

## エピジェネティクス異常抑制効果を示す卵由来成分の 探索と応用基盤的研究

三重大学大学院生物資源学研究科生物圏生命科学専攻・教授 奥村 克純

### ■ 緒言

DNA の塩基配列の変化を伴わずに、遺伝子の発現を調節する仕組みをエピジェネティクスと言い、DNA のメチル化やヒストンの修飾といったクロマチンの修飾による遺伝子の発現調節がその本体である<sup>1)</sup>。近年、栄養および食事が、環境要因としてエピジェネティクスに影響することが大きな注目を集めている。すなわち、栄養不足やエネルギー代謝の変動がエピジェネティクス異常を導き、がんや老化、メタボリックシンドローム、糖尿病、心疾患等を導くというもので、ナチスドイツの食料遮断による「オランダ飢餓」(胎児期の低栄養が、子供の成人後の成人病の発症リスクを高めた例)や、高ホモシステイン血症(低メチオニン状態)が葉酸摂取で回復する例など、病気とエピジェネティクスに関する報告が続々と挙げられつつある<sup>2,3)</sup>。著者らは、DNA の低メチル化がDNA 損傷を導くことを発見し(投稿中)、その分子機構モデルを提示する一方、「栄養因子のアンバランス→ゲノム上の局所的DNA 低メチル化→DNA 損傷→染色体不安定化→細胞・個体レベルの異常・疾患」という「食とエピジェネティクスと疾患」研究領域の拠点化を目指し研究に取り組んでいる。

一方、鶏卵は栄養学的に極めて優良な食品であり、世界の食卓において重要な役割を果たしてきた。卵にはこれまで有用性が示されてきた代表的な成分以外にも多種多様な成分が含まれており、それらが未知の機能を有する可能性が期待されるが、食品の機能性表示ルールの変更に伴い、機能性を示す成分を特定することが必須となっている。また、上述のエピジェネティクスと食品の関係については、研究の端緒についたに過ぎず、卵および卵に含まれる成分の役割を機能性として示すことは、卵の価値の再発見につながることを期待される。

本研究では、エピジェネティクスと食品の関連性を示す研究として、鶏卵に含まれる代表的な成分である葉酸やメチオニンが、上述のDNA 低メチル化に伴うDNA 損傷などの異常誘導の鍵となる重要な役割を果たしていることを示し、さらにDNA 損傷などの異常を抑制する効果を、鶏卵に含まれる多種多様な成分について探索するための基盤研究を開始した。これによって、将来的に個体レベルの研究としてモデル生物のゼブラフィッシュを用いた鶏卵成分の疾患予防効果を検証するための系などを確立し、これら細胞および個体レベルの研究を通して、卵の健康増進に資する有用性を提示し、産業応用の基盤としたい。

### ■ 方法

#### ・細胞培養

ヒト子宮頸がん由来のHeLa細胞を、特注の葉酸およびメチオニンを含まないDMEM(FA-)培地を用いて培養した。葉酸はDMSOで溶解し、10mMのストックを作成し必要量添加した。

#### ・免疫蛍光染色法

カバーガラスに付着させた細胞を洗浄後、Cytoskeleton (CSK) bufferで洗浄し、0.1% Triton X-100 in CSK bufferを氷上で5分間処理した。洗浄後、4% paraformaldehydeで処理し、細胞を固定した。ブロッキング処理後、1次抗体のmouse anti- $\gamma$ -H2AX IgG (Millipore)、2次抗体のAlexa Flour 488 goat anti-mouse IgGを反応させた。サンプルのイメージングは、CCDカメラ(ORCA R<sup>2</sup>, Hamamatsu Photonics, Inc.)を搭載した正立蛍光顕微鏡(ZEISS Axioplan 2)を用い、MetaMorph version 7.7 software (Universal Imaging Corporation)を用いて行った。撮影したイメージを用いて、DAPIで染色した核を1サンプルあたり100個以上囲んだ後、その領域内における $\gamma$ -H2AXの蛍光強度をMetaMorph softwareを用いて、定量的に解析した。

#### ・複製フォークの解析

DNA複製標識は、著者らの文献4に従った<sup>4)</sup>。概略を以下に示す。細胞培養系に100 $\mu$ M IdUで20分間、続いて100 $\mu$ M CldUで20分間複製標識した。細胞を回収し、アガロースブロックに封入、さらにタンパク分解、 $\beta$ -agarase処理によってDNA溶液を調製し、アミノプロピルシランコートカバー

ガラス(MATSUNAMI)を3~10分浸漬し、カバーガラスにDNAを貼り付けた。複製フォークの可視化は蛍光検出し、イメージングは免疫蛍光染色と同様のシステムで行った。複製フォークの速度は、1サンプルあたり100~200本の複製フォークの距離をMetaMorph softwareを用いて測定し、複製鎖標識した時間を元に算出した。

#### ・DNAメチル化解析

通常のDMEMで培養していたHeLa細胞を通常のDMEM、葉酸欠乏DMEMに懸濁し播種した。2、4日目に継代培養を行い、6日目にゲノムDNAを回収し、ゲノムDNAの抽出をおこなった。バイサルファイト変換はMethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulfite Modification Kit (Human Genetic Signatures)を用いて添付のプロトコールに従って行った。シークエンス解析は、BigDye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit (applied biosystems)を用いて、精製したプラスミドをテンプレートにして行った。三重大学遺伝子実験施設に解析を依頼したシークエンス解析結果をもとにして、Human LINE-1 promoterのCpGサイトにおけるメチル化状態を解析した。配列の解析はQUMA(理化学研究所)を用いて行った。

### ■ 結果

DNAのメチル化は、様々な遺伝子の発現の制御を行うエピジェネティック修飾の一つとして知られている。その制御はDNMT1, DNMT3a, DNMT3bの3種類のDNAメチル化酵素によって行われ、メチル化の基質にはS-アデノシルメチオニン(SAM)が用いられる。一方、葉酸(folic acid, folate)は生体内でメチル基、メチレン基などの一炭素単位基ドナーとして働き、様々な生化学反応において補因子として作用する。葉酸はメチル化反応の基質であるSAMの合成に関与する物質である。また、SAMはメチオニアデノシルトランスフェラーゼ(MAT)を触媒としてL-メチオニン(Met)とATPから合成される物質であるので、メチオニンも同様にSAM合成において重要な役割を果たすと考えられる(Fig. 1)。著者らは、5-aza-2'-deoxycytidine(5-aza-dC)処理やsiRNAを用いたノックダウンによるDNMT1阻害によってDNA損傷が引き起こされることを見出し、そのDNA損傷がDNA低メチル化に伴って誘導されるというメカニズムを提唱している(投稿中)。本研究では、鶏卵由来成分のエピジェネティクス異常抑制効果を明らかにするために、まずは鶏卵に豊富に含まれる葉酸の欠乏により、細胞内のメチル化基質SAMが減少することによって、複製に伴う受動的脱メチル化を引き起こし、DNAメチル化を低下させ、DNMT1阻害剤5-aza-dC処理やsiRNAによるノックダウンと同様に、DNA損傷やDNA複製フォーク速度の遅延を引き起こすことを示すことで、鶏卵由来成分の有効性を示すことを目的とした。

#### ・葉酸欠乏培養に伴うDNA損傷の誘導

葉酸欠乏条件でDNA損傷マーカーである $\gamma$ -H2AXの免疫蛍光染色を用いてDNA損傷の核内蓄積が起こるかどうかを判定した。H2AXはヒストンの一種であり、DNA2本鎖切断が生じた場合の細胞応答の1つに、H2AXの139番セリン部位のリン酸化があり、これを $\gamma$ -H2AX(リン酸化H2AX)と呼ぶ<sup>5)</sup>。よって、 $\gamma$ -H2AXに対する1次抗体、そして蛍光標識された2次抗体を用いることで、DNA2本鎖切断が起こった核内での位置を視覚的に検出することが可能となる。結果として、葉酸欠乏6日間の培養でDNA損傷の蓄積が生じることが明らかとなった(Fig. 2AB)。

#### ・葉酸欠乏培養に伴うDNA複製フォーク進行の遅延

6日間の葉酸の欠乏によりDNA損傷が生じることが示唆されたので、そのタイミングで複製フォークの遅延が発生しているのではないかと考え、分子コーミング法を用いた複製フォーク進行速度解析を行った。分子コーミング法とは、DNAが拡散した溶液中に疎水的な化学修飾(アミノプロピルシラン:APS, 7-オクテニルシラン:OTS)でコーティングしたカバーガラスを一定時間浸漬して、DNAの末端をカバーガラスに付着させる。そして機械的に一定の速度(300 $\mu$ m/sec)で溶液中から引き上げることで表面張力の作用と引き上げられる力が働き、カバーガラスの表面にDNAを1分子ずつ直線状に貼り付ける方法である(Fig. 3)。この方法ではDNAの伸展率は一定であり、またDNA同士が重なる可能性を低減でき、同様に複製フォーク解析によく用いられるDNAファイバー法と比較して、より正確な複製フォーク進行速度解析が可能となる<sup>6)</sup>。結果として、葉酸欠乏6日間の培養で複製フォーク速度の低下が見られた(Fig. 4)。

#### ・葉酸欠乏培養に伴う DNA 低メチル化の証拠

葉酸欠乏により生じる DNA 損傷、複製フォークの遅延が DNA メチル化の低下により引き起こされていることを確認するために、Bisulfite sequence 法により、葉酸欠乏条件で 6 日間培養した HeLa 細胞を用いて、Human LINE-1 の promoter 配列の DNA メチル化の度合いを解析した。その結果、葉酸欠乏培地培養細胞において、DNA メチル化の低下が示された (Fig. 4)。これらの結果から、SAM 合成に関与する栄養素(葉酸)の不足により DNA メチル化が低下することで、DNA 損傷や複製フォーク進行の遅延が引き起こされることが明らかとなった。

#### ■ 考 察

本研究では、鶏卵に豊富に含まれる葉酸の欠乏によって、エピジェネティック修飾の異常、すなわち、DNA の低メチル化が起これ、これによって DNA 損傷が誘導されることを、免疫蛍光染色法、分子コーミング法による DNA 複製フォークの解析、さらに Bisulfite sequencing 法によるメチル化解析によって明らかにした。これは、栄養因子の欠乏によって DNA 損傷が誘導されることを示した初めての発見である。この成果は、「栄養因子のアンバランス→ゲノム上の局所的 DNA 低メチル化→DNA 損傷→染色体不安定化→細胞・個体レベルの異常・疾患」という「食とエピジェネティクスと疾患」という新たな研究領域の重要性を指摘するとともに、鶏卵やその由来成分が、エピジェネティクス異常を抑制できることを示唆するものである。鶏卵は、葉酸だけでなく、DNA メチル化基質の SAM の合成に必要なメチオニンも豊富に含んでおり、葉酸に加えてメチオニン濃度の低下で、さらに短期間で DNA 損傷が起こることを見出している(未発表データ)。また、鶏卵には機能未知の多種多様なタンパク質等が含まれており、それらの中にもエピジェネティクス異常を抑制する因子が存在する可能性があり、現在検討中の個体レベルの系であるゼブラフィッシュを用いた評価系の開発を含めて検討を続けていく。

#### ■ 要 約

DNA の塩基配列の変化を伴わずに、DNA のメチル化などのクロマチンの修飾による遺伝子の発現を調節する仕組みをエピジェネティクスと言ひ、近年、栄養および食事が、環境要因としてエピジェネティクスに影響することが大きな注目を集めている。著者らは、DNA 低メチル化が DNA 損傷を誘導することを見出しており、本研究では、鶏卵に豊富に含まれる葉酸等の栄養因子の欠乏によって、DNA 損傷などが起こるかをまず検討した。その結果、葉酸の欠乏 6 日間の培養で細胞核内に DNA 損傷の蓄積が起こること、DNA 複製フォークの進行速度が遅延すること、DNA のメチル化レベルが低下していることなどを明らかにした。これらの結果は、「栄養因子のアンバランス→ゲノム上の局所的 DNA 低メチル化→DNA 損傷→染色体不安定化→細胞・個体レベルの異常・疾患」という「食とエピジェネティクスと疾患」という新たな研究領域の重要性を指摘するとともに、鶏卵やその由来成分が、エピジェネティクス異常を抑制できる可能性を示唆するものである。

#### ■ 文 献

- 1) Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*. 7143: 425-32(2007)
- 2) Inagaki T, Tachibana M, Magoori K, Kudo H, Tanaka T, Okamura M, Naito M. Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase JHDM2a-deficient mice. *Genes Cells*. 14(8):991-1001 (2009)
- 3) Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D, Wahl S, Meduri E, Morange PE, Gagnon F, Grallert H, et al. DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *Lancet*. 383:1990-98 (2014)
- 4) Sugimura K, Takebayashi S, Takeda S, Taguchi H, Okumura K. PARP-1 ensures regulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged DNA. *J Cell Biol*. 183:1203-1212 (2008)
- 5) Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*. 146:905-916 (1999)
- 6) Bensimon A, Simon A, Chiffaudel A, Croquette V, Heslot F, Bensimon D. Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science*. 265:2096-2098 (1994)

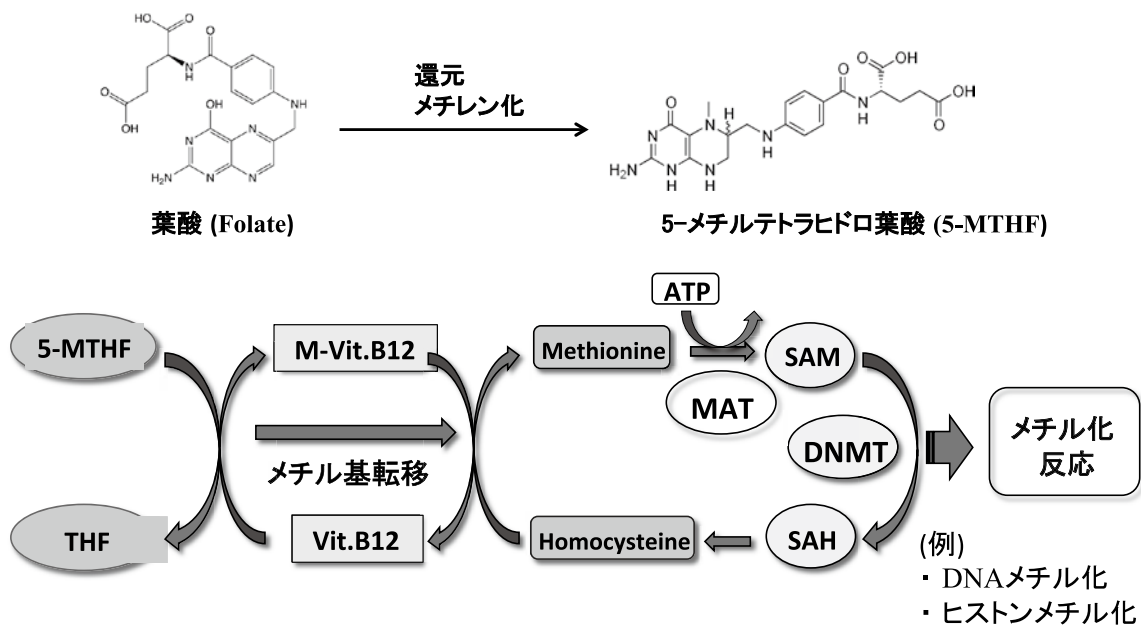


Fig. 1 葉酸の代謝経路図とメチル化反応の関係

食物から栄養として取り込まれた葉酸は生体内で還元やメチレン化を受けた後、ビタミン B<sub>12</sub> を介してホモシステインに対しメチル基転移を行い、メチオニンを合成する。その後、MAT を触媒としてメチオニンと ATP が反応することで、SAM が合成される。SAM は DNMT を触媒とした DNA メチル化などの様々なメチル化反応の基質となる。SAM: S-アデノシル-L-メチオニン、SAH: S-アデノシル-L-ホモシステイン、MAT: メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ、DNMT: DNA メチルトランスフェラーゼ、THF: テトラヒドロ葉酸

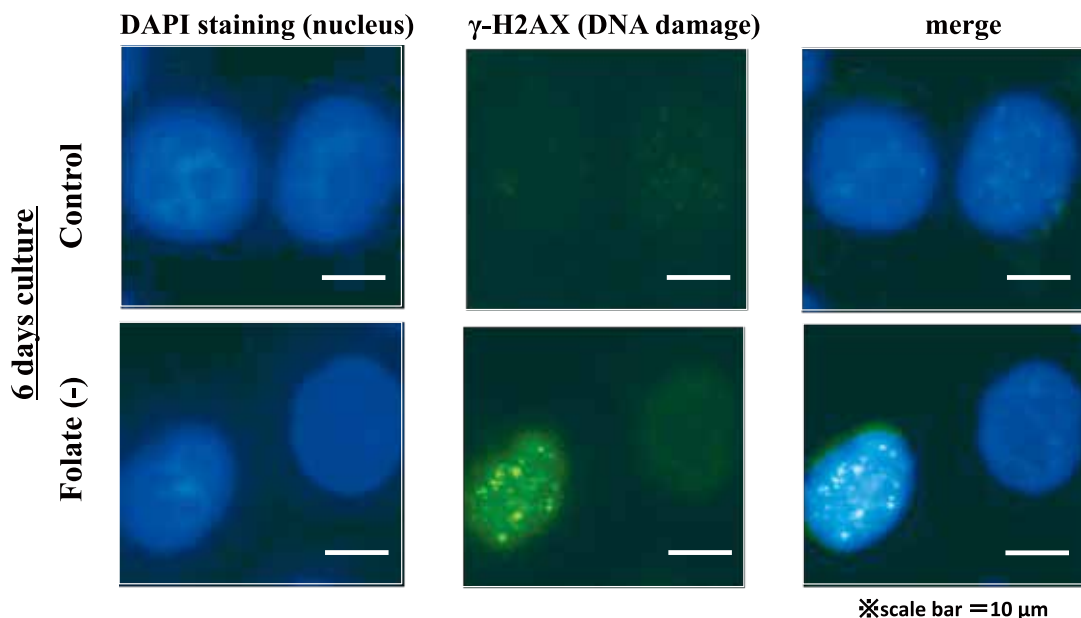


Fig. 2A 葉酸欠乏培地 6 日間培養における DNA 損傷蓄積 (免疫蛍光染色代表写真)

葉酸欠乏培地による 6 日間の培養後、DNA 損傷マーカーである  $\gamma$ -H2AX の免疫蛍光染色を行った。その代表的な写真を示した。左から順に DAPI(青)は核、 $\gamma$ -H2AX(緑)は DNA 損傷、左は核と DNA 損傷部位の重ね合わせを示す。スケールバーは 10 $\mu$ m を表す。

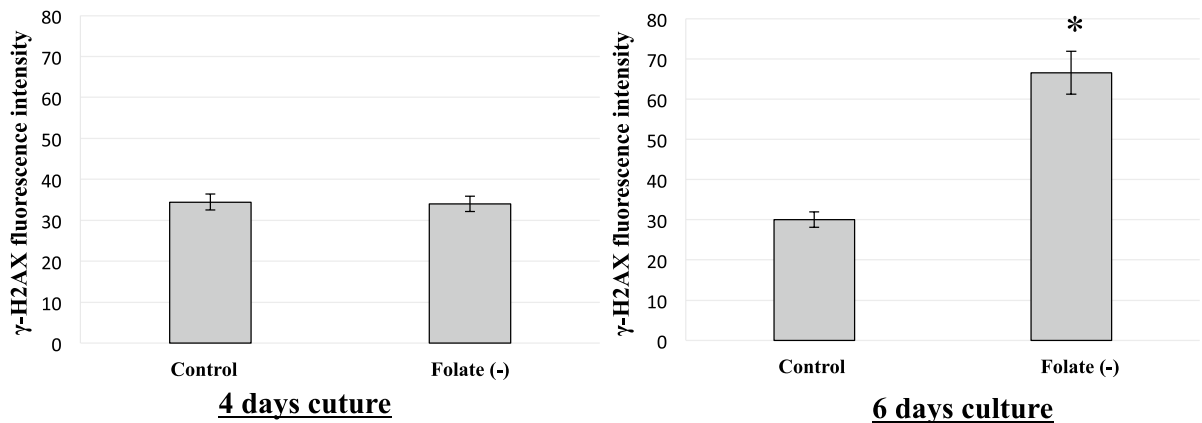


Fig. 2B 4, 6日間の葉酸欠乏培養細胞における DNA 損傷レベルの比較  
 HeLa 細胞を通常培地, 葉酸欠乏培地で 4, 6 日間培養した後, DNA 損傷マーカーである  $\gamma$ -H2AX の免疫蛍光染色を行った。核内のそれぞれの  $\gamma$ -H2AX の蛍光強度を定量解析し, グラフ化した。縦軸には  $\gamma$ -H2AX の平均蛍光強度を示した。Error bar は標準誤差を表す。有意差検定は Excel による t 検定を用いた。\* $P < 0.05$

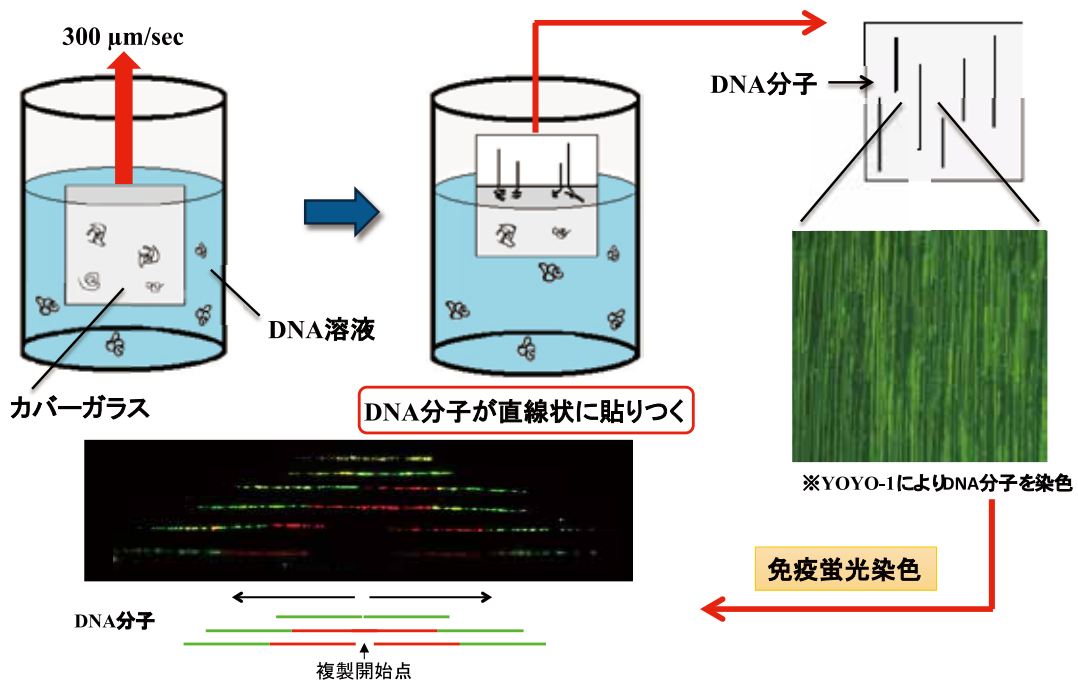


Fig. 3 分子コーミング法の模式図  
 細胞から DNA を抽出し MES buffer に溶解させ DNA 溶液を調整した後, APS コートしたカバーガラスを一定時間浸漬させ DNA の末端をカバーガラスに付着させる。機械的に一定の速度 (300 $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) で溶液中から引き上げることで表面張力の作用と引き上げられる力によって, カバーガラスの表面に DNA を一分子ずつ直線状に貼り付ける方法である。貼りつけた DNA は DNA 分子にインターカレートする蛍光物質 YOYO-1 によって可視化することができる。さらに, 免疫蛍光染色法と組み合わせることで, DNA 複製フォークを可視化することができる。

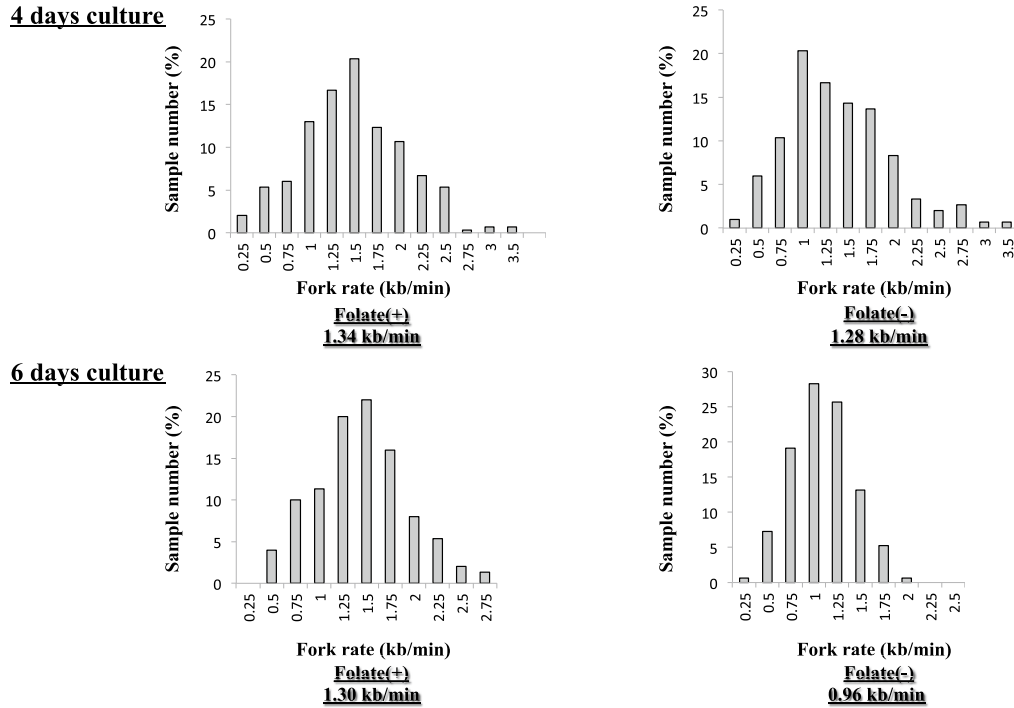


Fig. 4 葉酸欠乏 4, 6 日間培養細胞を用いた複製フォーク速度解析結果  
 通常の培地と葉酸欠乏培地を用いて 4, 6 日間培養した細胞の複製フォーク速度を分子コーミングを用いた手法により解析を行った。グラフの縦軸はサンプル数(%)を示し、横軸には複製フォーク速度(kb/min)を示した。グラフ下にそれぞれの複製速度の平均値を示した。複製フォークは 150 本以上解析を行った。

### Human LINE-1 promoter methylation level

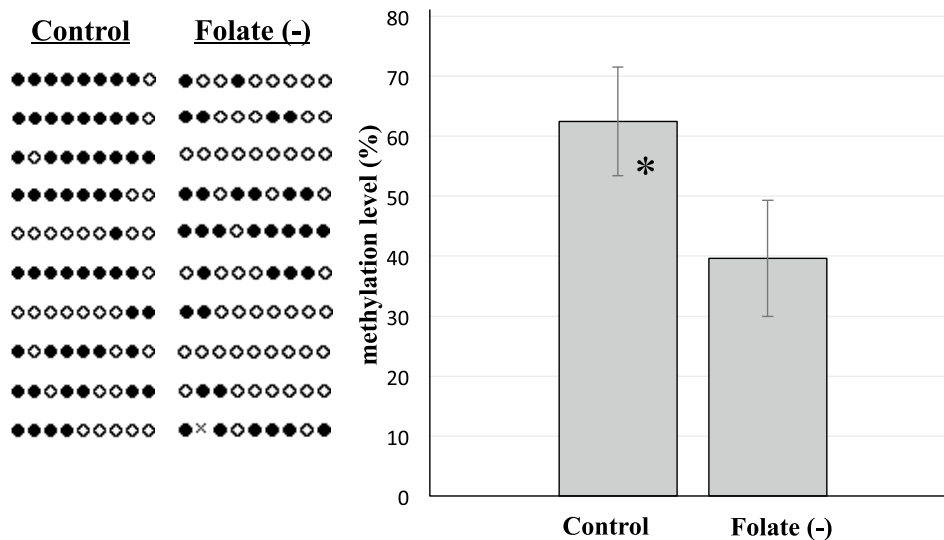


Fig. 5 Bisulfite-sequence 法による DNA メチル化レベル解析  
 HeLa 細胞を通常培地, Folate (-), 低 Met (80μM), Folate (-)かつ低 Met で 6 日間培養した後、Bisulfite sequence 法により Human LINE-1 promoter のメチル化レベルを解析した。図は各 CpG のメチル化状態について次のように示した。○: non-CpG, ●: me-CpG, ×: 変異。縦方向はサンプル数, 横方向は CpG の数を表す。グラフは、LINE-1 内の対象配列中に存在する全 CpG 中の me-CpG の割合の平均値を示した (N=10)。  
 Error bar は標準誤差を表す。有意差検定は Excel による t 検定を用いた。\*P<0.05