

## 群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和3年4月30日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 群馬大学 大学院理工学府  
職 名 分子科学部門  
研究代表者 黒沢 綾

下記のとおり令和2年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:20016)

1. 共同研究課題名	植物由来抗酸化物質によるゲノム安定性維持機構への影響の解析		
2. 共同研究目的	野菜や果実に含まれる抗酸化物質は、抗酸化作用のほかに抗腫瘍活性などの生理活性をもつ。申請者は、ケルセチンとケンフェロール、ゲニステインは構造が類似しているにも関わらず、ケルセチンは DNA 二本鎖切断、ケンフェロールとゲニステインは DNA 一本鎖切断の誘発もしくは蓄積に関わる可能性を示唆するデータを得た。本研究課題では、植物由来抗酸化物質によるゲノム不安定性を介した細胞毒性機構を明らかにし、これら食品由来抗酸化物質の健康増進における効果や作用を適切に活用することを目指す。		
3. 共同研究期間	令和 2 年 4 月 1 日 ~ 令和 3 年 3 月 31 日		
4. 共同研究組織			
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者) 黒沢 綾	群馬大学 大学院理工学府 分子科学部門	助教	研究の総括ならびに実験
(分担研究者)			
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	遺伝子情報分野 生体膜機能分野	氏 名 山下 孝之 関本 隆志

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

#### 6. 共同研究計画

本年度は植物由来抗酸化物質(ケルセチンとケンフェロール、ゲニステイン)による DNA トポイソメラーゼならびに DNA 修復因子への影響の解析を行う。まず、DNA トポイソメラーゼや DNA 修復因子への阻害能を明らかにするため、RNA 干渉によりこれらの因子の発現抑制をした細胞における抗酸化物質感受性を調べる。ついで、DNA 損傷の有無や DNA 修復因子の応答を免疫染色等により調べる。その後、市販のキットによる *in vitro* 酵素アッセイや細胞抽出液を用いた DNA 連結反応を行う。最後に、実験から得られた知見をもとに、山下教授の作製されたモデル細胞を用いて、これらの抗酸化物質がゲノム不安定性を引き起こす分子機構を詳細に解析する。

#### 7. 共同研究の成果

本年度はケルセチンによる DNA 二本鎖切断誘発機構の解明に焦点を絞り取り組んだ。まず、ケルセチンにより DNA 二本鎖切断が生じているかを確認するため、①抗 $\gamma$ H2AX 抗体による免疫染色と②外来遺伝子挿入頻度の解析を行った。まず、免疫染色による解析(①)では、無処理細胞では抗 $\gamma$ H2AX 抗体による染色がほとんど観察されなかったのに対し、ケルセチンで処理をすると、ほぼすべての細胞が抗 $\gamma$ H2AX 抗体により核全体が染色されていた。 $\gamma$ H2AX は DNA 二本鎖切断の指標であることから、ケルセチンによって DNA 二本鎖切断が誘発されていることが確認できた。

次に、外来遺伝子挿入頻度の解析を行った。研究代表者は以前に、外来遺伝子挿入頻度は核内の DNA 二本鎖切断数と相関性があることを報告しており(Toyoda and Kurosawa et al. BBRC 2020, Kamekawa and Kurosawa et al. Gene Technol 2013)、ケルセチン処理によって外来遺伝子挿入頻度が上昇するかを調べた(②)。ピューロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドを直鎖化し、エレクトロポレーションにより HeLa 細胞に導入後、ケルセチンもしくは DNA トポイソメラーゼ II 阻害剤エトポシド(コントロール)を含む培地で培養した。その後、ピューロマイシンを含む培地で培養を続け、生じたコロニーから挿入頻度を求めた。エトポシドで処理した HeLa 細胞では挿入頻度が無処理細胞よりも数倍上昇したのに対し、ケルセチンで処理した HeLa 細胞では有意な差は認められなかった。①のデータから DNA 二本鎖切断が生じていることは確認しているため、ケルセチンによって生じる DNA 二本鎖切断では、外来遺伝子挿入が生じにくい、細胞の生存に不利益となることが示唆される。また、ケルセチンには DNA トポイソメラーゼ II 阻害作用があるとの報告があったが(Sudan and Rupasinghe, Anticancer Res 2014)、本研究の解析からケルセチンには DNA トポイソメラーゼ II 阻害作用がない可能性が示唆された。今後、どのような機構でケルセチンにより DNA 二本鎖切断が生じているかを検討する。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

① 本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文  
なし

② この共同研究に基づくとの記載のある論文  
なし

③ 学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)  
第 74 回 日本酸化ストレス学会 第 21 回 日本 NO 学会 合同学術集会、2021 年 5 月 19, 20 日  
「抗酸化物質ケルセチンの放射線増感作用の分子機構の解析」

④ 本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)  
研究の進捗を報告