

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 5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4年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:)

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抗腫瘍活性として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ご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 4年 4月 1日 ~ 令和 5年 3月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属等	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	研究の実施ならびに総括	
(分担研究者) 染谷 柚月	大学院理工学府	大学院生	遺伝子破壊株の作製	
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、枠を自由に変更できます(横幅は変更不可)。6, 7, 8の項目全体では2頁に収めてください。

6. 共同研究計画

令和3年度の研究計画では、ケルセチンに関してはDNAトポイソメラーゼIIを中心に標的因子の同定を試みる予定であったが、解析をすすめる過程で、ケルセチンには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作用も有する可能性を示すデータを得た。そこで今年度は、ケルセチンによるDNAトポイソメラーゼII依存的(①)、ならびに非依存的(②)なDNA二本鎖切断誘発の分子機構の解明と、①と②の相関性や割合を明らかにする。このため、HT1080より遺伝子破壊株(DNA修復に関わる遺伝子やDNAトポイソメラーゼIIをコードする遺伝子を破壊)を作製し、DNA二本鎖切断の指標である γ H2AXの免疫染色を行い、処理濃度や損傷の局所性、細胞周期との関係を明らかにする。ケンフェロールとゲニステインについては、(a) DNAトポイソメラーゼI阻害、(b) DNA一本鎖切断修復阻害、(c) 抗酸化酵素阻害の効果を解析し、標的因子の同定とDNA損傷誘発の作用機序を明らかにする。(a)と(c)に関しては、遺伝子破壊株を用いた遺伝学的解析を実施する。(b)に関しては、市販されているケンフェロールとゲニステインの細胞内代謝物を用いて *in vitro* アッセイにより評価する。

7. 共同研究の成果

【ケルセチンの細胞毒性機構の解明】

ケルセチン誘発DNA二本鎖切断(double-strand break: DSB)が切断末端を2つ有するtwo-ended DSBか、一本鎖切断に複製フォークが衝突することで生じるone-ended DSB(切断末端が1つ)かを明らかにするため、two-ended DSB数に相関性をもつ外来遺伝子挿入頻度へのケルセチンの影響を調べた。その結果、ケルセチン濃度依存的に外来挿入頻度が上昇したことから、ケルセチン誘発DSBはtwo-ended DSBであることがわかった。現在、*in vitro*におけるDNAトポイソメラーゼIIアッセイによりケルセチンによる阻害効果を解析中である。

【ケンフェロールとゲニステインの細胞毒性機構の解明】

いずれの抗酸化物質についても、Nalm-6より作製した遺伝子破壊株ではtwo-ended DSB誘発、DNA-PK(非同末端連結因子)阻害剤NU7026で処理したHeLaではone-ended DSB誘発を示唆するデータを得た。現在、これらの違いがどのようなメカニズムにより生じているのかを検証中である。

8. 共同研究成果に関連する学会発表・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できる限り記載してください。なお、論文の場合は、PDFファイルを以下の研究所庶務係のメールアドレスまで報告書と併せてお送りください。) 研究所庶務係 e-mail : kk-msomu4@jimu.gunma-u.ac.jp

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. 染谷 柚月, 小林 咲音, 斎藤 慎太, 武田 茂樹, 足立 典隆, **黒沢 綾**

食品由来フラボノイドケルセチンのDNA二本鎖切断誘発作用の解析

日本環境変異原ゲノム学会第51回大会(広島)2022年11月,ポスター

2. 小林 咲音, 染谷 柚月, 西場 晟也, 鳥海 一也, 武田 茂樹, **黒沢 綾**

スルフォラファンの細胞毒性機構の解析

日本環境変異原ゲノム学会第51回大会(広島)2022年11月,ポスター

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)

ゲノム編集に関するお伺いをメールにて行った。