

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550041

研究課題名(和文) エピジェネティックな転写抑制を促進させる化学物質検出系の確立

研究課題名(英文) An assay to detect substances to promote epigenetic repression of transcription

## 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： エピジェネティックな遺伝子の変化、すなわちシトシンのメチル化は外来の化学物質によっても引き起こされると考えられる。06-メチルグアニンDNAメチル転移酵素(MGMT)のプロモーターはこのようなエピジェネティックな変化を検出できる適当な配列である。本研究ではMGMTプロモーターの下流にヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(hprt) cDNAを連結し、さらにネオマイシン耐性遺伝子をもつプラスミドを作製し、hprt欠損細胞に導入することで、MGMTプロモーターが活性化したら6-チオグアニン耐性になる細胞アッセイ系を作製した。この細胞を用いて外来のエピミュータジェンの探索を試みている。

研究成果の概要(英文)： Aberrant epigenetic alteration of genes, that is, cytosine methylation and demethylation, is caused occasionally when the cells are exposed to particular exogenous chemicals. We found that 06-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) gene promoter is the suitable DNA sequence that can detect the epigenetic alteration. In this study, we made the reporter plasmid that has hypoxanthine-phosphoribosyltransferase (hprt) cDNA under the control of the MGMT promoter and also has neomycin-resistance gene. We introduced the plasmid into hprt-deficient cells and established the cell line that becomes 6-thioguanine resistance by inactivation of the introduced hprt by the promoter methylation. We are now exploring the epimutagenic activity in a large variety of man-made substances.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：エピジェネティクス エピミュータジェン バイオアッセイ 5-メチルシトシン プロモーター

## 1. 研究開始当初の背景

近年、DNA 配列の変化を伴うことなく、後天的な作用により形質変異が次世代に伝わるエピジェネティックな機構が発見されている。この機構は2つ存在する。1つはDNAのシトシンの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・リン酸化などの化学修飾とそれらの脱反応による遺伝子発現の変化で、この2つの機構は密接に関連して起きている。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、そのような物質は、遺伝子変化を起こす Mutagen に対して、Epimutagen (エピミュータジェン)と呼ばれるようになった。代表的なエピミュータジェンである 5-azacytidine (AzaC) と Decitabine は、メチル基転移酵素を阻害することによって、遺伝子プロモーター領域の CpG 配列のシトシンメチル化を解消し、遺伝子発現を活性化する。しかしこれまで多くの化学物質の中からエピミュータジェンを簡便に探し出すことは困難であった。

申請者は以前に、癌細胞の多くにおいて DNA 修復酵素の1つ O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT)の発現が抑制されていることや MGMT 発現抑制が AzaC によって解消されることを見いだした。近年多くの研究者により MGMT 遺伝子のプロモーターの CpG サイトがメチル化されていることが証明され、MGMT はシトシンのメチル化による遺伝子発現制御が明らかで、発癌にも関わる代表的な遺伝子であると位置づけられた。近年、研究代表者は MGMT の発現がない HeLa MR 細胞を用いて、化学物質による 5-メチルシトシンの脱メチル化によって MGMT が活性化した細胞を簡便に定量的に検出・選択する方法を確立した<日本環境変異原学会第 42 回大会 (2013)、43 回大会 (2014)>。

## 2. 研究の目的

多くの癌で種々の遺伝子がエピジェネティックな変化を受けており、一部の外因性化学物質が遺伝子プロモーターのメチル化変化を通して遺伝子活性化や不活性化に関わっている可能性が高い。そこで本研究では、HeLa 細胞と MGMT 遺伝子のプロモーターを用いて、その CpG サイトのメチル化や脱メチル化による遺伝子発現やその抑制を簡便に定量的に検出するアッセイ系を樹立することを目的とした。さらに CpG サイトのメチル化を促進する能力のある化学物質を既知物質や環境中から探索することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) プロモーターの脱メチル化による MGMT 遺伝子の活性化

プロモーターの脱メチル化による活性化を確認するために、MGMT 活性を欠損するヒト HeLa MR 細胞を用いた。HeLa MR 細胞に AzaC と Decitabine 0.1、1.0、10、15  $\mu$ M 処理して 10 日間培養後に 6 cm dish に播種し、N-methyl-nitrosourea (MNU) 1  $\mu$ M 処理後に出現する MNU 抵抗性コロニー頻度を求めた。MNU 抵抗性を獲得した細胞および元の HeLa MR 細胞、MGMT を発現している HeLa S3 細胞の MGMT 発現量、MGMT プロモーターの CpG 領域のメチル化のレベルを Bisulfite 処理による COBRA 法、Bisulfite sequencing によって調べた。

### (2) MGMT プロモーターの不活性化 (メチル化) を検出するためのプラスミドと細胞の作製

MGMT を発現する HeLa S3 細胞に X 線を 1.5 Gy 照射し、2 週間培養した後 10 cm dish に 10<sup>5</sup> 個播種し、30  $\mu$ M 6-thioguanine (6TG) を含む培地で選択し、生じたコロニーを単離した。単離した細胞が hprt 遺伝子を欠失していることを PCR 法で確認した。

hprt cDNA を理研バンク IRAL005M19 から PCR で増幅した。MGMT プロモーター (配列は Harris et al. Nuc. Acids Res, 19, 1991) を増幅し、下流に hprt cDNA を結合し、プラスミド pSV3neo に挿入した。このプラスミドを pSV3neoMGMThprt と名付けた。

pSV3neoMGMThprt を制限酵素で直線化した後、HeLa S3 hprt 細胞に導入し、G418 で選択した。出現したコロニーを単離して、そのうちの1つを HeLa EMhprt1 細胞と名付けて使用した。

### (3) 化合物による MGMT プロモーター不活性化の検出

メチル化を促進する可能性のある化学物質や Epimutagenic な作用をする可能性のある物質を HeLa EMhprt1 細胞に 24 時間処理し、2 週間培養後、10cm dish あたり 10<sup>5</sup> 個の細胞を播種して、6TG 抵抗性細胞の出現頻度を調べた。HeLa EMhprt1 細胞は MGMT プロモーターによって下流の hprt 遺伝子が発現していて 6TG を含む培地では生存できない。しかし MGMT プロモーターの活性がなくなると hprt が発現せず 6TG 存在下で増殖が可能となる。

まず化学物質の候補として、ヒストンアセチル化酵素阻害剤 garcinol、ヒストンリジンメチル基転移酵素阻害剤 Chaetocin、

BIX-01338、メチル基供与体である S-アデノシルメチオニン、また環境汚染物質でエピミュータジェンの可能性がある三酸化二砒素を HeLa EMhprt1 細胞に処理した。化合物に MGMT プロモーターを活性化する機能があれば図 1 のように、無処理と比較して多数の 6TG 抵抗性コロニーの出現が期待される。

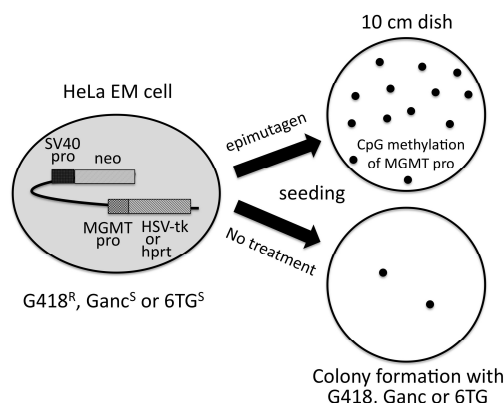


図 1 . MGMT 活性化実験結果の概略

#### 4 . 研究成果

##### (1) プロモーターの脱メチル化による MGMT 遺伝子の活性化

5  $\mu$ M の AzaC および 15  $\mu$ M の Decitabine を処理した場合に、MNU 抵抗性コロニーの出現頻度は最大となった。これらの MNU 抵抗性細胞における MGMT の発現をウエスタンブロッティングおよびリアルタイム PCR で確認した。さらに、MGMT 遺伝子のエクソン 1 の上流 -292 bp ~ -131 bp の領域 (161 bp) のメチル化解析を行った。ゲノム DNA をパイサルファイト処理し、非メチル化シトシンをウラシルに変換した後、対象領域を PCR で増幅し、制限酵素 *Taq*I で処理した。解析領域内部の標的 CpG がメチル化されていると、PCR 産物は *Taq*I で切断され、標的 CpG が脱メチル化されていると PCR 産物は切断されない。HeLa MR 細胞ゲノム DNA では、PCR 産物は *Taq*I により切断され、HeLa S3 細胞では切断されなかった。また、MNU 抵抗性細胞では、PCR 産物の大部分が *Taq*I によって切断されずに残っていた。さらに、HeLa MR 細胞、HeLa S3 細胞、5-AzaC 処理/MNU 抵抗性細胞、Decitabine 処理/MNU 抵抗性細胞において、対象領域内にある 17 箇所の CpG のメチル化状態をシーケンスにより解析したところ、脱メチル化 CpG の割合は順に、10.6%、42.2%、49.6%、16.4%であった。MGMT は化合物による遺伝子プロモーターのメチル化、脱メチル化の活性の検出に適することがわかった。

##### (2) MGMT プロモーターの不活性化 (メチル

化) を検出するためのプラスミドと細胞の作製

MGMT プロモーターの下流に hprt cDNA を連結することによって作製したプラスミド pSV3neo MGMT hprt (図 2) を、X 線による突然変異によって作製した HeLa S3 hprt 細胞に導入すると、G418 含有培地でプラスミド導入細胞のポジティブセレクションができ、6TG 含有培地で導入したプラスミド MGMT プロモーターの不活性化のネガティブセレクションができるはずである。

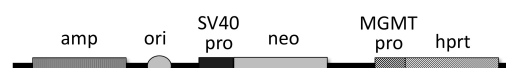


図 2 . プラスミド pSV3neo MGMT hprt

pSV3neo MGMT hprt を HeLa S3 hprt 細胞に導入し G418 含有培地で 10 個のコロニーを選択した。そのうち増殖の良い 1 つを HeLa EMhprt1 細胞と名付けた。

##### (3) 化合物による MGMT プロモーター不活性化の検出

化合物を HeLa EMhprt1 細胞に 24 時間処理し、2 週間培養後、10cm dish あたり  $10^5$  個の細胞を播種して、6TG 抵抗性細胞の出現頻度を調べる。現在、ヒストンアセチル化酵素阻害剤 garcinol 0.1, 1, 10, 100  $\mu$ M 1 時間処理し、30  $\mu$ M 6TG 含む培地で培養している。引き続き、Chaetocin、BIX-01338、S-アデノシルメチオニン、ビスフェノール A、三酸化二砒素の処理を行なう予定である。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Masanobu Kawanishi, Tomonari Matsuda, Takashi Yagi. Genotoxicity of formaldehyde: molecular basis of DNA damage and mutation. *Frontiers in Environmental Science*, 16 September, 2014. doi:10.3389/fenvs.2014.00036.

〔学会発表〕(計 4 件)

福本航大、西田裕、川西優喜、八木孝司、高村岳樹 . CRISPR/Cas9 法による DNA ポリメラーゼ およびヌクレオチド除去修復を欠損する細胞の作製と 3-ニトロベンズアントロン誘発突然変異の解析 . 大阪府第 2 回産学連携ナレッジセミナー、2016 年 2 月 19 日、大阪府堺市、大阪府立大学学術交流会館。

福本航大、川西優喜、八木孝司 . CRISPR/Cas9 法による Y ファミリー DNA ポリメラーゼ欠損細胞の作製 . 変異機構研究

会第 28 回夏の学校、2015 年 7 月 25 日～26 日、愛知県小牧市、小牧労働センター。

谷口美由紀、川西優喜、八木孝司 .MGMT 不活性化細胞を用いた DNA 脱メチル化剤の検出 . 日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月 4 日～5 日、東京都千代田区、一橋大学一橋講堂。(ベストプレゼンテーション・オックスフォードジャーナル賞を受賞)

谷口美由紀、川西優喜、八木孝司 . がん細胞における脱メチル化剤による O6-メチルグアニン修復酵素 (MGMT) の発現回復 . 変異機構研究会第 27 回夏の学校、2014 年 6 月 21 日～22 日、愛知県小牧市、小牧労働センター。

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

八木 孝司 (YAGI Takashi)  
大阪府立大学 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 理学系研究科・准教授  
研究者番号 : 70332963