrometer.

研究分野：化学物質影響評価

キーワード：マウス胚性幹細胞 紫外線照射 ゲノム修飾 未分化マーカー 受精卵 脱メチル化 LC/MS/MS

1. 研究開始当初の背景

日本人死因の3割を占める悪性新生物(がん)は、主に食事および生活環境から摂取される化学物質が原因とされている。化学発がんには遺伝情報の変化(イニシエーション)が必要とされ、その解析においてはゲノム全体の立体的な要因は考慮されていない。通常、ゲノム遺伝子はエピジェネティック変化に依存して凝縮度(立体的要因)を調節しており、均一な状態では存在していない。したがって、発がん物質による遺伝子損傷もまた、ゲノム遺伝子の凝集度合いに依存して変化することが予想される。

2. 研究の目的

本研究の当初の目的は、化学発がん物質によるゲノム遺伝子の塩基損傷を立体的要因も考慮し、全体像を把握することとした。まず初めに、タバコ煙中に含まれる発がん物質ベンゾ(a)ピレン(BaP)が生成する遺伝子損傷産物(*N2-(-)trans*-BPDE-dG、または*N2-(+)trans*-BPDE-dG)ならびに紫外線曝露により生成するシクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)の解析を進めた。また、今回の課題から派生して得られた成果として、遺伝子のエピジェネティックな修飾であるシトシンメチル化に関する結果についても報告する。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

ベンゾ(a)ピレンは和光純薬工業(大阪)

(2) マイクロ流体チップ電気泳動法

超微量核酸サンプルの分析法として、マイクロ流体チップを用いた電気泳動法を実施した。サンプルとしては、合成した1本鎖オリゴDNA(5'-GAGGTGCXTGTTTGT-3'、X=dG or *N2-(-)trans*-BPDE-dG、*N2-(+)trans*-BPDE-dG)を用いた。電気泳動には、バイオアナライザー(2100、アジレントテクノロジーズ社、Santa Clara, CA, USA)および1本鎖RNA分離キット(RNA6000ピコキット、アジレントテクノロジーズ社)を用いた。電気泳動像およびエレクトロフェログラムの解析には、アジレント2100エキスパートソフトウェアを使用した。

(3) 特異抗体を用いた遺伝子損傷部位の認識性の確認

遺伝子損傷の特異抗体として、BaPによるDNA損傷の解析では抗ベンゾ(a)ピレン抗体(BAP-13クローン、sc-51508、サンタクルズバイオテクノロジーズ社、Dallas, TX, USA)および抗BPDE-DNA抗体(6A486クローン、LS-C74786-100、ライフスパンバイオサイエンス社、Seattle, WA, USA)、UV照射によるCPD解析では抗CPD抗体(TDM-2クローン、NM-DND-001、コスモバイオ株式会社、東京)を用いた。

(4) 細胞培養

マウス胚性幹細胞はESD3細胞株をAmerican Type Culture Collectionより購入した。マウス胎児性繊維芽細胞(MEF)はマ

ウス14-15日胚からの初代培養細胞をオリエンタル酵母工業株式会社(東京)より購入し、継代数3回以内に使用した。

ESD3の培養では、10%コラーゲン溶液(新田ゼラチン、大阪)でコートした35mmディッシュ上にESD3細胞を播種した。維持培地としては、15%ノックアウト代替血清(ライフテクノロジーズ社、Carlsbad, CA, USA)、1%ペニシリン・ストレプトマイシン(PC/SM、和光)、1%L-グルタミン(和光)、1%非必須アミノ酸(和光)、1%モノチオグリセロール溶液(和光)およびヒト白血病阻止因子(和光)を含むノックアウトDMEM(ライフテクノロジーズ社)に、GSK3阻害剤[(2',3'E)-6-プロモインジルピン-3'-オキシム]を最終濃度5μMになるように添加し、フィーダーフリーで37/5%CO₂条件下にて培養した。ESD3細胞は6日毎に継代した。継代時には培地を取り除き、D-PBS(-)を添加して細胞層を洗浄した。トリプシン処理を行い3分間37°C/5%CO₂条件下でインキュベートした後、ディッシュから細胞を回収した。回収した細胞懸濁液は、1200rpmで3分間、室温にて遠心分離した。上清を吸引した後に維持培地で再懸濁し、維持培地で満たされたコラーゲンコートディッシュ上に播種した。

MEFはMEF培地(10%FBSおよび1%PC/SMを含むDMEM)で培養し、70%コンフルエント状態に達した時点で継代した。培養液を取り除きD-PBS(-)を添加して細胞層を洗浄した。トリプシン(EDTA-4Na含有)を添加(トリプシン処理)し、37/5%CO₂条件下で3分間加温した後、MEF培地を添加して回収した細胞懸濁液を1,200rpmで3分間、室温にて遠心分離した。上清を吸引した後にMEF用培地で再懸濁してディッシュに播種し、37/5%CO₂条件下で培養した。

(5) リアルタイムRT-PCR解析

細胞から回収したトータルRNAより合成したcDNAを10ng/μLに希釈しSYBR qPCRマスターミックス(東洋紡、大阪)を用いてリアルタイムRT-PCR法により未分化遺伝子(*Sox2*、*Nanog*、*Oct3/4*、*Dppa5*)およびアポトーシス関連遺伝子(*p53*、*p21*、*Gadd45a*、*Mdm2*、*Puma*、*Bax*、*Msh2*)の発現量をCt法に基づいて相対定量した。測定機器はLight Cycler 480II(ロシュ・ダイアグノスティクス社、Indianapolis, IN, USA)を用いた。各遺伝子の発現量は*Gapdh*を用いて補正した。プライマー配列設計には、ロシュ・ダイアグノスティクス社のユニバーサルプローブライブラリーアッセイデザインセンター(<http://www. Roche-biochem.jp/sis/rtPCR/universal-probelibrary-up1/>)を利用した。

(6) ドットプロット法によるCPDの測定

UV照射後の細胞から抽出したDNA溶液を5mM TE緩衝液中で5分間、95°CでインキュベートしてDNAを変性させた。PVDF膜(アトラス社、東京)上にDNA溶液を200pmolのDNA量でプロットした。5%スキムミルク溶液に膜

を浸して一晩 4 でインキュベートしブロッキングした。PBS-T で洗浄後、Anti-CPD 抗体溶液で膜を浸して 2 時間室温でインキュベートし、一次抗体を反応させた。PBS-T で洗浄後、HRP 標識抗マウス IgG 抗体溶液で膜を浸して 1 時間室温でインキュベートし、二次抗体を反応させた。PBS-T で洗浄後、ImageQuant LAS-4010 (GE ヘルスケア社、Little Chalfont、UK) で CPD レベルを定量した。

(7) 次世代シーケンサー用サンプルの調製

UV 照射により CPD が形成された mES 細胞由来ゲノム DNA を用いて、抗 CPD 抗体 (TDM-2 クローン、NM-DND-001、コスモバイオ株式会社、東京) による免疫沈降反応を実施した。抽出した DNA (およそ 30 μ g) を 130 μ L の 50 mM TE 緩衝液に溶解した。続いて、ゲノム DNA をおよそ 200 bp の断片にするために、超音波破砕機 (Covaris M220、Woburn、MA、USA) に供した。断片化されたサイズの確認は、バイオアナライザー (アジレントテクノロジー社) を用いて実施した。得られた断片サンプルの解析は、タカラバイオ社に依頼した。

4. 研究成果

(1) マイクロ流体チップ電気泳動法による BPDE-DNA 付加体に対する抗体反応性の検証

ダメージを受けていないオリゴ DNA および BPDE-DNA 付加体を含むオリゴ DNA をマイクロ流体チップ電気泳動に供した結果、DNA 付加体を持つオリゴ DNA は正常オリゴ DNA と異なる泳動度を示すことが明らかとなった (図 1)。

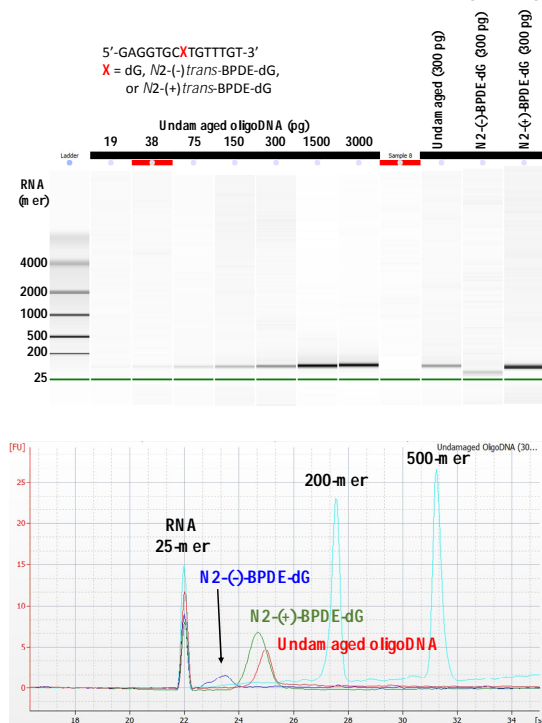


図 1. オリゴ DNA のマイクロ流体チップ電気泳動パターン (上、ゲル泳動像; 下、エレクトロフェログラム)

この実験系を用いて、DNA 損傷特異抗体による EMSA 試験を実施した。しかしながら、今回用いた 2 種類の抗体はいずれも損傷オリゴ DNA の泳動パターンに影響することはなく、DNA 損傷配列に結合して DNA を回収できるほどの特異性は得られないものと考えられる。

(2) 培養細胞への UV 照射による CPD 生成の検出

mES 細胞あるいは MEF 細胞に対して UV 照射後 0.5、3、9、24、48 h における CPD の形成をドットプロット法により検出した (未発表につき、データは示していない)。UV 照射強度 10 J/m^2 、100 J/m^2 のどちらの照射強度でも CPD は形成され、10 J/m^2 照射した mES 細胞では照射後経時的に CPD 量が減少し、照射後 24 h では初期生成量の約 25% まで減少した。一方、100 J/m^2 照射群では照射後 48 h において約 40% の CPD が残存していた。また、10 J/m^2 照射した MEF 細胞では、CPD の減少はほとんど見られず 48 h においても約 80% の CPD が残存していた。

(3) UV 照射が及ぼす mES 細胞の未分化状態に対する影響

アルカリホスファターゼ染色法を用いて、mES 細胞の未分化状態およびコロニー形状について観察した。UV 照射後 0.5、3、9、24、48 h の mES 細胞のコロニーの未分化状態および細胞状態を観察した。また、UV 照射後の MEF 細胞も同様のタイムポイントで観察した。mES 細胞では、照射後 24 h にかけて細胞増殖の低下が見られ、その後、48 h にかけて回復する様子が見られた。MEF 細胞においては UV 照射後 24 h から細胞が剥がれてくる様子が見られ、48 h にはほとんどの細胞が浮遊していた (未発表につき、データは示していない)。

リアルタイム RT-PCR 法を用いて mES 細胞の多能性マーカー遺伝子 (*oct3/4*、*Nanog*、*Sox2*、*Dppa5*) および *p53*、その下流因子 (*p21*、*Gadd45a*、*Bax*、*Mdm2*、*Puma*、*Msh2*) の変動を評価した (未発表につき、データは示していない)。10 J/m^2 の UV を照射した mES 細胞では、*Dppa5* 発現はどのタイムポイントにおいても変動しなかったが、*Oct3/4* および *Nanog*、*Sox2* では照射後 3-9 h にかけて低下し、その後、照射後 24 h では回復に転じた。次に、UV 照射により誘導された CPD の修復、コロニーサイズの回復といった細胞応答がどのような機序により引き起こされているのかを検討するために、*p53* とその下流因子の発現を評価した。*p53* 発現の顕著な変動は見られず、その下流因子である *Gadd45a* および *Puma*、*Mdm2* は照射後 3-9 h にかけて増加したが、*p21* および *Bax*、*Msh2* は顕著な変動が見られなかった。

(4) UV 曝露に起因する mES 細胞の未分化状態変化に対する *p53* の関与

UV 照射単独時と同様に、mES 細胞の多能性マーカー (*Oct3/4*、*Nanog*、*Sox2*、*Dppa5*) および *p53* とその下流因子 (*p21*、*Gadd45a*、*Bax*、*Mdm2*、*Puma*、*Msh2*) の発現を評価した (未発

表につき、データは示していない)。Dppa5発現はUV照射単独時と同様に変動しなかった。p53阻害剤であるcPFT- を処理した場合でも、p53およびp21、Bax、Msh2発現に変化はなく、Oct3/4およびNanog、Sox2の低下、Gadd45aおよびMdm2、Pumaの増加もUV照射単独時と同様であった。

(5) UV照射が及ぼすMEFのp53およびその関連因子の発現変動

リアルタイムRT-PCR法を用いてMEF細胞のp53およびその下流因子(p21、Gadd45a、Bax、Mdm2、Puma、Msh2)の変動を評価した(未発表につき、データは示していない)。UV 10 J/m²を照射したMEF細胞ではp53およびMdm2においてUV照射後9hにかけて減少したが、その後、照射後24hでは増加した。一方、Gadd45aおよびBax、Puma、Msh2、p21発現にばらつきはあるが、顕著な増加を示すことはなかった。

(6) 次世代シーケンサーサンプルのクオリティーチェック

超音波破砕機にて断片化したDNAのサイズを確認するために、断片化サンプルをバイオアナライザーに供した。その結果、およそ200bpあたりに切断サンプルが生成していることが明らかとなった。このサンプルについて、抗CPD抗体を用いた免疫沈降反応を実施した後、タカラバイオ社に解析を依頼した。その結果、次世代シーケンサーの解析に足る十分なDNA量ではないことが判明したため、今回は解析を断念した。

(7) 着床前マウス受精卵のシトシンメチル化ダイナミクス

本課題が目的とするゲノム修飾の全体像を解析するという取り組みから、エピジェネティックなゲノム修飾の測定を実施し、ユニークな結果が得られた。これまでに受精卵中の父親および母親ゲノムに描かれているエピジェネティックな模様は、それぞれ異なるメカニズムで消去されていくことが報告されていた。今回、実際にゲノム中のメチルシトシンおよびヒドロキシメチルシトシン量の変化を、高速液体クロマトグラフ-トリプル四重極型質量分析計を用いて数値化することに成功した。本成果は、プレスリリースされ、日刊工業新聞(2016年1月12日付け)および京都新聞(2016年1月13日付け)に掲載されるとともに、新聞掲載がきっかけで化学同人が毎月出版している月刊「化学」に解説記事を掲載することとなった。

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 8件)

Yoshinori Okamoto、Naoko Yoshida、Toru Suzuki、Nobuhiro Shimozawa、Maki Asami、Tomonari Matsuda、Nakao Kojima、Anthony C. F. Perry、Tatsuyuki Takada、

DNA methylation dynamics in mouse preimplantation embryos revealed by mass spectrometry, *Sci. Rep.*、査読有、6巻、2016、19134

DOI: doi: 10.1038/srep19134

Takao Tobe、Koji Ueda、Motozumi Ando、Yoshinori Okamoto、Nakao Kojima、Thiol-mediated multiple mechanisms centered on selenodiglutathione determine selenium cytotoxicity against MCF-7 cancer cells, *J. Biol. Inorg. Chem.*、査読有、20巻、2015、687-694

DOI:10.1007/s00775-015-1254-6

Yoshinori Okamoto、Takao Tobe、Koji Ueda、Tatsuyuki Takada、Nakao Kojima、Oral administration of Brazilian propolis exerts estrogenic effect in ovariectomized rats, *J. Toxicol. Sci.*、査読有、40巻、2015、235-242

DOI: 10.2131/jts.40.235

Koji Ueda、Rena Makino、Takao Tobe、Yoshinori Okamoto、Nakao Kojima、Effects of organic and inorganic mercury(II) on gene expression via DNA conformational changes, *Fund. Toxicol. Sci.*、査読有、1巻、2014、73-79

DOI:

http://www2.e-kenkyu.com/fts_journal/papers?number=2&volume=1&year=2014

Yuki Taniguchi、Takao Tobe、Hideyuki Hayami、Yoshinori Okamoto、Koji Ueda、Tatsuyuki Takada、Nakao Kojima、Neural differentiation of pluripotent stem cells and application for metal-induced neural toxicity study, *Yakugaku Zasshi*、査読有、134巻、2014、793-795

DOI:10.1248/yakushi.14-00017-3

Takao Tobe、Koji Ueda、Yoshinori Okamoto、Motozumi Ando、Hiroyuki Nishida、Kazuo Itoh、Nakao Kojima、Roles of glutathione-mediated metabolites in the anti-tumor effects of selenium, *J. Res. Inst. Meijo Univ.*、査読有、13巻、2014、35-40

DOI: N/A

Takao Tobe、Yoshinori Okamoto、Tatsuyuki Takada、Nakao Kojima、A simple and convenient synthesis of a stable isotope-labeled 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine, the sixth base in mammalian DNA, *J. Res. Inst. Meijo Univ.*、査読有、13巻、2014、19-25

DOI: N/A

Naoki Okashita、Yuichi Kumaki、Kuniaki Ebi、Miyuki Nishi、Yoshinori Okamoto、Megumi Nakayama、Shota Hashimoto、

Tomohumi Nakamura, Kaoru Sugasawa, Nakao Kojima, Tatsuyuki Takada, Masaki Okano, Yoshiyuki Seki, PRDM14 promotes active DNA demethylation through the ten-eleven translocation (TET)-mediated base excision repair pathway in embryonic stem cells, Development, 査読有, 141 巻, 2014, 269-280
DOI: 10.1242/dev.099622

〔学会発表〕(計 3件)

Yoshinori Okamoto, Naoko Yoshida, Toru Suzuki, Nobuhiro Shimosawa, Maki Asami, Tomonari Matsuda, Nakao Kojima, Anthony C. F. Perry, Tatsuyuki Takada, DNA methylation dynamics in mouse preimplantation embryos revealed by mass spectrometry, International Symposium on "Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cells 2016", 2016年2月18日, 京都大学(京都, 京都) 長谷川祥子, 戸邊隆夫, 若原美沙紀, 植田康次, 岡本誉土典, 高田達之, 小嶋仲夫, 神野透人, マウス胚性幹細胞の発がん性多環芳香族炭化水素に対する感受性の比較, 第61回日本薬学会東海支部総会・大会, 2015年7月4日, 名古屋市立大学薬学部(愛知, 名古屋) 清水優希, 戸邊隆夫, 岡本誉土典, 植田康次, 高田達之, 小嶋仲夫, 紫外線曝露によるマウス胚性幹細胞のp53非依存的細胞死, フォーラム2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2014年9月19日, つくば国際会議場(茨城, つくば)

〔図書〕(計 1件)

岡本誉土典, 高田達之, 化学同人, 月刊「化学」, 2016年, pp.12-16

〔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〕

京都新聞、遺伝子発現制御を正確に測定
立命大、がん検査など応用へ、2016年1
月13日付
日刊工業新聞、立命館大など、DNAメ
チル化解析 微量定量法・マウス胚で確
立、2016年1月12日付
ホームページ

<http://www2.meijo-u.ac.jp/~jinno/cms/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 誉土典 (OKAMOTO, Yoshinori)
名城大学・薬学部・助教
研究者番号: 50512323

(2) 研究分担者

小嶋 仲夫 (KOJIMA, Nakao)
鈴鹿医療科学大学・医用工学部・
非常勤講師
研究者番号: 80333178

(3) 連携研究者

()

研究者番号: