

様式3

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 4年 4月28日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 国立大学法人群馬大学
職 名 助教
研究代表者 黒沢 綾

下記のとおり令和3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、いくつかの植物由来抗酸化物質が DNA 損傷誘発能をもつことを示唆するデータを得ている。本研究課題では、ゲノム編集を用いた研究で高名である生体調節研究所畑田教授との共同研究のもと、ヒト遺伝子変異株を作製し、植物由来抗酸化物質の細胞内標的の同定を行う。これにより、ゲノム不安定性を介した細胞毒性機構を明らかにし、これら抗酸化物質の健康増進やがん治療における有効活用を目指す。			
3. 共同研究期間	令和3年 4月 1日 ~ 令和4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	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	ゲノム科学リソース	氏 名	畑田出穂教授

※ 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。

(課題番号:)

6. 共同研究計画

令和2年度に引き続き、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損傷誘発機構の解明に取り組む。申請者の得たデータと一致してケルセチンはDNAトポイソメラーゼII阻害効果の報告があることから(Sudan et al. 2014)、DNAトポイソメラーゼを中心に標的因子の同定を試みる。ゲノム編集によりヒトHT1080細胞を用いてDNAトポイソメラーゼ変異株(DNAトポイソメラーゼI変異株ならびにDNAトポイソメラーゼII α 変異株、DNAトポイソメラーゼII β 破壊株)を作製し、これらの細胞の抗酸化物質への感受性を調べる。DNAトポイソメラーゼIIが標的であることが明らかとなった場合、 α アイソフォームは抗がん剤の有力な標的となることから、 α と β からなるアイソフォームのいずれに作用するかを明らかにする。あわせて、*in vitro*トポイソメラーゼアッセイや細胞抽出液を用いたDNA連結反応、細胞周期解析を行う。抗酸化物質の標的がDNAトポイソメラーゼ以外である可能性が得られた場合、DNA鎖切断やその修復に関わる因子をコードする遺伝子を破壊した細胞株を作製し、解析を行う。

7. 共同研究の成果

令和3年度は、①HT1080細胞におけるgH2AXの検出と②外来遺伝子挿入頻度の再検討の準備、③ヒト遺伝子破壊株を用いたケルセチン感受性を実施した。詳細を以下に示す。

①HT1080細胞におけるgH2AXの検出

HT1080細胞を用いてゲノム編集による遺伝子破壊株の作製するため、ゲノム編集に先立ち、ケルセチン処理したHT1080細胞においてDNA二本鎖切断の指標である γ H2AXが濃度依存的に観察されることを確認した。

② 外来遺伝子挿入頻度の再検討の準備

令和2年度に、ケルセチンによる外来遺伝子挿入頻度の促進を解析したところ、DNAトポイソメラーゼII阻害剤エトポシドでHeLa細胞を処理した時と異なり、ケルセチンで処理しても外来遺伝子挿入頻度は上昇しなかった。この実験に用いた外来遺伝子(pNHEJ-RPG)は特殊な構造をもつことから、新たにpCMV-Puroを作製した。現在、HT1080細胞における挿入頻度を解析するため、エレクトロポレーション法による遺伝子導入条件を検討中である。

③ ヒト遺伝子破壊株を用いたケルセチン感受性の解析

ヒトNalm-6細胞より作製したDNA二本鎖切断修復欠損細胞(横浜市大 足立教授より分与)のケルセチンとエトポシド感受性を比較した。ケルセチンによって生じたDNA二本鎖切断の修復には、エトポシド同様に非相同末端連結が重要であることがわかった。しかし、相同組換えや代替末端連結の重要度は、ケルセチン処理とエトポシド処理とで異なることがわかった。本結果も、令和2年度に得られた解析結果同様に、ケルセチンがDNAトポイソメラーゼII非依存的にDNA二本鎖切断を誘発する可能性を示唆するものである。

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)

1. 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 (Web)、2021年5月、
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
2. 日本食品工学会第22回(2021年度)年次大会 (web)、2021年9月、
DNA損傷に着目したケルセチンによる抗腫瘍作用のメカニズムの解析

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