

ゲノムレベルにおける酸化ストレス病態解析法の開発とその応用

●豊國 伸哉

京都大学大学院医学研究科基礎病態学講座病態生物医学専攻

〈研究の目的と進め方〉

悪性新生物・動脈硬化症・糖尿病・膠原病などの多因子疾患の発症やその病態において、酸化ストレスが主要因のひとつであることが明らかになってきた。酸化ストレスの原因である活性酸素・フリーラジカルは、あらゆる生体分子を標的として修飾・切断・重合反応などを行うが、とりわけゲノムDNAは遺伝情報という点で重要な標的である。私たちは、これまでの実験データより、各種細胞のゲノムにおいて、「酸化ストレスに対して脆弱な部位が存在する」ことを主張してきた。更に、膠原病においては、抗DNA抗体の出現など、その発症メカニズムに直接関係している可能性もある。本研究の1年間に、酸化ストレスに特異的な分子修飾や細胞内シグナル伝達を探索すると同時に、酸化修飾を受けたDNA塩基に対するモノクローナル抗体を使用した新しいアプローチを開発することにより、個体各臓器の細胞のゲノムの中で酸化ストレスに対して弱い部位を網羅的に同定し、その意義を明らかにする。

〈研究開始時の研究計画〉

1) 酸化ストレス発がん過程で特異的に活性化されるシグナル経路を探索する。これまでの研究よりannexin2に注目した。2) 酸化ストレス反応に伴う脂質過酸化反応産物4-hydroxy-2-nonenalがどのタンパク質を修飾しやすいかを検討する。3) 修飾塩基に対する抗体を使用して、その修飾塩基を含むDNA断片をクローニングするという技術の開発に取り組む。このような技術は現在、確立されていないため、諸条件を詳細に検討する必要がある。また長い配列になった場合、セファロースや磁気ビーズとDNAの非特異的結合が問題になることが予想される。これに対しては、dNTPなどによるブロックあるいは種々の界面活性剤を使用して特異性を高めるといことで、免疫沈降の最適条件を決定したいと考えている。4) フリーラジカル反応による修飾塩基を検出するのであるから、DNA抽出などの行程で新たに8-OHdGを生成しないように細心の注意を払う必要がある。抽出法にヨウ化ナトリウム法を使用する、すべての緩衝液をアルゴンガスで置換する、鉄のすべての配位子ブロックするキレート剤であるデスフェラルを添加するなど、私たちはDNA抽出の技術をこれまでに確立している。5) このように細心の注意をしながら得たゲノムDNAに短時間の制限酵素処理を行い、1 kilobase 程度の長さで切断する。その後、免疫沈降の処理を行い、反応したDNAフラグメントを回収する。プラスミドベクターにクローニングした後、塩基配列を決定し、Celera社等のデータベースと照らし合わせて、対応するゲノム内部情報、遺伝子との関連情報を得る。6) このような実験に際して、マウスあるいはラットのモデルを使用する。これまでの研究で、鉄ニトリロ三酢酸投与腎発がんモデルに関しては、私たちは膨大なデータの蓄積を有する。まず、最初にこのモデルの腎臓より解析を始める。フラグメントのクローニングはひとつの条件について300クローン以上でのレベルで行う。遺伝子部位に関してはcDNAマイクロアレイとの併用を考える。また、同時に発現解析を行い、8-OHdGの

生成する部位と発現との関係を解析する。7) この解析が軌道に乗れば、徐々にモデルを増やし、Goto-Kakizaki糖尿病モデルにおける膵、高コレステロール血症モデルにおける血管などに応用を図る。

〈研究期間の成果〉

1) 酸化ストレス発がんモデルでannexin 2遺伝子が重要な役割を果たしていることを見出した。この遺伝子は、発がんの過程でゲノム情報の変化は起こらないが、発現が増加する。発現はレドックス制御を受けており、原発巣の発現量は転移の有無と正の相関を示した。酸化ストレス発がんにおいてannexin2が重要な役割を果たしていることが判明した(0409152053)。2) ラット腎臓において、酸化傷害を受けやすい蛋白を網羅的に調べたところ、アクチンが主なもののひとつであった。アルブミン、メタロチネイン、GAPDH、SODに比較して、アクチンはin vitroでも酸化を受けやすいことが判明した。また、アクチン蛋白は細胞内でフリーラジカル反応の緩衝剤として作用している可能性がある。3) ~6) を実施した。モノクローナル抗体を使用して、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)またはacrolein-2'-deoxyadenosine(acrolein-dA)を含むDNA断片のみを免疫沈降により回収し、ライブラリーとする技術を確認した。この技術を使用して、鉄発がんモデルの初期腎臓の皮質に関して検討したところ、修飾塩基を含む断片の染色体位置に関して片寄りがあることが判明した。また、遺伝子部位は相対的に少ない傾向が認められた。フリーラジカル反応によるゲノムの傷害はランダムではない。

〈国内外での成果の位置づけ〉

いずれも発表後、抗体や方法の問い合わせがあるなど興味を持って受け入れられている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

7) は時間・費用的な制約で実施できなかった。

〈今後の課題〉

本成果を新しい酸化ストレスバイオマーカーの開発に生かすことを試みつつある。また、得られた結果は傷害を受けやすいゲノム部位は細胞間期における染色体領域と関連することが示唆されるため、現在、培養細胞を使用してさらに詳細な解析を行っている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) Tanaka T et al. Redox regulation of annexin 2 and its implications for oxidative stress-induced renal carcinogenesis and metastasis. *Oncogene* 23: 3980-89, 2004 (0409152053). 2) Ozeki M et al. Susceptibility of actin to modification by 4-hydroxy-2-nonenal. *J Chromatogr B* 827: 119-26, 2005 (0502152023) 3) Akatsuka S et al. Contrasting genome-wide distribution of 8-hydroxyguanine and acrolein-modified adenine during oxidative stress-induced renal carcinogenesis. *Am J Pathol* (in press). 4) 傷害を受けたDNA断片の収集法 (特許出願中)