

博士論文

環境中親電子物質による
DNA メチル化制御を介した
ケモカイン発現誘導機構

令和7年3月

土田 知貴

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科

博士後期課程

薬科学専攻

目次

略語表	3
使用薬物一覧	6
序論	9
1. 環境因子とエクスポソーム	9
2. エクスポソームにおける親電子物質	10
3. 一酸化窒素による酸化修飾を介した DNA メチル化制御.....	11
4. DNA メチル化による遺伝子発現制御.....	11
5. 本研究の目的	13
第 1 章 親電子物質による DNA メチル化活性の阻害	14
1-1. 背景と目的.....	14
1-2. 実験方法.....	14
1-2-1. 親電子物質.....	14
1-2-2. <i>in vitro</i> DNMTs 酵素活性測定	22
1-2-3. LC-MS/MS 解析.....	23
1-2-4. DNMT3B 立体構造の再構築	24
1-2-5. DNMT ファミリータンパク質の相同性比較.....	24
1-2-6. 統計解析.....	24
1-3. 実験結果.....	25
1-3-1. DNA メチル化活性を阻害する親電子物質の同定	25
1-3-2. 1,2-NQ による DNMT3B 修飾部位の同定	27
1-4. 考察	30
1-4-1. DNMT3B 酵素活性を上昇させた親電子物質	30
1-4-2. DNMT3B 酵素活性を阻害した親電子物質と化学構造の類似性	31
1-4-3. 1,2-NQ によるタンパク質付加体形成を介した DNMT3B 酵素活性阻害機構	35
1-4-4. ナフトキノロン骨格を持たない水素化 MDI による DNMT3B 酵素活性の阻害	36
1-4-5. DNMT1, DNMT3A に対する 1,2-NQ の阻害効果	37
第 2 章 親電子物質 1,2-NQ による DNA メチル化制御とその影響.....	39
2-1. 背景と目的.....	39
2-2. 実験方法.....	39
2-2-1. 細胞培養.....	39
2-2-2. 試薬処理.....	39
2-2-3. RNA-sequencing (RNA-seq) によるトランスクリプトーム解析.....	40
2-2-4. 発現変動遺伝子の抽出およびエンリッチメント解析.....	42

2-2-5. RT-qPCR	45
2-2-6. Bisulfite-sequencing (Bisulfite-seq) による DNA メチル化解析	47
2-2-7. ChIP-qPCR.....	54
2-2-8. Luciferase assay	56
2-2-9. 核抽出.....	61
2-2-10. NF-kB p65 核移行解析.....	62
2-2-11. 細胞増殖解析 (WST-8 法)	63
2-2-12. TCGA データの解析.....	64
2-2-13. 統計解析.....	64
2-3. 実験結果.....	65
2-3-1. 1,2-NQ による網羅的な遺伝子発現への影響.....	65
2-3-2. 1,2-NQ による CXC ケモカインの発現誘導	70
2-3-3. 1,2-NQ による DNA メチル化制御を介した <i>CXCL8</i> 発現の誘導.....	73
2-3-4. 1,2-NQ による DNA メチル化制御を介したがん細胞増殖への影響.....	78
2-3-5. TCGA を用いた肺腺がん患者における <i>CXCL8</i> 発現解析.....	80
2-4. 考察	81
2-4-1. 1,2-NQ 処理条件について.....	81
2-4-2. 1,2-NQ によるトランスクリプトーム解析.....	82
2-4-3. 1,2-NQ により発現誘導される CXC ケモカイン	83
2-4-4. DNMT 酵素活性を阻害する一酸化窒素と 1,2-NQ の遺伝子発現に対する影響.....	84
2-4-5. 1,2-NQ による他のタンパク質への影響.....	85
2-4-6. 1,2-NQ によるエンハンサー活性制御.....	86
2-4-7. 1,2-NQ による <i>CXCL8</i> 発現誘導とがん病態の関連.....	87
総括	90
引用文献	91
参考文献	102
謝辞	103

略語表

1,2-NQ	1,2-naphthoquinone
1,4-NQ	1,4-naphthoquinone
5-Aza	5-aza-2'-deoxycytidine
5caC	5-carboxylcytosine
5fC	5-formylcytosine
5hmC	5-hydroxymethylcytosine
5mC	5-methylcytosine
ADD	ATRX-DNMT3-DNMT3L-type zinc finger
AML	Acute Myeloid Leukemia
ANOVA	Analysis of Variance
APS	Ammonium Persulfate
BAH	Bromo Adjacent Homology
BER	Base Excision Repair
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	complementary DNA
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
CpG	Cytosine-phosphate-Guanine
CXXC	Cysteine-rich Zn ²⁺ binding
DEGs	Differentially Expressed Genes
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNMT	DNA methyltransferase
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine <i>N, N, N', N'</i> -tetra acetic acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FBS	Fetal bovine serum
FDR	False Discovery Rate
gDNA	Genomic DNA
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GSNO	<i>S</i> -nitrosoglutathione
HRP	Horseradish Peroxidase
HSAB	Hard and Soft Acids and Bases
IgG	Immunoglobulin G
IKK β	Inhibitor of I κ B Kinase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
I κ B	Inhibitor of κ B
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry
LPS	Lipopolysaccharides
MDI	Methylene Diphenyl diisocyanate
NES	Normalized Enrichment Score
NO	Nitric Oxide
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDB	Protein Data Bank
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
PWWP	Proline-tryptophan-tryptophan-Proline
RFTS	Replication-Foci Targeting Sequence
RIN ^e	RNA Integrity Number equivalent
RIPA	Radioimmunoprecipitation
RPKM	Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads
RT-qPCR	Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction
SAH	S-Adenosyl-L-Homocysteine
SAM	S-Adenosylmethionine
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	Standard Error of the Mean
TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween 20
TCEP	Tris (2-Carboxyethyl) Phosphine
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TDG	Thymine-DNA Glycosylase
TE buffer	Tris-EDTA buffer
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethyl ethylenediamine
TET	Ten Eleven Translocation
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha
TPM	Transcripts Per Million
TRD loop	Target Recognition Domain loop
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Tween 20	Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
W.B.	Western Blotting
X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside

核酸塩基

A	adenine
T	thymine
G	guanine
C	cytosine

アミノ酸

A (Ala)	Alanine	L (Leu)	Leucine
R (Arg)	Arginine	K (Lys)	Lysine
N (Asn)	Asparagine	M (Met)	Methionine
D (Asp)	Aspartic acid	F (Phe)	Phenylalanine
C (Cys)	Cysteine	P (Pro)	Proline
E (Glu)	Glutamic acid	S (Ser)	Serine
Q (Gln)	Glutamine	T (Thr)	Threonine
G (Gly)	Glycine	W (Trp)	Tryptophan
H (His)	Histidine	Y (Tyr)	Tyrosine
I (Ile)	Isoleucine	V (Val)	Valine

使用薬物一覧

2-mercaptoethanol	Merck Millipore
2-propanol	和光純薬
5-Aza	東京化成化学
50 bp DNA ladder	NIPPON Genetics
Acetic acid	和光純薬
Acrylamide/Bis	ナカライテスク
Agarose S	NIPPON Gene
Ampicillin Sodium	和光純薬
APS	和光純薬
Bacto Agar	Becton, Dickinson
Bacto Tryptone	Becton, Dickinson
Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson
Bradford Protein Assay Kit	TaKaRa
Bromophenol blue	和光純薬
CaCl ₂	和光純薬
Cell Counting Kit-8	DOJINDO
Chloroform	和光純薬
Competent Quick DH5 α	TOYOBO
D-MEM (High-Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red	和光純薬
DMSO	和光純薬
DNMT Universal Chemiluminescent Assay Kit	BPS Bioscience
DNMT3B Chemiluminescent Assay Kit	BPS Bioscience
DTT	Sigma-Aldrich
Dynabeads Protein G	Thermo Fisher Scientific
EDTA (pH 8.0)	DOJINDO
EDTA-free Protease Inhibitor (for ChIP)	Roche
EmeraldAmp PCR Master Mix	TaKaRa
EpiTaq HS (for bisulfite-treated DNA)	TaKaRa
EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kit	QIAGEN
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethidium Bromide	Amresco
FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit	FAVORGEN
FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit	FAVORGEN
FBS	Gibco
Gel Loading Dye	New England Biolabs
Glycerol	和光純薬

Glycine	和光純薬
HCl	和光純薬
Human Recombinant DNMT3B/3L complex	Active Motif
Immobilon-P PVDF membrane	Merck Millipore
ImmunoStar LD	和光純薬
ImmunoStar Zeta	和光純薬
IPTG	和光純薬
KCl	和光純薬
KH ₂ PO ₄	和光純薬
KOD SYBR qPCR Mix	TOYOBO
KOD-plus-Neo	TOYOBO
Ligation High Ver.2	TOYOBO
Luciferase Assay System	Promega
Methanol	Sigma-Aldrich
Mighty TA-cloning Kit	TaKaRa
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	和光純薬
NaCl	和光純薬
NP-40	Sigma-Aldrich
Nuclear Extract Kit	Active Motif
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific
PEI-MAX	Polysciences
Penicillin-Streptomycin	和光純薬
pGL4.14 [luc2/Hygro] Vector	Promega
Proteinase K (for ChIP)	TaKaRa
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix	TOYOBO
RNase A (for ChIP)	NIPPON Gene
SCH-527123	Selleck
SDS	和光純薬
Skim-milk	雪印乳業
Sodium Acetate	和光純薬
Sodium deoxycholate	Sigma-Aldrich
TEMED	和光純薬
TNF- α	Proteintech
TRI Reagent	Molecular Research Center
Tris	ナカライテスク
Tris-HCl (pH 8.0 for ChIP)	ナカライテスク
Tween 20	和光純薬

Wizard Genomic DNA Purification Kit
X-gal

Promega
TaKaRa

- ※ 親電子物質一覧は表 1, 2, 3 に記載.
- ※ ChIP-qPCR に用いた抗体は表 15 に記載.
- ※ Luciferase vector の作製に用いた制限酵素は表 18 に記載.
- ※ Western blotting に用いた抗体は表 20 に記載.

序論

1. 環境因子とエクスポソーム

私たち人類が生活する環境中には多様な環境因子が存在し、日常的にそれらに曝露されている。近年では、こうした環境因子ががんや神経変性疾患、糖尿病など様々な疾患の発症に寄与することが複数報告されており、人々の健康を脅かしている^{1,3}。一方で、環境因子は膨大な数存在し、それらが複合的に関わり合っていることから、その作用メカニズムや疾患発症に寄与する個々の環境因子は同定されておらず、不明な点が多く残されている。そこで、国際がん研究機関の所長であった Christopher Wild は 2005 年にヒトの生涯における環境曝露の総体を表す概念として「エクスポソーム」を提唱し、環境要因研究の重要性を訴えた⁴。しかしながら、従来のエクスポソームは個人の受胎から死に至るまでの全ての環境曝露から成り立つとされており、測定項目や分析手法は無限に近く、研究の発展に繋がらなかった。そこで、彼は 2012 年に環境要因を特殊的要因、一般的要因、内的要因の 3 つに分類し、完全なエクスポソームから限定されたエクスポソームへの移行を提案した (図 1)⁵。これにより近年では、複数の技術を組み合わせたバイオモニタリング戦略の提案やウェアラブルセンサーの開発および導入など生涯環境曝露量の解明を目指した研究が数多く行われている^{6,7}。一方で、多くの研究は生涯曝露量の測定を目指したものであり、分子メカニズムベースで環境曝露の影響を解明する試みはほとんど行われていない。

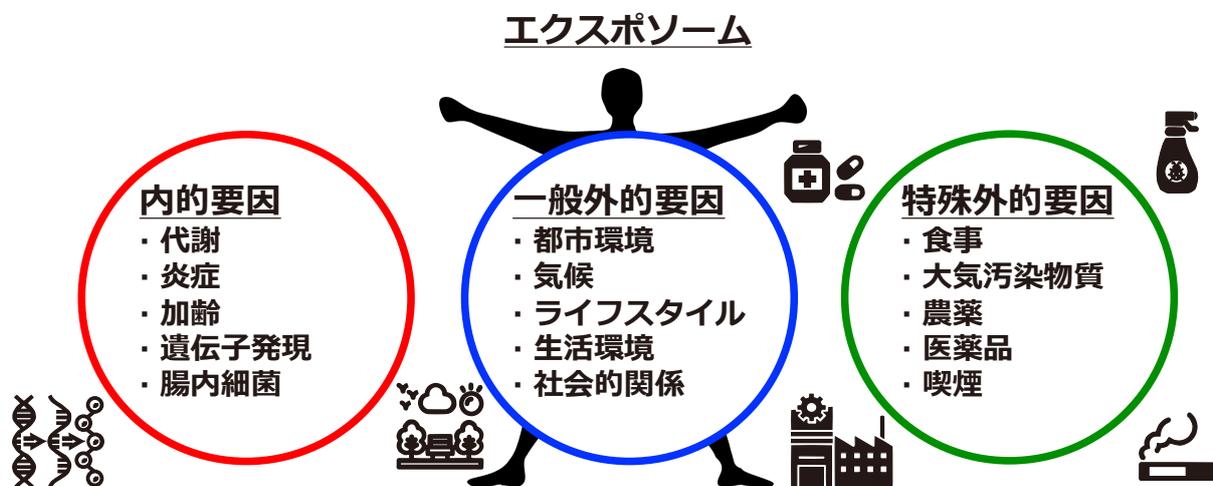


図 1. エクスポソームにおける環境要因の分類

2. エクスポソームにおける親電子物質

エクスポソームを構成する様々な環境因子の中でも、特に親電子物質と呼ばれる化学物質は、近年優先的に評価されるべき物質として報告されている⁸。親電子物質とは分子内に元素ごとの電気陰性度の違いにより生じる電子密度の低い化学構造を有する。親電子物質は例えば脂質の過酸化により生じるアクロレインや4-ヒドロキシノネナール、加工食品に含まれるアクリルアミド、大気汚染物質であるナフトキノン類などが知られている(図2)⁹⁻¹⁴。これらの親電子物質は分子内にカルボニルやハロゲン化アルキル、イソシアネートなど電子密度の低い部分を有し、電子を豊富に持つDNAやタンパク質と付加体を形成する。特に、親電子物質は求核性アミノ酸残基であるシステインのチオール基やリジンのアミノ基、ヒスチジンのイミダゾール基と共有結合を形成し、タンパク質の機能変化をもたらすことが知られている¹⁵(図3)。

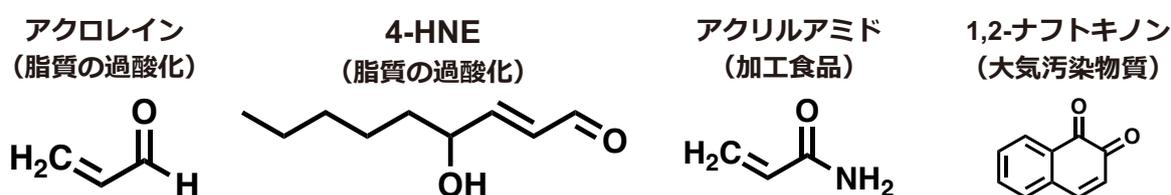


図 2. エクスポソームを構成する代表的な親電子物質



図 3. 親電子物質によるタンパク質付加体形成

3. 一酸化窒素による酸化修飾を介した DNA メチル化制御

所属研究室では、炎症や加齢により生体内で産生される一酸化窒素 (NO) によるタンパク質システインチオール基の酸化修飾 (S-ニトロシル化) に着目し、標的タンパク質の同定や機能解析を行っている (図 4)。NO による S-ニトロシル化はその酵素活性や局在を変化させることが知られており¹⁶、がんや神経変性疾患など様々な疾患の病態形成に寄与する¹⁷⁻¹⁹。近年、DNA メチル化を制御する DNA メチル基転移酵素 (DNMT) が NO による酸化修飾を受け、その酵素活性が低下し、DNA メチル化異常をきたすことが報告された²⁰。重要なことは、親電子物質と NO はタンパク質への修飾能という類似した性質を持つ点である。NO は分子内ラジカルによる酸化修飾であり、システインチオール基のみを標的とする点で共有結合を形成する親電子物質とは厳密に異なるが、両者は類似した標的タンパク質を有する可能性がある。以上より、本研究では DNA メチル化に着目し、研究を行った。



図 4. NO によるシステインチオール基の酸化修飾 (S-ニトロシル化)

4. DNA メチル化による遺伝子発現制御

DNA メチル化は DNA 塩基配列 (ゲノム) における化学修飾の一つであり、エピゲノムと総称される。DNA メチル化は遺伝子発現制御、ゲノムインプリンティング、X 染色体の不活性化、レトロトランスポゾンの不活性化など、さまざまな生命現象と密接に関連している²¹。DNA メチル化は DNMT によって触媒され、S-アデノシルメチオニン (SAM) をメチル基供与体としてシトシンの 5 位炭素原子にメチル基を付加する (図 5A)。哺乳類では 3 種の DNMT (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) が同定されており、いずれも正常な発達に不可欠である^{22,23}。DNMT1 は DNA 複製に伴ってメチル化状態を維持する「維持メチル化」を担い、DNA 複製時において親鎖の DNA メチル化状態を娘鎖に還元する。DNMT3A および DNMT3B は新たにメチル基を導入する「新規メチル化」をそれぞれ担い、胚発生時における DNA メチル化パターンの構築およびゲノムインプリンティングの確立に重要な役割を果たす²⁴。また、メチルトランスフェラーゼ活性を有さないものの、DNMT3A や DNMT3B のホモログであり、補因子として機能する DNMT3L がある (図 5B)²⁵。DNMT1 と DNMT3 では C 末端領域に酵素活性ドメインを持つことを除いてそのドメイン構造が大きく異なる。DNMT1 の N 末端にはヒストン H3 ユビキチン化を認識し、ヘミメチル化 DNA を呼び込む RFTS (Replication-Foci Targeting Sequence) ドメイン、自己抑制に関与し、異常な新規メチル化を防ぐ CXXC (cysteine-rich Zn²⁺ binding) ドメイン、RFTS と同様に複数のヒストンマークを読み取り、ヘミメチル化 DNA を呼び込む BAH (Bromo adjacent homology) ドメインといった特徴的な構造を持つ²⁶⁻²⁸。一方で、DNMT3 にはそれらの構造は含まれないが、N 末端に共通して存在する PWWP (proline-tryptophan-tryptophan-proline) および ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L-type zinc finger) ドメインはいずれもヒストンマークを認識し、ゲノム DNA に DNMT3 をリクルートする役割を持つ^{29,30}。

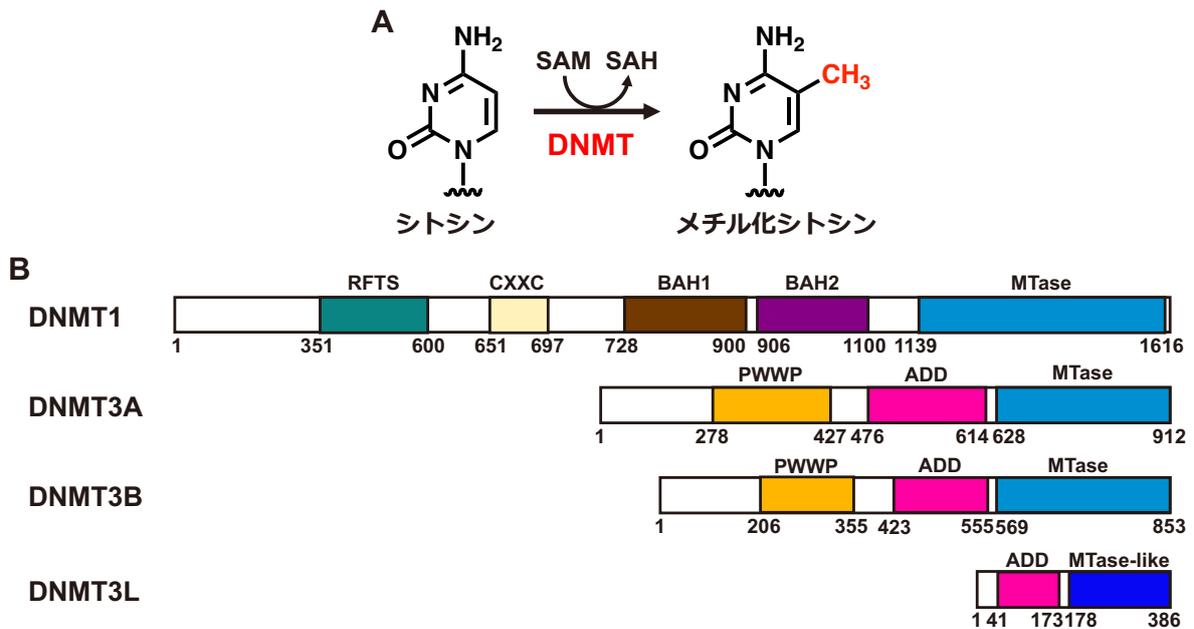


図 5. DNMT によるシトシンメチル化と DNMT のドメイン構造

(A) DNMT によるシトシン 5 位炭素へのメチル基付加

(B) ヒトの DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L ドメイン構造

DNMT による DNA メチル化は主としてシトシン-グアニン (CpG) 配列中のシトシンに対して起こる。CpG 配列が密集する領域は CpG アイランドと呼ばれ、その多くは遺伝子プロモーター領域に存在する³¹。DNA メチル化を受けたプロモーター領域は転写因子のアクセス性が低下し、下流遺伝子の発現を抑制する (図 6)。この DNA メチル化による遺伝子発現抑制は古くから、がんの発症や進行に関与することが知られており、がん細胞では DNA メチル化の異常が見られる³²。がん細胞における DNA メチル化の異常はプロモーター領域の高メチル化およびゲノムワイドな低メチル化の両者が報告されており、前者はがん抑制遺伝子の発現抑制、後者はゲノム不安定性を示し、発がん過程に関与する^{33,34}。こうした DNA メチル化異常が生じる分子メカニズムはこれまでほとんど解明されていない。がんの病態形成メカニズムとして、一般的に変異などの遺伝的要因および環境因子などの外的要因が知られている³⁵。近年、いくつかのがんにおいて DNMT の過剰発現や酵素活性の変動を伴う変異が見られることが報告された^{36,37}。特に、急性骨髄性白血病 (AML) における DNMT3A 変異がよく知られている。これは AML 全患者の 20% 程度で見られ、予後が非常に悪い³⁸。この変異は酵素活性ドメイン内において起こり、その酵素活性を著しく低下させることで、造血機能を攪乱する³⁹。このように、がんなどの病態形成において DNMT の発現や活性が重要であることが示唆されているが、生体内における DNMT の調節は遺伝的要因によるものが報告されているのみで、特に外的要因による影響はほとんど明らかではない。

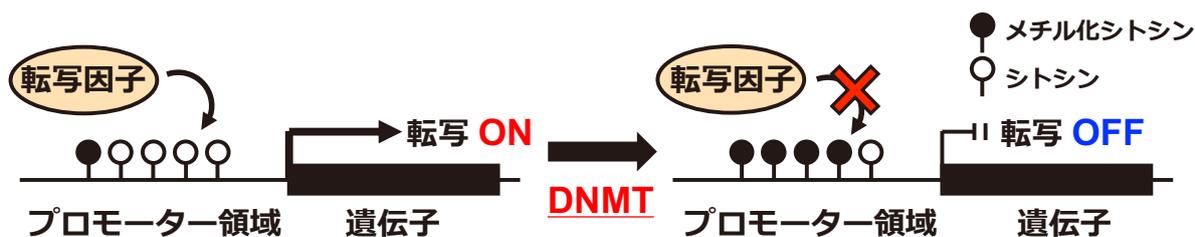


図 6. DNA メチル化を介した遺伝子発現の抑制

5. 本研究の目的

近年、種々の大気汚染物質や鉛、ヒ素などの重金属、内分泌攪乱物質、タバコ煙など多様な環境因子が DNA メチル化レベルを変動させ、人体に悪影響を及ぼすことが報告されている⁴⁰。一方で、それらの報告の多くは疫学的研究によるものであり、DNA メチル化を変動させるメカニズムについては不明な点が多い。また、奥田らは親電子物質と類似した性質を持つ NO が DNMT を酸化修飾し、その酵素活性を低下させることで発がんに寄与することを報告した²⁰。以上より、DNMT への修飾を介した酵素活性調節という観点から、環境因子による DNA メチル化制御を説明できる可能性が考えられた。そこで、本研究では環境因子の中でも重要な親電子物質に着目し、その DNA メチル化制御メカニズムと遺伝子発現変動に伴う影響について解明することを目指した。

第1章 親電子物質による DNA メチル化活性の阻害

1-1. 背景と目的

NO によるタンパク質酸化修飾は通常、細胞内の酸化還元状態に応じて厳密に制御されており、基本的には短時間で還元されることが知られている⁴¹。一方で、NO による DNMT3B 酸化修飾は DNMT1 や DNMT3A に対するものとは異なり、細胞内において長時間持続することが示された²⁰。以上より、DNMT3B は NO や親電子物質によるアミノ酸修飾の良好な標的であることが示唆された。そこで、本章では DNMT の中でも DNMT3B に着目し、親電子物質による酵素活性阻害効果や付加体形成について解析を試みた。まず初めに、環境中に含まれる親電子物質を幅広く入手し、DNMT3B 酵素活性に対する影響を *in vitro* にて解析した。さらに、LC-MS/MS (liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry) 解析を用いて親電子物質による付加体形成および修飾部位の同定を行った。

1-2. 実験方法

1-2-1. 親電子物質

農薬、食品、大気中などに含まれる親電子物質を 45 種入手した。下記表にその一覧を示す (表 1)。なお、化学構造や使用用途、由来は別表に示した (表 2)。また、各親電子物質は 10 mM 溶液として再調製し、実験に用いた (表 3)。

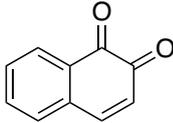
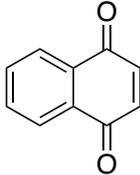
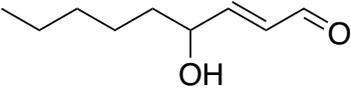
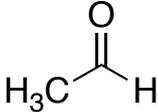
表 1. 本研究において使用した親電子物質一覧

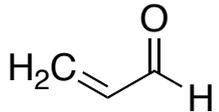
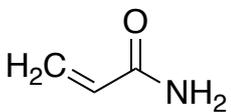
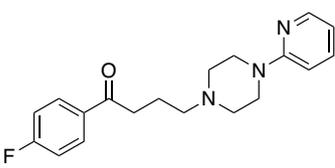
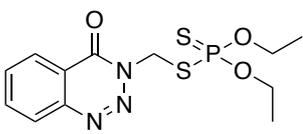
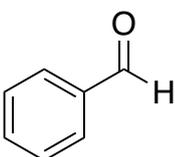
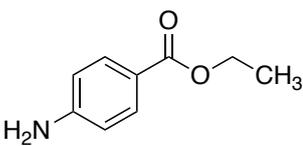
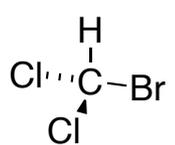
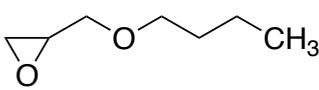
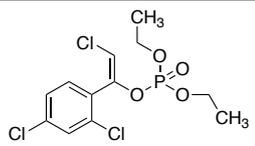
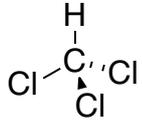
No.	Name	CAS RN	Product No.	Manufacturer
1	1,2-Naphthoquinone	524-42-5	#346616	Sigma-Aldrich
2	1,4-Naphthoquinone	130-15-4	#N0040	東京化成化学
3	4-Hydroxynonenal	75899-68-2	#32100	Cayman Chemical
4	Acetaldehyde	75-07-0	#A1640	東京化成化学
5	Acrolein	107-02-8	#A0137	東京化成化学
6	Acrylamide	79-06-1	#06114-24	ナカライテスク
7	Azaperone	1649-18-9	#HY-B1470	MedChemExpress
8	Azinphos-ethyl	2642-71-9	#45332	Sigma-Aldrich

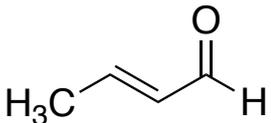
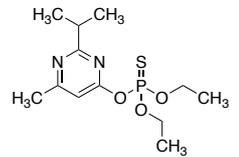
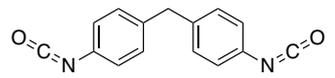
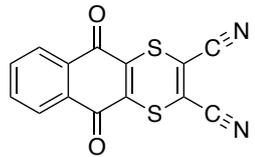
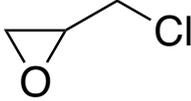
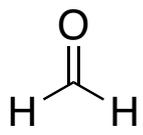
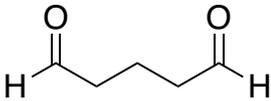
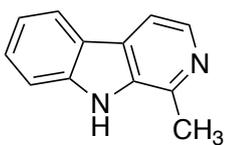
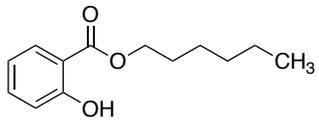
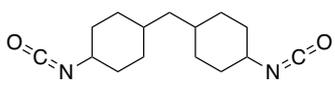
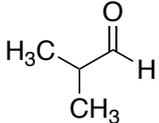
9	Benzaldehyde	100-52-7	#025-1220	和光純薬
10	Benzocaine	94-09-7	#A0271	東京化成化学
11	Bromodichloromethane	75-27-4	#M-502-04-10X	和光純薬
12	Butyl glycidyl ether	2426-08-6	#B0697	東京化成化学
13	Cadmium chloride	10108-64-2	#038-00102	和光純薬
14	Chlorfenvinphos	470-90-6	#519-45321	和光純薬
15	Chloroform	67-66-3	#034-02603	和光純薬
16	Crotonaldehyde	4170-30-3	#039-07033	和光純薬
17	Diazinon	333-41-5	#BIOC-201N-10MG	和光純薬
18	Diphenylmethane diisocyanate	101-68-8	#D0897	東京化成化学
19	Dithianon	3347-22-6	#45462	Sigma-Aldrich
20	Epichlorohydrin	106-89-8	#E0012	東京化成化学
21	Formaldehyde	50-00-0	#063-04815	和光純薬
22	Glutaraldehyde	111-30-8	#G0068	東京化成化学
23	Harmane	486-84-0	#29613	Cayman Chemical
24	Hexyl salicylate	6259-76-3	#84280	Sigma-Aldrich
25	Hydrogenated MDI	5124-30-1	#D2380	東京化成化学
26	Isobutyl aldehyde	78-84-2	#022-03943	和光純薬
27	Menbutone	3562-99-0	#HY-B1136	MedChemExpress
28	Mepronil	55814-41-0	#131-07904	和光純薬
29	Methional	3268-49-3	#277460	Sigma-Aldrich
30	Methyl ethyl ketone	78-93-3	#E0140	東京化成化学
31	Methyl isobutyl ketone	108-10-1	#138-02073	和光純薬
32	Methylmercury chloride	115-09-3	#M0589	東京化成化学

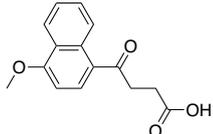
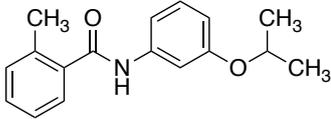
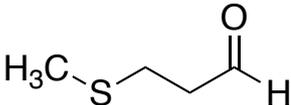
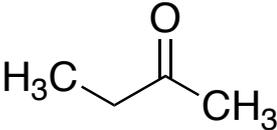
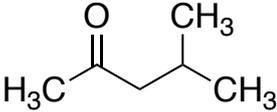
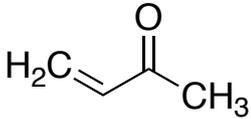
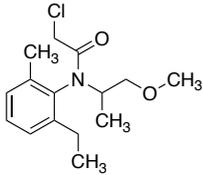
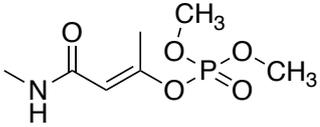
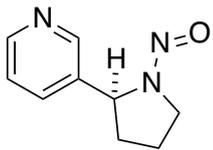
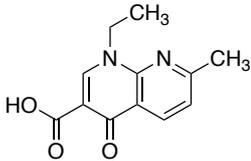
33	Methyl vinyl ketone	83897-55-6	#M0460	東京化成化学
34	Metolachlor	51218-45-2	#131-17431	和光純薬
35	Monocrotophos	6923-22-4	#36173	Sigma-Aldrich
36	N-Nitrosornicotine	16543-55-8	#75285	Sigma-Aldrich
37	Nalidixic acid	389-08-2	#147-09641	和光純薬
38	Nequinat	13997-19-8	#147-09141	和光純薬
39	Paraformaldehyde	30525-89-4	#168-20955	和光純薬
40	Prednisolone	50-24-8	#165-11491	和光純薬
41	Pyridaphenthion	119-12-0	#169-10914	和光純薬
42	Resorcinol diglycidyl ether	101-90-6	#sc-272285	Santa Cruz Biotechnology
43	Toluene 2,4-diisocyanate	584-84-9	#T0263	東京化成化学
44	Vamidotion	2275-23-2	#227-01711	和光純薬
45	α -Hexylcinnamaldehyde	101-86-0	#09178	Sigma-Aldrich

表 2. 親電子物質の化学構造と主な使用用途

No.	Name	Chemical Structure	Application
1	1,2-Naphthoquinone		タバコ煙, ディーゼル排気
2	1,4-Naphthoquinone		タバコ煙, ディーゼル排気, ポリエステル樹脂の 重合調整剤
3	4-Hydroxynonenal		食品中での脂質の過酸化
4	Acetaldehyde		タバコ煙, 接着剤, 果実

5	Acrolein		燃料や食品の不完全燃焼
6	Acrylamide		食品に含まれる アミノ酸や糖類の加熱
7	Azaperone		神経遮断性鎮静薬
8	Azinphos-ethyl		リン酸エステル系殺虫剤
9	Benzaldehyde		香料
10	Benzocaine		局所麻酔薬
11	Bromodichloromethane		水道水における 消毒副生成物
12	Butyl glycidyl ether		エポキシ樹脂の 希釈剤, 安定剤
13	Cadmium chloride	$\text{Cl}-\text{Cd}-\text{Cl}$	農畜水産物 (主に米)
14	Chlorfenvinphos		リン酸エステル系殺虫剤
15	Chloroform		溶媒, 溶剤

16	Crotonaldehyde		有機合成原料
17	Diazinon		有機リン系殺虫剤
18	Diphenylmethane diisocyanate		接着剤, 塗料の原料
19	Dithianon		農薬や殺菌剤
20	Epichlorohydrin		エポキシ樹脂の 接着剤や原料
21	Formaldehyde		樹脂や接着剤として 建材に使用
22	Glutaraldehyde		医療機器の 殺菌や消毒, 滅菌
23	Harmane		コーヒーやステーキなどの 熱加工食品, タバコ煙
24	Hexyl salicylate		紫外線吸収剤として 化粧品成分
25	Hydrogenated MDI		接着剤, 塗料の原料
26	Isobutyl aldehyde		有機合成原料

27	Menbutone		動物用胆汁分泌促進薬
28	Mepronil		酸アミド系殺菌剤
29	Methional		食品中香気成分
30	Methyl ethyl ketone		塗料や接着剤, 印刷インキの溶剤
31	Methyl isobutyl ketone		合成樹脂の溶媒, 塗料成分の溶剤
32	Methylmercury chloride	$\text{H}_3\text{C}-\text{Hg}-\text{Cl}$	海洋哺乳類（主にマグロ）
33	Methyl vinyl ketone		タバコ煙や排気ガス
34	Metolachlor		クロロアセトアミド系 除草剤
35	Monocrotophos		有機リン系殺虫剤
36	N-Nitrosornicotine		タバコ煙
37	Nalidixic acid		キノロン系抗菌剤 (現在販売中止)

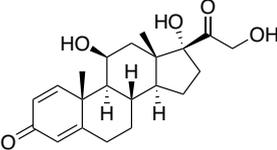
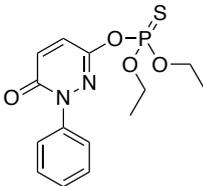
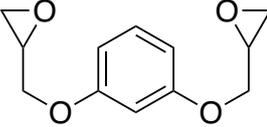
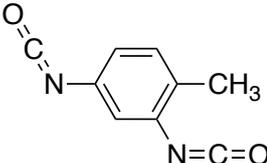
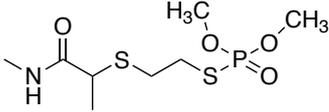
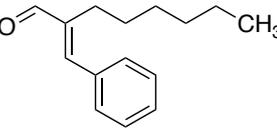
38	Nequinatate		動物用医薬品
39	Paraformaldehyde	$\text{HO} \left[\text{H}_2\text{C}-\text{O} \right]_n \text{H}$	殺菌, 消毒, 防腐剤
40	Prednisolone		ステロイド系抗炎症薬
41	Pyridaphenthion		有機リン系殺虫剤
42	Resorcinol diglycidyl ether		エポキシ樹脂の 希釈剤, 改質材
43	Toluene 2,4-diisocyanate		ポリウレタン原料
44	Vamidotion		有機リン系殺虫剤
45	α -Hexylcinnamaldehyde		香料 (ジャスミンなど 花香の調合)

表 3. 親電子物質の 10 mM 溶液調製

Volume/mL: 1 mL の溶媒に対する試薬必要量, Solvent/ μ L: 1 μ L の試薬に対する溶媒必要量

No.	Name	State	Solvent	Volume/mL (μ g)	Solvent/ μ L (μ L)
1	1,2-Naphthoquinone	Solid	DMSO	1.5815	
2	1,4-Naphthoquinone	Solid	DMSO	1.5815	
3	4-Hydroxynonenal	Liquid	Ethanol		5.4
4	Acetaldehyde	Liquid	Water		1788
5	Acrolein	Liquid	Water		1430

6	Acrylamide	Solid	Water	7.108 (100 mM)	
7	Azaperone	Liquid	DMSO	10 mM	
8	Azinphos-ethyl	Solid	Ethanol	3.4538	
9	Benzaldehyde	Liquid	Ethanol		988
10	Benzocaine	Solid	Ethanol	1.6519	
11	Bromodichloromethane	Liquid	Methanol		3.8 (100 μ M)
12	Butyl glycidyl ether	Liquid	Ethanol		692
13	Cadmium chloride	Solid	Water	1.8332	
14	Chlorfenvinphos	Liquid	DMSO		377
15	Chloroform	Liquid	Ethanol		540
16	Crotonaldehyde	Liquid	Water		1200
17	Diazinon	Liquid	Ethanol		2.28 (1 mM)
18	Diphenylmethane diisocyanate	Liquid	Ethanol		460
19	Dithianon	Solid	DMSO	2.9633	
20	Epichlorohydrin	Liquid	Water		1262
21	Formaldehyde	Liquid	Water		1229
22	Glutaraldehyde	Liquid	Water		560
23	Harmane	Solid	DMSO	1.8222	
24	Hexyl salicylate	Liquid	DMSO		462
25	Hydrogenated MDI	Liquid	Ethanol		366
26	Isobutyl aldehyde	Liquid	Water		1062
27	Menbutone	Liquid	DMSO	10 mM	
28	Mepronil	Solid	Ethanol	2.6934	
29	Methional	Liquid	Ethanol		960
30	Methyl ethyl ketone	Liquid	Water		1111
31	Methyl isobutyl ketone	Liquid	Ethanol		798
32	Methylmercury chloride	Solid	Water	2.5109	
33	Methyl vinyl ketone	Liquid	Water		1161
34	Metolachlor	Liquid	DMSO		389
35	Monocrotophos	Solid	Water	2.2316	
36	<i>N</i> -Nitrosornicotine	Solid	Ethanol	1.772	
37	Nalidixic acid	Solid	DMSO	2.3224	
38	Nequinat	Solid	DMSO	3.6542	
39	Paraformaldehyde	Liquid	Water		1229
40	Prednisolone	Solid	Ethanol	3.6044	
41	Pyridaphenthion	Solid	Ethanol	3.4034	
42	Resorcinol diglycidyl ether	Liquid	Methanol		543

43	Toluene 2,4-diisocyanate	Liquid	Ethanol		685
44	Vamidothion	Solid	Water	2.8734	
45	α -Hexylcinnamaldehyde	Liquid	Ethanol		372

1-2-2. *in vitro* DNMTs 酵素活性測定

1-2-2-1. 試薬調製

TBS-T	137 mM NaCl
	10 mM Tris-HCl (pH 7.4)
	0.1 (v/v) % Tween 20

1-2-2-2. 45 種の親電子物質による DNMT3B 酵素活性測定 (図 7, 8, 9)

DNMT3B 酵素活性測定は BPS Bioscience 社の DNMT3B Chemiluminescent Assay Kit (#52034) を用いて提示されたプロトコルに従って行った。以下に概要を記す。初めに、DNMT3B の基質となる CpG 配列を含んだ DNA 断片がコーティングされた 96-well plate に、TBS-T 150 μ L を添加し、15 分間室温にてインキュベートした。続いて、活性部位である C 末端側領域のリコンビナント DNMT3B/3L 複合体を 1 \times DNMT assay buffer (DTT 含有) を用いて 20 ng/ μ L となるように希釈した。TBS-T を取り除いた後、下記の表に従って、4 \times DNMT assay buffer, SAM, 滅菌精製水, DNMT3B/3L, 親電子物質, 親電子物質溶媒を各ウェルに添加した (表 4)。その後 37 $^{\circ}$ C にて 2 時間インキュベートした。続いて、各ウェル内の反応液を取り除き、TBS-T にて 3 回洗浄した後、Blocking buffer 100 μ L を添加し、10 分間室温にてインキュベートした。その後、抗 5-メチル化シトシン抗体を Blocking buffer にて 400 倍に希釈し、各ウェルに 100 μ L 添加して 1 時間室温にて反応させることでメチル化シトシンを標識した。続いて TBS-T にて再び 3 回洗浄した後、Blocking buffer 100 μ L を添加し、10 分間室温にてインキュベートした。その後、HRP 標識された二次抗体を Blocking buffer にて 1000 倍に希釈し、各ウェルに 100 μ L 添加して 30 分室温にて反応させた。次に、TBS-T にて 3 回洗浄した後、Blocking buffer 100 μ L を添加し、10 分間室温にてインキュベートした。最後に HRP chemiluminescent substrate A および B をそれぞれ 50 μ L ずつ混合し、100 μ L を各ウェルに添加した。得られた発光を GloMax Multi Detection System (Promega) にて測定し、DNMT3B の DNA メチル基転移活性を評価した。

表 4. DNMT3B 酵素活性測定における試薬調製

Reagents	Blank	Control	Sample
4 \times DNMT assay buffer	12.5 μ L	7.5 μ L	7.5 μ L
400 μ M SAM	5 μ L	5 μ L	5 μ L
滅菌精製水	27.5 μ L	12.5 μ L	12.5 μ L
DNMT3B/3L (20 ng/ μ L)	—	20 μ L	20 μ L
200 μ M 親電子物質 (Final 20 μ M)	—	—	5 μ L
親電子物質溶媒	5 μ L	5 μ L	—
合計	50 μ L	50 μ L	50 μ L

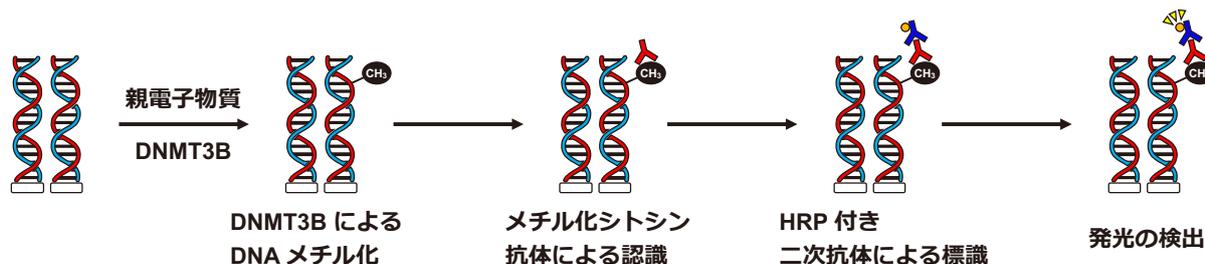


図 7. DNMT3B 酵素活性測定の概略図

1-2-2-3. 1,2-NQ による DNMT1/3A/3B 酵素活性測定 (図 10)

1,2-NQ による DNMT1/3A/3B 酵素活性測定は BPS Bioscience 社の DNMT Universal Chemiluminescent Assay Kit (#52035) を用いて提示されたプロトコルに従って行った。概要は 1-2-2-2.と同様である。試薬調製条件は下記表に示した (表 5)。

表 5. DNMT1/3A 酵素活性測定における試薬調製

Reagents	Blank	Control	Sample
4× DNMT assay buffer	12.5 μL	12.5 μL	12.5 μL
400 μM SAM	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
滅菌精製水	30 μL	10 μL	10 μL
DNMT1 or 3A or 3B (10 ng/μL)	—	20 μL	20 μL
1,2-NQ	—	—	5 μL
DMSO	5 μL	5 μL	—
合計	50 μL	50 μL	50 μL

1-2-3. LC-MS/MS 解析

Human Recombinant DNMT3B/3L complex (Active motif) 1 μg (0.25 μg/μL) に、終濃度 20 μM となるように 1,2-NQ を添加し、30 分間室温にて反応させた。その後ドライアイス中に保存し、ヤマト運輸クール便にて東京薬科大学 生命科学部 細胞情報科学研究室 伊藤 昭博教授に送付し、解析を依頼した。

1-2-3-1. 高速液体クロマトグラフ (HPLC)

HPLC は EASY-nLC 1000 System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、製品のプロトコルに従って行った。トリプシン消化後のサンプルを NANO-HPLC capillary column, C18 (Nikkyo Technos) (0.075×150 mm) を用いて、45 °C の条件下で分離した。2 種類の溶媒 (溶媒 A: 0.1 % ギ酸, 溶媒 B: 100 % アセトニトリル混合 0.1 % ギ酸) を用いて流速 300 nL/min で、60 分間グラジエント溶出を行った。なお、48 分間で 5-35 % Bin, その後の 12 分間で 35-65 % Bin を溶出した。トラップカラムには Acclaim PepMap 100 pre-column, 100 μm×2 cm (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

1-2-3-2. 質量分析 (Mass Spectrometry) およびデータ解析

質量分析は、ポジティブモードのナノスプレーイオン源を備えた Q-Exactive ハイブリッド四重極オービトラップ質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。得られたデータは Proteome Discoverer (Ver. 2.4) および MASCOT search engine (Ver. 2.7.0) を用いて解析した。データベースは SwissProt を用いた。

1-2-4. DNMT3B 立体構造の再構築

DNMT3B 酵素活性ドメインの立体構造は Protein Data Bank から得た (PDB: 6u8p)⁴²。得られたデータは PyMOL (Ver. 2.5.2) を用いて再構築した。

1-2-5. DNMT ファミリータンパク質の相同性比較

DNMT ファミリータンパク質のシーケンスデータは Uniprot (<https://www.uniprot.org>) から取得した。相同性比較には Clustal Omega Software (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) を用いて行った⁴³。

1-2-6. 統計解析

定量値は平均値±標準誤差 (SEM) で示した。統計解析は GraphPad Prism (ver. 10.4.0) (GraphPad Software) を使用した。統計解析方法については、適宜詳細を記述した。なお、 $p < 0.05$ の場合を統計的に有意差ありと判定した。

1-3. 実験結果

1-3-1. DNA メチル化活性を阻害する親電子物質の同定

まず初めに、親電子物質による DNMT3B 酵素活性への影響を解析した。解析にあたり、次の 5 つの条件を独自に設定し、親電子物質の選定を行った。(1) 環境中に豊富に含まれること、(2) 食品中や農薬中、大気中など様々な由来を持つこと (3) キノンやアルデヒド、 α,β -不飽和カルボニルなど多様な化学構造を持つこと (4) 分子量が 500 未満であること、(5) 市販品として容易に入手可能であること、これらの条件をもとに入手した親電子物質 45 種 (前項に記述) について、*in vitro* 酵素活性測定キットを用いて解析を行った。なお、親電子物質は最終濃度 20 μM となるように処理した。その結果、DNMT3B 酵素活性を顕著に低下させる親電子物質として、大気汚染物質である 1,2-NQ や 1,4-NQ、農薬である Dithianon、塗料や接着剤の原料である水素化 MDI (HMDI) の 4 種を同定した (図 8)。

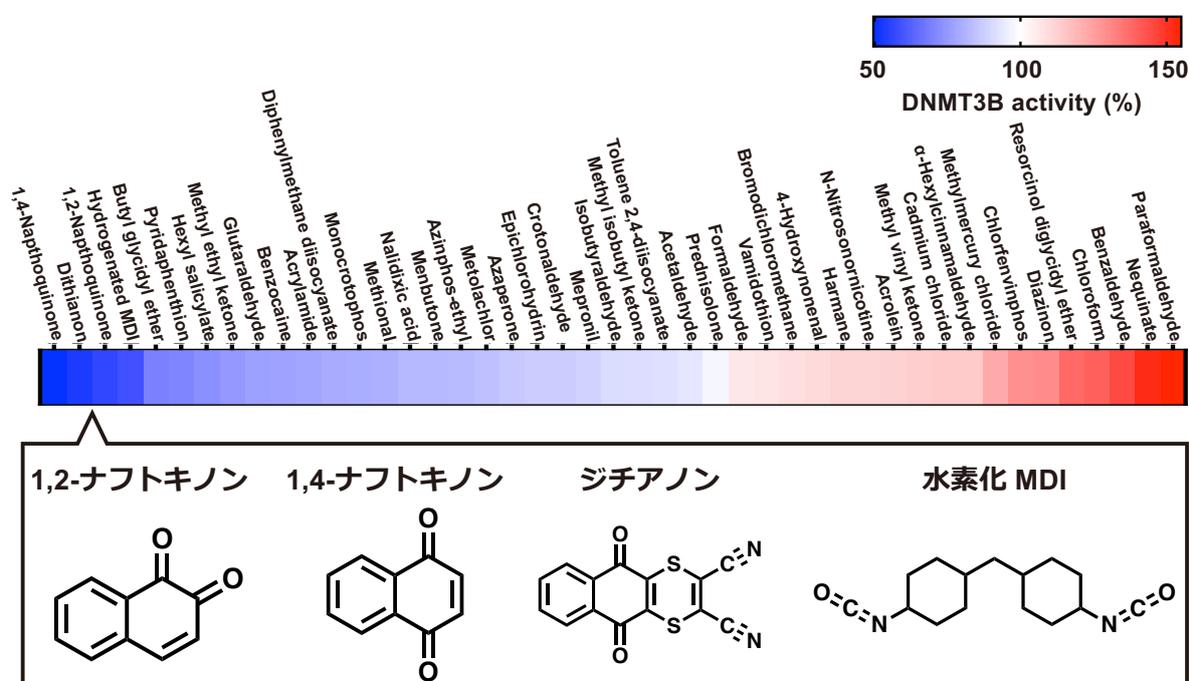


図 8. DNMT3B 酵素活性を阻害する親電子物質の探索

ヒートマップは DNMT3B 酵素活性への親電子物質の影響を示す。45 種の親電子物質の中でも、1,2-NQ, 1,4-NQ, Dithianon, 水素化 MDI の 4 種が顕著な酵素活性阻害効果を示した。

続いて、これら4種の親電子物質について DNMT3B 酵素活性阻害効果の濃度依存性を検討したところ、いずれの親電子物質についても、処理濃度依存的な酵素活性阻害効果が確認された(図9)。以降は4種の親電子物質の中でも、特にタバコ煙やディーゼル排気に含まれる1,2-NQに着目した。1,2-NQは他の3種の親電子物質よりもその特徴や性質がよく知られていること、また1,2-NQによる付加体形成の標的タンパク質は数多く報告されていることから⁴⁴、親電子物質の付加体形成を主眼においた本研究において最適な被験物質であると考えた。続いて、DNMT3B以外のサブタイプであるDNMT1やDNMT3A酵素活性に及ぼす1,2-NQの影響を解析したところ、1,2-NQは極めて低い濃度域において全てのDNMT酵素活性を処理濃度依存的に阻害することが示された(図10)。一方で、図9と図10では、1,2-NQのDNMT3B酵素活性阻害効果が大きく異なっていた。これは使用したキットの違いにより生じたと推察される。本研究では環境条件にも合致する図10のようなより低い濃度域での1,2-NQの影響に着目し、解析を行った。

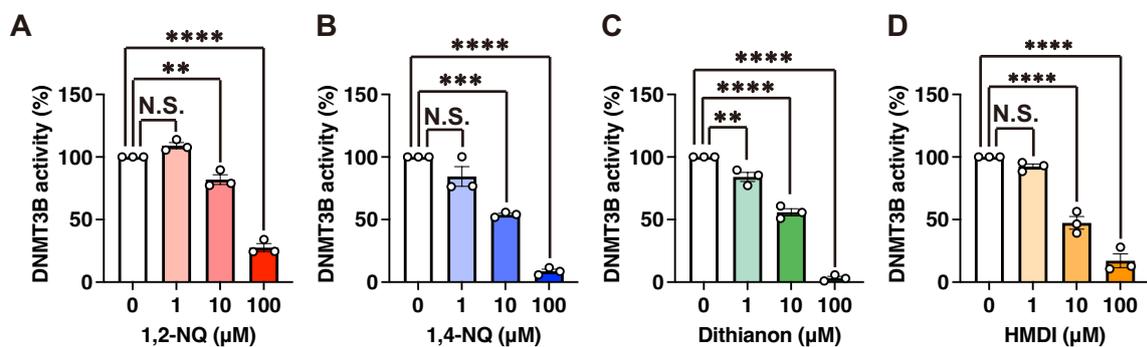


図 9. 4種の親電子物質による DNMT3B 酵素活性の阻害

(A) 1,2-NQ, (B) 1,4-NQ, (C) Dithianon, (D) HMDI の各濃度 (0, 1, 10, 100 μM) における DNMT3B 酵素活性阻害効果を DNMT3B Chemiluminescent Assay Kit (#52034) により測定した。(n=3, N.S. = Not Significant, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001: One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test)

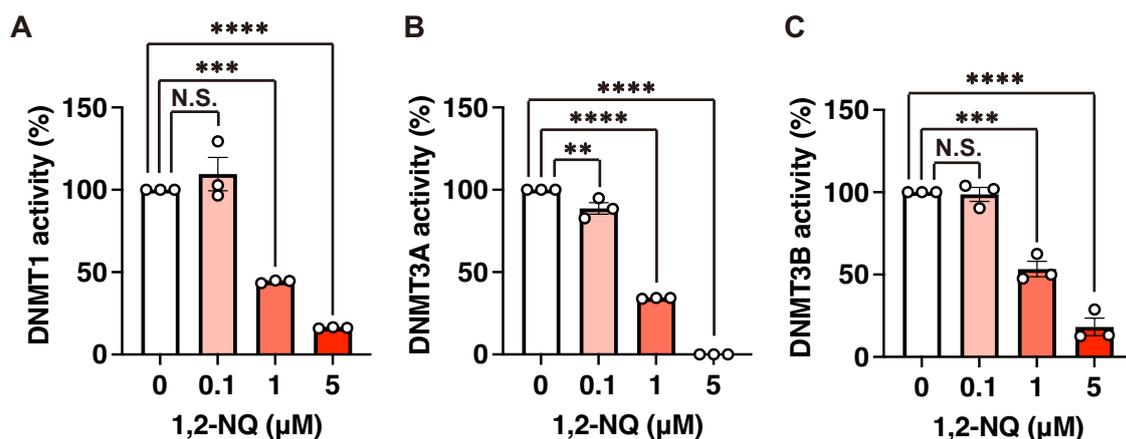


図 10. 1,2-NQ による DNMTs 酵素活性の阻害

1,2-NQ による (A) DNMT1, (B) DNMT3A, (C) DNMT3B 酵素活性阻害効果を DNMT Universal Chemiluminescent Assay Kit (#52035) により測定した。(n=3, N.S. = Not Significant, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001: One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test)

1-3-2. 1,2-NQ による DNMT3B 修飾部位の同定

1,2-NQ は分子内に電子密度の不足した構造を持つことから、求核性残基であるシステイン (Cys) チオール基やリジン (Lys) アミノ基, ヒスチジン (His) イミダゾール基と共有結合することが知られている⁴⁵⁻⁴⁸. そこで, 1,2-NQ による DNA メチル化活性の阻害に付加体形成が関与するか検討するため, タンパク質の化学修飾を解析できる LC-MS/MS 解析を行った. その結果, 1,2-NQ による修飾部位として N 末端近傍の H7, ADD ドメイン内に位置する K540, 酵素活性ドメイン内の K662, H841 の 4 箇所を同定した (図 11).

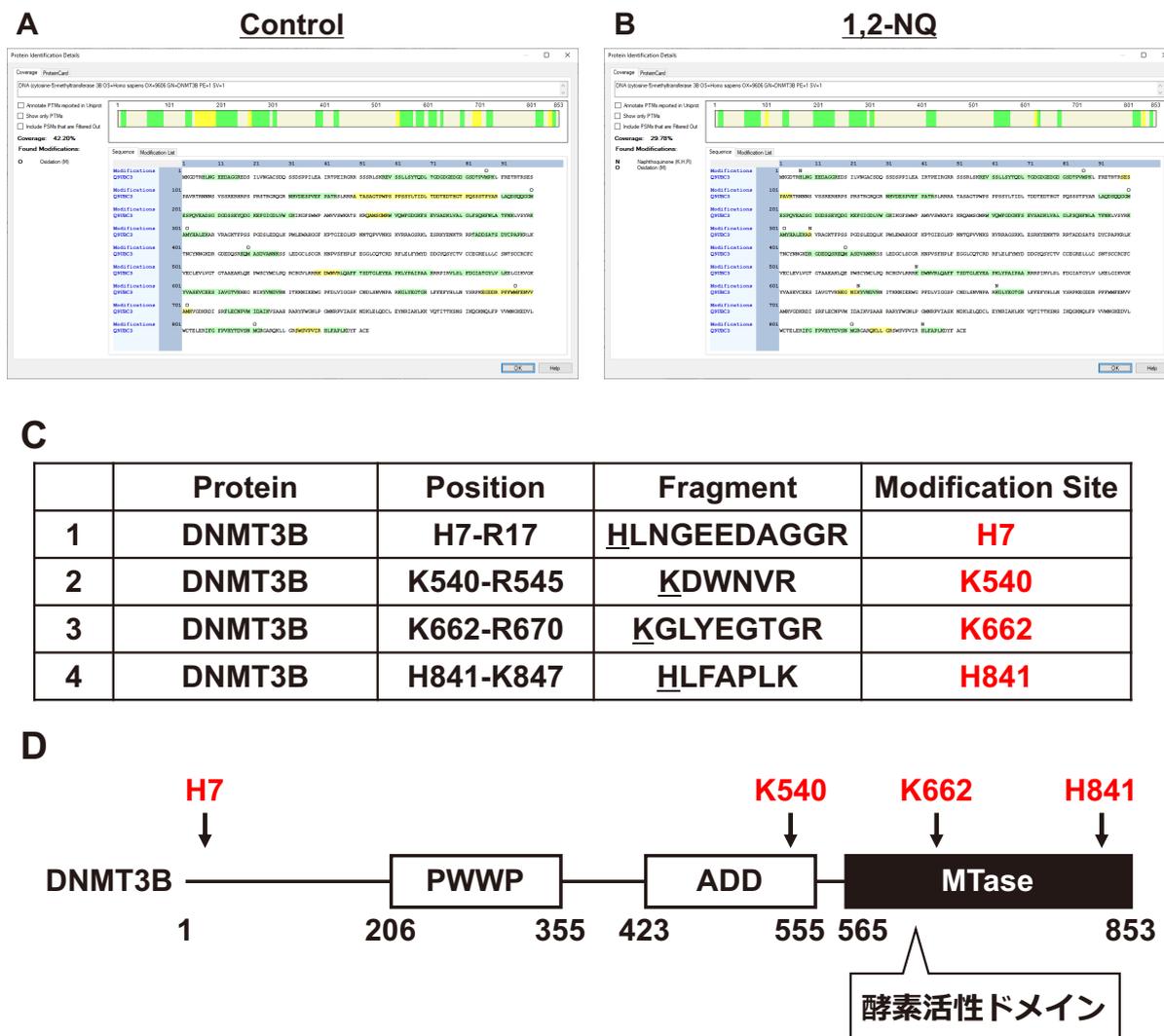


図 11. LC-MS/MS 解析による 1,2-NQ の DNMT3B 修飾部位同定

(A, B) LC-MS/MS 解析の結果. 緑色あるいは黄色で示した領域は MS/MS 解析により同定されたアミノ酸ペプチド. (配列カバー率 DMSO: 42.20 %, 1,2-NQ: 29.78 %)

(C) LC-MS/MS 解析により同定された 1,2-NQ の DNMT3B 修飾部位

(D) DNMT3B の構成ドメインと 1,2-NQ による修飾部位のマッピング

(PWWP: Pro-Trp-Trp-Pro, ADD: ATRX-DNMT3-DNMT3L)

これらの MS スペクトルを以下に示す (図 12). 例えば, フラグメント HLFAPLK (DNMT3B: H841-K847) 中のフラグメントイオン b_1^+ において, 単独ヒスチジン (分子量 138) 残基と比較して 156.02113 Da の増加が確認された (図 12D). この増加は 1,2-NQ (156.02113 Da) が付加したヒスチジン-1,2-NQ 付加体の形成によるものであると考えられる. 他のフラグメントイオンについても同様に, 単独アミノ酸残基と比較して 156.02113 Da の増加が複数確認され, それらの残基は 1,2-NQ 付加体を形成していることが示された.

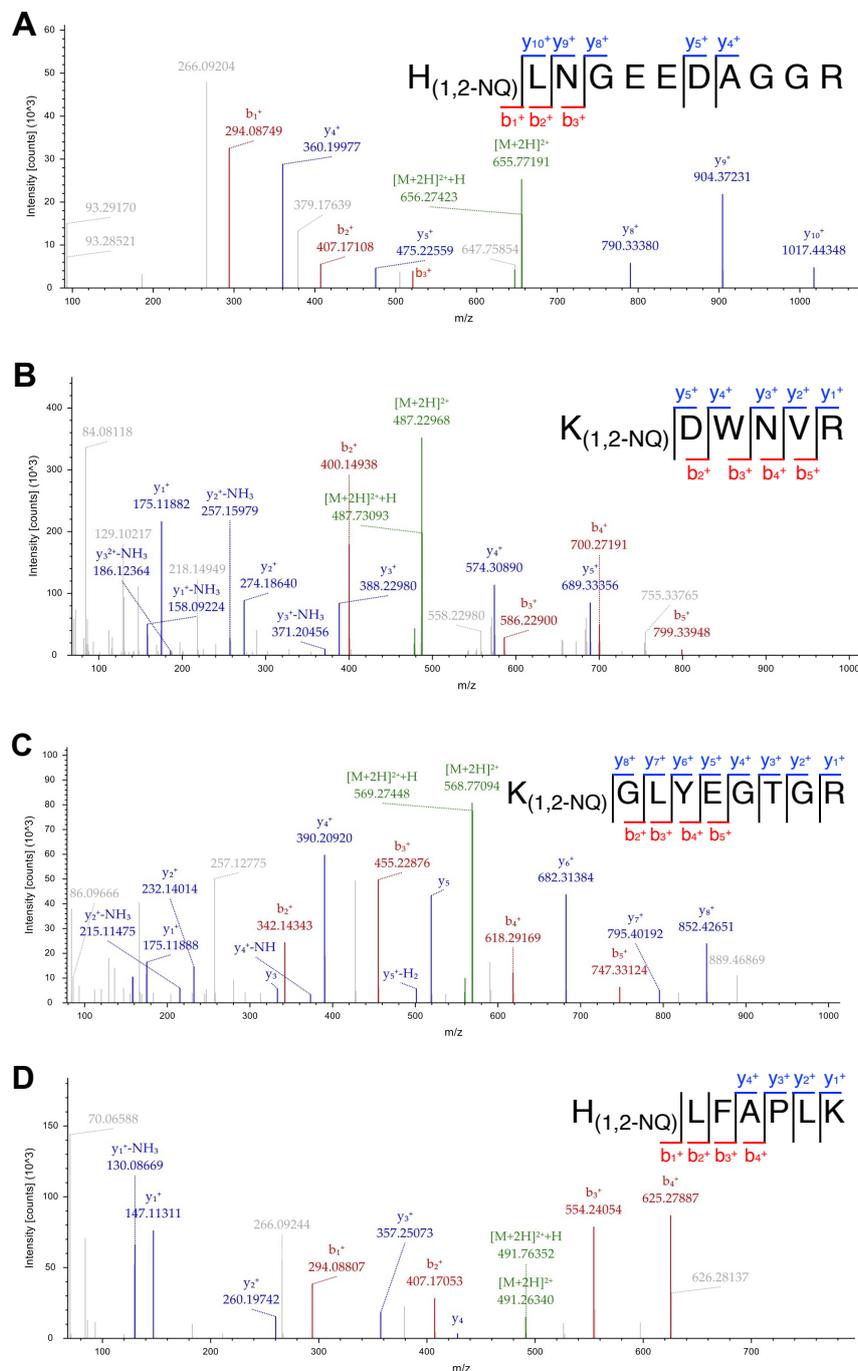


図 12. 各ペプチド断片における MS/MS スペクトル

1,2-NQ による (A) H7, (B) K540, (C) K662, (D) H841 への共有結合修飾を示した MS スペクトル図.

続いて、酵素活性に重要な酵素活性ドメインに着目し、K662, H841 の立体構造上の位置について確認を行った。既報の立体構造データ (PDB: 6u8p) をダウンロードし⁴², PyMOL にて描画した (図 13)。その結果、K662 は DNA との相互作用領域近傍に位置することがわかった。一方で、H841 はタンパク質表面に位置していた。次に、K662 付近を拡大した図を示す (図 13B)。K662 は DNMT3B 酵素活性中心である C651 の近傍に位置し、1,2-NQ の修飾部位と推定されるアミノ基 (図 13B K662 内の青色で示された部位) と酵素活性に重要なシステインチオール基 (図 13B C651 内の黄色で示された部位) の距離はおよそ 11.2 Å であった。C651 は CpG DNA のシトシン 6 位炭素に求核攻撃することで、5 位炭素へのメチル基付加を媒介する⁴⁹。以上より、1,2-NQ は DNMT3B 付加体形成を介して酵素活性を阻害する可能性が示された。

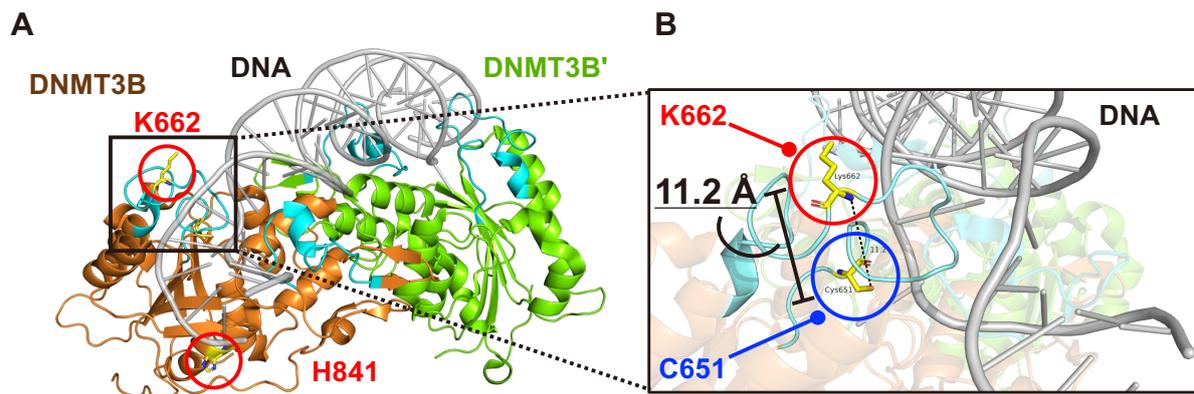


図 13. DNMT3B 酵素活性ドメインにおける 1,2-NQ の修飾部位

(A) DNMT3B 酵素活性ドメインを PyMOL にて再構築した。1,2-NQ 修飾部位である K662 および H841 は黄色で示した。

(B) DNMT3B-DNA 相互作用部位の拡大図。酵素活性中心である C651 と 1,2-NQ 修飾部位である K662 の距離はおよそ 11.2 Å であった。

1-4. 考察

1-4-1. DNMT3B 酵素活性を上昇させた親電子物質

本研究では 45 種の環境中親電子物質による DNMT3B 酵素活性への影響を解析し、酵素活性を顕著に低下させる 4 種を同定した (図 8)。一方で、酵素活性を上昇させる親電子物質も複数同定した (図 14)。DNMT 酵素活性を上昇させる化合物の報告はこれまでになく、詳しい制御機構は明らかではないが、非常に興味深い結果である。DNA メチル化は DNMT 中のシステイン残基 (DNMT3B であれば C651) が DNA シトシン残基へ求核攻撃することで 5 位炭素が活性化され駆動する。その後、メチル基供与体である SAM のメチル基に 5 位炭素が求核攻撃することで、メチル基の移動が起こる (図 15)。この DNA メチル化のプロセスから、親電子物質による DNMT3B 酵素活性上昇の分子機構として以下の 3 点を予測した。① C651 求核性の向上、② SAM に対するアクセス性の向上、③ DNMT3B-DNA 相互作用の安定化。① C651 の求核性はチオール基からプロトンが脱離したチオラートアニオンの形成と安定性に依存する⁵⁰。このことから、親電子物質が何らかの作用によりチオラートアニオンの安定化に寄与した可能性がある。仮説として、酵素活性を上昇させた親電子物質は長鎖アルデヒドやクロロホルムなど疎水性の高い物質であったことから、疎水性環境の形成が C651 の求核性向上に貢献した可能性が考えられる。②・③ SAM や DNA との相互作用には立体構造の維持が重要である。実際に触媒ドメインを持たない補酵素である DNMT3L は DNMT3A と相互作用することでコンフォメーション変化を引き起こし、SAM や DNA との相互作用の安定化を介して、酵素活性の誘導につながる事が報告されている⁵¹。このことから、親電子物質による付加体形成が DNMT3B 立体構造を変化させ、相互作用の安定化に寄与した可能性が考えられる。実際に、アルデヒドは 1 級アミンとシッフ塩基を形成することが知られており、DNMT3B 立体構造の変化に寄与する可能性がある⁵²。

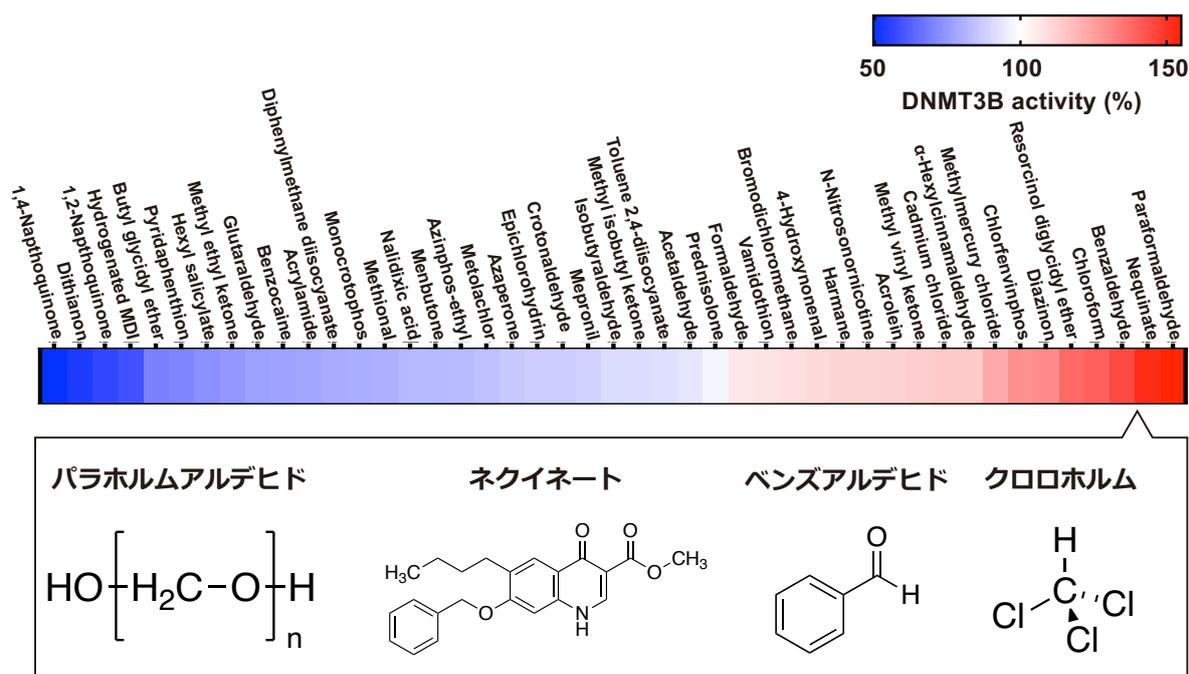


図 14. DNMT3B 酵素を上昇させた親電子物質 (図 8 より改変)

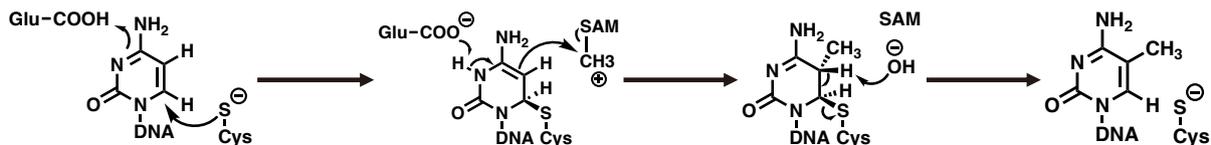


図 15. DNMT によるシトシン 5 位炭素へのメチル基付加 (⁵³より改変)

1-4-2. DNMT3B 酵素活性を阻害した親電子物質と化学構造の類似性

本研究では、DNMT3B 酵素活性を阻害する 4 種の親電子物質を同定した。4 種の親電子物質の中でも水素化 MDI を除く 3 種はナフトキノン骨格を有し、構造上の類似性が見られた。ナフトキノン骨格は特に親電子性が高く、様々なタンパク質と反応し付加体を形成することが知られている¹⁴。そこで、親電子物質の化学構造と DNMT3B 酵素活性阻害効果を関連づけることができないかと考えた。親電子物質の化学構造は 1,2-NQ との構造類似性を算出することで評価した。化学物質の構造類似性の評価にはタニモト係数を用いた。タニモト係数は化学物質のフィンガープリントを算出し、フィンガープリント同士の類似度を計算する指標である。タニモト係数は下記表の Python コードを用いて、Google Colaboratory 上で算出した (表 6, 7)。各親電子物質のタニモト係数と DNMT3B 酵素活性への影響の相関関係を解析したところ、1,2-NQ との類似性と DNMT3B 酵素活性に及ぼす影響はほとんど相関しなかった (図 16)。その原因として、本研究では化学構造の多様性を重視し、親電子物質の選定を行ったため 1,2-NQ と類似度の高い物質はほとんど含まれておらず、相関関係を得ることができなかつたことが挙げられる。一方で、親電子物質の化学構造と DNMT3B 酵素活性阻害効果は相関しない可能性が示されたことは重要である。また、タニモト係数は化学構造のみを表現できる指標であり、親電子物質の性質を完全に評価できていない点に注意すべきである。今後、親電子性を評価できる新たな評価軸が開発されることで、親電子物質の標的タンパク質への作用が予測でき、その毒性がより明瞭になる可能性がある。

表 6. タニモト係数の算出に用いた Python コード

```
!pip install rdkit
from rdkit import Chem, DataStructs
from rdkit.Chem import AllChem, Draw
from rdkit.Chem.Draw import IPythonConsole #必要なモジュールのインストール
#各化合物の SMILES を書き並べる
mol1 = Chem.MolFromSmiles("O=C(C=CC1=C2C=CC=C1)C2=O")
mol2 = Chem.MolFromSmiles("O=C(C1=C2C=CC=C1)C=CC2=O")
mol3 = Chem.MolFromSmiles("CCCCCC(O)/C=C/C=O")
mol4 = Chem.MolFromSmiles("CC=O")
mol5 = Chem.MolFromSmiles("O=CC=C")
mol6 = Chem.MolFromSmiles("C=CC(N)=O")
mol7 = Chem.MolFromSmiles("O=C(C1=CC=C(F)C=C1)CCCN2CCN(C3=CC=CC=N3)CC2")
mol8 = Chem.MolFromSmiles("S=P(SCN1N=NC2=CC=CC=C2C1=O)(OCC)OCC")
mol9 = Chem.MolFromSmiles("O=CC1=CC=CC=C1")
mol10 = Chem.MolFromSmiles("CCOC(C1=CC=C(C=C1)N)=O")
mol11 = Chem.MolFromSmiles("ClC(Br)Cl")
mol12 = Chem.MolFromSmiles("CCCCOCC1CO1")
mol13 = Chem.MolFromSmiles("Cl[Cd]Cl")
mol14 = Chem.MolFromSmiles("O=P(OCC)(OCC)O/C(C1=CC=C(Cl)C=C1Cl)=C/Cl")
mol15 = Chem.MolFromSmiles("ClC(Cl)Cl")
mol16 = Chem.MolFromSmiles("C/C=C/C=O")
```

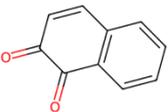
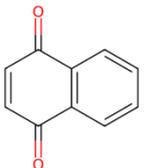
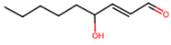
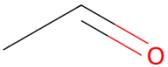
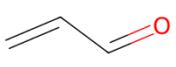
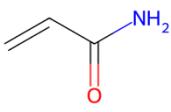
```

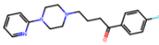
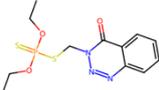
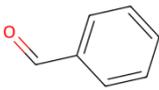
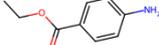
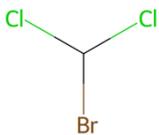
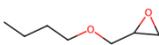
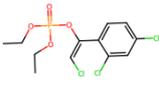
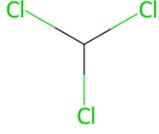
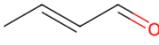
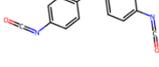
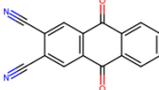
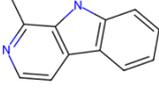
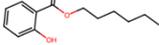
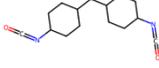
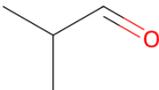
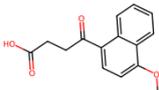
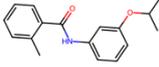
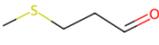
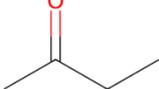
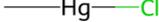
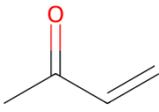
mol17 = Chem.MolFromSmiles("CC1=NC(C(C)C)=NC(OP(OCC)(OCC)=S)=C1")
mol18 = Chem.MolFromSmiles("C1=CC(=CC=C1CC2=CC=C(C=C2)N=C=O)N=C=O")
mol19 = Chem.MolFromSmiles("O=C1C2=C(C(C3=CC=CC=C31)=O)C=C(C#N)C(C#N)=C2")
mol20 = Chem.MolFromSmiles("ClCC1C01")
mol21 = Chem.MolFromSmiles("C=O")
mol22 = Chem.MolFromSmiles("O=CCCC=O")
mol23 = Chem.MolFromSmiles("CC1=NC=CC2=C1NC3=C2C=CC=C3")
mol24 = Chem.MolFromSmiles("OC1=CC=CC=C1C(OCCCCC)=O")
mol25 = Chem.MolFromSmiles("O=C=NC(CC1)CCC1CC2CCC(N=C=O)CC2")
mol26 = Chem.MolFromSmiles("CC(C)C=O")
mol27 = Chem.MolFromSmiles("O=C(C1=CC=C(OC)C2=CC=CC=C12)CCC(O)=O")
mol28 = Chem.MolFromSmiles("O=C(NC1=CC=CC(OC(C)C)=C1)C2=CC=CC=C2C")
mol29 = Chem.MolFromSmiles("O=CCSC")
mol30 = Chem.MolFromSmiles("O=C(C)CC")
mol31 = Chem.MolFromSmiles("O=C(C)CC(C)C")
mol32 = Chem.MolFromSmiles("C[Hg]Cl")
mol33 = Chem.MolFromSmiles("O=C(C)C=C")
mol34 = Chem.MolFromSmiles("O=C(N(C1=C(C)C=CC=C1CC)C(COC)C)CC1")
mol35 = Chem.MolFromSmiles("O=P(OC)(OC)O/C(C)=C/C(NC)=O")
mol36 = Chem.MolFromSmiles("O=NN1CCCC1C2=CC=CN=C2")
mol37 = Chem.MolFromSmiles("CCN1C=C(C(C2=C1N=C(C=C2)C)=O)C(O)=O")
mol38 = Chem.MolFromSmiles("CCCCC1=CC2=C(C=C1OCC3=CC=CC=C3)NC=C(C(OC)=O)C2=O")
mol39 = Chem.MolFromSmiles("O=C")
mol40 = Chem.MolFromSmiles("O=C1C=C[C@]2(C)[C@@]3([H])C(O)C[C@]4(C)[C@](C(CO)=O)(O)CC[C@]4([H])[C@]3([H])CCC2=C1")
mol41 = Chem.MolFromSmiles("S=P(OCC)(OCC)OC1=NN(C2=CC=CC=C2)C(C=C1)=O")
mol42 = Chem.MolFromSmiles("C1(OCC2CO2)=CC=CC(OCC3CO3)=C1")
mol43 = Chem.MolFromSmiles("CC1=CC=C(N=C=O)C=C1N=C=O")
mol44 = Chem.MolFromSmiles("O=P(OC)(OC)SCCSC(C)C(NC)=O")
mol45 = Chem.MolFromSmiles("O=C/C(CCCCC)=C\C1=CC=CC=C1")

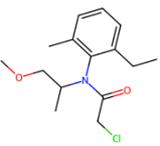
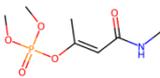
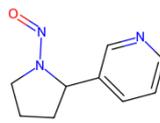
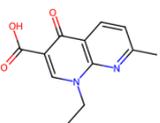
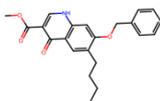
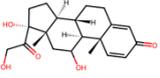
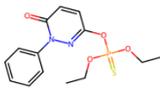
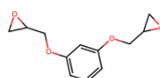
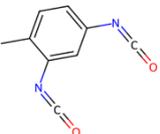
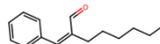
list = [mol1, mol2, mol3, mol4, mol5, mol6, mol7, mol8, mol9, mol10, mol11, mol12,
mol13, mol14, mol15, mol16, mol17, mol18, mol19, mol20, mol21, mol22, mol23,
mol24, mol25, mol26, mol27, mol28, mol29, mol30, mol31, mol32, mol33, mol34,
mol35, mol36, mol37, mol38, mol39, mol40, mol41, mol42, mol43, mol44, mol45]
MACCSkeys_fp = [AllChem.GetMACCSKeysFingerprint(mol) for mol in list]
tanimoto = DataStructs.BulkTanimotoSimilarity(MACCSkeys_fp[0], MACCSkeys_fp)
Draw.MolsToGridImage(list, molsPerRow=len(list), subImgSize=(300,300),
legends=['Tanimoto: {:.2f}'.format(i) for i in tanimoto])

```

表 7. 表 6 により算出した各親電子物質のタニモト係数 (1,2-NQ を 1 とした場合)

	Tanimoto		Tanimoto		Tanimoto
	1.000000		0.882353		0.156250
	0.111111		0.166667		0.115385

	0.134615		0.196970		0.294118
	0.187500		0.000000		0.131579
	0.000000		0.214286		0.000000
	0.166667		0.120690		0.275862
	0.714286		0.100000		0.111111
	0.190476		0.193548		0.297297
	0.218750		0.100000		0.393939
	0.342857		0.071429		0.130435
	0.125000		0.000000		0.210526

	0.166667		0.139535		0.100000
	0.326087		0.333333		0.111111
	0.319149		0.171875		0.264706
	0.310345		0.078431		0.206897

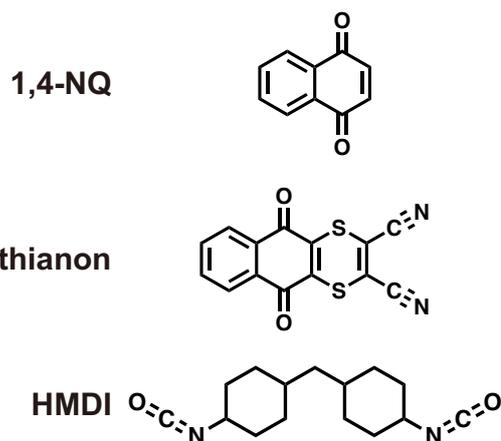
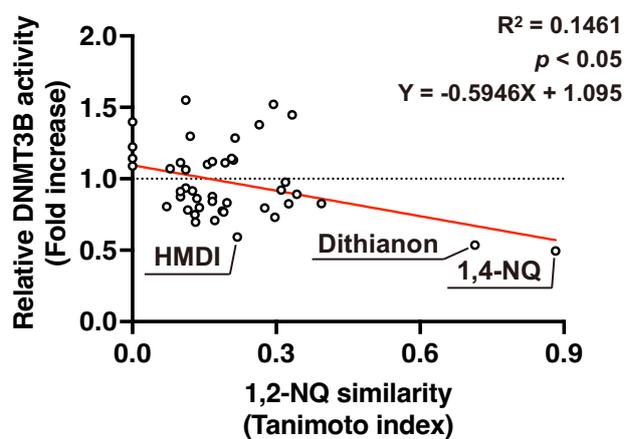


図 16. 各親電子物質の構造類似性と DNMT3B 酵素活性阻害効果

各親電子物質の 1,2-NQ 類似性と DNMT3B 酵素活性阻害効果の相関関係を線形回帰分析により解析した。(R²: 決定係数)

1-4-3. 1,2-NQ によるタンパク質付加体形成を介した DNMT3B 酵素活性阻害機構

本研究では 1,2-NQ による DNMT3B 付加体形成が酵素活性に影響を及ぼす可能性を提示した。本項では、その詳細な機構について 3 点の可能性を提示する。1 点目は DNA メチル化の基質である SAM との相互作用に影響を及ぼした可能性が考えられる。古くから、SAM の代謝物である S-アデノシルホモシステイン (SAH) の類似体は DNMT に結合することでその酵素活性を阻害することが知られており^{54,55}、様々な SAH 類似体が DNMT 阻害物質として同定されてきた^{56,57}。このことから、SAM との相互作用は DNA メチル化プロセスにおいて重要な役割を果たすことが推察される。1,2-NQ の修飾部位と SAM 相互作用部位の関連を解析するため、PDB データベースから立体構造データを取得し、再構築を行った。その結果、1,2-NQ 修飾部位である K662 は SAH から遠く離れ、およそ 16 Å の距離があった (図 17A)。以上より、SAM と DNMT3B C651 の相互作用に 1,2-NQ の K662 修飾が影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。2 点目は DNA との相互作用に影響を与えた可能性である。DNMT3B は Catalytic loop (residues 648-672) および TRD (Target recognition domain) loop (residues 772-791) のコンフォメーション変化を介して DNA と相互作用することが知られており⁴⁹、これらの領域は酵素活性に重要な役割を果たしている (図 17B)。近年では、ICF 症候群で見られる DNMT3B G663S や L664T 変異は Catalytic loop のコンフォメーション変化を介して、酵素活性を低下させることが報告された^{49,58,59}。そこで、PyMOL にて点変異を導入できる「Mutagenesis Wizard」を用いてリジン残基を側鎖の大きなプロリン残基に置換した際の立体構造に及ぼす影響を解析した。その結果、K662P 変異は Catalytic loop 内 D653 と大きな立体障害を生じた (図 17C)。以上より、1,2-NQ による K662 への修飾は Catalytic loop のコンフォメーション変化に寄与した可能性が考えられる。一方で、1,2-NQ による K662 への共有結合修飾が立体構造に及ぼす影響についてはフリーソフトを駆使し、シミュレーション解析を進めていたが、有用な結果を得ることはできなかった。そのため、本仮説に関しては、今後さらなる検討や解析が必要である。

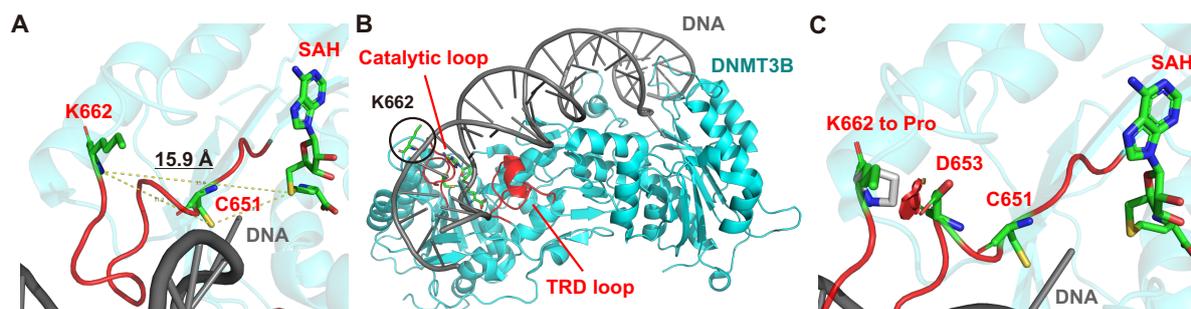


図 17. DNMT3B K662 付近の立体構造および変異の導入 (PDB: 6u8p)

- (A) 基質である SAM 類似体 SAH 相互作用部位と K662 の距離
- (B) DNMT3B 酵素活性部位の立体構造。Catalytic loop および TRD loop は DNA を認識する。
- (C) K662 にプロリン変異を導入した場合の構造変化。赤色は立体障害を示す。

3 点目は LC-MS/MS 解析では検出されなかった他のアミノ酸に対する 1,2-NQ の共有結合修飾が存在する可能性である。LC-MS/MS 解析では 1,2-NQ による修飾部位を 4 箇所同定した。一方で、ペプチドカバー率は高いとは言えず、LC-MS/MS 解析の検出効率をさらに高めることに

課題を残した。プロテオミクスを用いた化学物質によるタンパク質付加体形成の解析は発展途上であり、プロトコルの最適化が求められる。さらに、1,2-NQ による修飾部位にシステイン残基が検出されなかったことについても疑問が残る。本研究において実施した LC-MS/MS 解析では、カバーされたペプチド中にシステイン残基は含まれていなかったことから 1,2-NQ によるシステイン修飾が検出されなかった可能性がある。また、1,2-NQ によるシステイン修飾は還元剤により容易に還元される一方で、リジン修飾は還元剤による影響を受けないことが報告されている。酵素溶液中には活性維持を目的として、強力な還元剤 TCEP (tris (2-carboxyethyl) phosphine) が含まれていたため、本実験系におけるシステイン修飾の検出は困難であったと考えられる。また、近年ではナフトキノン骨格を持つ Nanaomycin A が DNMT3B C651 を修飾し、その酵素活性を阻害することが報告されている⁶⁰。これらをまとめると、1,2-NQ による酵素活性中心 C651 への修飾の可能性は十分に考えられる。

1-4-4. ナフトキノン骨格を持たない水素化 MDI による DNMT3B 酵素活性の阻害

本研究では DNMT3B 酵素活性を阻害する親電子物質を 4 種同定し、うち 3 種がナフトキノン骨格を有することを明らかにした。一方で、ナフトキノン骨格を持たない HMDI が酵素活性阻害効果を示した。HMDI が持つ求電子性の高いイソシアネート基 ($-N=C=O$) はリジン残基をカルバミル化するほか、システインチオール基とチオウレタン結合を形成することが知られている (図 18)⁶¹⁻⁶³。これらの結合は不可逆的であり、酵素活性や立体構造への影響は大きい。以上より、HMDI も 1,2-NQ と同様に DNMT3B に対して付加体を形成し、酵素活性に影響を及ぼした可能性がある。一方で、同様にイソシアネート基を持つ Diphenylmethane diisocyanate (DMDI) は中程度の酵素活性阻害効果を示した。HMDI はシクロヘキシル基を持つ一方、DMDI は芳香族環であるフェニル基を持つことから芳香族環の電子供与性により、イソシアネート基の窒素原子に電子が渡されることで、炭素原子の電子密度が増加し、HMDI よりも硬い酸として振る舞った可能性が考えられる。硬い酸とは 1960 年代にピアソンにより提唱された HSAB (Hard and Soft Acids and Bases) 則で示されたもので、一般的に電気陰性度が大きく、電子密度の高い物質を指す^{64,65}。HSAB 則においては硬い酸は硬い塩基と結合しやすく、軟らかい酸は軟らかい塩基と結合しやすいとされている。HSAB 則に従うと、リジンアミノ基は硬い塩基として振る舞う一方、システインチオール基は軟らかい塩基として振る舞う⁶⁶。以上より、DMDI は HMDI に比してリジン残基への反応性が高く、システイン残基への反応性が低いことが予想される。これらの結果から、DNMT3B 酵素活性の阻害にはリジン残基のみならずシステイン残基への反応性も重要である可能性が示された。実際に、DNMT3B 酵素活性を顕著に阻害した 1,2-NQ, 1,4-NQ, Dithianon はいずれもやや軟らかい酸であり、システイン残基への反応性は無視できない。



図 18. リジンアミノ基およびシステインチオール基とイソシアネート基の付加反応

(A) イソシアネートによるリジンアミノ基のカルバミル化

(B) イソシアネートによるシステインチオール基とのチオウレタン結合の形成

1-4-5. DNMT1, DNMT3A に対する 1,2-NQ の阻害効果

1,2-NQ は DNMT1 や DNMT3A に対しても DNMT3B と同様の酵素活性阻害効果を示した。LC-MS/MS 解析による修飾部位の同定は DNMT3B に対してのみ行ったため、DNMT1 や DNMT3A に対する 1,2-NQ の付加体形成は不明である。そこで、DNMT3B における 1,2-NQ の修飾部位が DNMT1 や DNMT3A に保存されているか、マルチプルアラインメントにより解析した。その結果、酵素活性ドメイン内に位置する K662 および H841 は DNMT3A に保存されていた。一方で、H7 および K540 は DNMT1・DNMT3A に保存されていなかった (図 19)。

A		Sequence															
Subtype																	
DNMT1	97-	H	A	Y	N	R	E	V	N	G	R	-	-106				
DNMT3A	18-	E	R	E	E	D	R	K	D	G	E	E	-28				
DNMT3B	7-	-	-	-	-	-	H	L	N	G	E	E	-12				

B		Sequence															
Subtype																	
DNMT1	726-	Q	N	K	N	R	I	S	W	V	G	E	-736				
DNMT3A	598-	-	-	-	-	R	E	D	W	P	S	R	-604				
DNMT3B	539-	-	-	-	-	R	K	D	W	N	V	R	-545				

C		Sequence															
Subtype																	
DNMT1	1232-	M	N	R	F	N	S	R	T	Y	S	K	-1242				
DNMT3A	716-	V	N	P	A	R	K	G	L	Y	E	G	-726				
DNMT3B	657-	V	N	P	A	R	K	G	L	Y	E	G	-667				

D		Sequence															
Subtype																	
DNMT1	1462-	R	K	N	G	R	S	S	S	G	A	L	-1472				
DNMT3A	900-	-	-	-	-	-	H	L	F	A	P	L	-905				
DNMT3B	841-	-	-	-	-	-	H	L	F	A	P	L	-846				

図 19. DNMTs 間における 1,2-NQ 修飾部位の保存性

(A) H7, (B) K540, (C) K662, (D) H841 周辺のアミノ酸配列アラインメント。一致したアミノ酸は灰色で示す。

まず初めに、DNMT3A について PDB データベースから DNMT3A 立体構造を取得し、解析を行った。DNMT3A には DNMT3B K662 に対応する K721 と DNMT3B C651 に対応する C710 が存在するため、付近の立体構造を可視化したところ DNMT3A K721 は DNMT3B K662 と同様に SAH から約 17 Å 離れた位置に存在した (図 20A)。この結果から、DNMT3A に関して SAM との相互作用を 1,2-NQ が阻害する可能性は高くないと推察される。続いて、DNMT3A K721 に側鎖の大きいプロリン残基を導入したところ、DNMT3B と同様に K721P 変異は C710 に近い D712 と大きな立体障害を生じた (図 20B)。以上より、1,2-NQ による DNMT3A 酵素活性阻害には DNMT3B と同様に酵素活性中心近傍のリジン残基への共有結合修飾が関与する可能性が示唆された。

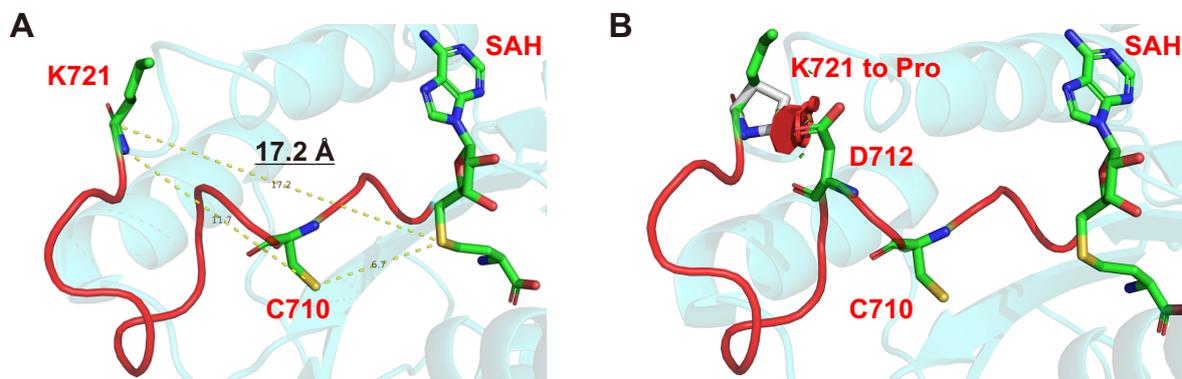


図 20. DNMT3A K721 周辺の立体構造 (PDB: 8tdr⁶⁷)

- (A) 基質である SAM 類似体 SAH 相互作用部位と K721 の距離
 (B) K662 にプロリン変異を導入した場合の構造変化。赤色は立体障害を示す。

続いて、DNMT1 に焦点を当てる。DNMT1 には 1,2-NQ の修飾部位である 4 箇所のアミノ酸はいずれも保存されていなかった。このことから、1,2-NQ による DNMT1 阻害には異なるアミノ酸修飾が関与する可能性が高い。DNMT1 の立体構造を PDB データベースから取得し、同様に確認した。DNMT1 は維持メチル化を担い DNMT3A や DNMT3B とは立体構造が大きく異なる (図 21A)。DNMT1 の DNA との相互作用領域である Catalytic loop に着目したところ、1,2-NQ により修飾を受ける可能性のあるリジン残基は含まれておらず、近傍に K1242 が位置していた (図 21B)。しかし、K1242 は SAM や DNA との相互作用部位からは離れた位置に存在しており、1,2-NQ による K1242 への修飾が酵素活性に影響を及ぼす可能性は不明瞭である。また、Catalytic loop を構成するアミノ酸の中でも 1,2-NQ による修飾を受ける可能性のある残基は C1226, R1234, R1238 の 3 種であった。C1226 は酵素活性中心であり、酵素活性に重要な部位であることが知られている。一方で、R1234 および R1238 の酵素活性に対する役割は明らかではないものの、1,2-NQ による修飾が Catalytic loop のコンフォメーション変化に寄与する可能性がある。まとめると、1,2-NQ による DNMT1 酵素活性への影響を明らかにするためには、LC-MS/MS 解析による修飾部位の同定や変異体を用いた解析などさらなる解析が必要であり、不明な点が多く残されている。

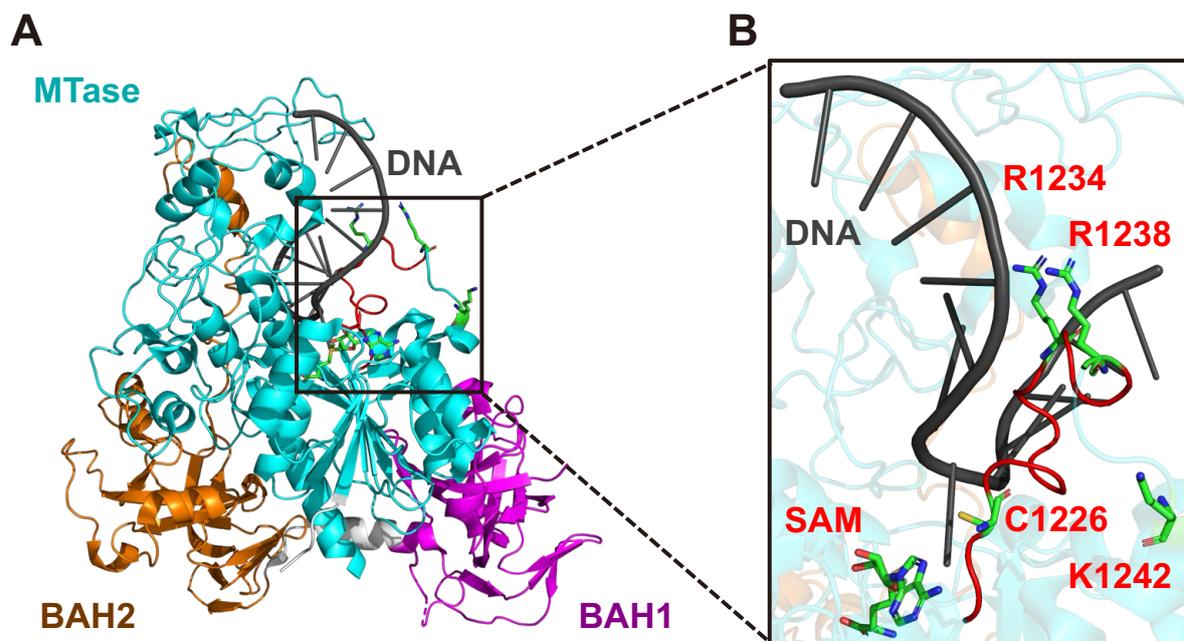


図 21. DNMT1 の立体構造 (PDB: 7sfg⁶⁸)

(A) DNMT1 立体構造。BAH1, BAH2, MTase ドメインを示した。

(B) DNMT1-DNA 相互作用部位の拡大図。Catalytic loop は赤色で示した。1,2-NQ により修飾を受ける可能性のある残基を緑色で示した。

第2章 親電子物質 1,2-NQ による DNA メチル化制御とその影響

2-1. 背景と目的

第1章より、大気中に含まれる 1,2-NQ は DNMTs の活性を阻害することが明らかとなり、遺伝子発現への影響が示唆された。そこで、本章ではヒト肺組織における 1,2-NQ 曝露の影響を解析するため、ヒト肺細胞モデルとして維持が簡便な細胞株である A549 細胞を用いて種々の検討を行った。まず初めに、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析および RT-qPCR (Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction) を行い、遺伝子発現に対する 1,2-NQ の詳細な影響を解析した。続いて、1,2-NQ による発現上昇遺伝子の中から個々の遺伝子に着目し、発現制御機構および細胞応答に及ぼす影響を解析した。これらの解析により、環境因子による DNA メチル化制御とその影響を理解することを目指した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 細胞培養

ヒト肺胞上皮腺癌由来 A549 細胞(ATCC)およびヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞(ATCC) は 56°C, 30 分間非働化処理をした 10 % FBS (gibco) および 1 % Penicillin-Streptomycin (和光純薬) を含む D-MEM (High-Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red 培地 (和光純薬) を用いて、5 % CO₂, 37°C の条件下で培養した。CO₂ インキュベーターは MCO-19AICUV (Panasonic) を使用した。

2-2-2. 試薬処理

2-2-2-1. 試薬調製

PBS 137 mM NaCl
 2.7 mM KCl
 8.1 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O
 1.5 mM KH₂PO₄

2-2-2-2. 1,2-NQ 処理

1,2-NQ (Sigma Aldrich) は表 3. 親電子物質の調製 に従って 10 mM 溶液を用時調製した。溶媒には DMSO を用いた。その後、培地にて適宜希釈を行い、終濃度 10 μM となるように処理した。コントロールサンプルには等量の DMSO を処理した (終濃度 0.1 %)。

2-2-2-3. 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) 処理

5-Aza (東京化成工業) は 2.28 mg に対して DMSO 1 mL を加えることで 10 mM 溶液を調製し、小分けにして -20 °C で保存した。小分けは凍結融解を行わず、使い切りとした。培地にて

適宜希釈を行い、終濃度 10 μM となるように処理した。コントロールサンプルには等量の DMSO を処理した (終濃度 0.1%)。

2-2-2-4. TNF-a 処理

TNF- α (Proteintech) は 0.2 mg/mL となるよう PBS で再懸濁し、小分けにして -80°C で保存した。小分けは凍結融解を行わず、使い切りとした。培地にて適宜希釈を行い、終濃度 25 ng/mL となるように処理した。コントロールサンプルには等量の PBS を処理した。

2-2-2-5. SCH-527123 処理

SCH-527123 (Selleck) は 3.97 mg に対して DMSO 1mL を加えることで 10 mM 溶液を調製し、小分けにして -80°C で保存した。小分けは凍結融解を行わず、使い切りとした。培地にて適宜希釈を行い、終濃度 50, 100, 200 μM となるように処理した。コントロールサンプルには等量の DMSO を処理した (終濃度 0.1%)。

2-2-3. RNA-sequencing (RNA-seq) によるトランスクリプトーム解析

RNA-sequencing は次世代シーケンサーを用いて細胞や組織における遺伝子発現を網羅的かつ定量的に解析する代表的な遺伝子発現解析手法の一つである。

2-2-3-1. サンプルの準備

A549 細胞を 6 cm-dish に 2.0×10^5 cells/mL となるように播種し、一晚経過後に DMSO および終濃度 10 μM の 1,2-NQ を処理した。処理 72 時間後に、培養上清を吸引し、冷 PBS にて洗浄後、再び PBS を加え、スクレイパーを用いて細胞を回収した。その後、微量高速冷却遠心機 (トミー精工) にて、 4°C , 15,000 rpm, 5 min 遠心した。上清を除去し、得られた細胞ペレットを冷 PBS にて懸濁した後、再び同じ条件で遠心した。上清を除去し、得られた細胞ペレットは液体窒素にて瞬間凍結した。その後、細胞ペレットを山口大学大学研究推進機構 総合科学実験センター 遺伝子実験施設長・教授 水上 洋一先生に送付し、2-2-3-2.項 Total RNA の抽出から 2-2-3-5.項 得られたデータの解析までを実施していただいた。

2-2-3-2. Total RNA の抽出

Total RNA の抽出には Maxwell RSC simply RNA Cell Kit (Promega) を用いて、提示されたプロトコルに従って行った。得られた Total RNA の濃度は Nano Drop ONE (Thermo Fisher Scientific) を用いて確認し、純度は Tapestation 4200 High Sensitivity RNA (Agilent Technologies) による RIN^e (RNA Integrity Number equivalent) の測定により確認した。RIN^e は RNA の分解度を客観的に評価し 1 から 10 の値でスコア化した指標である。測定結果は以下の表に示した (表 8)。

表 8. 得られた Total RNA の濃度と純度

Sample	Total RNA 濃度 (ng/ μL)	RIN ^e	容量 (μL)	総量 (μg)
DMSO_1	95.8	9.6	40	3.8
DMSO_2	108.0	9.6	40	4.3
1,2-NQ_1	132.1	9.7	40	5.3
1,2-NQ_2	132.8	9.7	40	5.3

2-2-3-3. RNA-Seq ライブラリー作製

2-2-3-3-1. poly (A) RNA の抽出と断片化

poly (A) RNA の抽出と断片化は NEBNext Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England BioLabs) と NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina (New England BioLabs) を用いて Total RNA 100 ng から行った。プロトコルは NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina Instruction Manual に従った。Oligo dT Beads による mRNA の単離を行い、単離した poly (A) RNA は NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina の NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer と NEBNext Random Primers を加えて、94 °C, 15 min インキュベートすることで断片化した。

2-2-3-3-2. 逆転写とアダプター配列の結合

断片化した poly (A) RNA は NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina の NEBNext First Strand Synthesis Enzyme Mix を用いて逆転写され、1 本鎖 cDNA を合成した。その後、NEBNext Second Strand Synthesis Enzyme Mix を用いて 2 本鎖の cDNA を合成した。続いて、AMPureXP (Beckman coulter) を用いて cDNA を精製した。その後、NEBNext Adaptor (New England BioLabs) を用いてアダプターを付加し、アダプターライゲーション産物は AMPureXP を用いて再度精製した。

2-2-3-3-3. cDNA の増幅とバーコード配列の付加

得られた cDNA は以下の条件で PCR (c1000 Touch thermal cycler, BioRad) をを行い、増幅することで、ライブラリーを作製した。サンプルを識別するため、NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (New England BioLabs) を用いて、バーコード配列を付加し、AMPureXP を用いて精製した。作製したライブラリーの濃度は Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、ライブラリーの長さの分布と純度は Tapestation 4200 D1000 (Agilent Technologies) を用いて解析した。目的の長さのライブラリーが作製されており、十分な濃度と純度を確認したのち、以降の解析を行った。

PCR 条件

98 °C	30 sec	} × 11 cycles
98 °C	10 sec	
65 °C	75 sec	
65 °C	5 min	
4 °C	∞	

2-2-3-4. Illumina NovaSeq 6000 を用いたシーケンス解析

NovaSeq 6000 SP Reagent Kit V1.5 (Illumina) を用いて、cDNA 領域 50bp 及びインデックス配列のシーケンスを行った。

2-2-3-5. 得られたデータの解析

データ解析には CLC Genomics Workbench 22.0.1 (GWB, QIAGEN) を使用した。

2-2-3-5-1. リードのトリミング

Illumina NovaSeq 6000 から出力された BCL ファイルを bcl2fastq v2.20.0.402 tool を用いて fastq ファイルに変換した。fastq ファイルを GWB にインポートし、Trim reads 2.6 でリードのトリミングを行った。パラメータ設定は 3'末端を 1 bp 削除するほかはデフォルト設定 (Trim using quality scores=Yes, Quality limit=0.05, Trim ambiguous nucleotides=Yes, Maximum number of ambiguities=2, Automatic read-through adapter trimming=Yes, Remove 5' terminal nucleotides=No, Remove 3' terminal nucleotides=Yes, Number of 3' terminal nucleotides=1, Remove on first read=Yes, Remove on second read (for paired reads) =Yes, Trim a fixed length=No, Maximum length=150, Trim end=Trim from 3'-end, Discard short reads=No, Discard long reads=No, Save discarded sequences=No, Save broken pairs=No, Create report=Yes) とした。

2-2-3-5-2. リードのマッピング

トリミング処理後のリードは GWB の RNA-Seq Analysis 2.6 を用いてリファレンス配列へのマッピングとタグカウントを行った。パラメータ設定は Expression value を TPM に、Count paired read as two を Yes にしたほかはデフォルト設定 (Reference type=Genome annotated with genes and transcripts, Reference sequence=Homo sapiens (hg19) sequence, Gene track=Homo sapiens (hg19) _Gene, mRNA track=Homo sapiens (hg19) _mRNA, Use spike-in controls=no, Mismatch cost=2, Insertion cost=3, Deletion cost=3, Length fraction=0.8, Similarity fraction=0.8, Global alignment=No, Strand specific=Both, Library type=Bulk, Maximum number of hits for a read=10, Count paired reads as two=Yes, Ignore broken pairs=Yes, Expression value=TPM, Calculate expression for genes without transcripts=Yes, Minimum read count fusion gene table=5, Create reads track=Yes, Create report=Yes, Create fusion gene table=Yes, Create list of unmapped reads=Yes) とした。リファレンス配列およびゲノムアノテーションは GWB の機能により Ensembl からダウンロードした Homo sapiens GRCh37 (hg19) release-75 を使用した。以下に URL を示す。リファレンス配列 (http://ftp.ensembl.org/pub/release-75/fasta/homo_sapiens/dna/Homo_sapiens.GRCh37.75.dna.chromosome.1.fa.gz) ゲノムアノテーション (http://ftp.ensembl.org/pub/release-75/gtf/homo_sapiens/Homo_sapiens.GRCh37.75.gtf.gz)

2-2-3-5-3. 発現解析

GWB の RNA-Seq Analysis tool を用いて、遺伝子 ID、転写産物 ID ごとのリード数をカウントし、遺伝子ごとのカウント数や遺伝子の長さ (Total gene reads) とリード量で正規化した値 (RPKM) および (TPM) を算出した。Total gene reads はそれぞれの遺伝子にマップされたリード数の合計であり、リファレンス配列にエクソンの情報がアノテーションされていた場合は、それぞれの遺伝子のエクソン領域にマップされたリード数の合計 (Total exon reads) の値である。以降のエンリッチメント解析では Total gene reads の値を遺伝子発現の指標として用いた。

2-2-4. 発現変動遺伝子の抽出およびエンリッチメント解析

以降の解析はすべて統計解析ソフト R (ver. 4.3.1) および RStudio (ver. 2023.09.1+494) にて行った。

2-2-4-1. 発現変動遺伝子 (DEGs) の抽出

DEGs の抽出は BiocManager (ver. 1.30.25) および edgeR (ver. 3.42.4) パッケージを用い

て行った⁶⁹⁻⁷²。なお、事前に Gene Symbol, Gene ID, ENSEMBL ID, Total gene reads を抜き出したエクセルファイル (Totalgenereads.xlsx) を作製し、解析に用いた。以下に詳細なスクリプトを示す (表 9)。

表 9. DEGs の抽出に用いたスクリプト

```
#BiocManager と edgeR のインストール
install.packages("BiocManager")
BiocManager::install("edgeR")

#RNA-seq のデータファイル読み込みと成形
library(openxlsx)
DATA<-read.xlsx("Totalgenereads.xlsx")
rownames(DATA)<-DATA[,1] #データの行名を SYMBOL に変換
DATA<-DATA[,3:7] #ENSEMBL と各 Gene counts のみ抽出
edgeRdata<-DATA[,2:5] #edgeR 計算用に Gene counts のみ抽出したデータセット

#edgeR で計算
library(edgeR)
group <- factor(c("C", "C", "D", "D")) #今回は"DMSO""DMSO""1,2-NQ""1,2-NQ".
d<-DGEList(counts=edgeRdata, group=group) #counts=edgeR 計算用データセットの名前
e<-calcNormFactors(d)
f<-estimateCommonDisp(e)
g<-estimateTagwiseDisp(f)
result <-exactTest(g)
topTags(result)
edgeRresult <-as.data.frame(topTags(result, n=nrow(edgeRdata)))
#result をテーブルデータに変換
edgeRresult$ENSEMBL <- DATA[,1]
#result テーブルデータに ENSEMBL ID の情報を追加

#DEGs 抽出
library(dplyr)
UP_DEGs<-edgeRresult%>%filter(logFC>=0.58 & FDR<=0.01)
#複数条件は & で書き並べる
write.table(UP_DEGs, file="UP_DEGs.txt",col.names = T,row.names = T,sep = "¥t")
#DEGs リストをファイルに描き出す
```

2-2-4-2. Volcano plot の描画

2-2-4-1.の項より得られた DEGs を用いて Volcano plot を描画した。描画には GraphPad Prism 10 (ver. 10.4.0) を用いた。

2-2-4-3. GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)

GSEA は GSEA ソフトウェア (ver. 4.1.0) を用いて行った^{73,74}。パラメータ設定はデフォルト設定のまま行った。

2-2-4-4. エンリッチメント解析

2-2-4-4-1. GO (Gene Ontology) 解析

GO 解析は clusterProfiler (ver. 4.8.2) パッケージを用いて発現上昇遺伝子および発現減少遺伝子の双方に対して行った⁷⁵⁻⁷⁷。データベースは org.Hs.eg.db (ver. 3.17.0) パッケージを用いた。以下に詳細なスクリプトを示す (表 10)

表 10. GO 解析に用いたスクリプト

```
#GO 解析の準備
BiocManager::install("org.Hs.eg.db")
library(org.Hs.eg.db)
library(clusterProfiler)

#GO 解析
egoMF <- enrichGO(gene = UP_DEGs$`Ensembl gene ID`,          #Ensembl ID を使用
  OrgDb           = org.Hs.eg.db,
  ont             = "MF",          #"BP", "CC", "MF"の指定
  pAdjustMethod = "BH",
  pvalueCutoff  = 1,
  qvalueCutoff  = 1,
  keyType       = "ENSEMBL",
  readable      = TRUE)

#dot plot による描画
clusterProfiler::dotplot(egoMF, x="-log10(pvalue)",
  orderBy="pvalue",
  decreasing=FALSE,
  showCategory=10,          #表示する GO ターム数の指定
  font.size=15,
  label_format=50)

#描画の書き出し
library(ggplot2)
ggsave("up_MF.png", width = 9, height = 9, dpi = 1000) #図の高さ, 幅, dpi の指定
```

2-2-4-4-2. KEGG Pathway 解析

KEGG Pathway 解析は clusterProfiler (ver. 4.8.2) パッケージを用いて発現上昇遺伝子および発現減少遺伝子の双方に対して行った。データベースは KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) パスウェイデータベースを用いた。なお、事前に HGNC BioMart (<https://biomart.genenames.org>) にて Gene Symbol から ENTERZ ID を取得し、エクセルファイルに追記した (UP_ENTERZ.xlsx)。以下に詳細なスクリプトを示す (表 11)。

表 11. KEGG Pathway 解析に用いたスクリプト

```
# KEGG 実行
library(clusterProfiler)
UP_ENTERZ<-read_excel("UP_ENTERZ.xlsx")
kegg <- enrichKEGG(gene = UP_ENTERZ$`NCBI gene ID`, pvalueCutoff = 0.05)
#ENTREZ ID のみ使用可能
as.data.frame(kegg)          #KEGG の結果を表示
clusterProfiler::dotplot(kegg, x="-log10(pvalue)",
  orderBy="pvalue",
  decreasing=FALSE,
  showCategory=10,
  font.size=12,
  label_format=43,
  color="pvalue")
browseKEGG(kegg, "hsa04668") #ドットプロットを描図→PDF に保存
                             #ブラウザでパスウェイを表示

#描画の書き出し
library(ggplot2)
ggsave("up_KEGG.png", width = 9, height = 9, dpi = 1000) #図の高さ, 幅, dpi の指定
```

2-2-5. RT-qPCR

2-2-5-1. Total RNA 抽出

Total RNA 抽出は 6-well plate に播種した A549 細胞を用いて行った。初めに培養上清を吸引後、冷 PBS 1 mL にて培養細胞を洗浄した。続いて TRI Reagent (Molecular Research Center) 1 mL を添加し、ピペティングして細胞をホモジナイズした。次にクロロホルム 200 μ L を加え、15 秒間ボルテックスした。その後、室温にて 3 分間静置し、4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm, 15 min 遠心した。次に、水層 400 μ L を新しい 1.5 mL チューブに移し、2-propanol 450 μ L (和光純薬) を添加して転倒混和した。室温にて 6 分間静置した後、4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm, 8 min 遠心した。続いて上清を吸引し、用時調製した 75 % Ethanol 1 mL を添加し、ボルテックスすることで RNA ペレットを洗浄した。その後 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm, 8 min 遠心し、上清を吸引した後、チューブの蓋を開けて 10 分間風乾した。得られた RNA ペレットに滅菌精製水 20 μ L を添加し、60 $^{\circ}$ C に設定したドライブロックバス (アズワン) にて 10 分間静置した。その後、混和し微量分光光度計 Nano Drop ONE (Thermo Fisher Scientific) により RNA 溶液の濃度および純度測定を行った。リファレンスには滅菌精製水を用いた。

2-2-5-2. cDNA 合成

cDNA (complementary DNA: 相補的 DNA) の合成は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて、製品のプロトコールに従って行った。下記の表に従って氷上にて反応液を作成した。反応液を調製後、サーマルサイクラー (BioRad, T100 Thermal cycler) を用いて以下のプログラムにて反応を行った。反応後の cDNA 溶液は -20 $^{\circ}$ C にて保存した。

反応液調製表

5 \times RT Master Mix	2 μ L
Total RNA	X μ L
RNase-free Water	(8-X) μ L
Total	10 μ L

反応条件

37 $^{\circ}$ C	15 min
50 $^{\circ}$ C	5 min
98 $^{\circ}$ C	5 min
4 $^{\circ}$ C	∞

2-2-5-3. プライマーの設計と入手

標的とする遺伝子の mRNA Locus number は NCBI のデータベースから取得した。得られた Locus number から Primer designing tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて Primer を作製した。なお、設定したパラメータについてはタカラバイオの「プライマー設計ガイドライン」(<https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/pdfs/prt3-1.pdf>) を参照した。本研究において

用いたプライマーの一覧を下記に記載する (表 12)。設計したプライマーはユーロフィンジェノミクス株式会社のスタンダードオリゴ合成サービスを利用して入手した。

表 12. RT-qPCR に用いたプライマーセット

<i>Gene</i>		Sequence (5' to 3')	T _m (°C)	Product (bp)
<i>CXCL1</i>	Forward	TGGCTTAGAACAAAGGGGCTTA	59.62	113
	Reverse	AGTAAAGGTAGCCCTTGTTCCTCC	60.25	
<i>CXCL3</i>	Forward	AGCACCAACTGACAGGAGAG	59.32	135
	Reverse	AGTCCTTTCCAGCTGTCCCTA	60.2	
<i>CXCL5</i>	Forward	ATCTTCGCTCCTCCAATCTCC	59.31	87
	Reverse	AGGAGGCTCATAGTGGTCAAGA	60.29	
<i>CXCL8</i>	Forward	CCAGGAAGAAACCACCGGAA	59.89	127
	Reverse	CTCCTTGGCAAACTGCACC	59.97	
<i>ACTB</i>	Forward	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA	67.49	295
	Reverse	CAGCGGAACCGCTCATTGCCACTGG	70.3	

2-2-5-4. qPCR

qPCR は KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて、製品のプロトコルに従って行った。まず、KOD SYBR qPCR Master Mix に 50×ROX reference dye を終濃度 0.1×となるように混合した。また、cDNA 溶液 10 μL に滅菌精製水 82 μL を添加し、希釈した (9.2 倍希釈)。下記の表に従ってサンプルを 0.1 mL 96-well PCR plate (WATSON) に調製した。ネガティブコントロールとして cDNA 溶液の代わりに滅菌精製水を用いた。プレートはシールで密封し、CFX Duet リアルタイム PCR システム (BioRad) にて PCR 反応を行った。PCR 条件は以下に示す条件にて行った。なお、融解曲線分析はデフォルトの設定で行った。解析対象遺伝子の Ct 値は内部標準遺伝子である ACTB の Ct 値で標準化し、 $\Delta\Delta Ct$ 法にて相対発現量を比較定量した。

反応液調製表

cDNA	4.6 μL
KOD SYBR qPCR Mix (0.1×ROX reference dye)	5.0 μL
Forward Primer (10 μM)	0.2 μL
Reverse Primer (10 μM)	0.2 μL
Total	10 μL

PCR 条件

98 °C	2 min	} × 40 cycles
98 °C	10 sec	
60 °C	10 sec	
68 °C	30 sec	
4 °C	∞	

2-2-6. Bisulfite-sequencing (Bisulfite-seq) による DNA メチル化解析

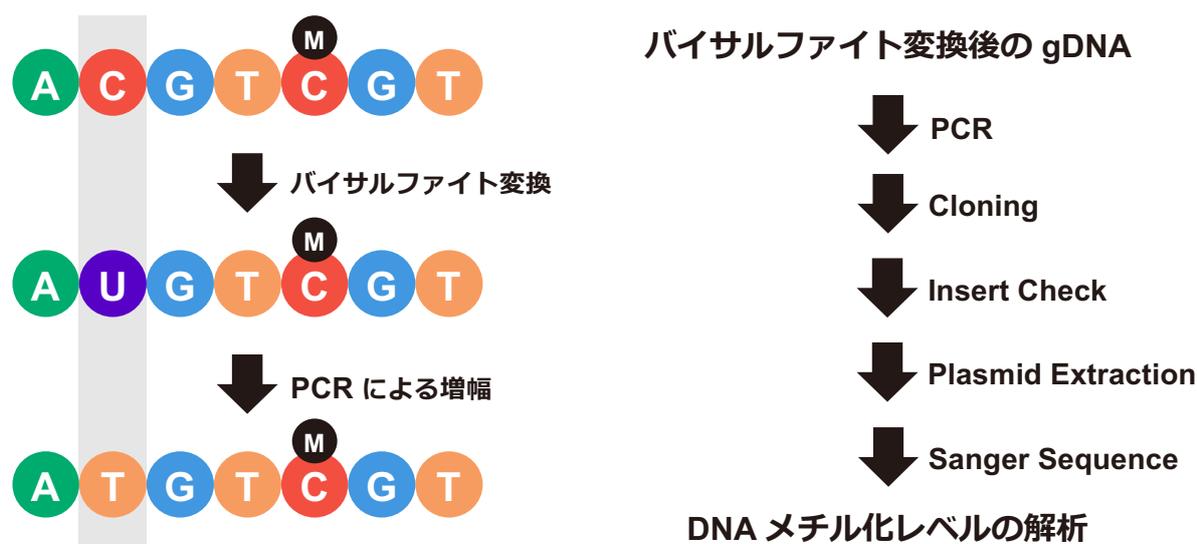


図 22. Bisulfite-sequencing の原理と概略

Bisulfite-sequencing は DNA メチル化研究において汎用的に行われる実験手法であり、特定の領域におけるシトシンメチル化レベルを解析できる (図 22)。Bisulfite 処理により、メチル化されていないシトシンはウラシルに変換される一方、メチル化シトシンは変換されず維持される。その結果、Bisulfite 処理した DNA を鋳型として PCR を行うと、ウラシルに変換された非メチルシトシンはチミンに変換されるが、メチル化シトシンはシトシンのまま増幅される。この差異を Sanger-sequencing により読み取ることでメチル化レベルを定量する。

2-2-6-1. ゲノム DNA (gDNA) 抽出

6 cm dish に播種した A549 細胞からの gDNA 抽出は Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いて、製品のプロトコルに従って行った。初めに培養上清を吸引後、冷 PBS 1 mL にて培養細胞を洗浄した。その後、Nuclei Lysis Solution 600 μ L を加え、ピペッティングにより細胞を溶解した。次に、Protein Precipitation Solution 200 μ L を加え、ボルテックスしたのち、氷上にて 5 分間インキュベートした。微量高速冷却遠心機にて 4 °C, 16,000 \times g, 4 min 遠心し、上清 700 μ L を新しいチューブに移した。さらに、4 °C, 16,000 \times g, 4 min 遠心し、上清 600 μ L を新しいチューブに移した。続いて、2-propanol 600 μ L を加えて転倒混和した。4 °C, 16,000 \times g, 1 min 遠心し、上清を丁寧に取り除いた。その後、70% Ethanol 600 μ L を加え、転倒混和した。4 °C, 16,000 \times g, 1 min 遠心し、上清を丁寧に取り除いたのち、チューブの蓋を開けて 15 分間風乾した。続いて、DNA

Rehydration Solution 100 μ L を加え、60 $^{\circ}$ C に設定したドライブロックバスにて1時間静置した。最後に、微量分光光度計 Nano Drop One により DNA 溶液の濃度および純度測定を行った。リファレンスには DNA Rehydration Solution を用いた。

2-2-6-2. バイサルファイト変換

バイサルファイト変換は EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kit (QIAGEN) を用いて、製品のプロトコルに従って行った。gDNA 溶液と Bisulfite Solution を溶解後、下記表に従って試薬を調製した。その後、サーマルサイクラーにセットし、下記条件で反応を行った。

反応液調製表

gDNA (1 μ g)	X μ L
Bisulfite Solution	85 μ L
DNA protect Buffer	35 μ L
RNase-free Water	(20-X) μ L
Total	140 μ L

反応条件

95 $^{\circ}$ C	5 min
60 $^{\circ}$ C	20 min
95 $^{\circ}$ C	5 min
60 $^{\circ}$ C	20 min
20 $^{\circ}$ C	∞

反応終了後、反応液を 1.5 mL チューブに移し、Buffer BL 310 μ L を加えてボルテックスした。続いて 100 % Ethanol 250 μ L を加えて再びボルテックスした。コレクションチューブに MinElute DNA spin column をセットし、反応液をアプライした。20 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm, 1 min 遠心し、ろ液を取り除いた。続いて、Buffer BW 500 μ L をアプライし、再び 20 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm, 1 min 遠心したのち、ろ液を取り除いた。次に Buffer BD 500 μ L をアプライし、室温にて15分間静置した。その後、Buffer BW 500 μ L をアプライし、20 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm, 1 min 遠心後、ろ液を取り除いた。この作業をもう1度繰り返したのち、100 % Ethanol 250 μ L をアプライし、20 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm, 1 min 遠心後、ろ液を取り除いた。スピнкаラムを新しいコレクションチューブにセットし、20 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm, 5 min 遠心した。その後、60 $^{\circ}$ C に設定したドライブロックバスにて10分間静置した。続いて、スピнкаラムを新しい1.5 mL チューブにセットし、Buffer EB 15 μ L をカラムの中心にアプライした。室温にて1分間静置し、20 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm, 1 min 遠心することでDNAを溶出した。最後に、微量分光光度計 Nano Drop One により DNA 溶液の濃度測定を行った。リファレンスには Buffer EB を用いた。

2-2-6-3. Bisulfite DNA の PCR による増幅

2-2-6-3-1. Bisulfite DNA 用プライマーの作製

プライマーの作製は MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>) を用いて行った⁷⁸. DNA 配列の取得は UCSC ゲノムブラウザ (<https://genome.ucsc.edu>) および IGV (ver. 2.18.2) ソフトウェアを用いた⁷⁹⁻⁸³. 本研究において使用した Bisulfite DNA 用プライマーを下記に示す (表 13).

表 13. Bisulfite DNA 用プライマーセット

Region	Sequence (5' to 3')		Product (bp)
Region 1	Forward	TTATTAAATTGTGGAGTTTTAGTATTTTAA	275
	Reverse	CTCTACTATCTCTAAAAATTTATACCTTAT	
Region 2	Forward	ATTTAATTTAATTGGTTAAATAAGGGTAAA	466
	Reverse	CAAATAAAAATTCAAAAAAATTTTTAATAA	

2-2-6-3-2. PCR for Bisulfite DNA

Bisulfite DNA の PCR は TaKaRa EpiTaq HS (for bisulfite-treated DNA) を用いて、製品のプロトコルに従って行った。下記表に従って氷上にて試薬を調製した。その後、サーマルサイクラーにセットし、下記条件で反応を行った。反応終了後、反応液はアガロースゲル電気泳動に供し、単一の産物が増幅されていることを確認した。単一の産物が増幅されていない場合はゲル切り出しを行った。

反応液調製表

	Region 1	Region 2
Bisulfite DNA solution (50 ng)	X μ L	Y μ L
RNase-free Water	(21.75-X) μ L	(23.75-X) μ L
TaKaRa EpiTaq HS	0.25 μ L	0.25 μ L
10×EpiTaq PCR buffer	5 μ L	5 μ L
25 mM MgCl ₂	5 μ L	5 μ L
2.5 mM dNTP mixture	8 μ L	6 μ L
Forward Primer (4 μ M)	5 μ L	5 μ L
Reverse Primer (4 μ M)	5 μ L	5 μ L
Total	50 μ L	50 μ L

PCR 条件

Region 1	Region 2	
98 °C	98 °C	10 sec
59 °C	49 °C	30 sec
72 °C	72 °C	30 sec
4 °C	4 °C	∞

} ×40 cycles

2-2-6-4. アガロースゲル電気泳動

2-2-6-4-1. 試薬調製

1×TAE buffer 40 mM Tris
 40 mM Acetic acid
 1 mM EDTA (pH8.0)

2-2-6-4-2. アガロースゲル作製

アガロースゲルはアガロース S (NIPPON GENE) を 1×TAE buffer に溶解し、電子レンジで加熱後、型に流し込むことで作製した。PCR 産物の長さに応じて 0.5 %-2 %のアガロースゲルを作製し、電気泳動を行った。

2-2-6-4-3. 電気泳動

PCR 産物 5 µL と Gel Loading Dye (6×) (New England BioLabs) 1 µL を混和し、その全量を 1×TAE buffer で満たした電気泳動槽にアプライした。DNA マーカーとして 50 bp DNA Ladder (NIPPON Genetics) を用いた。100V の電圧で 30 分間泳動したのち、臭化エチジウム (EtBr) を加えた 1×TAE buffer 中で 20 分間振盪させた。その後、Gel Doc EZ Imager (BioRad) を用いて Image Lab Software (BioRad) により PCR 産物のバンドを解析した。

2-2-6-5. ゲル切り出し (オプション)

ゲル切り出しは Bisulfite DNA の PCR により単一の産物が増幅されなかった場合にのみ行った。ゲル切り出しは FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN) を用いて、製品のプロトコルに従って行った。ゲル切り出しを行う際は 2-2-6-3.項の PCR 産物を全量電気泳動に供した。電気泳動後のアガロースゲルはスパーテルを用いて目的の長さの PCR 産物を切り出した。1.5 mL チューブに切り出したアガロースゲルと FADF buffer 500 µL を加え、55 °C に設定したドライブロックバスで 15 分間インキュベートした。なお、インキュベート中は 3 分毎にボルテックスした。アガロースゲルが完全に溶解し、サンプルが室温に戻ったことを確認したのち、FADF column に 750 µL をアプライした。20 °C, 11,000×g, 1 min 遠心し、ろ液を取り除いた。次に、Wash buffer 750 µL をアプライし、20 °C, 11,000×g, 1 min 遠心したのち、ろ液を取り除いた。続いて、20 °C, 18,000×g, 5 min 遠心し、カラムを新しい 1.5 mL チューブにセットした。30 µL の Elution buffer をカラムの膜中央にアプライし、室温で 1 分間静置したのち、20 °C, 18,000×g, 1 min 遠心することで、目的の長さの産物を溶出した。

2-2-6-6. PCR 産物の精製

PCR 産物の精製はゲル切り出しを行わない場合にのみ行った。PCR 産物の精製は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて、製品のプロトコルに従って行った。電気泳動に供した残りの PCR 産物 45 μ L を 1.5 mL チューブに移し、Buffer PB 225 μ L を加えてボルテックスした。溶液が紫色を示した場合、3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH5.2) 10 μ L を加え、pH を調整した。溶液が黄色であることを確認し、全量を QIAquick column にアプライした。20 $^{\circ}$ C, 17,900 \times g, 1 min 遠心し、ろ液を取り除いた。Buffer PE 750 μ L をアプライし、室温にて 5 分間静置したのち、20 $^{\circ}$ C, 17,900 \times g, 1 min 遠心し、ろ液を取り除いた。その後、20 $^{\circ}$ C, 17,900 \times g, 5 min 遠心し、カラムを新しい 1.5 mL チューブにセットした。Buffer EB 30 μ L をカラムの膜中央にアプライし、室温で 1 分間静置したのち、20 $^{\circ}$ C, 17,900 \times g, 1 min 遠心することで、DNA 産物を精製した。精製後の DNA 産物は微量分光光度計 Nano Drop One により濃度および純度測定を行った。リファレンスには Buffer EB を用いた。

2-2-6-7. TA クローニング

TA クローニングは Mighty TA-cloning Kit (TaKaRa) を用いて、製品のプロトコルに従って行った。精製後の DNA 産物を用いて下記表に従って反応液を調製した。その後、サーマルサイクラーにて 16 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。

反応液調製表

PCR 産物	1 μ L
pMD20-T vector	1 μ L
Ligation Mighty Mix	5 μ L
RNase-free Water	3 μ L
<hr/>	
Total	10 μ L

2-2-6-8. トランスフォーメーション

2-2-6-8-1. 試薬調製

LB 培地	1 % Bacto Tryptone
	0.5 % Bacto Yeast Extract
	1 % NaCl
LB-Amp-IPTG-X-gal plate	1 % Bacto Tryptone
	0.5 % Bacto Yeast Extract
	1 % NaCl
	1.5 % Bacto Agar
	50 μ g/mL Ampicillin Sodium
	40 μ g/mL X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside)
	0.2 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)

2-2-6-8-2. LB-Amp-IPTG-X-gal plate の作製

LB-Amp-IPTG-X-gal plate は 2-2-6-8-1.の項に従って溶液を調製し、オートクレーブした。その後、シャーレに流し込み、クリーンベンチ内で 30 分程度風乾させた。溶液が固まっていることを確認したのち、暗所にて一晩放置した。翌日、完成した Plate はアルミホイルで包み、4℃にて保管した。

2-2-6-8-3. トランスフォーメーション

トランスフォーメーションはクリーンベンチ内で行った。Competent Quick DH5α (TOYOBO) は指先で急速に解凍した。慎重にピペティングしたのち、DH5α 50 μL を新しいチューブに移し、TA クローニング産物 5 μL を加え、優しく混ぜた。氷上にて 5 分間静置し、42℃に設定した水浴にて 30 秒間インキュベートした。その後、再び氷上にて 3 分間静置し、LB 培地 200 μL を加えて慎重にピペティングした。必要に応じて、37℃にて 1 時間程度回復培養を行った（翌日のコロニー形成数が極端に少なかった場合）。LB-Amp-IPTG-X-gal plate に 100~200 μL を加熱滅菌したガラス製コンラージ棒を用いて塗布した（翌日のコロニー形成数次第で柔軟に塗布量は変更した）。クリーンベンチ内にて 15 分間風乾し、37℃にて最大 16 時間インキュベートした。

2-2-6-9. Colony Check PCR

Colony Check PCR は EmeraldAmp PCR Master Mix (TaKaRa) を用いて製品のプロトコルに従って行った。コロニーが十分に形成されていることを確認したのち、下記の表に従って反応液を 8 連チューブに調製した。反応液を調製後、選定したコロニーの一部を 20 μL チップで掻き取り、反応液に加えた。コロニーは白色であり、独立しているものを選定した。なお、用いたプライマーは以下の表に示した（表 14）。その後、サーマルサイクラーにセットし、下記条件で反応を行った。

反応液調製表

EmeraldAmp PCR Master Mix	5 μL
M13 Primer M4 (10 μM)	0.2 μL
M13 Primer RV (10 μM)	0.2 μL
RNase-free Water	4.6 μL
Total	10 μL

表 14. Colony Check PCR に用いたプライマーセット

Name	Sequence (5' to 3')	
M13	M4	GTTTTCCCAGTCACGAC
	RV	CAGGAAACAGCTATGAC

PCR 条件

98 °C	10 sec	} ×25 cycles
55 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
4 °C	∞	

反応終了後、2-2-6-4.項で示したアガロースゲル電気泳動を行い、インサートの有無を確認した。(インサートが挿入されているコロニーでは、挿入されていないコロニーと比べてバンドのシフトアップが見られる.)

2-2-6-10. プラスミド DNA の抽出

2-2-6-10-1. 小スケール培養

14 mL ラウンドチューブに 50 µg/mL Ampicillin Sodium を含む LB 培地を 3 mL 加え、Colony Check PCR にて陽性であったコロニーを 200 µL チップで全量掻き取り、チップごと培地に加えた。その後、37 °Cにて攪拌しながら 16 時間培養した。

2-2-6-10-2. プラスミド DNA の抽出

プラスミド DNA の抽出は FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN) を用いて製品のプロトコルに従って行った。大腸菌液が十分に濁っていることを確認したのち、菌液を 1.5 mL tube に移し、20 °C, 11,000×g, 1 min 遠心した。上清を取り除き、RNase A を含む FAPD1 Buffer 250 µL を加えてボルテックスすることでペレットを再懸濁した。次に FADP2 Buffer 250 µL を加え、10 回転倒混和したのち、3 分間静置した。次に、FAPD3 Buffer 350 µL を加え、10 回転倒混和した。20 °C, 18,000×g, 10 min 遠心し、コレクションチューブにセットした FAPD column に上清 700 µL をアプライした。次に、20 °C, 11,000×g, 30 sec 遠心し、ろ液を取り除いた。WF Buffer 400 µL をアプライし、20 °C, 11,000×g, 30 sec 遠心したのち、ろ液を取り除いた。Wash Buffer 700 µL をアプライし、20 °C, 11,000×g, 30 sec 遠心したのち、ろ液を取り除いた。20 °C, 18,000×g, 5 min 遠心し、カラムを新しい 1.5 mL チューブにセットした。Elution Buffer 50 µL をカラムの膜中央にアプライし、1 分間静置したのち、20 °C, 18,000×g, 1 min 遠心することでプラスミド DNA を溶出した。抽出したプラスミド DNA は微量分光光度計 Nano Drop One により濃度および純度測定を行った。リファレンスには Elution Buffer を用いた。

2-2-6-11. サンガーシーケンス

サンガーシーケンスは AZENTA 社が提供するサンガーシーケンス受託解析サービスを利用した (<https://www.genewiz.com/ja-JP/Public/Services/Sanger-Sequencing>)。サンプル調製はサンプル提出ガイドラインに従って行った。反応液は下記の表に従って 8 連チューブもしくは 96 ウェルプレートに調製した。サンプル調製後、封緘し、代理店に送付を依頼した。

反応液調製表

プラスミド DNA 溶液 (500 ng)	X μ L
M13 Primer RV (10 μ M)	0.2 μ L
RNase-free Water	(14.8-X) μ L
Total	15 μ L

取得したデータを基に、QUMA (http://quma.cdb.riken.jp/top/quma_main_j.html) を用いて DNA メチル化解析を行った⁸⁴。QUMA では標的配列のシーケンスデータ (Bisulfite 変換前) が必要になるため、UCSC ゲノムブラウザ (<https://genome.ucsc.edu>) から取得などすることで事前に準備しておく。

2-2-7. ChIP-qPCR

ChIP-qPCR はクロマチン免疫沈降と qPCR の手法を組み合わせることで、特定のゲノム領域における DNA-タンパク質相互作用を定量できる実験手法であり、分子生物学分野において汎用的に行われている。

2-2-7-1. 試薬調製

SM buffer	2 % FBS in PBS
ChIP-RIPA buffer	50 mM Tris-HCl (pH8.0) 150 mM NaCl 2 mM EDTA (pH8.0) 1 % NP-40 0.5 % Sodium deoxycholate 0.1 % SDS
ChIP buffer	10 mM Tris-HCl (pH8.0) 200 mM NaCl 1 mM CaCl ₂ 0.5 % NP-40
ChIP-Wash buffer	10 mM Tris-HCl (pH8.0) 450 mM NaCl 1 mM CaCl ₂ 0.5 % NP-40
TE buffer	10 mM Tris-HCl (pH8.0) 1 mM EDTA (pH8.0)
ChIP-Elution buffer	50 mM Tris-HCl (pH8.0) 10 mM EDTA (pH8.0) 1 % SDS

2-2-7-2. ChIP

2-2-7-2-1. パラホルムアルデヒドによるクロマチンの固定

10 cm dish に播種した A549 細胞の培養上清を除去し、冷 PBS 5 mL で洗浄した。その後、トリプシン処理することで細胞ペレットを回収した。細胞ペレットは PBS にて洗浄し、20 °C、1,000 rpm、5 min 遠心したのち、上清を除去した。その後、1 % パラホルムアルデヒド 150 μ L を加え、ピペッティング後、37 °C に設定した水浴にて 5 分間インキュベートした。インキュベート終了後即座に氷上に移し、SM buffer 1.4 mL を加えて、転倒混和した。4 °C、3,000 rpm、5 min 遠心し、上清を取り除いた。その後、SM buffer 200 μ L を加えて、ピペッティングし、4 °C、5,000 rpm、1 min 遠心した。上清を取り除いたのち、同様の操作をもう 1 度繰り返した。細胞ペレットは SM buffer にて再懸濁し、セルカウントを行って 1 サンプルあたり 2.0×10^6 cells となるように 1.5 mL チューブに分注した。その後、4 °C、5,000 rpm、1 min 遠心し、上清を取り除いて細胞ペレットを得た。

2-2-7-2-2. ソニケーションによるクロマチンの断片化

クロマチン固定後の細胞ペレットに 0.5 \times EDTA-free Protease Inhibitor (Roche) を含む ChIP-RIPA buffer 550 μ L を加えてピペッティングにより完全に懸濁した。次に、氷上にて 10 分間静置し、ソニケーター (TAITEC) を用いてソニケーションを行った。ソニケーションは氷上にて 50 % の強さで 10 秒間行い、60 秒間静置するというサイクルを 15 回繰り返した。その後、4 °C、15,000 rpm、15 min 遠心し、上清を得た。

2-2-7-2-3. 免疫沈降

ChIP buffer 1 mL を含む 1.5 mL チューブに Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) 20 μ L を 200 μ L フィルターチップを用いて加え、転倒混和した。Spin Magnet (Thermo Fisher Scientific) 上で 1 分間静置することでビーズを吸着し、上清を慎重に取り除いた。次に、ChIP buffer 1 mL を加え、転倒混和したのち、Spin Magnet 上で 1 分間静置し、上清を慎重に取り除いた。同様の操作をもう 1 度繰り返したのち、ChIP buffer 500 μ L を加えた。続いて、100 mg/mL BSA (和光純薬) 5 μ L を加えたのち、ネガティブコントロールとして IgG 抗体および標的タンパク質抗体 1 μ g を加えた。その後、4 °C にて 1~3 時間程度ローテートすることで、ビーズと抗体を結合させた。抗体結合したビーズに ChIP buffer 500 μ L を加え、転倒混和したのち Spin Magnet 上で 1 分間静置し、上清を慎重に取り除いた。同様の操作をもう 1 度繰り返したのち、クロマチン断片化後の上清 500 μ L を加え、4 °C にて 1 晩ローテートした。なお、Input サンプルとして上清 25 μ L を新しい 1.5 mL チューブに移した。用いた抗体は下記表に示した (表 15)。

表 15. ChIP-qPCR に用いた抗体

Target	Source	Conc.	Product No.	Manufacturer
IgG	Rabbit	1000 μ g/mL	#148-09551	和光純薬
NF- κ B p65	Rabbit	208 μ g/mL	#8242	Cell Signaling Technology
c-Fos	Rabbit	108 μ g/mL	#2250	Cell Signaling Technology
STAT3	Rabbit	500 μ g/mL	#10253-2-AP	Proteintech

2-2-7-2-4. ビーズの洗浄

免疫沈降の翌日に逆架橋による精製を行った。免疫沈降後のサンプルは Spin Magnet 上で1分間静置し、上清を慎重に取り除いた。続いて、ChIP-Wash buffer 1 mL を加えて転倒混和したのち、Spin Magnet 上で1分間静置し、上清を慎重に取り除いた。同様の操作を3度繰り返すことで、ビーズを洗浄した。次に、TE buffer 500 μ L を加えて転倒混和したのち、Spin Magnet 上で1分間静置し、上清をピペットマンにて慎重に取り除いた。同様の操作をもう1度繰り返し、上清を完全に取り除いた。なお、抗体の確認のため、初回実施時のみ1 \times SDS Sampling Buffer 50 μ L を加え95 $^{\circ}$ Cにて10分間加熱処理し、W.B.に供した (W.B.の詳細は後述する)。

2-2-7-2-5. 逆架橋および精製

以降の操作は Beads サンプルと Input サンプルの両方に対して行った。続いて、ChIP-Elution buffer 47.5 μ L (Input サンプルは22.5 μ L) を加えて、ボルテックスした。次に、5M NaCl 2.5 μ L を加えてボルテックスした。65 $^{\circ}$ Cに設定したドライブロックバスにて4時間インキュベートした。なお、インキュベート中は1時間ごとにボルテックスとスピンドアウンを行った。続いて、RNase A 1.25 μ L を加えて、ボルテックスし、37 $^{\circ}$ Cの水浴にて30分間インキュベートした。次にProteinase K 0.25 μ L を加えて、ボルテックスし、50 $^{\circ}$ Cに設定したドライブロックバスにて1時間インキュベートした。インキュベート終了後、Spin Magnet を用いて上清のみを回収し、QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製を行った。手順は2-2-6-6.項に従った。

2-2-7-2-6. qPCR

qPCR は KOD SYBR qPCR Mix を用いて行った。精製後のサンプルは RNase-free water にて10倍希釈し、qPCR に用いた。qPCR は2-2-5-4.qPCR の項にしたがって行い、用いたプライマーは下記表に示した (表16)。なお、定量値は% input 法にて算出した。

表 16. ChIP-qPCR に用いたプライマーセット

Name		Sequence (5' to 3')	Tm ($^{\circ}$ C)	Product (bp)
ChIP-1	Forward	CTCAATCTAACTGGTTAAACAAGGG	57.85	95
	Reverse	ACGTGAATGACATTGTACTGGA	57.73	
ChIP-2	Forward	AACTGGCGAATGGGACTTTAGA	59.70	112
	Reverse	CCATTACCTATCTACCCACCTCTG	49.47	

2-2-8. Luciferase assay

Luciferase assay はプロモーターやエンハンサーなど転写調節領域の転写活性を高感度に測定できる実験系であり、汎用されている。

2-2-8-1. Luciferase ベクターの構築

Luciferase ベクターは pGL4.14 [luc2/Hygro] Vector を鋳型として、CXCL8 エンハンサー領域およびプロモーター領域を挿入することにより作製した。初めにエンハンサー領域を挿入し、その後プロモーター領域を挿入する形で構築した。

2-2-8-1-1. インサートの調製

インサートは A549 細胞から抽出した gDNA から調製した。gDNA 抽出は 2-2-6-1.項に従って行った。gDNA は KOD-plus-Neo (TOYOBO) を用いて増幅し、制限酵素処理によりインサートの切り出しを行った。反応液は下記表に従って試薬を調製した。なお、用いたプライマーは以下の表に示した (表 17)。

反応液調製表

KOD-Plus-Neo (1U/ μ L)	1 μ L
10 \times PCR Buffer for KOD-Plus-Neo	5 μ L
2 mM dNTPs	5 μ L
25 mM MgSO ₄	3 μ L
10 mM Forward Primer	1.5 μ L
10 mM Reverse Primer	1.5 μ L
Template gDNA (50 ng)	X μ L
RNase-free Water	(33-X) μ L
Total	50 μ L

表 17. Luciferase vector の作製に用いたプライマーセット

Name	Sequence (5' to 3')	
Promoter	Forward	CCCAGATCTTAGGAAGTGTGATGACTCAGGTTT
	Reverse	CCCAAGCTTAGTTTGTGCCTTATGGAGTGCT
Enhancer	Forward	CCCGGTACCTGTGAAGCAGTGTTGGTAATAGC
	Reverse	CCCGAGCTCTAAATCCCCTTATTTTCCCCTGC

プライマーは Primer Blast を用いて目的領域に設計したのち、使用する制限酵素の認識配列 (6 塩基分) および CCC を 5' 側に追加することで作製した。反応液調製後、サーマルサイクラーにセットし、下記条件で反応を行った。反応終了後、反応液を電気泳動に供し、2-2-6-6.項に従って PCR 産物の精製を行い、インサートとした。

PCR 条件

Enhancer		Promoter		
95 °C	3 min	95 °C	3 min	
98 °C	15 sec	98 °C	15 sec	} 15 cycles
65 °C (-0.5 °C/cycle)	30 sec	65 °C (-0.5 °C/cycle)	30 sec	
68 °C	20 sec	68 °C	10 sec	
98 °C	15 sec	98 °C	15 sec	} 20 cycles
55 °C	30 sec	55 °C	30 sec	
68 °C	20 sec	68 °C	10 sec	
68 °C	7 min	68 °C	7 min	
12 °C	∞	12 °C	∞	

2-2-8-1-2. インサートおよびベクターの制限酵素処理

制限酵素 4 種を用いてインサートおよびベクターから目的配列の切り出しを行った。用いた制限酵素は以下の表に示した (表 18)。

表 18. Luciferase vector の作製に用いた制限酵素

Name	Conc.	Product No.	Manufacture	Usage
KpnI-HF	100,000 units/mL	#R3142M	New England Biolabs	Enhancer cloning
SacI-HF	20,000 units/mL	#R3156S	New England Biolabs	
HindIII	20,000 units/mL	#R0104S	New England Biolabs	Promoter cloning
BglII	10,000 units/mL	#FG-BglII	NIPPON Genetics	

下記の表に従って反応液を調製し、37 °C に設定したインキュベーターもしくはサーマルサイクラーにて 60 分間反応させた。

反応液調製表 (エンハンサー配列)

Vector		Insert	
DNA (10 µg)	X µL	DNA (3 µg)	Y µL
KpnI-HF	1 µL	KpnI-HF	0.3 µL
SacI-HF	5 µL	SacI-HF	1.5 µL
CutSmart Buffer	5 µL	CutSmart Buffer	5 µL
RNase-free Water	(39-X) µL	RNase-free Water	(43.2-Y) µL
Total	50 µL	Total	50 µL

エンハンサーのクローニングにおいては Double digestion が可能であったため、反応終了後、2-2-6-5.項に従ってゲル切り出しによる精製を行い、制限酵素処理を完了した。一方で、プロモーターのクローニングにおいては Double digestion が不可能であったため、HindIIIによる切断を行ったのち、PCR産物を精製した上で、BglIIIによる切断を実施した。なお、PCR産物の精製は2-2-6-6.項に従って実施したが、Elution buffer として 60 °Cに加熱した RNase-free Water を用いた。BglIIIによる切断終了後、2-2-6-5.項に従ってゲル切り出しを行い、精製することで制限酵素処理を完了させた。

反応液調製表（プロモーター配列）

Part1			
Vector		Insert	
DNA (10 µg)	X µL	DNA (1 µg)	Y µL
HindIII	5 µL	HindIII	1 µL
2.1 Buffer	5 µL	2.1 Buffer	5 µL
RNase-free Water	(40-X) µL	RNase-free Water	(44-Y) µL
Total	50 µL	Total	50 µL

Part2			
Vector		Insert	
Purified DNA	30 µL	Purified DNA	30 µL
BglII	5 µL	BglII	2 µL
FastCut Buffer	5 µL	FastCut Buffer	5 µL
RNase-free Water	10 µL	RNase-free Water	13 µL
Total	50 µL	Total	50 µL

2-2-8-1-3. ライゲーション

ベクターとインサートを繋ぐライゲーション反応は Ligation High Ver.2 (TOYOBO) を用いて行った。前項によって得られた制限酵素処理後の DNA は微量分光光度計 Nano Drop One により濃度測定を行った。得られた濃度と DNA の長さ (bp) を元に、NEBioCaluculator (<https://nebiocalculator.neb.com>) を用いて反応に必要な DNA 量を算出し、反応液を下記表に従って調製した。なお、ベクター/インサートのモル比は 1:5 とした。その後、サーマルサイクラーにて 16 °Cで 30 分間反応させたのち、2-2-6-8-3.項に従ってトランスフォーメーションを行った。プレートは LB-Amp プレートを用いた。

反応液調製表

Insert DNA	X μ L
Vector DNA	Y μ L
Ligation High	7.5 μ L
RNase-free Water	(7.5-X-Y) μ L
Total	15 μ L

2-2-8-1-4. Insert Check PCR

Insert Check PCR は KOD-plus-Neo (TOYOBO) を用いて行った。コロニーが十分に形成されていることを確認したのち、下記の表に従って反応液を 8 連チューブに調製した。反応液を調製後、選定したコロニーの一部を 20 μ L チップで掻き取り、反応液に加えた。Sequence Primer は AZENTA 社の推奨条件に従って作製し、用いたプライマーは以下の表に示した (表 19)。(<https://www.genewiz.com/Public/Resources/Sample-Submission-Guidelines/Sanger-Sequencing-Sample-Submission-Guidelines/technical-notes#sanger-sequence>) 反応液調製後、サーマルサイクラーにセットし、2-2-8-1-1.項と同様の PCR 条件にて反応を行った。反応終了後、2-2-6-4.項で示したアガロースゲル電気泳動を行い、インサートの有無を確認した。

反応液調製表

KOD-Plus-Neo (1U/ μ L)	0.5 μ L
10 \times PCR Buffer for KOD-Plus-Neo	2.5 μ L
2 mM dNTPs	2.5 μ L
25 mM MgSO ₄	1.5 μ L
10 mM Sequence Forward Primer	0.75 μ L
10 mM Sequence Reverse Primer	0.75 μ L
RNase-free Water	16.5 μ L
Total	25 μ L

表 19. Luciferase vector の sequencing に用いたプライマーセット

Name	Sequence (5' to 3')	
Sequence	Forward	ACATTTCTCTGGCCTAACTG
	Reverse	AATGTCCACCTCGATATGTG

2-2-8-1-5. プラスミド DNA の抽出

インサートの挿入が確認できたコロニーは 2-2-6-10.項に従ってプラスミド DNA 抽出に供した。

2-2-8-1-6. サンガーシーケンス

抽出したプラスミドは 2-2-6-11.項に従ってサンガーシーケンスを行い、DNA 配列データ

を取得することで、ルシフェラーゼベクターの配列を確認した。

2-2-8-2. Luciferase assay

本解析ではトランスフェクション効率を考慮し、ヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞を用いた。24-well plate に 2.0×10^5 cells/mL となるように播種した HEK293T 細胞に所属研究室で保有している p3×FLAG-CMV10-DNMT3B1 (DNMT3B ベクター) および構築したルシフェラーゼベクターをトランスフェクションし、その 6 時間後に終濃度 10 μ M となるよう 1,2-NQ を処理し、処理後 72 時間時点において Luciferase の発光を測定した。

2-2-8-2-1. トランスフェクション

トランスフェクションは Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) および PEI-MAX (Polysciences) を用いて行った。なお、本項では 24-well plate における試薬分量を示しており、細胞のスケールに応じて試薬分量は変更する必要がある。Opti-MEM 50 μ L に PEI-MAX 2 μ L を加え、慎重にボルテックスすることで混和し、これを A 液とした。A 液は室温にて 5 分間インキュベートした。続いて、Opti-MEM 50 μ L に 400 ng に相当するルシフェラーゼベクターおよび DNMT3B ベクターを加え、慎重にボルテックスすることで混和し、これを B 液とした。A 液と B 液を混ぜ合わせ、慎重にボルテックスしたのち、室温にて 20 分間インキュベートした。インキュベート後、A+B 液 100 μ L を底面の細胞に直接触れないように、液面を傾け、最も深い部分に緩やかに加えた。その後、6 時間後に培地交換を行なった。

2-2-8-2-2. Luciferase の発光検出

Luciferase の検出には Luciferase Assay System (Promega) を用いて、製品のプロトコルに従って行なった。HEK293T 細胞は培養上清を除去し、冷 PBS 1 mL で洗浄した。その後、Luciferase Cell Culture Reagent 100 μ L を加え、スクレイパーにて細胞を回収後、氷上に静置した。15 秒間ボルテックスした後、4 $^{\circ}$ C, 12,000 \times g, 2 min 遠心し、上清 20 μ L を SPL 96-well white plate (Bio medical sciences) に移した。Luciferase Assay Reagent 100 μ L を加え、10 秒間の発光をルミノメーターにより測定した。

2-2-9. 核抽出

核抽出は Nuclear Extract Kit (Active Motif) を用いて製品のプロトコルに従って行なった。10 cm dish に播種した A549 細胞は培養上清を除去し、冷 PBS 5 mL で洗浄した。その後、Phosphatase/PBS 3 mL を加え、スクレイパーにて細胞を丁寧にはがし、15 mL チューブに加えた。その後、4 $^{\circ}$ C, 1000 \times g, 5 min 遠心し、上清を丁寧に取り除いた。続いて、1 \times Hypotonic Buffer 500 μ L を加え、ピペッティングした後、1.5 mL チューブに移し、氷上にて 15 分間反応させた。次に、10% NP-40 25 μ L を加え、10 秒間ボルテックスした。その後、4 $^{\circ}$ C, 14,000 \times g, 30 sec 遠心し、上清を細胞質画分とした。上清を丁寧に取り除いた核ペレットに Complete Lysis Buffer (10 mM DTT 5 μ L, Lysis Buffer AM1 44.5 μ L, Protease Inhibitor Cocktail 0.5 μ L) 50 μ L を加え、ピペッティングした後、10% NP-40 2.5 μ L を加え、10 秒間ボルテックスすることにより再懸濁した。続いて、4 $^{\circ}$ C に設定した Thermomixer comfort (Eppendorf) にて、300 rpm で 30 分間インキュベートした。次に、30 秒間ボルテックスし、4 $^{\circ}$ C, 14,000 \times g, 10 min 遠心することで、上清を核画分とした。

2-2-10. NF-kB p65 核移行解析

2-2-10-1. 核抽出サンプルのタンパク質定量

核抽出サンプルのタンパク質定量は Bradford Protein Assay Kit (TaKaRa) を用いて、製品のプロトコルに従って行なった。

2-2-10-1-1. 細胞質サンプルのタンパク質定量

検量線作成用に 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の BSA 溶液を BSA ストック溶液から RNase-free Water で希釈することにより作製した。各サンプルと BSA 溶液 4 μL を 96-well multi dish (BioLite) にアプライしたのち、Bradford Dye Reagent 200 μL を加え、室温にて 5 分間インキュベートした。その後、iMark マイクロプレートリーダー (BioRad) にて 595 nm における各サンプルの吸光度を測定した。また、BSA 溶液における検出値から検量線を作成し、サンプル溶液のタンパク質濃度を算出した。

2-2-10-1-2. 核サンプルのタンパク質定量

界面活性剤の影響をできる限り除くため、Complete Lysis Buffer はタンパク質定量用に 250 倍に希釈して用いた。検量線作成用に 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の BSA 溶液を BSA ストック溶液から 250 倍に希釈した Complete Lysis Buffer で希釈することにより作製した。また、各サンプルも RNase-free Water を用いて 250 倍に希釈したものを用いた。各サンプルと BSA 溶液 100 μL を 96-well multi dish (BioLite) にアプライしたのち、Bradford Dye Reagent 100 μL を加え、室温にて 5 分間インキュベートした。その後、iMark マイクロプレートリーダー (BioRad) にて 595 nm における各サンプルの吸光度を測定した。また、BSA 溶液における検出値から検量線を作成し、サンプル溶液のタンパク質濃度を算出した。

2-2-10-2. Western blotting (W.B.)

2-2-10-2-1. 試薬調製

4×SDS Sampling Buffer	250 mM Tris-HCl (pH7.4) 20 % 2-mercaptoethanol 40 % glycerol 8 % SDS 0.02 % bromophenol blue
SDS-PAGE Running Buffer	25 mM Tris 192 mM Glycine 1 % SDS
Transfer Buffer	25 mM Tris 192 mM Glycine 20 % Methanol
Running Gel	10 % Acrylamide/Bis 250 mM Tris-HCl (pH8.6) 0.1 % SDS 0.1 % APS

Stacking Gel	0.06 % TEMED
	4.5 % Acrylamide/Bis
	125 mM Tris-HCl (pH6.8)
	0.1 % SDS
	0.1 % APS
TBS-T	0.1 % TEMED
	10 mM Tris-HCl (pH7.4)
	137 mM NaCl
	0.1 % Tween-20

2-2-10-2-2. W.B.用サンプルの調製

2-2-9.項にて抽出した細胞質および核サンプル 60 μ L に 4 \times SDS Sampling Buffer 20 μ L を加え、ピペッティング後 100 $^{\circ}$ C に設定したドライブロックバス上にて 5 分間加熱処理し、W.B.用サンプルとした。

2-2-10-2-3. W.B.

ポリアクリルアミドゲルに W.B.用サンプルを供し、SDS-PAGE Running Buffer を用いて電気泳動を行った。電気泳動は 100 V の定電圧で 90 分間行った。その後、ゲル上のタンパク質は Immobilon-P PVDF membrane (Merck) に Transfer Buffer を用いて転写した。タンパク質の転写は 100 V の定電圧で 90 分間行った。転写後、PVDF 膜は 5 % Skim-milk/TBS-T を用いて室温で 1 時間ゆっくりと震盪させることで、Blocking を行った。続いて、TBS-T を用いて室温で 5 分間 PVDF 膜を振盪させることで洗浄した。この洗浄を 3 回行ったのち、下記表に従って 5 % BSA 溶液に希釈した 1 次抗体を加え、4 $^{\circ}$ C にて一晩ゆっくりと震盪させた (表 20)。翌日、TBS-T による洗浄を 3 回行い、5 % Skim-milk/TBS-T に 1:25000 の割合となるよう 2 次抗体を加え、室温にて 1 時間ゆっくりと震盪させた。再び TBS-T による洗浄を 3 回行った後、ブロッキング検出試薬であるイムノスターLD/Zeta (和光純薬) による発光を Chemidoc XRS+ System (BioRad) を用いて検出した。ブロッキングの定量は ImageJ ソフトウェアを用いた。

表 20. W.B.に用いた抗体

Target	Source	Product No.	1st Ab	Detection	Manufacturer
NF- κ B p65	Rabbit	#8242	1:5000	LD	Cell Signaling Technology
Lamin A/C	Rabbit	#10298-1-AP	1:5000	Zeta	Cell Signaling Technology
α -Tubulin	Mouse	#017-25031	1:10000	LD	Proteintech

2-2-11. 細胞増殖解析 (WST-8 法)

細胞増殖の解析は WST-8 アッセイにより行った。WST-8 は細胞膜を容易に通過し、細胞内の脱水素酵素によって還元され、水溶性ホルマザンへと変換される。細胞数と生成したホルマザンの量は直線的な比例関係にあるため、ホルマザンの 450 nm の吸光度を測定することで生細胞数を推定することが可能である^{85,86}。WST-8 アッセイは Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて

製品のプロトコルに従って行った。24-well plate に播種した A549 細胞は血清の影響を除くため、無血清培地にて 24 時間培養した後、解析に用いた。CCK-8 20 μ L を各ウェルに加え、インキュベーターにて 3 時間インキュベートした。その後、培養上清 200 μ L を 96-well multi dish にアプライし、iMark マイクロプレートリーダーにて 450 nm における各サンプルの吸光度を測定した。

2-2-12. TCGA データの解析

肺腺がん患者における遺伝子発現や様々な臨床データは TCGA データを収録したデータポータルである cBioPortal (<https://www.cbioportal.org>) から取得した⁸⁷⁻⁸⁹。本研究では 2024 年 6 月 10 日アクセス時点での Lung Adenocarcinoma (TCGA, Firehose Legacy) (https://www.cbioportal.org/study/summary?id=luad_tcg) データセットから mRNA expression z-scores relative to all samples (log RNA Seq V2 RSEM) および Clinical Data を取得した。(データは 2010 年から 2014 年にかけて 515 人の患者から得た。内訳は男性が 238 人、女性が 277 人)

2-2-13. 統計解析

定量値は平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。統計解析は GraphPad Prism (ver. 10.4.0) (GraphPad Software) を使用した。統計解析方法については、適宜詳細を記述した。なお、 $p < 0.05$ の場合を統計的に有意差ありと判定した。

2-3. 実験結果

2-3-1. 1,2-NQ による網羅的な遺伝子発現への影響

1,2-NQ による DNMT 酵素活性阻害は DNA メチル化の攪乱を通して、遺伝子発現を広範に変動させることが考えられる。そこで、RNA-Seq を行い、1,2-NQ のトランスクリプトームへの影響について解析した。A549 細胞に終濃度 10 μM となるよう 1,2-NQ を処理し、処理後 72 時間時点でのサンプルを RNA-seq に供した。得られたデータから、DEGs の抽出を行ったところ、発現が 1.5 倍以上に上昇した 277 の発現上昇遺伝子および発現が 0.66 倍以下に低下した 328 遺伝子を得た (図 23A)。次に、2 群間で発現が異なる遺伝子群が特定の遺伝子セットに偏っているかを解析する GSEA を行ったところ、炎症応答や細胞周期の進行に関連する遺伝子セットが 1,2-NQ 処理群において有意に濃縮されていた (図 23B, C)。

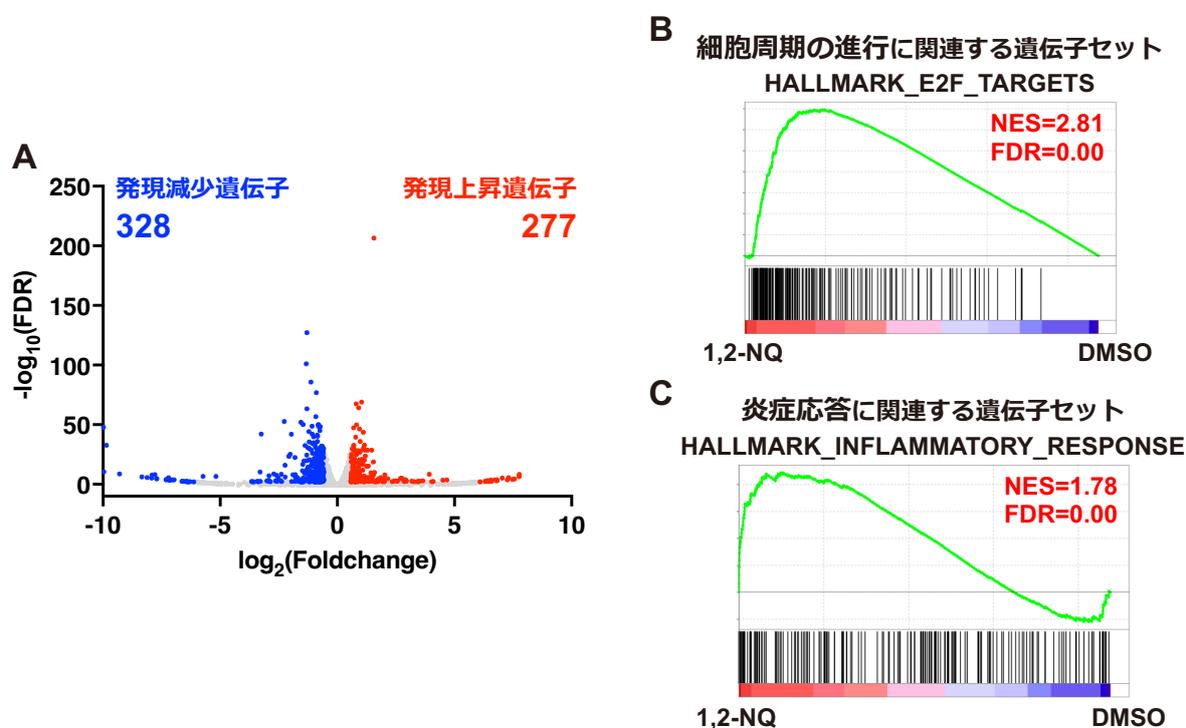


図 23. 1,2-NQ によるトランスクリプトーム解析

(A) A549 細胞に終濃度 10 μM となるよう 1,2-NQ を 72 時間処理後、RNA-seq を行った。結果は Volcano-plot にて示した。発現上昇遺伝子 (\log_2 -Fold change > 0.58 and FDR < 0.01) は赤色で示し、発現減少遺伝子 (\log_2 -Fold change < -0.58 and FDR < 0.01) は青色で示した。

(B, C) GSEA の結果はエンリッチメントプロットにて示した。(B) HALLMARK_E2F_TARGETS (C) HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE

続いて、1,2-NQ により発現が上昇する遺伝子または低下する遺伝子について、その特徴や生理的意義を解析するエンリッチメント解析を行った。まず、発現上昇遺伝子について GO 解析を行ったところ、Biological Process の結果から、血液凝固の負の調節や好中球の遊走に関わる遺伝子が多く含まれ、Molecular Functions の結果から、サイトカイン活性やケモカイン受容体に対する結合能を有する遺伝子が多く含まれることが明らかとなった (図 24)。一方で、発現減少遺伝子についても同様に GO 解析を行ったところ、Biological Process の結果から、神経の分枝化や成熟に関わる遺伝子が多く含まれ、Molecular Functions の結果から、トランスポーターやチャネルとしての活性を持つ遺伝子が多く含まれることが明らかとなった (図 25)。

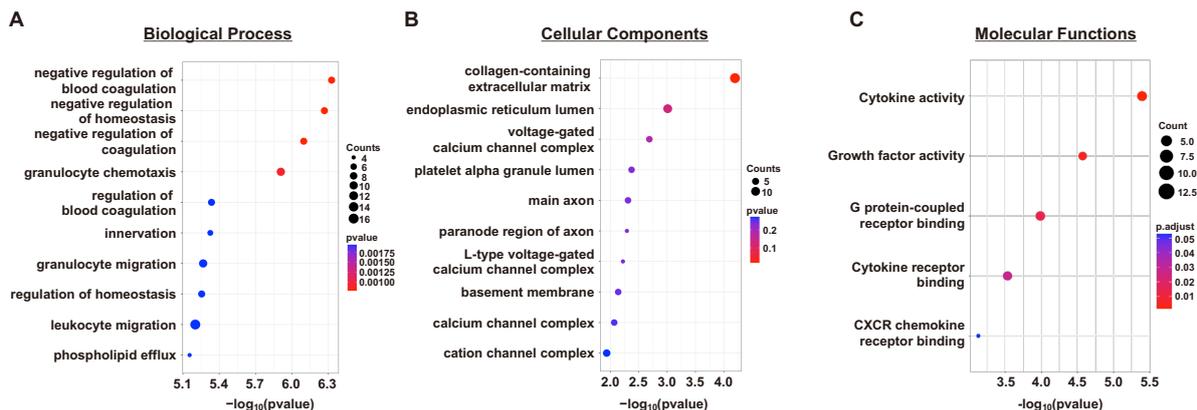


図 24. 1,2-NQ 発現上昇遺伝子の GO 解析

(A, B, C) GO 解析結果は Dot plot にて示した。(A) Biological Process における GO 解析結果 (B) Cellular Components における GO 解析結果 (C) Molecular Functions における GO 解析結果

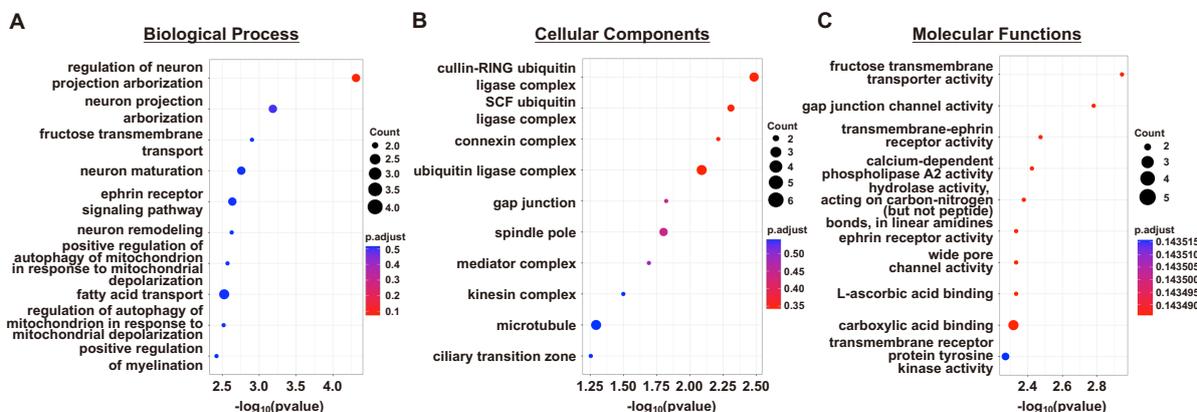


図 25. 1,2-NQ 発現減少遺伝子の GO 解析

(A, B, C) GO 解析結果は Dot plot にて示した。(A) Biological Process における GO 解析結果 (B) Cellular Components における GO 解析結果 (C) Molecular Functions における GO 解析結果

さらに、発現変動遺伝子がどのような分子経路に関連するかを解析できる KEGG Pathway 解析を行ったところ、発現上昇遺伝子は TNF signaling pathway や NF- κ B signaling pathway, IL-17 signaling pathway など複数の炎症性サイトカインシグナルに関連することがわかった (図 26A)。一方で、発現減少遺伝子はレチノール代謝やシトクロム P450 による薬物代謝などに関連することが示された (図 26B)。

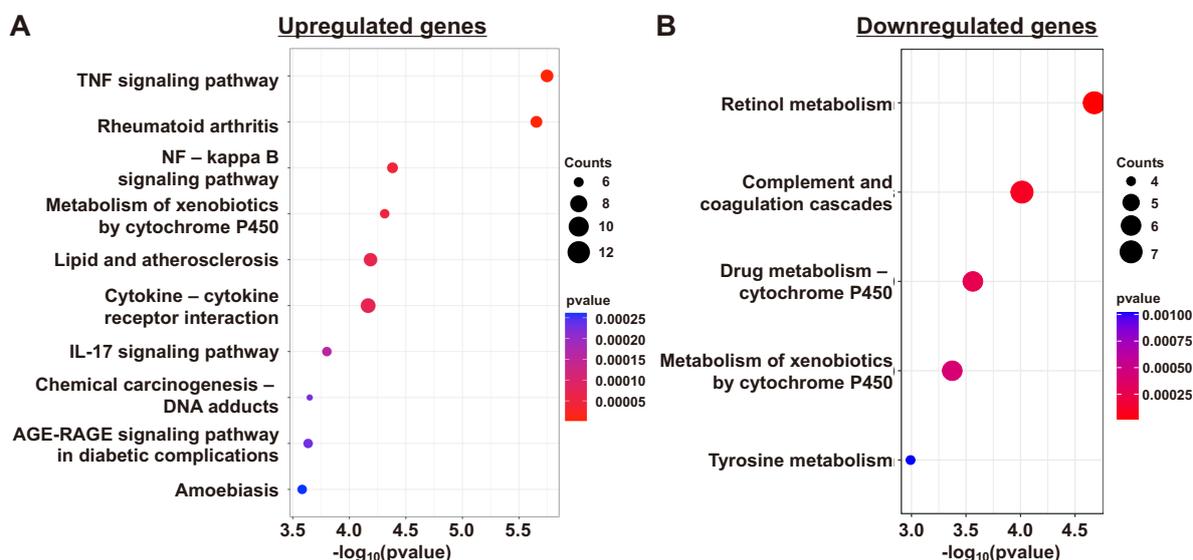
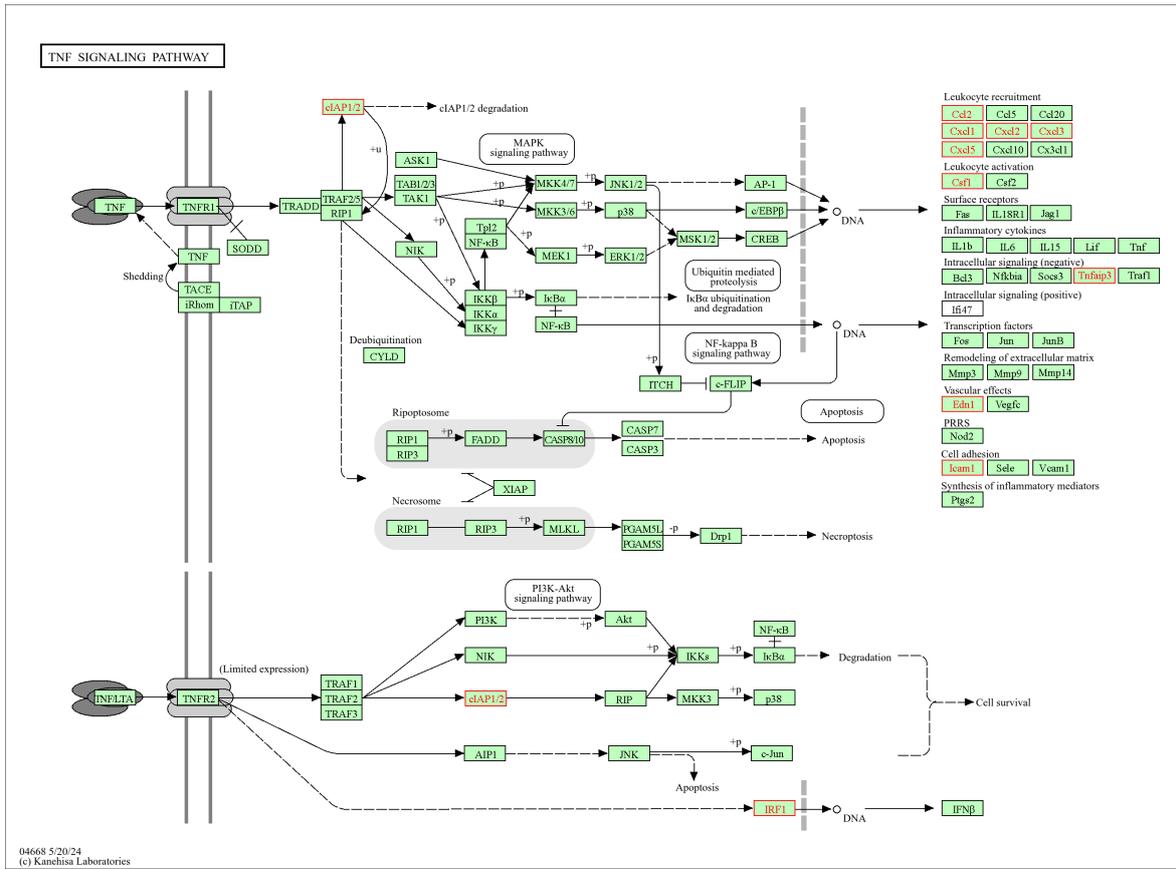


図 26. 1,2-NQ 発現変動遺伝子の KEGG 解析

(A, B) KEGG 解析結果は Dot plot にて示した。(A) 発現上昇遺伝子における KEGG 解析結果 (B) 発現減少遺伝子における KEGG 解析結果

続いて、DNMTs 酵素活性阻害に伴う転写調節領域の低メチル化は一般的に遺伝子発現を上昇させることから、1,2-NQ により発現が上昇する遺伝子に着目し、以降の解析を進めた。KEGG 解析により、1,2-NQ による DEGs が最も濃縮されていた TNF signaling pathway のパスウェイマップを以下に示した。赤色でハイライトされた遺伝子は 1,2-NQ による DEGs である。パスウェイマップから、1,2-NQ は TNF signaling を構成する因子ではなく、その下流に位置するサイトカイン類の発現を誘導することが示された (図 27A)。続いて、KEGG 解析において強く濃縮されていた Cytokine-cytokine receptor interaction のパスウェイマップを以下に示した。パスウェイマップから、1,2-NQ による DEGs は CXC ケモカインファミリーに多く含まれることが示された (図 27B)。そこで、以降では 1,2-NQ による CXC ケモカイン発現誘導に着目し、そのメカニズムと影響について解明することを目指した。ケモカインはサイトカインの 1 種であり、白血球などの遊走に参与することで炎症反応を形成する⁹⁰。中でも、CXC ケモカインは N 末端側の 2 つのシステイン残基の間に他のアミノ酸が 1 つ存在する CXC モチーフを持ち、白血球の中でも特に好中球の遊走を誘導することが知られている^{91,92}。CXC ケモカインファミリーについて、標準化された遺伝子発現レベルの値である Z スコアを算出したところ、ほぼ全ての CXC ケモカインが 1,2-NQ により発現誘導されることが示された (図 28A)。以降は 1,2-NQ による DEGs に含まれていた *CXCL1*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL8* に着目した (図 28B)。

A



B

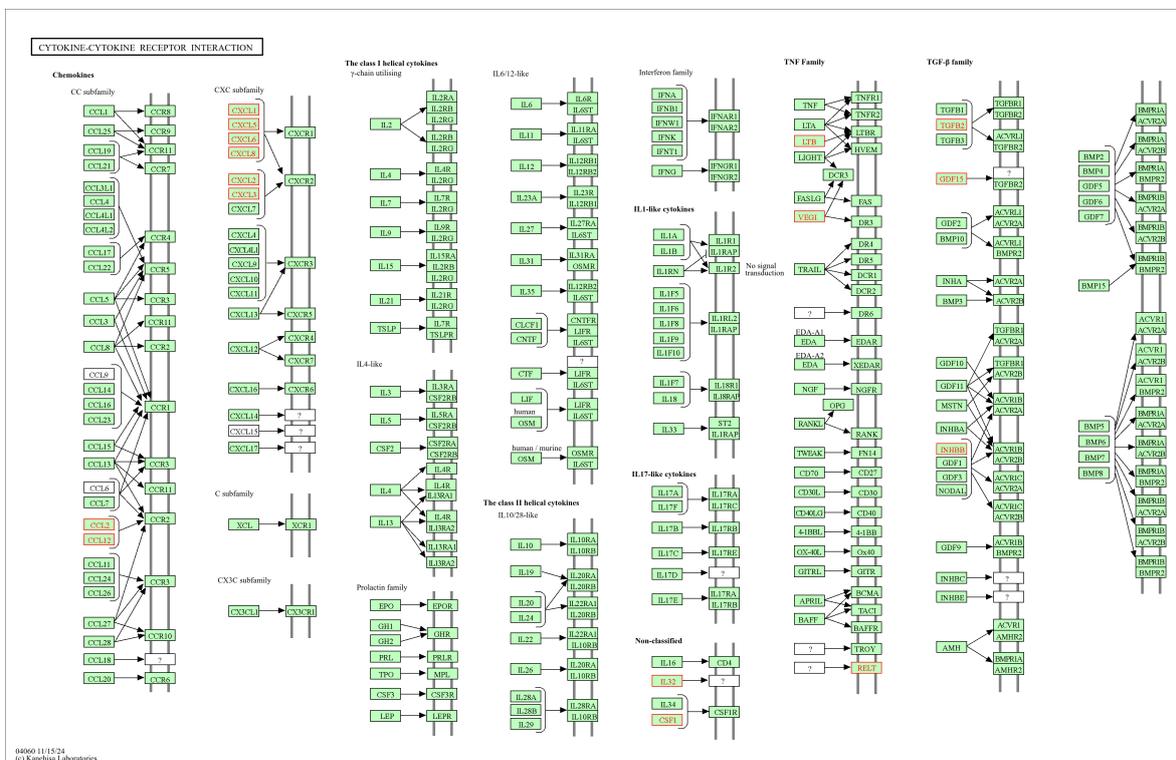


図 27. 1,2-NQ による発現上昇遺伝子が濃縮された 2 種のパスウェイマップ (KEGG Pathway Database より引用^{93,94})

- (A) TNF signaling pathway 1,2-NQ による発現上昇遺伝子は赤色で示される。
 (B) Cytokine-cytokine interaction pathway 1,2-NQ による発現上昇遺伝子は赤色で示される。

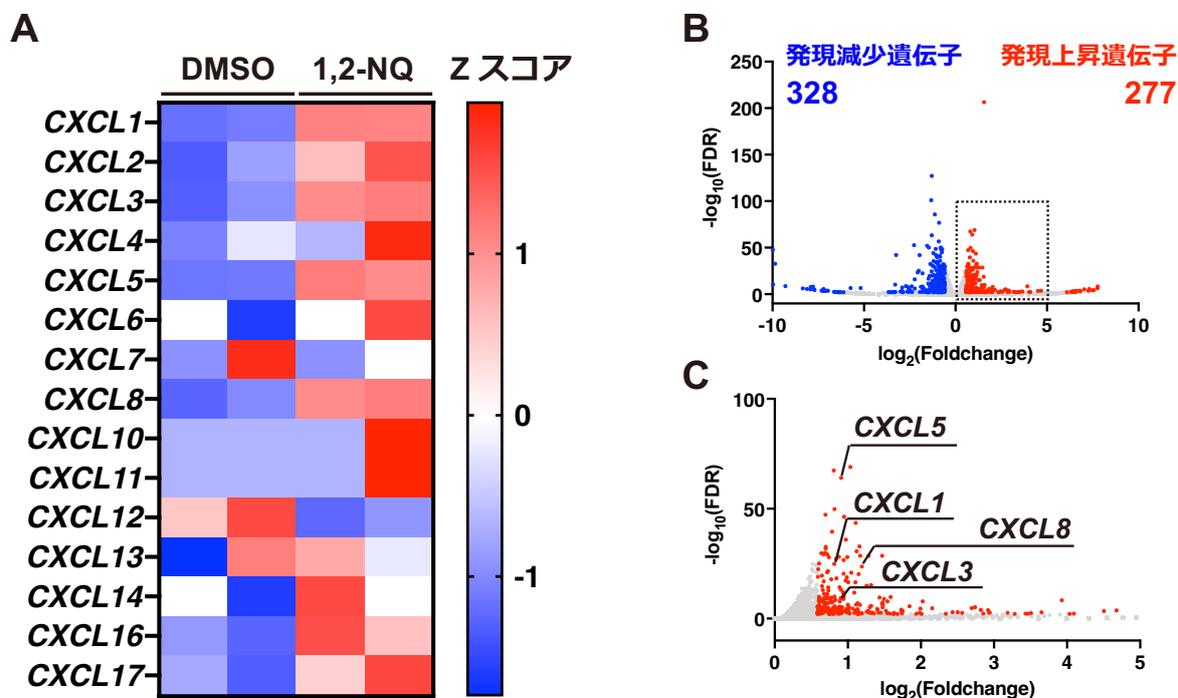


図 28. 1,2-NQ による CXC ケモカインファミリーの発現誘導

- (A) CXC ケモカインファミリーの遺伝子発現レベルをヒートマップで示した。Zスコアは平均値からのズレを算出した値である。
 (B) 1,2-NQ によるトランスクリプトーム解析の Volcano-plot
 (C) (B) Volcano-plot 内の点線領域を拡大したもの。CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL8 はいずれも 1,2-NQ による発現上昇遺伝子に含まれる。

2-3-2. 1,2-NQ による CXC ケモカインの発現誘導

1,2-NQ による CXC ケモカイン発現誘導について、より詳細な解析を行うため、RT-qPCR による経時的な遺伝子発現解析を行った。まず初めに、1,2-NQ 処理後 24 時間時点における CXC ケモカインの発現レベルを解析したところ、いずれのケモカインについても 1,2-NQ による発現誘導は認められなかった (図 29)。

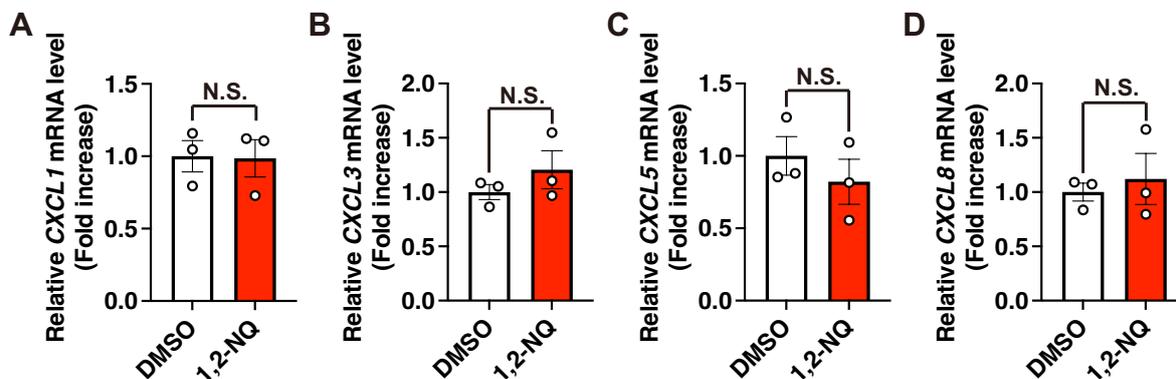


図 29. 1,2-NQ 処理後 24 時間時点での CXC ケモカイン発現

(A, B, C, D) A549 細胞に終濃度 10 μ M となるよう 1,2-NQ を 24 時間処理後、RT-qPCR に供した。(A) *CXCL1* (B) *CXCL3* (C) *CXCL5* (D) *CXCL8* ($n=3$, N.S. = Not Significant: One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test)

続いて、長時間の 1,2-NQ 処理が及ぼす影響を解析するため、1,2-NQ 処理後 48, 60, 72 時間時点における CXC ケモカインの発現レベルを解析した。その結果、*CXCL1* や *CXCL3* は 1,2-NQ の処理後 48 時間以降に有意な発現上昇が認められた。また、*CXCL5* や *CXCL8* は 1,2-NQ の処理後 60 時間以降に有意な発現上昇が認められた (図 30)。以上より、1,2-NQ による CXC ケモカインの発現誘導は 48 時間や 60 時間以降に緩徐に引き起こされることが示された。続いて、1,2-NQ による CXC ケモカイン発現誘導に DNA メチル化制御が関与するか解析するため、シチジンアナログとして DNA 鎖に取り込まれ、DNMT 酵素活性を阻害する 5-Aza (5-aza-2'-deoxycytidine) を用いて同様の検討を行った⁹⁵。その結果、5-Aza は処理後 48 時間以降に CXC ケモカイン発現を有意に上昇させた (図 30)。以上より、CXC ケモカインは DNA メチル化制御を介してエピジェネティックに転写誘導される可能性が示された。

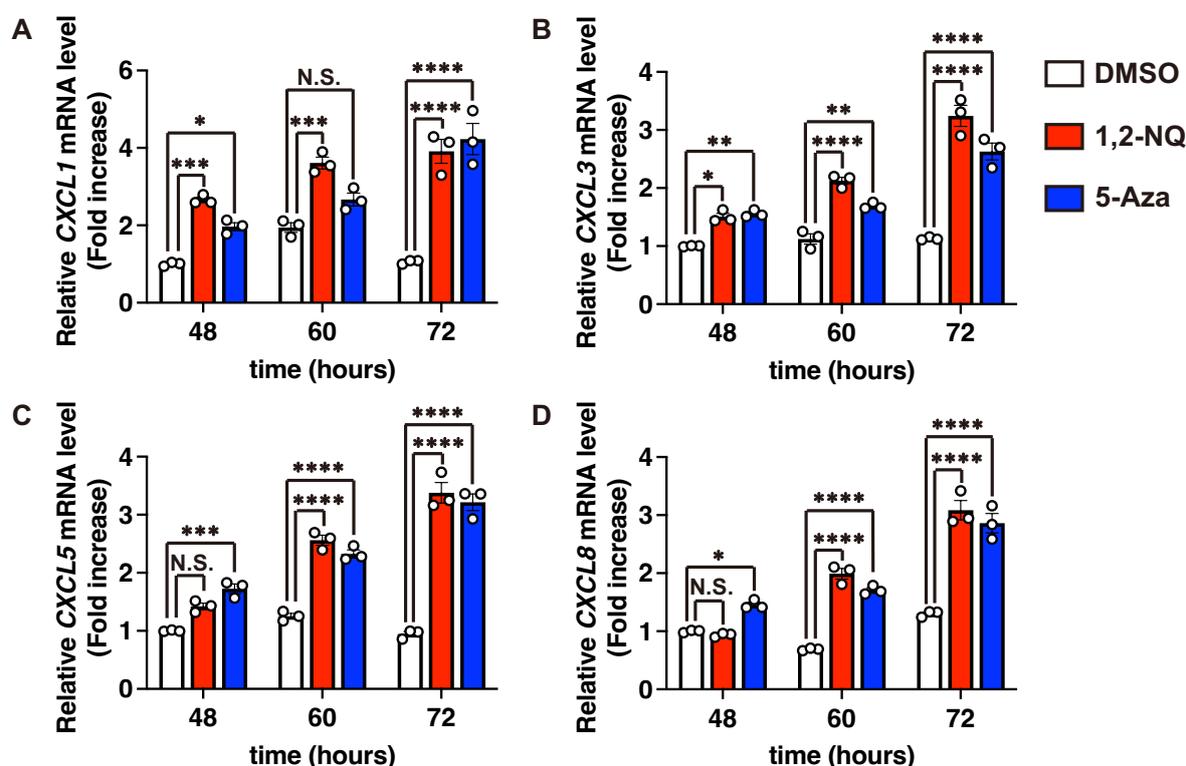


図 30. 1,2-NQ や 5-Aza による緩徐な CXC ケモカイン発現の誘導

(A, B, C, D) A549 細胞に終濃度 10 μ M となるよう 1,2-NQ もしくは 5-Aza を 48, 60, 72 時間処理後、RT-qPCR に供した。(A) *CXCL1* (B) *CXCL3* (C) *CXCL5* (D) *CXCL8* ($n=3$, N.S. = Not Significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$: One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test)

一方で、炎症性サイトカインであり、複数の炎症性シグナルを駆動することで CXC ケモカインを発現誘導することが知られている^{96,97}、TNF- α は CXC ケモカイン発現を短時間で急速に誘導した (図 31)。これまでの結果をまとめると、TNF- α は急速かつ強力に CXC ケモカインの発現誘導を示したのに対し、1,2-NQ や DNMT 阻害薬 5-Aza は微弱かつ緩徐な発現誘導を示した (図 32)。以上より、1,2-NQ は TNF- α とは異なり、DNA メチル化制御を介して CXC ケモカインを発現誘導する可能性が示された。

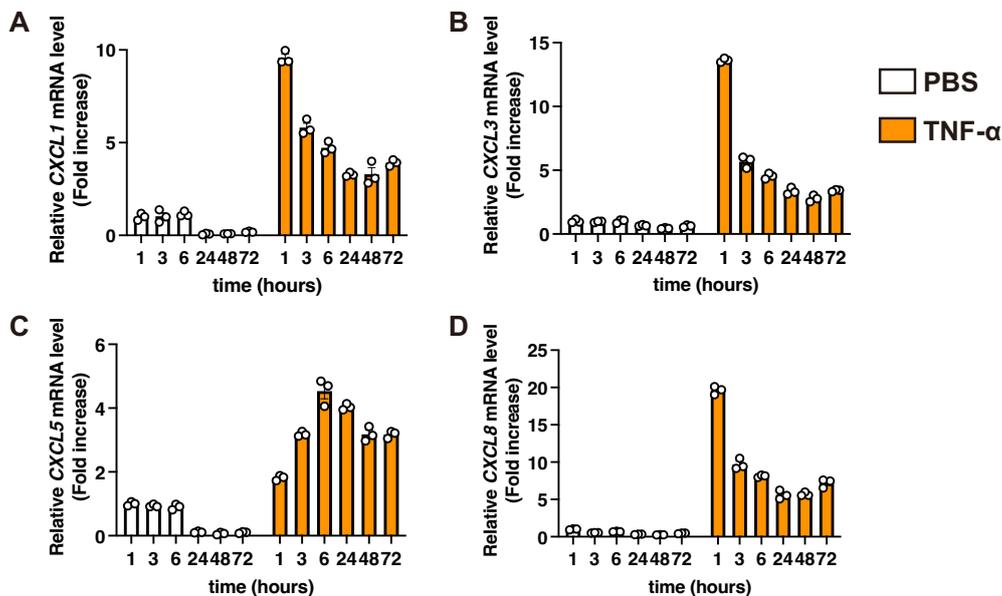


図 31. TNF- α による強力かつ急速な CXC ケモカイン発現の誘導

(A, B, C, D) A549 細胞に終濃度 25 ng/mL となるよう TNF- α を処理し、処理後 1, 3, 6, 24, 48, 72 時間後に RT-qPCR に供した。(A) CXCL1 (B) CXCL3 (C) CXCL5 (D) CXCL8 ($n=3$)

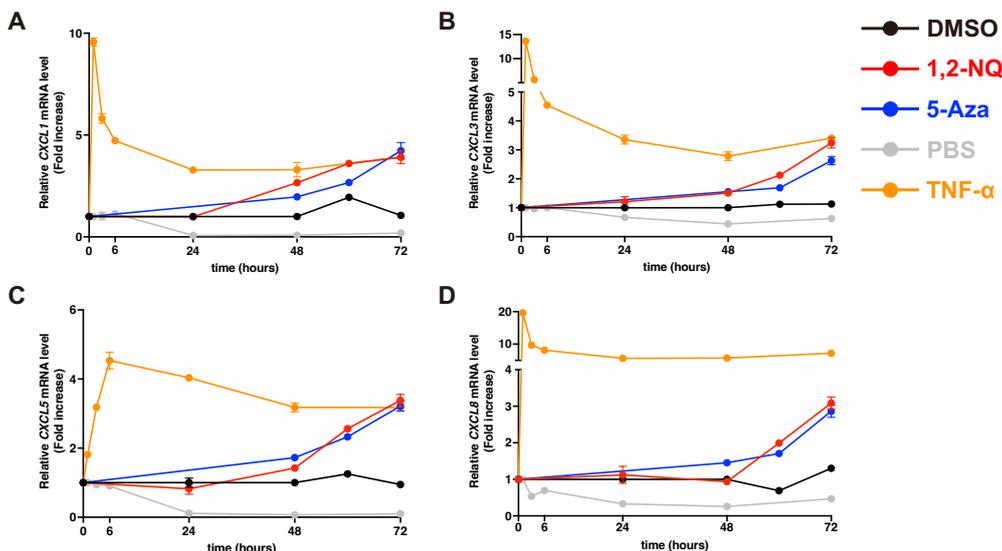


図 32. 1,2-NQ と TNF- α による CXC ケモカイン発現制御機構の違い

図 29, 30, 31 の結果を 1 つのグラフにまとめた。橙色で示された TNF- α は急速かつ強力に CXCL8 発現を誘導したが、赤色で示された 1,2-NQ や青色で示された 5-Aza は緩徐に CXCL8 発現を誘導した。(A) CXCL1 (B) CXCL3 (C) CXCL5 (D) CXCL8 ($n=3$)

2-3-3. 1,2-NQ による DNA メチル化制御を介した CXCL8 発現の誘導

CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL8 は 1,2-NQ および 5-Aza により緩徐な発現誘導を受けることから、これらの遺伝子はいずれも DNA メチル化制御を受ける可能性が示された。中でも、CXCL8 発現はプロモーター領域の DNA メチル化レベルと逆相関することが以前に複数報告されている^{98,99}。そこで、以降は 1,2-NQ による CXCL8 発現誘導における DNA メチル化制御の役割について解析を行った。CXCL8 転写調節領域として転写開始点近傍のプロモーターおよび下流のエンハンサーに着目し、特定のゲノム領域における DNA メチル化レベルを 1 塩基単位で解析できる Bisulfite-seq を行った。その結果、CXCL8 プロモーター領域はコントロールおよび 1,2-NQ 処理サンプルで完全に脱メチル化されていた (図 33B)。一方で、下流エンハンサー領域に位置するシトシン残基が 1,2-NQ により脱メチル化されることが見出された (図 33C, D)。

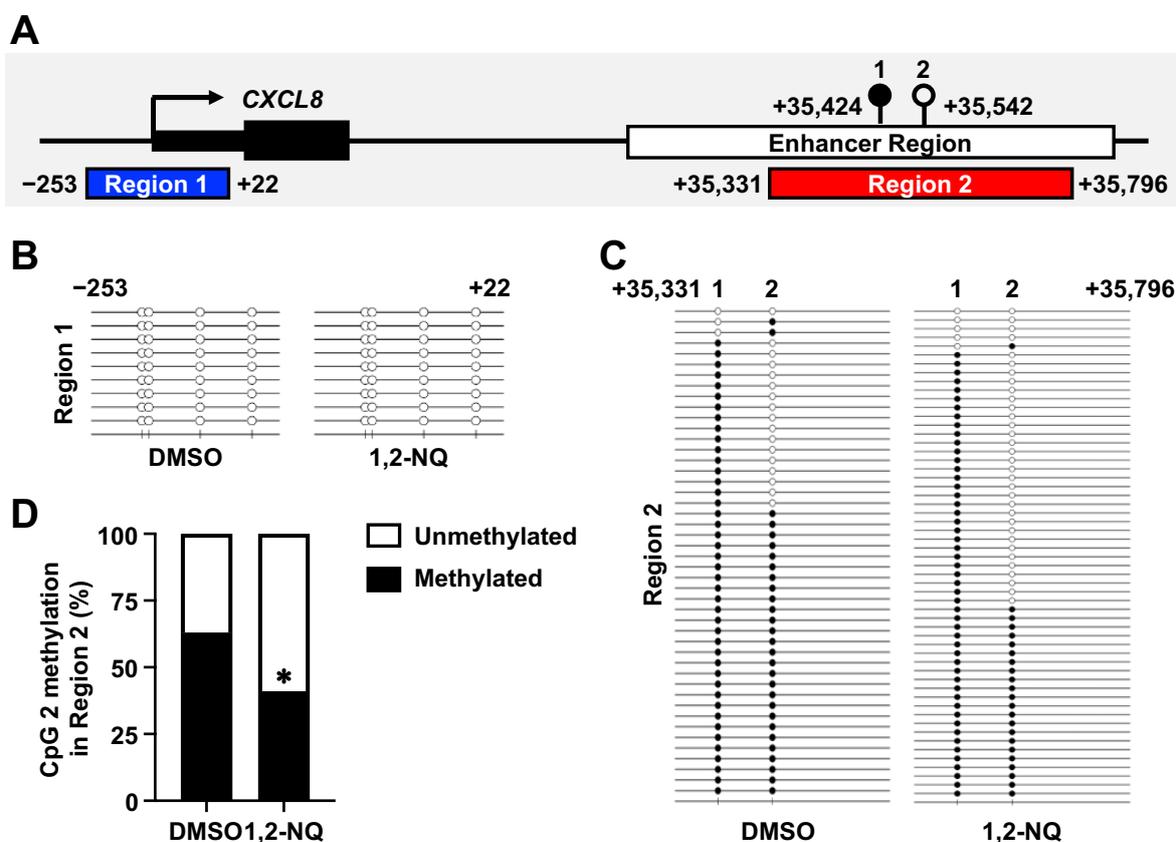


図 33. 1,2-NQ による CXCL8 エンハンサーの脱メチル化

- (A) CXCL8 エンハンサー領域と Bisulfite-seq の標的として Region1, Region2 を設定した。
 (B, C) A549 細胞に DMSO もしくは終濃度 10 μ M となるよう 1,2-NQ を 72 時間処理後、Bisulfite-seq に供した。白丸はシトシン、黒丸はメチル化シトシンを示す。
 (B) Region 1 (プロモーター領域) (C) Region 2 (エンハンサー領域)
 (D) Region 2 内の上流に位置する CpG サイト (+35542) のメチル化レベル ($n = 46$ (DMSO), $n = 56$ (1,2-NQ)), $*p < 0.05$, versus control DMSO: two-tailed Fisher's exact test.)

続いて、下流エンハンサー領域の転写活性についてルシフェラーゼアッセイにより解析した。HEK293T 細胞に DNMT3B ベクターと CXCL8 エンハンサーおよびプロモーター領域を含むルシフェラーゼベクターの両者を一過性に発現させ、1,2-NQ を処理することで 1,2-NQ による CXCL8 転写活性への影響を解析した (図 34A)。その結果、1,2-NQ によりルシフェラーゼの発光が 3 倍程度増加し、1,2-NQ は CXCL8 転写活性を亢進することが示された (図 34B)。

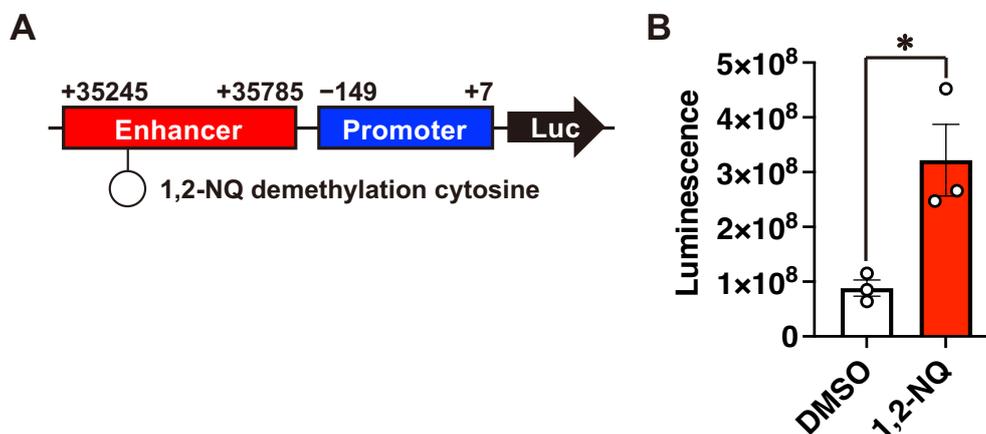


図 34. 1,2-NQ による CXCL8 エンハンサー活性の誘導

(A) 構築した Luciferase vector の概略図。

(B) HEK293T 細胞に Luciferase vector および DNMT3B を共発現させ、終濃度 10 μ M となるよう 1,2-NQ を 72 時間処理後、Luciferase assay に供した。 ($n=3$, $*p < 0.05$: One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test)

次に、1,2-NQ による CXCL8 転写活性の亢進に寄与する転写因子の探索を行った。公共データベースから ChIP-seq データを取得し、下流エンハンサー領域におけるピークをカウントした。その結果、エンハンサー領域にピークを持つ転写因子として NF- κ B p65, STAT1, STAT3, c-Fos の 4 種を同定した (図 35)。

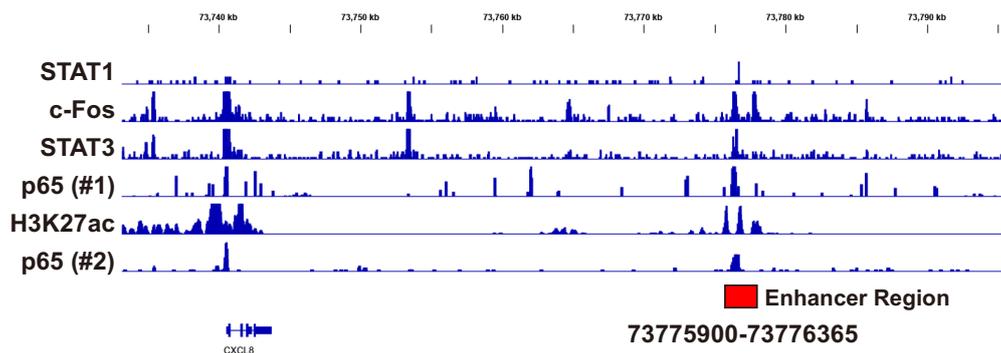


図 35. CXCL8 エンハンサー領域に結合する転写因子の探索

NCBI GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) から ChIP-seq 公共データを取得し、IGV genome viewer により可視化した。STAT1 (GSM935360), c-Fos (GSM935398), STAT3 (GSM935399) は ENCODE プロジェクトよりデータを取得した。p65 (GSM2746542), H3K27ac (GSM2746538) は文献より取得した^{100,101}。

これらの転写因子について ChIP を実施できるか抗体の確認を行ったところ、STAT1 を除く 3 種の転写因子が ChIP により濃縮された (図 36). 続いて、STAT1 を除くこれら 3 種の転写因子について ChIP-qPCR を行った (図 37A). その結果、エンハンサー内 ChIP-1, ChIP-2 領域において NF- κ B p65 の占有が 1,2-NQ により増加した (図 37B). 一方で、STAT3 や c-Fos の占有は増加しなかった (図 37C, D). 以上より、1,2-NQ は NF- κ B p65 をエンハンサー領域にリクルートすることが示された.

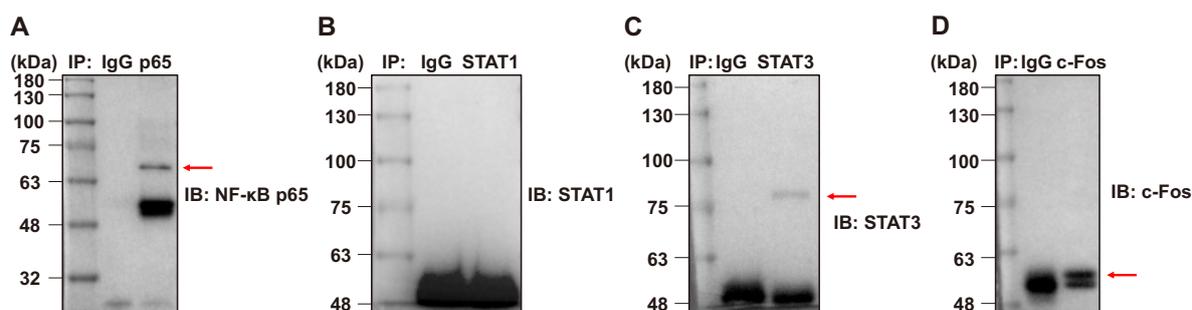


図 36. 抗体のワークチェック (ChIP-W.B.)

(A, B, C, D) A549 細胞において各抗体で ChIP を実施し、得られたサンプルを W.B. に供することで抗体の ChIP におけるワークチェックを実施した. 赤矢印で示したバンドが目的のタンパク質である. (A) NF- κ B p65 (B) STAT1 (C) STAT3 (D) c-Fos

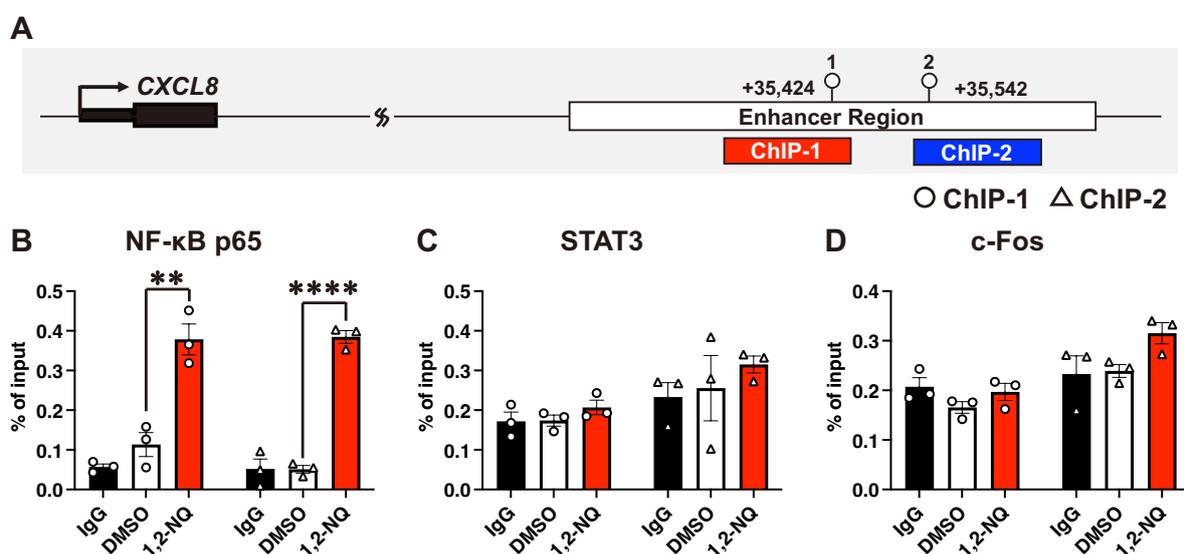


図 37. 1,2-NQ による NF- κ B p65 のエンハンサー領域への誘導

(A) ChIP-qPCR における標的配列 (ChIP-1, ChIP-2)

(B, C, D) A549 細胞に終濃度 10 μ M となるよう 1,2-NQ を 72 時間処理後、各抗体を用いて ChIP-qPCR を行った. ($n=3$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ versus control DMSO: One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test)

続いて、NF- κ B p65 は細胞質から核へと移行することで強力な転写活性を発揮することが知られている。そこで、核分画により NF- κ B p65 の核移行について解析を行った。その結果、CXCL8 発現を強力かつ急速に誘導した TNF- α は一過性の NF- κ B p65 核移行を顕著に誘導した(図 38A)。一方で、1,2-NQ や 5-Aza は NF- κ B p65 核移行を誘導しなかった。続いて、1,2-NQ による経時的な NF- κ B p65 核移行への影響を解析したところ、処理後 72 時間までに 1,2-NQ は一過性の NF- κ B p65 核移行を誘導しなかった (図 38B)。

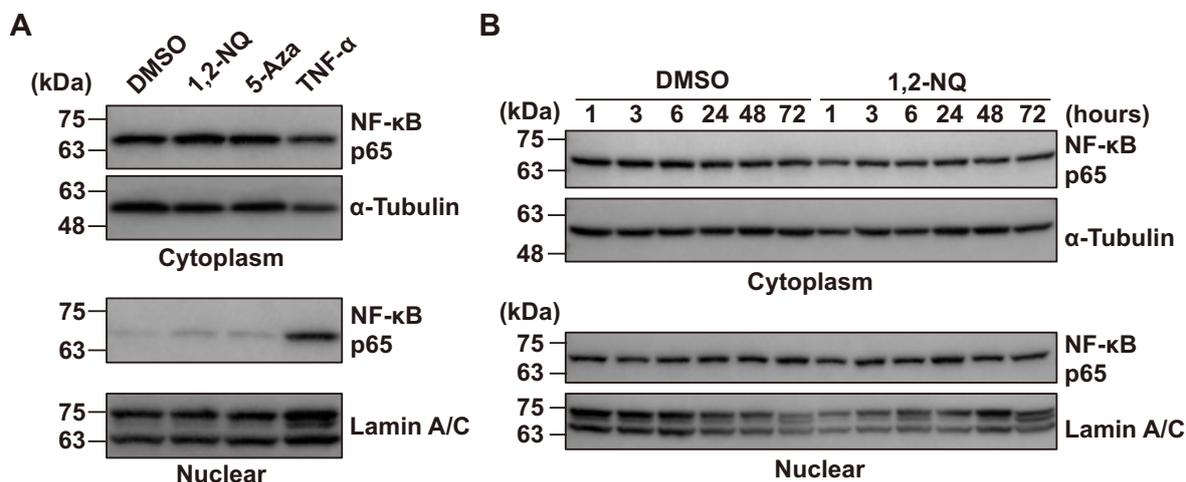


図 38. 1,2-NQ による NF- κ B p65 核移行に対する影響

(A) A549 細胞に DMSO もしくは終濃度 10 μ M となるよう 1,2-NQ もしくは 5-Aza もしくは終濃度 25 ng/mL となるよう TNF- α を処理し、処理後 3 時間時点において核抽出を行った。その後、細胞質および核サンプルについて W.B.を行った。

(B) (A) と同様の試薬処理を行い、処理後 1, 3, 6, 24, 48, 72 時間時点において核抽出を行った。その後、(A) と同様に W.B.を行った。

(α -Tubulin: 細胞質マーカー, Lamin A/C: 核マーカー)

これらの結果をまとめると、1,2-NQ は NF- κ B p65 の一過性の核移行を誘導することなく、核内に存在する微量の NF- κ B p65 の CXCL8 エンハンサーへのアクセス性を増加させ、転写活性を上昇させることが示された。また、NOS2 や CDX1 の転写調節領域への NF- κ B p65 の結合はシトシンメチル化により阻害されることが以前に報告されている^{102,103}。以上より、NF- κ B p65 のアクセス性の向上には1,2-NQ による DNA 脱メチル化が関与しており、1,2-NQ は CXCL8 下流エンハンサーの脱メチル化を介して CXCL8 発現をエピジェネティックに制御することが示された (図 39)。

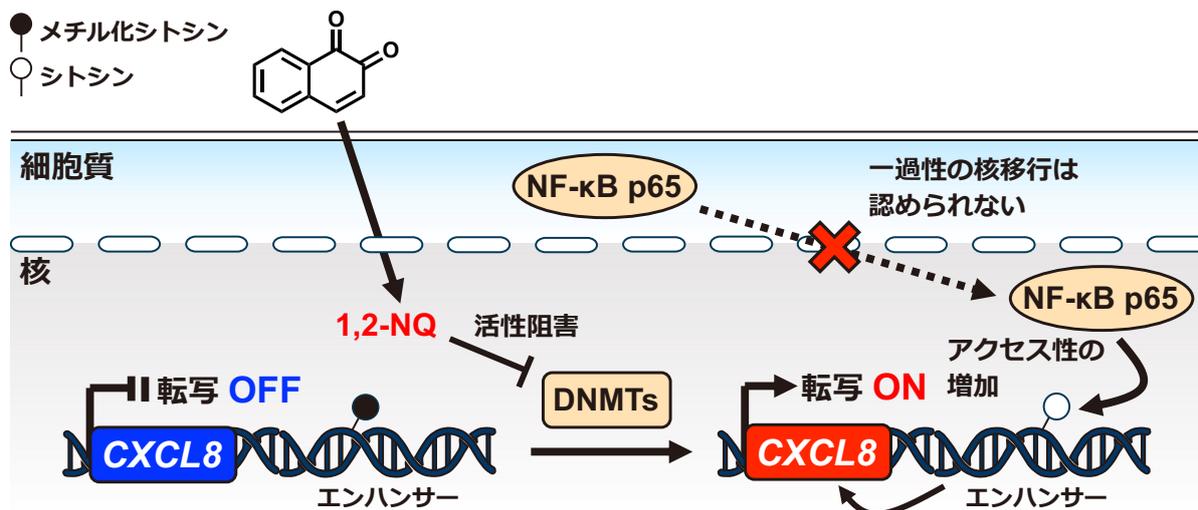


図 39. 1,2-NQ によるエピジェネティックな CXCL8 発現誘導機構

2-3-4. 1,2-NQ による DNA メチル化制御を介したがん細胞増殖への影響

1,2-NQ による DNA メチル化制御を介した CXC ケモカインの発現誘導ががん細胞表現型に与える影響を解明するため、CXC ケモカインの主要な役割の一つであるがん細胞増殖の誘導に着目し、解析を行った。まず初めに、1,2-NQ によるがん細胞増殖への影響を WST-8 法により検討した。1,2-NQ は処理後 24 時間および 48 時間時点においては有意ながん細胞増殖の誘導効果を示さなかった一方で、処理後 72 時間時点において終濃度 5 μM まで濃度依存的ながん細胞増殖の誘導効果を示した (図 40)。以上より、1,2-NQ によるがん細胞増殖の誘導は CXC ケモカインの発現タイムコースと類似して、処理後後期に起こることが示され CXC ケモカインの関与が示唆された。

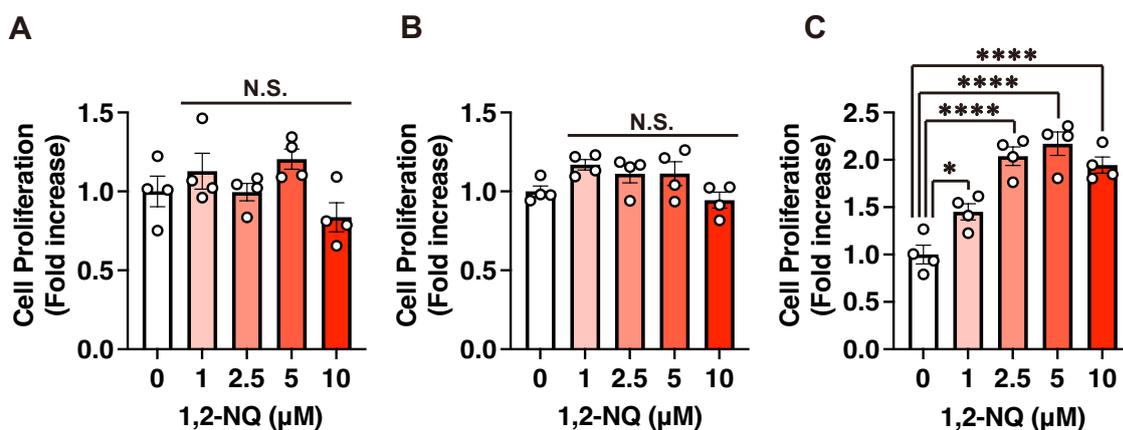


図 40. 1,2-NQ による細胞増殖の誘導

(A, B, C) A549 細胞は血清の影響を除くため、無血清培地にて 24 時間培養された。その後終濃度 1, 2.5, 5, 10 μM となるよう 1,2-NQ を処理し、処理後 24, 48, 72 時間時点において WST-8 assay に供した。(A) 処理後 24 時間 (B) 処理後 48 時間 (C) 処理後 72 時間 ($n=4$, N.S. = Not Significant, $*p < 0.05$, $****p < 0.0001$ versus control DMSO: One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test)

続いて、CXC ケモカインはその受容体 CXCR1/2 を介して FAK/Src, Rho-GTPase, Raf/MEK/ERK などの下流シグナルを活性化し、がん細胞の増殖や浸潤、血管新生を促進することが知られている⁹⁷。そこで、CXCR1/2 アンタゴニストである SCH-527123 (SCH) を前処理し、1,2-NQ 誘導性細胞増殖への影響を検討した。その結果、1,2-NQ により誘導される細胞増殖は SCH の処理濃度依存的に抑制された (図 41)。以上より、1,2-NQ による CXC ケモカイン発現の誘導は CXCR1/2 シグナリングを介してがん細胞増殖の亢進に関連することが示された。

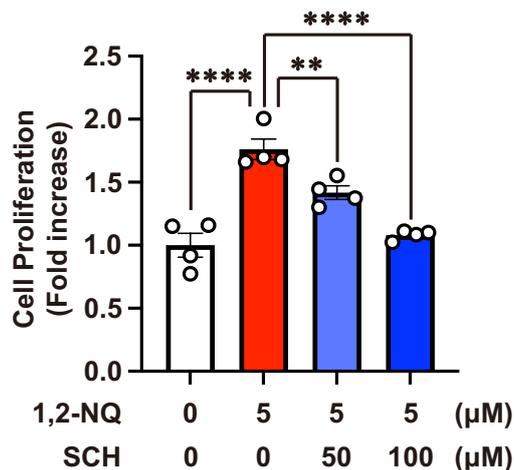


図 41. 1,2-NQ による CXCR1/2 シグナリングを介した細胞増殖の誘導

A549 細胞は血清の影響を除くため、無血清培地にて 24 時間培養された。その後、SCH-527123 を終濃度 50, 100 μM となるように前処理した。4 時間後 1,2-NQ を終濃度 5 μM となるよう処理し、1,2-NQ 処理後 72 時間時点で WST-8 assay に供した。(n = 4, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001: One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test)

2-3-5. TCGA を用いた肺腺がん患者における CXCL8 発現解析

最後に、各がん種のマルチオミクスデータを公開している TCGA データベースからデータを収集し、肺腺がん患者における CXCL8 発現とその予後について解析を行った。初めに、CXCL8 発現レベルが上位 20%に位置している患者を発現が高い群 (High)、下位 20%に位置している患者を発現が低い群 (Low) とし、それぞれの生存率について Kaplan-Meier 法による解析を行った。その結果、CXCL8 発現が高い群では発現が低い群と比較して生存期間が短縮した (図 42A)。続いて、CXCL8 発現レベルと肺腺がんの進行度を表すステージの関連を解析したところ、肺腺がんが進行している状態であるステージ 3 の患者ではステージ 1 の患者に比べて CXCL8 発現が有意に高かった (図 42B)。以上より、肺腺がん患者における CXCL8 発現は予後不良と関連することがわかり、1,2-NQ による CXCL8 発現の誘導は肺腺がんの進行や増悪に寄与する可能性が示された。

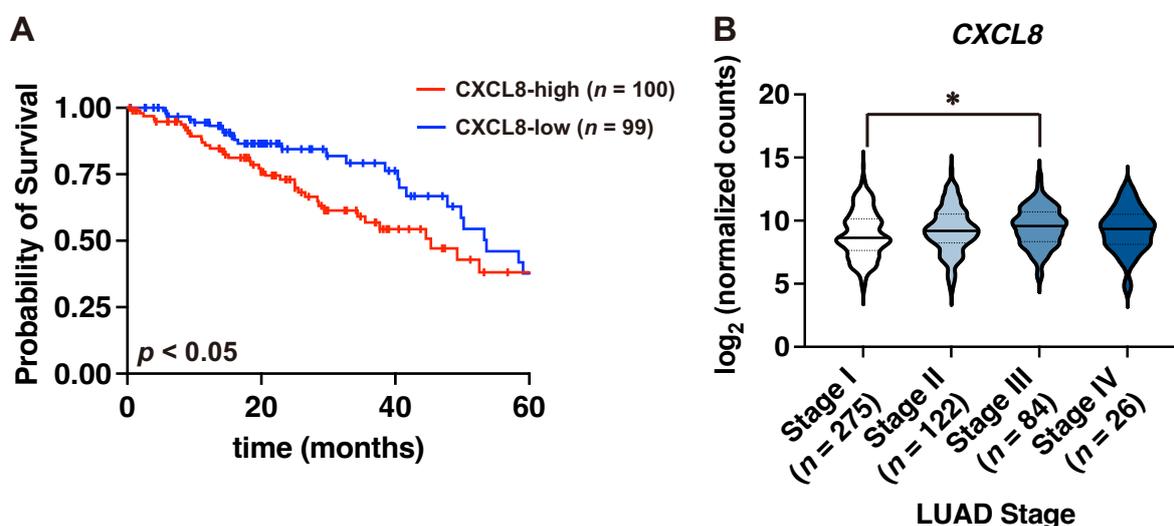


図 42. CXCL8 発現と肺腺がん患者の予後解析

(A) CXCL8 発現の高い群 (上位 20%) と低い群 (下位 20%) における生存期間解析。結果は Kaplan-Meier プロットにて示した。(Log-rank test)

(B) 各がんステージにおける CXCL8 発現解析。結果はバイオリンプロットにて示した。中央の実線は平均値を、上下の破線はそれぞれ第 1 四分位数、第 3 四分位数を示す。(* $p < 0.05$: One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test)

2-4. 考察

2-4-1. 1,2-NQ 処理条件について

本研究では終濃度 10 μM となるよう 1,2-NQ を処理し、A549 細胞の遺伝子発現に及ぼす影響について解析を行った。大気中の 1,2-NQ は 2004 年に初めて同定され¹³、その後大気中の 1,2-NQ 濃度を解析した研究が複数報告されているが、大気の採取場所によりその濃度は大きく異なっている (表 21)。また、南カリフォルニアにおける研究では、都市部や農村部、風下や風上、季節変化など様々な地理的要因に伴い 1,2-NQ の大気中濃度が変化することが示された¹⁰⁴。以上のことから、ヒトの 1,2-NQ 曝露量は地理的影響を大きく受けるため概算することは難しい。一方で、本研究で用いた 10 μM 以下の濃度域では A549 細胞において細胞死がほとんど見られないことから、生体にとって過酷な処理条件ではないことが推察される。また、注目すべき点として、環境中には 1,2-NQ のみならず多様な親電子物質が存在する点がある。さらに近年では、農薬や大気中に含まれる親電子物質および重金属の複合曝露は相加・相乗的な毒性をもたらすことが報告された^{105,106}。このことから、親電子物質の複合曝露はより低い濃度帯における毒性発揮につながる可能性があり、より環境に近い条件下での親電子物質の影響を解析できる点で有用であると考えられる。一方で、複合曝露研究はその組み合わせが多岐にわたることからほとんど展開されておらず、今後さらなる発展が期待されている。

表 21. 各採取場所の大気中における 1,2-NQ 濃度

採取場所	1,2-NQ 濃度	参照
Birmingham, UK	3374 pg/m^3	107
South California, USA	6-521 pg/m^3	104
Kabul, Afghanistan	40-550 pg/m^3	108
Fresno, USA	1100 pg/m^3	109
Athens, Greece	310 pg/m^3	110

2-4-2. 1,2-NQ によるトランスクリプトーム解析

本研究では A549 細胞においてトランスクリプトーム解析を行い、1,2-NQ の 72 時間処理による発現上昇遺伝子を同定した。続いて、発現上昇する遺伝子群について GO 解析や Pathway 解析を行い、その特長や生物学的機能を明らかにした。その中でも、本研究では炎症性サイトカインの 1 種である CXC ケモカインに着目し、その詳細な発現制御機構の解明を試みた。一方で、一連の解析の結果、1,2-NQ による発現上昇遺伝子は多様であり、様々な機能を持っていることが示された。これは 1,2-NQ がユニークな化学的特性を有することに起因すると考えられる。1,2-NQ は様々なタンパク質と付加体形成し、その機能を変化させるほか、レドックスサイクルと呼ばれる生体内で酸化還元を繰り返す性質を持つ (図 43) ¹¹¹。シトクロム P450 などの還元酵素による一電子還元反応によりキノンはセミキノンラジカルへと還元される。セミキノンラジカルは分子状酸素によりキノンへと再酸化される。その過程で活性酸素種であるスーパーオキシドラジカルが生成される。このサイクルが繰り返されることで微量のキノンから多量の活性酸素種が産生され、酸化ストレスおよび細胞死の誘導につながる ¹¹²。以上より、トランスクリプトーム解析結果から、1,2-NQ による DNMT 阻害の影響を説明することはできない。DNMTs の KO もしくは DNMTs 阻害薬のトランスクリプトーム解析を併せて実施することで、1,2-NQ による DNA メチル化制御の影響がより明瞭になるだろう。

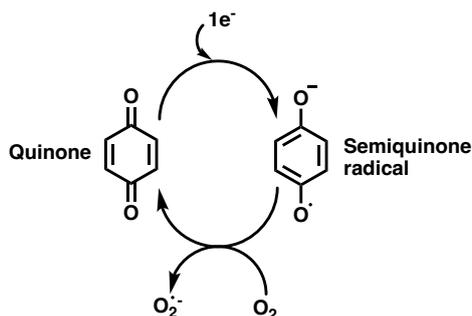


図 43. キノンのレドックスサイクル

続いて、本研究では RT-qPCR を行うことで 1,2-NQ による発現上昇遺伝子から DNA メチル化制御を受ける遺伝子として CXC ケモカインを得た。この結果を得る上で 1,2-NQ による CXCL8 発現のタイムコースと TNF- α によるタイムコースの違いは非常に重要である。本研究では、TET (Ten-eleven translocation) による能動的な脱メチル化ではなく、DNMT の酵素活性低下に伴う受動的な脱メチル化に焦点を当てている。一般的に、受動的な脱メチル化は複製依存的に起こるため、緩やかに進行する ¹¹³。つまり、1,2-NQ による DNA メチル化制御を介した遺伝子発現変動も緩やかに進行することが予想される。CXC ケモカインが 1,2-NQ 処理後 24 時間時点では発現誘導されず、48 もしくは 60 時間以降に発現誘導されたことはエピジェネティックな制御を受ける重要な証拠である。さらに、CXC ケモカインは DNMT 阻害薬 5-Aza を用いた場合でも 1,2-NQ と同様に緩徐な発現誘導を示した。一方で、5-Aza が DNMT 阻害作用のみを示したかどうかについては疑問が残る。5-Aza はシチジンアナログとして DNA 鎖に取り込まれ、DNMT 阻害効果を発揮するため DNA 損傷や細胞毒性をもたらすことが知られている ¹¹⁴。そのため、細胞毒性を示さず、作用点が 1,2-NQ と一致する非ヌクレオシド系 DNMT 阻害薬を用いた検討を今後行う必要がある。

2-4-3. 1,2-NQ により発現誘導される CXC ケモカイン

ケモカインは 8-14 kDa の小さな分子群であり、生体における様々な細胞の組織内移動や局在を制御する^{92,115}。また、炎症性疾患および自己免疫疾患、がんの増殖や転移に深く関与していることが知られている^{116,117}。ケモカインは高度に保存された 4 つのシステイン残基の位置から、CXC, CC, XC, CX3C のサブファミリーに分類され、全て 7 回膜貫通型 G タンパク質受容体を介して作用する⁹⁰。ケモカインの特徴として、1 つの受容体に複数のリガンドが対応する。また、それぞれのリガンドも複数の受容体に対応する。CXC ケモカインは ELR モチーフ (Glu-Leu-Arg) を有する ELR⁺ および、そのモチーフを有さない ELR⁻ に分類される (表 22)。それぞれは血管新生に対する役割が異なっており、ELR⁺ は血管新生を促進する一方で、ELR⁻ は血管新生を阻害する¹¹⁸。本研究で明らかにした 1,2-NQ による発現上昇遺伝子である CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL8 はいずれも ELR⁺ であり、血管新生を促進させる。また、CXCL2 および CXCL3 はブレオマイシン誘発性肺繊維症の病態形成に重要であり、それらの減少で症状が改善する¹¹⁸。また、CXCL5 および CXCL8 は非小細胞肺癌における血管新生に関与する¹¹⁹。さらに、本研究では 1,2-NQ が DNA メチル化制御を介して CXCL8 を発現誘導することを明らかにした。これまでに DNA メチル化調節を受けるケモカインは CXCL2, CXCL12, CXCL14 が報告されているが¹²⁰⁻¹²²、いずれも限定的な知見にとどまり DNA メチル化によるケモカイン発現制御の包括的な理解には至っていない。

表 22. CXC ケモカインの分類

ELR ⁺ chemokines	ELR ⁻ chemokines
Growth-related gene alpha (GRO- α) 【CXCL1】	Platelet factor-4 (PF4) 【CXCL4】
Growth-related gene beta (GRO- β) 【CXCL2】	Monokine induced by interferon- γ (MIG) 【CXCL9】
Growth-related gene gamma (GRO- γ) 【CXCL3】	Interferon- γ -inducible protein (IP-10) 【CXCL10】
Epithelial neutrophil activating protein-78 (ENA-78) 【CXCL5】	IFN-inducible T-cell α -chemoattractant (I-TAC) 【CXCL11】
Granulocyte chemotactic protein-2 (GCP-2) 【CXCL6】	Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) 【CXCL12】
Platelet basic protein (PBP) 【CXCL7】	B cell-attracting chemokine 1 (BCA-1) 【CXCL13】
Interleukin-8 (IL-8) 【CXCL8】	Breast and kidney-expressed chemokine (BRAK) 【CXCL14】
Lungkine 【CXCL15】	CXC chemokine ligand 16 【CXCL16】
	CXC chemokine ligand 17 【CXCL17】

2-4-4. DNMT 酵素活性を阻害する一酸化窒素と 1,2-NQ の遺伝子発現に対する影響

本研究では、NO による酸化修飾を受ける DNMT3B が 1,2-NQ による付加体形成も受けることを明らかにした。一方で、両者の標的残基は異なっていた。NO は酵素活性中心である C651 を酸化修飾するが、1,2-NQ は C651 近傍の K662 など計 4 箇所のリジンおよびヒスチジン残基を修飾した (図 11, 12)。1,2-NQ による付加体形成の酵素活性に対する直接的な影響は完全に解明されていないが、公共の立体構造データを再解析することでその可能性が示された (図 13)。続いて、遺伝子発現に対する NO と 1,2-NQ の影響を比較した。所属研究室で以前に報告した NO による発現上昇遺伝子と 1,2-NQ による発現上昇遺伝子をそれぞれ比較したところ、それらはほとんど一致しなかった (図 44)¹²³。これは NO と 1,2-NQ の両者ともに低分子かつ反応性が高いことから作用点を豊富に持つことに起因すると考えられる。さらに、本研究において着目した CXC ケモカイン (*CXCL1*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL8*) はいずれも NO による発現上昇遺伝子に含まれていなかった。以上より、NO と 1,2-NQ は DNMT3B という共通した標的を有するが、細胞に及ぼす影響は大きく異なることが示唆された。

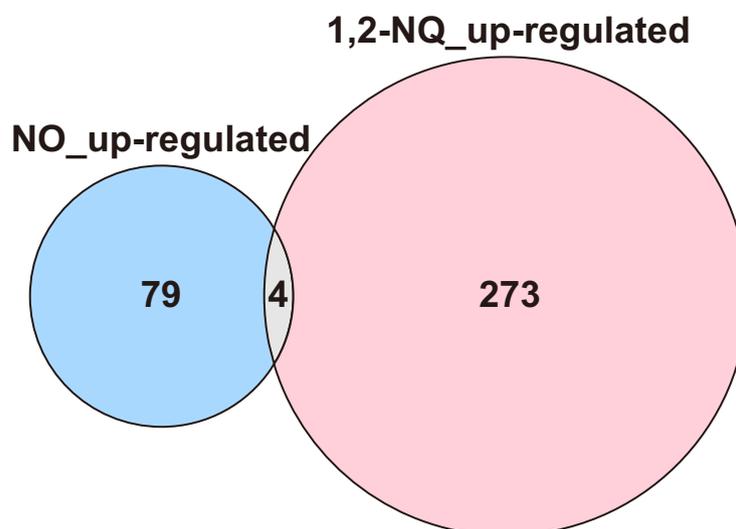


図 44. NO および 1,2-NQ による発現上昇遺伝子

ベン図の作成は jvenn (<https://jvenn.toulouse.inrae.fr/app/index.html>) を用いて行った¹²⁴。

NO_up-regulated: NO による発現上昇遺伝子 (青色)

A549 細胞に NO ドナーである GSNO (*S*-nitrosoglutathione) を終濃度 100 μ M となるよう処理し、処理後 48 時間後に RNA-Seq を行った。発現上昇遺伝子は \log_2 -Fold change ≥ 1 かつ $p < 0.01$ であった遺伝子を定義した¹²³。

1,2-NQ_up-regulated: 1,2-NQ による発現上昇遺伝子 (赤色)

図 23 参照

2-4-5. 1,2-NQ による他のタンパク質への影響

これまでに、1,2-NQ は様々なタンパク質と付加体を形成することが報告されており、本研究においても DNMT に対してのみ付加体を形成した可能性は低い。1,2-NQ の標的タンパク質の中でも EGFR (epidermal growth factor receptor) および IKK β (inhibitor of I κ B kinase) との付加体形成は本研究で得られた結果と関連する可能性がある。また、脱メチル化を担う TET に対する影響も併せて考察する。

2-4-5-1. 1,2-NQ による EGFR 付加体形成

1,2-NQ は EGFR K80 と結合し、EGFR-Akt シグナリングを活性化させることで抗アポトーシス効果を示すことが知られている⁴⁸。さらに、1,2-NQ により活性化される EGFR-ERK1/2 シグナリングは CXCL8 発現を誘導することが報告されている¹²⁵⁻¹²⁷。このことから、本研究における CXCL8 発現誘導を介した細胞増殖の誘導に EGFR シグナリングが関与している可能性が考えられる。一方で、1,2-NQ による EGFR シグナリングの活性化はいずれも短時間での解析であり、1,2-NQ を長時間処理した場合のシグナルの状態は明らかではない。今後は、内在性の EGFR が発現していない HEK293T 細胞を用いた検討を行うことで、CXCL8 発現誘導における EGFR シグナリングの役割を明らかにできると考える。

2-4-5-2. 1,2-NQ による IKK β 付加体形成

IKK β は NF- κ B と結合し負に調節する I κ B (inhibitor of κ B) をリン酸化することで遊離させ、NF- κ B を活性化する¹²⁸。1,2-NQ は IKK β C179 と結合することで LPS (Lipopolysaccharides) により誘導される IKK β リン酸化活性を阻害し、下流の NF- κ B シグナルおよび iNOS 発現を抑制することが報告されている¹²⁹。これは本研究において NF- κ B p65 の核移行が 1,2-NQ により誘導されなかったことと一致する。つまり、1,2-NQ は NF- κ B シグナルに依存することなく複数の炎症性サイトカインの発現をエピジェネティックに誘導できるユニークな化学物質である。

2-4-5-3. 1,2-NQ による脱メチル化酵素 TET への影響

一般的に受動的な脱メチル化は複製依存的に見られるが、能動的な脱メチル化はコンテキスト依存的に見られ、酵素やシグナルの状態によっても変化することから、本研究では受動的な脱メチル化にのみ着目した。ここでは 1,2-NQ による脱メチル化酵素 TET 活性化の可能性について考察したい。TET は哺乳類では TET1, TET2, TET3 の 3 種が同定され、5mC (メチル化シトシン) を連続的に酸化することで 5hmC (ヒドロキシメチル化シトシン)、5fC (ホルミルシトシン)、5caC (カルボニルシトシン) を産生する (図 45)。これらの塩基は TDG (チミン DNA グリコシラーゼ)、BER (塩基除去修復) もしくは DNA 複製の過程によりシトシンへと戻される¹³⁰。これまでに TET に対する 1,2-NQ の影響は報告されていない。TET2 の機能喪失変異は造血性悪性腫瘍において頻繁に見られ、予後不良と関連することが知られており^{131,132}、TET の活性化が悪性腫瘍に対する治療標的となりうる。これまでに、ビタミン C やターメリック由来成分であるクルクミンが TET の活性化剤として報告されてきた^{133,134}。さらに、近年では過酸化水素由来酸化ストレスが TET1 の活性化を介して DNA 脱メチル化を誘導することが報告された¹³⁵。前述したように 1,2-NQ は酸化ストレスを誘導することが知られており、TET1 の活性化に関連した可能性が考えられる。まとめると、1,2-NQ による TET への影響は未だ不明な点が多く、今後さらな

る解析が必要である。

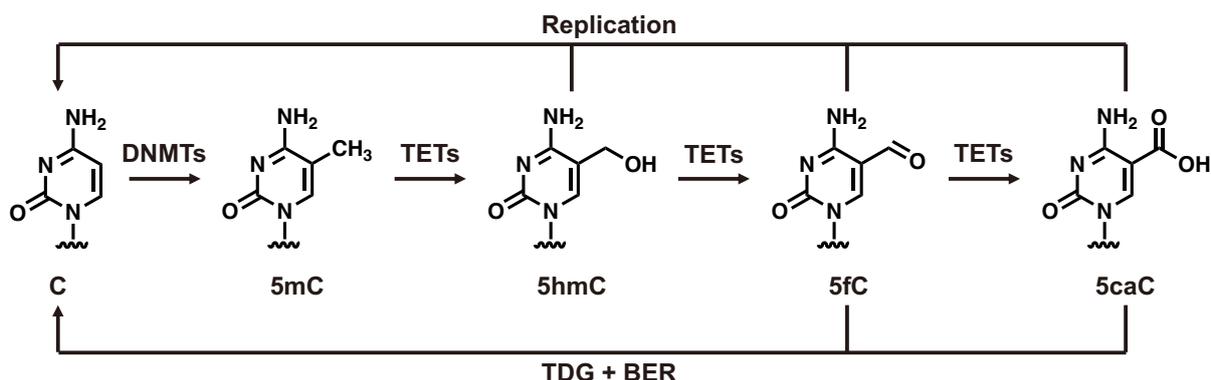


図 45. TET による能動的な脱メチル化

2-4-6. 1,2-NQ によるエンハンサー活性制御

本研究では 1,2-NQ によるエンハンサー領域内 CpG サイトの脱メチル化が転写因子 NF- κ B p65 のリクルートを誘導し CXCL8 転写活性の上昇につながることを示した。エンハンサーは転写調節領域の 1 つであり、プロモーターに転写因子をリクルートすることで転写を促進する。エンハンサーは CpG が乏しく (CpG の多くはプロモーターに集積し CpG アイランドを形成する)、TSS (転写開始点) との距離や方向に関係なく転写を誘導できるため、その定義が複雑であり、これまで DNA メチル化の役割はほとんど明らかではなかった¹³⁶。一方で、近年では次世代シーケンサーの発達によりその役割が徐々に明らかになっている。例えば、プロモーターではなくエンハンサーの DNA メチル化が、喫煙者にしばしば発生する肺扁平上皮癌の腫瘍形成と免疫浸潤に重要な役割を果たすことが報告されており¹³⁷、エンハンサーの DNA メチル化ががんの発生や進行に寄与する可能性が強調されている。また、エンハンサーのシトシン脱メチル化はその DNA 配列や結合する転写因子に依存する形で活性化につながることを示された¹³⁸。重要なことは、DNA メチル化によるエンハンサーの活性化は転写因子に依存するという点である。転写因子の DNA へのアクセスには DNA の配列や構造、他の転写因子との相互作用といった物理的要因のほか、ヒストン修飾や DNA メチル化などのエピジェネティックな要因が関与することが知られている¹³⁹。一般的に、メチル化 DNA は転写因子の結合を阻害することが知られており、実際に多くの転写因子の結合が DNA メチル化により阻害される¹⁴⁰。一方で、DNA メチル化により DNA への結合が増加する転写因子もいくつか報告されている¹⁴¹。このように、DNA メチル化に対する転写因子の応答性が体系的に示されているが、これらはコンテキストにより大きく異なる点に注意が必要である。例えば、CTCF 結合は認識モチーフ内の特定の CpG サイトのメチル化により影響を受ける¹⁴²。まとめると、転写因子の DNA メチル化に対する応答性はエンハンサーの活性化に重要であるが、それはコンテキスト依存的に変動するため、エンハンサーのエピジェネティックな調節機構の解明にはさらなる研究が必要である。

2-4-7. 1,2-NQ による CXCL8 発現誘導とがん病態の関連

本研究では TCGA データベースから肺腺がん患者における遺伝子発現および生存期間データを取得し、CXCL8 発現と肺腺がん患者の予後不良について相関関係を得た。炎症性ケモカインである CXCL8 は、炎症反応や血管新生を亢進し、腫瘍微小環境内での腫瘍細胞の増殖と遊走を促進する^{143,144}。その結果、腫瘍の進行および肺腺がん患者の予後不良に繋がったと推察される。また、1,2-NQ により発現誘導される他の CXC ケモカインである CXCL1, CXCL3, CXCL5 についても同様の解析を行ったところ、予想に反してこれらのケモカインの発現が高い患者においては生存期間の短縮は示さなかった (図 46)。さらに、がんステージの進行に伴ってもこれらのケモカインの発現は上昇しなかった (図 47)。CXCL1 は主に好中球の動員に関与するが、好中球の浸潤は肺腺がんの予後に相関しないことが報告されている¹⁴⁵。一方で、CXCL8 は他のケモカインに比して強力な血管新生作用を有していることも¹⁴⁶、腫瘍の予後不良や進行との顕著な相関を示した原因であると考えられる。これらの結果から、CXCL8 発現は腫瘍の進行と増悪に重要な役割を果たしている可能性が示された。

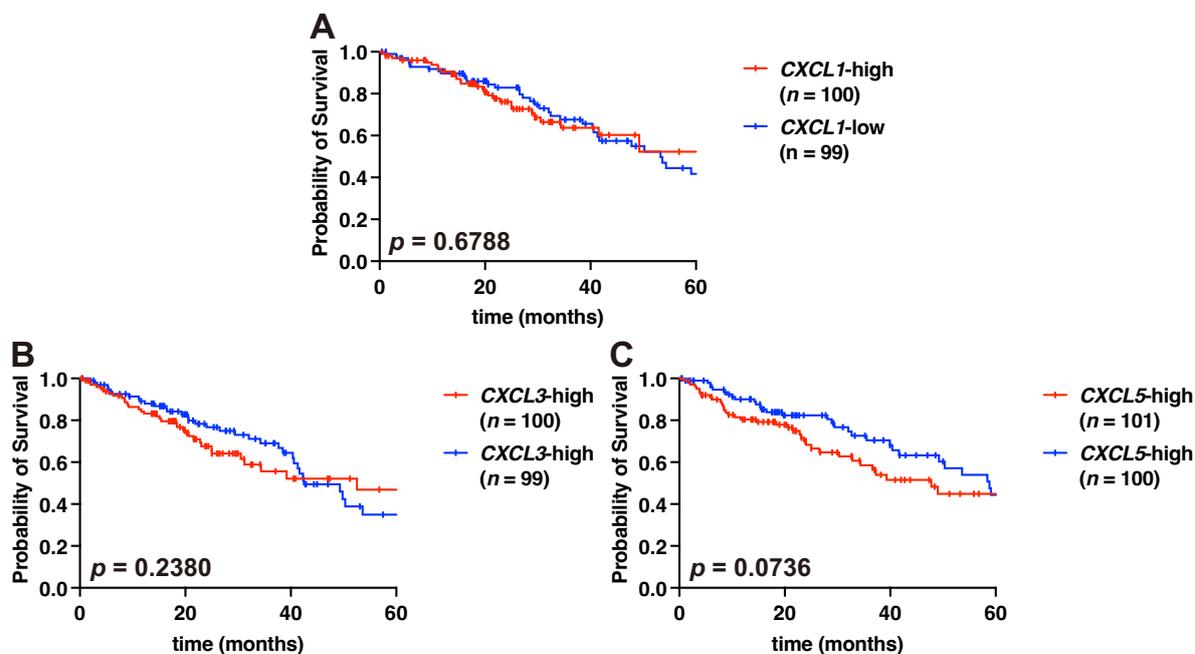


図 46. CXCL1, CXCL3, CXCL5 発現と肺腺がん患者の予後解析

(A, B, C) (A) CXCL1 (B) CXCL3 (C) CXCL5 発現の高い群 (上位 20%) と低い群 (下位 20%) における生存期間解析。結果は Kaplan-Meier プットにて示した。(Log-rank test)

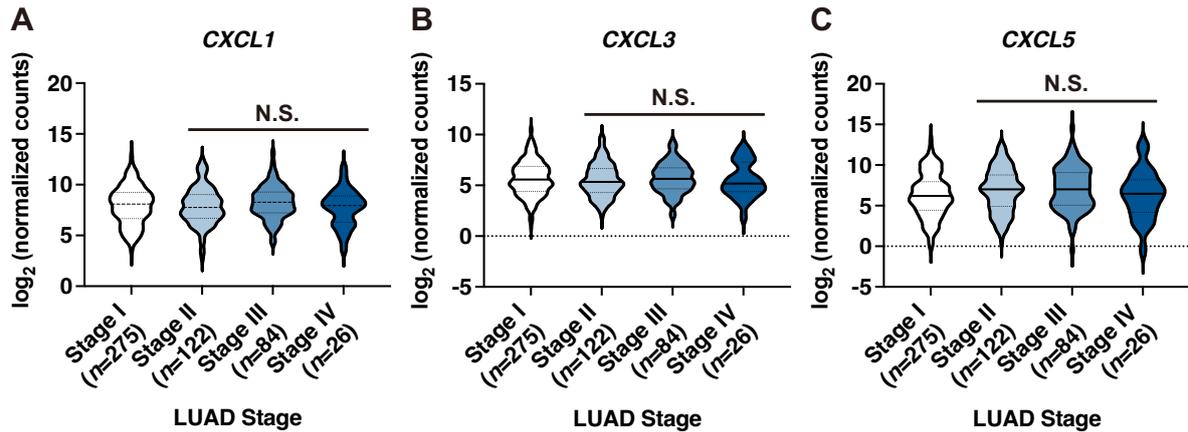


図 47. 各がんステージにおける *CXCL1*, *CXCL3*, *CXCL5* 発現解析

(A, B, C) 各がんステージにおける (A) *CXCL1* (B) *CXCL3* (C) *CXCL5* 発現解析. 結果はバイオリンプロットにて示した. 中央の実線は平均値を, 上下の破線はそれぞれ第 1 四分位数, 第 3 四分位数を示す. (N.S. = Not Significant: One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test)

続いて, 1,2-NQ による *CXCL8* 発現誘導ががん病態にどのように関連するか, 臨床データから解析を行った. 1,2-NQ はタバコ煙にも含まれていることから, 1,2-NQ 曝露要因として喫煙歴に着目した. TCGA データベースには喫煙歴に関する 2 つの指標が収録されている. 1 つは「Smoking history indicator」であり, 過去の喫煙歴から患者を 5 群に分けている (詳細は図 48A). もう 1 つは「Smoking pack years」であり, 1 日に吸ったタバコの箱数と喫煙期間 (年) を掛けることで生涯喫煙量を定義するものである¹⁴⁷. これらの指標と *CXCL8* 発現の相関関係について解析したところ, いずれの指標も喫煙歴と *CXCL8* 発現に相関は見られなかった (図 48). この結果は喫煙歴を正確に反映できていないこと (喫煙歴は主として自己申告) や陰性対照の問題 (環境負荷がない患者は存在しない), 他の環境要因の影響などから生じたと考えられる. これらの問題点はいずれも環境要因研究における重大な障壁であり, 臨床研究との橋渡しを難しくする要因として認識されている. 喫煙歴の他に環境負荷を予測する指標は TCGA データベースには収録されておらず, さらに地理的要因や受動喫煙の有無によっても 1,2-NQ の生涯曝露量は変化しうるため, 1,2-NQ 曝露によるがん病態への影響を解析することは现阶段では困難である. また, 本研究では 1,2-NQ 誘導性 *CXCL8* 発現が細胞増殖に及ぼす影響に焦点を当てて解析を行っており, 浸潤や遊走に関連した解析は行っていない. *CXCL8* 発現が腫瘍の他組織への浸潤やリンパ節への転移が見られるステージ 3 において有意に高かったことから, *CXCL8* はがん細胞の増殖だけでなく, 浸潤や遊走にも重要な役割を果たしている可能性がある. 今後, 1,2-NQ 曝露とがん病態とのさらなる関連を明らかにするためには, モデルマウスを用いた *in vivo* 実験などより病態に即した研究が必要である.

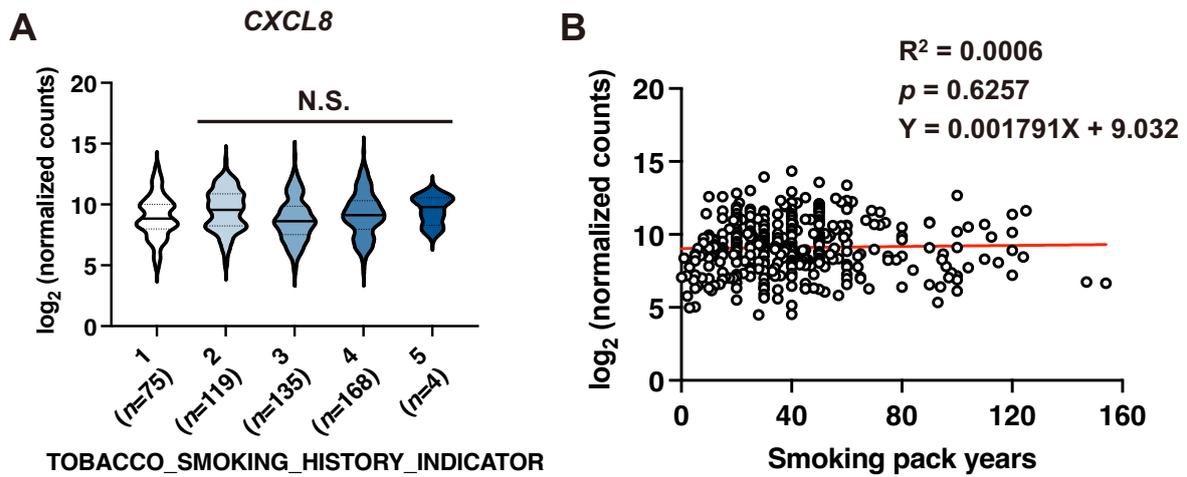


図 48. 肺腺がん患者における喫煙歴と *CXCL8* 発現の相関解析

(A) 「TOBACCO_SMOKING_HISTORY_INDICATOR」と *CXCL8* 発現の相関解析 (N.S. = Not Significant: One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test)

「TOBACCO_SMOKING_HISTORY_INDICATOR」

- 1: 生涯にわたる非喫煙者 (生涯にわたる喫煙が 100 本未満の場合も含む)
- 2: 現在喫煙者
- 3: 喫煙習慣が 15 年以上前にあり, 現在は非喫煙者である者
- 4: 喫煙習慣が 0 から 15 年前にあり, 現在は非喫煙者である者
- 5: 現在は非喫煙者であるが, 禁煙期間が不明である者

(B) 「Smoking pack years」と *CXCL8* 発現の相関解析 (R²: 決定係数)

総括

本研究により得られた成果を以下に示す (図 49)。

1. DNMT 酵素活性を阻害する 4 種の親電子物質を新たに同定した。
2. 4 種の親電子物質の一つである 1,2-NQ は DNMT3B 酵素活性中心近傍のリジン残基と共有結合し、付加体を形成した。
3. 1,2-NQ は複数の炎症性サイトカインシグナルに関連する遺伝子群を転写誘導した。
4. 1,2-NQ はエンハンサー領域の脱メチル化を介して NF- κ B p65 をリクルートし *CXCL8* 発現をエピジェネティックに誘導した。
5. 1,2-NQ は CXCR1/2 シグナルを介して細胞増殖を誘導した。
6. 肺腺がん患者における *CXCL8* 発現はその予後不良に関連した。

本研究ではタバコ煙やディーゼル排気に含まれる親電子物質 1,2-NQ による DNMT 酵素活性阻害を介した DNA メチル化制御とエピジェネティックな CXC ケモカイン発現誘導に伴うがん細胞増殖の亢進を明らかにした。また、*CXCL8* 発現が肺腺がん患者における予後不良に関連することを明らかにし、環境因子 1,2-NQ による DNMT 活性阻害を介した DNA メチル化制御ががん病態と関連する可能性を提示した。

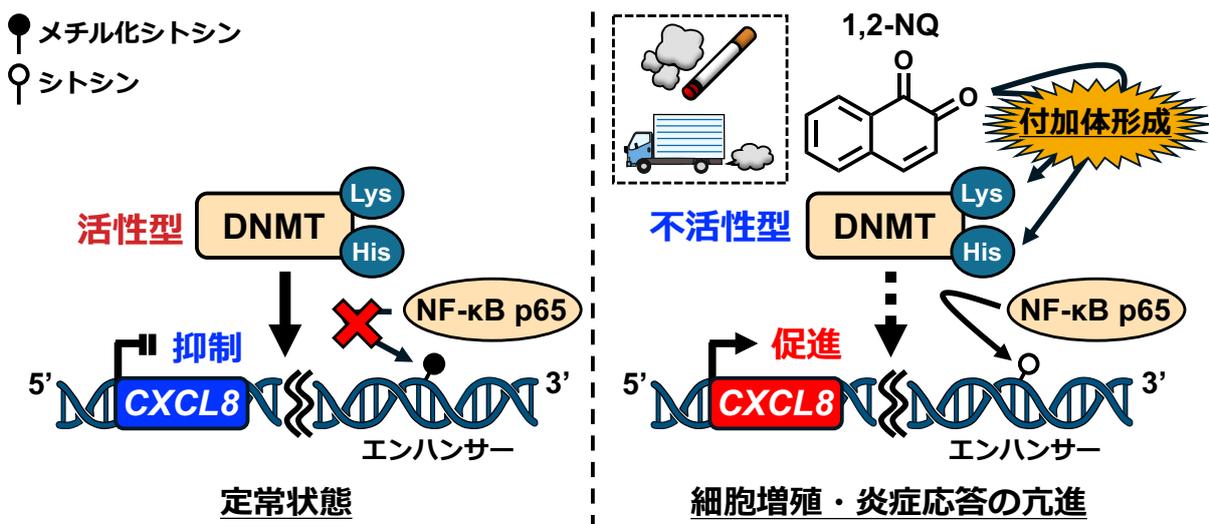


図 49. グラフィカルアブストラクト

引用文献

1. Parkin, D.M., Boyd, L., and Walker, L.C. (2011). 16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *Br J Cancer* *105 Suppl 2*, S77-81. 10.1038/bjc.2011.489.
2. Karimi, S.M., Maziyaqi, A., Ahmadian Moghadam, S., Jafarkhani, M., Zarei, H., Moradi-Lakeh, M., and Pouran, H. (2020). Continuous exposure to ambient air pollution and chronic diseases: prevalence, burden, and economic costs. *Rev Environ Health* *35*, 379-399. 10.1515/reveh-2019-0106.
3. Beulens, J.W.J., Pinho, M.G.M., Abreu, T.C., den Braver, N.R., Lam, T.M., Huss, A., Vlaanderen, J., Sonnenschein, T., Siddiqui, N.Z., Yuan, Z., et al. (2022). Environmental risk factors of type 2 diabetes-an exposome approach. *Diabetologia* *65*, 263-274. 10.1007/s00125-021-05618-w.
4. Wild, C.P. (2005). Complementing the genome with an "exposome": the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. In *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, pp. 1847-1850. 10.1158/1055-9965.epi-05-0456.
5. Wild, C.P. (2012). The exposome: from concept to utility. *Int J Epidemiol* *41*, 24-32. 10.1093/ije/dyr236.
6. Dennis, K.K., Marder, E., Balshaw, D.M., Cui, Y., Lynes, M.A., Patti, G.J., Rappaport, S.M., Shaughnessy, D.T., Vrijheid, M., and Barr, D.B. (2017). Biomonitoring in the Era of the Exposome. *Environ Health Perspect* *125*, 502-510. 10.1289/ehp474.
7. Fanti, G., Borghi, F., Spinazzè, A., Rovelli, S., Campagnolo, D., Keller, M., Cattaneo, A., Cauda, E., and Cavallo, D.M. (2021). Features and Practicability of the Next-Generation Sensors and Monitors for Exposure Assessment to Airborne Pollutants: A Systematic Review. *Sensors (Basel)* *21*. 10.3390/s21134513.
8. Rappaport, S.M., and Smith, M.T. (2010). Epidemiology. Environment and disease risks. *Science* *330*, 460-461. 10.1126/science.1192603.
9. Uchida, K. (1999). Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. *Trends Cardiovasc Med* *9*, 109-113. 10.1016/s1050-1738(99)00016-x.
10. Uchida, K. (2003). 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* *42*, 318-343. 10.1016/s0163-7827(03)00014-6.
11. Mottram, D.S., Wedzicha, B.L., and Dodson, A.T. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* *419*, 448-449. 10.1038/419448a.
12. Kautzman, K.E., Surratt, J.D., Chan, M.N., Chan, A.W., Hersey, S.P., Chhabra, P.S., Dalleska, N.F., Wennberg, P.O., Flagan, R.C., and Seinfeld, J.H. (2010). Chemical composition of gas- and aerosol-phase products from the photooxidation of naphthalene. *J Phys Chem A* *114*, 913-934. 10.1021/jp908530s.
13. Arthur, K.C., Emma Di, S., Ying, Y., Chester, E.R., Debra, A.S., Yoshito, K., Antonio, H.M., Arantzazu, E.-F., Takahiro, K., Ed, A., and John, R.F. (2004). Determination of Four Quinones in Diesel Exhaust Particles, SRM 1649a, and Atmospheric PM_{2.5} Special Issue of *Aerosol Science and Technology* on Findings from the Fine Particulate Matter Supersites Program. *Aerosol Science and Technology* *38*, 68-81. 10.1080/02786820390229471.

14. Kumagai, Y., Shinkai, Y., Miura, T., and Cho, A.K. (2012). The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *52*, 221-247. 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134517.
15. Kumagai, Y., and Abiko, Y. (2017). Environmental Electrophiles: Protein Adducts, Modulation of Redox Signaling, and Interaction with Persulfides/Polysulfides. *Chem Res Toxicol* *30*, 203-219. 10.1021/acs.chemrestox.6b00326.
16. Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A., Mullins, M.E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D.J., and Loscalzo, J. (1992). S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 444-448. 10.1073/pnas.89.1.444.
17. Nakamura, T., Oh, C.K., Zhang, X., and Lipton, S.A. (2021). Protein S-nitrosylation and oxidation contribute to protein misfolding in neurodegeneration. *Free Radic Biol Med* *172*, 562-577. 10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.002.
18. Gu, Z., Nakamura, T., and Lipton, S.A. (2010). Redox reactions induced by nitrosative stress mediate protein misfolding and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* *41*, 55-72. 10.1007/s12035-010-8113-9.
19. Anand, P., and Stamler, J.S. (2012). Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. *J Mol Med (Berl)* *90*, 233-244. 10.1007/s00109-012-0878-z.
20. Okuda, K., Nakahara, K., Ito, A., Iijima, Y., Nomura, R., Kumar, A., Fujikawa, K., Adachi, K., Shimada, Y., Fujio, S., et al. (2023). Pivotal role for S-nitrosylation of DNA methyltransferase 3B in epigenetic regulation of tumorigenesis. *Nat Commun* *14*, 621. 10.1038/s41467-023-36232-6.
21. Smith, Z.D., and Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* *14*, 204-220. 10.1038/nrg3354.
22. Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* *99*, 247-257. 10.1016/s0092-8674(00)81656-6.
23. Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* *69*, 915-926. 10.1016/0092-8674(92)90611-f.
24. Li, E., and Zhang, Y. (2014). DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *6*, a019133.
25. Jurkowska, R.Z., Jurkowski, T.P., and Jeltsch, A. (2011). Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem* *12*, 206-222. 10.1002/cbic.201000195.
26. Kikuchi, A., Onoda, H., Yamaguchi, K., Kori, S., Matsuzawa, S., Chiba, Y., Tanimoto, S., Yoshimi, S., Sato, H., Yamagata, A., et al. (2022). Structural basis for activation of DNMT1. *Nat Commun* *13*, 7130. 10.1038/s41467-022-34779-4.
27. Takeshita, K., Suetake, I., Yamashita, E., Suga, M., Narita, H., Nakagawa, A., and Tajima, S. (2011). Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1). *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 9055-9059. 10.1073/pnas.1019629108.
28. Ren, W., Fan, H., Grimm, S.A., Kim, J.J., Li, L., Guo, Y., Petell, C.J., Tan, X.F., Zhang, Z.M., Coan, J.P.,

- et al. (2021). DNMT1 reads heterochromatic H4K20me3 to reinforce LINE-1 DNA methylation. *Nat Commun* *12*, 2490. 10.1038/s41467-021-22665-4.
29. Sendžikaitė, G., Hanna, C.W., Stewart-Morgan, K.R., Ivanova, E., and Kelsey, G. (2019). A DNMT3A PWWP mutation leads to methylation of bivalent chromatin and growth retardation in mice. *Nat Commun* *10*, 1884. 10.1038/s41467-019-09713-w.
 30. Kubo, N., Uehara, R., Uemura, S., Ohishi, H., Shirane, K., and Sasaki, H. (2024). Combined and differential roles of ADD domains of DNMT3A and DNMT3L on DNA methylation landscapes in mouse germ cells. *Nat Commun* *15*, 3266. 10.1038/s41467-024-47699-2.
 31. Fatemi, M., Pao, M.M., Jeong, S., Gal-Yam, E.N., Egger, G., Weisenberger, D.J., and Jones, P.A. (2005). Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic Acids Res* *33*, e176. 10.1093/nar/gni180.
 32. Jones, P.A. (2002). DNA methylation and cancer. *Oncogene* *21*, 5358-5360.
 33. Herman, J.G., and Baylin, S.B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* *349*, 2042-2054. 10.1056/NEJMra023075.
 34. Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* *21*, 5400-5413.
 35. Perera, F.P. (1996). Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* *88*, 496-509.
 36. Daniel, F.I., Cherubini, K., Yurgel, L.S., de Figueiredo, M.A., and Salum, F.G. (2011). The role of epigenetic transcription repression and DNA methyltransferases in cancer. *Cancer* *117*, 677-687. 10.1002/cncr.25482.
 37. Zhang, W., and Xu, J. (2017). DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. *Biomark Res* *5*, 1. 10.1186/s40364-017-0081-z.
 38. Ley, T.J., Ding, L., Walter, M.J., McLellan, M.D., Lamprecht, T., Larson, D.E., Kandoth, C., Payton, J.E., Baty, J., Welch, J., et al. (2010). DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* *363*, 2424-2433. 10.1056/NEJMoa1005143.
 39. Sandoval, J.E., Huang, Y.H., Muise, A., Goodell, M.A., and Reich, N.O. (2019). Mutations in the DNMT3A DNA methyltransferase in acute myeloid leukemia patients cause both loss and gain of function and differential regulation by protein partners. *J Biol Chem* *294*, 4898-4910. 10.1074/jbc.RA118.006795.
 40. Martin, E.M., and Fry, R.C. (2018). Environmental Influences on the Epigenome: Exposure-Associated DNA Methylation in Human Populations. *Annu Rev Public Health* *39*, 309-333. 10.1146/annurev-publhealth-040617-014629.
 41. Wolhuter, K., Whitwell, H.J., Switzer, C.H., Burgoyne, J.R., Timms, J.F., and Eaton, P. (2018). Evidence against Stable Protein S-Nitrosylation as a Widespread Mechanism of Post-translational Regulation. *Mol Cell* *69*, 438-450.e435. 10.1016/j.molcel.2017.12.019.
 42. Gao, L., Emperle, M., Guo, Y., Grimm, S.A., Ren, W., Adam, S., Uryu, H., Zhang, Z.M., Chen, D., Yin, J., et al. (2020). Comprehensive structure-function characterization of DNMT3B and DNMT3A reveals distinctive de novo DNA methylation mechanisms. *Nat Commun* *11*, 3355. 10.1038/s41467-020-17109-

- 4.
43. Madeira, F., Madhusoodanan, N., Lee, J., Eusebi, A., Niewielska, A., Tivey, A.R.N., Lopez, R., and Butcher, S. (2024). The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Res* 52, W521-w525. 10.1093/nar/gkae241.
44. Soares, A.G., Muscara, M.N., and Costa, S.K.P. (2020). Molecular mechanism and health effects of 1,2-Napthoquinone. *Excli j* 19, 707-717. 10.17179/excli2020-1210.
45. Iwamoto, N., Sumi, D., Ishii, T., Uchida, K., Cho, A.K., Froines, J.R., and Kumagai, Y. (2007). Chemical knockdown of protein-tyrosine phosphatase 1B by 1,2-naphthoquinone through covalent modification causes persistent transactivation of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 282, 33396-33404. 10.1074/jbc.M705224200.
46. Shinkai, Y., Ding, Y., Miura, T., and Kumagai, Y. (2020). Aggregation of β -crystallin through covalent binding to 1,2-naphthoquinone is rescued by α -crystallin chaperone. *J Toxicol Sci* 45, 37-43. 10.2131/jts.45.37.
47. Toyama, T., Shinkai, Y., Yazawa, A., Kakehashi, H., Kaji, T., and Kumagai, Y. (2014). Glutathione-mediated reversibility of covalent modification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 by 1,2-naphthoquinone through Cys152, but not Lys4. *Chem Biol Interact* 214, 41-48. 10.1016/j.cbi.2014.02.008.
48. Nakahara, K., Hamada, K., Tsuchida, T., Takasugi, N., Abiko, Y., Shien, K., Toyooka, S., Kumagai, Y., and Uehara, T. (2021). Covalent N-arylation by the pollutant 1,2-naphthoquinone activates the EGF receptor. *J Biol Chem* 296, 100524. 10.1016/j.jbc.2021.100524.
49. Lin, C.C., Chen, Y.P., Yang, W.Z., Shen, J.C.K., and Yuan, H.S. (2020). Structural insights into CpG-specific DNA methylation by human DNA methyltransferase 3B. *Nucleic Acids Res* 48, 3949-3961. 10.1093/nar/gkaa111.
50. Poole, L.B. (2015). The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radic Biol Med* 80, 148-157. 10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013.
51. Gowher, H., Liebert, K., Hermann, A., Xu, G., and Jeltsch, A. (2005). Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J Biol Chem* 280, 13341-13348. 10.1074/jbc.M413412200.
52. Xavier, A., and Srividhya, N. (2014). Synthesis and study of Schiff base ligands. *IOSR Journal of Applied Chemistry* 7, 06-15.
53. Du, Q., Wang, Z., and Schramm, V.L. (2016). Human DNMT1 transition state structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 2916-2921. 10.1073/pnas.1522491113.
54. Deguchi, T., and Barchas, J. (1971). Inhibition of transmethylations of biogenic amines by S-adenosylhomocysteine. Enhancement of transmethylation by adenosylhomocysteinase. *J Biol Chem* 246, 3175-3181.
55. Ueland, P.M., and Saebø, J. (1979). S-Adenosylhomocysteinase from mouse liver. Effect of adenine and adenine nucleotides on the enzyme catalysis. *Biochemistry* 18, 4130-4135. 10.1021/bi00586a012.
56. Saavedra, O.M., Isakovic, L., Llewellyn, D.B., Zhan, L., Bernstein, N., Claridge, S., Raepfel, F.,

- Vaisburg, A., Elowe, N., Petschner, A.J., et al. (2009). SAR around (l)-S-adenosyl-l-homocysteine, an inhibitor of human DNA methyltransferase (DNMT) enzymes. *Bioorg Med Chem Lett* 19, 2747-2751. 10.1016/j.bmcl.2009.03.113.
57. Isakovic, L., Saavedra, O.M., Llewellyn, D.B., Claridge, S., Zhan, L., Bernstein, N., Vaisburg, A., Elowe, N., Petschner, A.J., Rahil, J., et al. (2009). Constrained (l)-S-adenosyl-l-homocysteine (SAH) analogues as DNA methyltransferase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19, 2742-2746. 10.1016/j.bmcl.2009.03.132.
58. Weemaes, C.M., van Tol, M.J., Wang, J., van Ostaijen-ten Dam, M.M., van Eggermond, M.C., Thijssen, P.E., Aytekin, C., Brunetti-Pierri, N., van der Burg, M., Graham Davies, E., et al. (2013). Heterogeneous clinical presentation in ICF syndrome: correlation with underlying gene defects. *Eur J Hum Genet* 21, 1219-1225. 10.1038/ejhg.2013.40.
59. Lappalainen, I., and Vihinen, M. (2002). Structural basis of ICF-causing mutations in the methyltransferase domain of DNMT3B. *Protein Eng* 15, 1005-1014. 10.1093/protein/15.12.1005.
60. Kuck, D., Caulfield, T., Lyko, F., and Medina-Franco, J.L. (2010). Nanaomycin A selectively inhibits DNMT3B and reactivates silenced tumor suppressor genes in human cancer cells. *Mol Cancer Ther* 9, 3015-3023. 10.1158/1535-7163.mct-10-0609.
61. Szymańska, A., Dutkiewicz, M., and Maciejewski, H. (2024). Thiol-isocyanate Click Reaction for Rapid and Efficient Generation of a Library of Organofunctional Silanes. *Organometallics*.
62. Shin, J., Lee, J., and Jeong, H.M. (2018). Properties of polythiourethanes prepared by thiol–isocyanate click reaction. *Journal of Applied Polymer Science* 135, 46070.
63. Stark, G.R. (1965). REACTIONS OF CYANATE WITH FUNCTIONAL GROUPS OF PROTEINS. II. FORMATION, DECOMPOSITION, AND PROPERTIES OF N-CARBAMYLIMIDAZOLE. *Biochemistry* 4, 588-595. 10.1021/bi00879a032.
64. Pearson, R.G. (1963). Hard and soft acids and bases. *Journal of the American Chemical society* 85, 3533-3539.
65. Pearson, R.G., and Songstad, J. (1967). Application of the principle of hard and soft acids and bases to organic chemistry. *Journal of the American Chemical Society* 89, 1827-1836.
66. Lopachin, R.M., Gavin, T., Decaprio, A., and Barber, D.S. (2012). Application of the Hard and Soft, Acids and Bases (HSAB) theory to toxicant--target interactions. *Chem Res Toxicol* 25, 239-251. 10.1021/tx2003257.
67. Lu, J., Guo, Y., Yin, J., Chen, J., Wang, Y., Wang, G.G., and Song, J. (2024). Structure-guided functional suppression of AML-associated DNMT3A hotspot mutations. *Nat Commun* 15, 3111. 10.1038/s41467-024-47398-y.
68. Horton, J.R., Pathuri, S., Wong, K., Ren, R., Rueda, L., Fosbenner, D.T., Heerding, D.A., McCabe, M.T., Pappalardi, M.B., Zhang, X., et al. (2022). Structural characterization of dicyanopyridine containing DNMT1-selective, non-nucleoside inhibitors. *Structure* 30, 793-802.e795. 10.1016/j.str.2022.03.009.
69. Chen, Y., Lun, A.T., and Smyth, G.K. (2016). From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. *F1000Res* 5,

1438. 10.12688/f1000research.8987.2.
70. Chen, Y., Chen, L., Lun, A.T.L., Baldoni, P.L., and Smyth, G.K. (2024). edgeR 4.0: powerful differential analysis of sequencing data with expanded functionality and improved support for small counts and larger datasets. *bioRxiv*, 2024.2001.2021.576131. 10.1101/2024.01.21.576131.
 71. McCarthy, D.J., Chen, Y., and Smyth, G.K. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* *40*, 4288-4297. 10.1093/nar/gks042.
 72. Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* *26*, 139-140. 10.1093/bioinformatics/btp616.
 73. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., and Mesirov, J.P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 15545-15550. 10.1073/pnas.0506580102.
 74. Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., et al. (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* *34*, 267-273. 10.1038/ng1180.
 75. Xu, S., Hu, E., Cai, Y., Xie, Z., Luo, X., Zhan, L., Tang, W., Wang, Q., Liu, B., Wang, R., et al. (2024). Using clusterProfiler to characterize multiomics data. *Nat Protoc* *19*, 3292-3320. 10.1038/s41596-024-01020-z.
 76. Wu, T., Hu, E., Xu, S., Chen, M., Guo, P., Dai, Z., Feng, T., Zhou, L., Tang, W., Zhan, L., et al. (2021). clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation (Camb)* *2*, 100141. 10.1016/j.xinn.2021.100141.
 77. Yu, G., Wang, L.G., Han, Y., and He, Q.Y. (2012). clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics* *16*, 284-287. 10.1089/omi.2011.0118.
 78. Li, L.C., and Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* *18*, 1427-1431. 10.1093/bioinformatics/18.11.1427.
 79. Perez, G., Barber, G.P., Benet-Pages, A., Casper, J., Clawson, H., Diekhans, M., Fischer, C., Gonzalez, J.N., Hinrichs, A.S., Lee, C.M., et al. (2024). The UCSC Genome Browser database: 2025 update. *Nucleic Acids Res*. 10.1093/nar/gkae974.
 80. Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., and Mesirov, J.P. (2011). Integrative genomics viewer. In *Nat Biotechnol*, pp. 24-26. 10.1038/nbt.1754.
 81. Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J.T., and Mesirov, J.P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* *14*, 178-192. 10.1093/bib/bbs017.
 82. Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Wenger, A.M., Zehir, A., and Mesirov, J.P. (2017). Variant Review with the Integrative Genomics Viewer. *Cancer Res* *77*, e31-e34. 10.1158/0008-5472.can-17-0337.

83. Robinson, J.T., Thorvaldsdottir, H., Turner, D., and Mesirov, J.P. (2023). igv.js: an embeddable JavaScript implementation of the Integrative Genomics Viewer (IGV). *Bioinformatics* 39. 10.1093/bioinformatics/btac830.
84. Kumaki, Y., Oda, M., and Okano, M. (2008). QUMA: quantification tool for methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 36, W170-175. 10.1093/nar/gkn294.
85. Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., and Watanabe, M. (1999). A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Analytical Communications* 36, 47-50.
86. Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y., and Ueno, K. (1997). A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta* 44, 1299-1305. 10.1016/s0039-9140(97)00017-9.
87. Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A., Jacobsen, A., Byrne, C.J., Heuer, M.L., Larsson, E., et al. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2, 401-404. 10.1158/2159-8290.cd-12-0095.
88. Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., et al. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6, p11. 10.1126/scisignal.2004088.
89. de Bruijn, I., Kundra, R., Mastrogiacomo, B., Tran, T.N., Sikina, L., Mazor, T., Li, X., Ochoa, A., Zhao, G., Lai, B., et al. (2023). Analysis and Visualization of Longitudinal Genomic and Clinical Data from the AACR Project GENIE Biopharma Collaborative in cBioPortal. *Cancer Res* 83, 3861-3867. 10.1158/0008-5472.can-23-0816.
90. Murphy, P.M. (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 12, 593-633. 10.1146/annurev.iy.12.040194.003113.
91. Baird, A.-M., Gray, S.G., and O'Byrne, K.J. (2011). Epigenetics underpinning the regulation of the CXC (ELR+) chemokines in non-small cell lung cancer. *PloS one* 6, e14593.
92. Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127.
93. Kanehisa, M., and Sato, Y. (2020). KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Sci* 29, 28-35. 10.1002/pro.3711.
94. Kanehisa, M., Sato, Y., and Kawashima, M. (2022). KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data. *Protein Sci* 31, 47-53. 10.1002/pro.4172.
95. Christman, J.K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21, 5483-5495. 10.1038/sj.onc.1205699.
96. Inui, T., Watanabe, M., Nakamoto, K., Sada, M., Hirata, A., Nakamura, M., Honda, K., Ogawa, Y., Takata, S., Yokoyama, T., et al. (2018). Bronchial epithelial cells produce CXCL1 in response to LPS and TNF α : A potential role in the pathogenesis of COPD. *Exp Lung Res* 44, 323-331. 10.1080/01902148.2018.1520936.

97. Xiong, X., Liao, X., Qiu, S., Xu, H., Zhang, S., Wang, S., Ai, J., and Yang, L. (2022). CXCL8 in Tumor Biology and Its Implications for Clinical Translation. *Front Mol Biosci* 9, 723846. 10.3389/fmolb.2022.723846.
98. Dimberg, J., Ström, K., Löfgren, S., Zar, N., Lindh, M., and Matussek, A. (2012). DNA promoter methylation status and protein expression of interleukin-8 in human colorectal adenocarcinomas. *Int J Colorectal Dis* 27, 709-714. 10.1007/s00384-011-1367-5.
99. Tekpli, X., Landvik, N.E., Anmarkud, K.H., Skaug, V., Haugen, A., and Zienolddiny, S. (2013). DNA methylation at promoter regions of interleukin 1B, interleukin 6, and interleukin 8 in non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 62, 337-345. 10.1007/s00262-012-1340-3.
100. Rahnamoun, H., Lu, H., Duttke, S.H., Benner, C., Glass, C.K., and Lauberth, S.M. (2017). Mutant p53 shapes the enhancer landscape of cancer cells in response to chronic immune signaling. *Nat Commun* 8, 754. 10.1038/s41467-017-01117-y.
101. Rahnamoun, H., Lee, J., Sun, Z., Lu, H., Ramsey, K.M., Komives, E.A., and Lauberth, S.M. (2018). RNAs interact with BRD4 to promote enhanced chromatin engagement and transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* 25, 687-697. 10.1038/s41594-018-0102-0.
102. de Andrés, M.C., Takahashi, A., and Oreffo, R.O. (2016). Demethylation of an NF- κ B enhancer element orchestrates iNOS induction in osteoarthritis and is associated with altered chondrocyte cell cycle. *Osteoarthritis Cartilage* 24, 1951-1960. 10.1016/j.joca.2016.06.002.
103. Rau, T.T., Rogler, A., Frischauf, M., Jung, A., Konturek, P.C., Dimmler, A., Faller, G., Sehnert, B., El-Rifai, W., Hartmann, A., et al. (2012). Methylation-dependent activation of CDX1 through NF- κ B: a link from inflammation to intestinal metaplasia in the human stomach. *Am J Pathol* 181, 487-498. 10.1016/j.ajpath.2012.04.028.
104. Eiguren-Fernandez, A., Miguel, A.H., Di Stefano, E., Schmitz, D.A., Cho, A.K., Thuraiatnam, S., Avol, E.L., and Froines, J.R. (2008). Atmospheric distribution of gas-and particle-phase quinones in Southern California. *Aerosol Science and Technology* 42, 854-861.
105. Singh, N., Gupta, V.K., Kumar, A., and Sharma, B. (2017). Synergistic Effects of Heavy Metals and Pesticides in Living Systems. *Front Chem* 5, 70. 10.3389/fchem.2017.00070.
106. Jiang, N., Wen, H., Zhou, M., Lei, T., Shen, J., Zhang, D., Wang, R., Wu, H., Jiang, S., and Li, W. (2020). Low-dose combined exposure of carboxylated black carbon and heavy metal lead induced potentiation of oxidative stress, DNA damage, inflammation, and apoptosis in BEAS-2B cells. *Ecotoxicol Environ Saf* 206, 111388. 10.1016/j.ecoenv.2020.111388.
107. Delgado-Saborit, J., Alam, M., Pollitt, K., Stark, C., and Harrison, R. (2013). Analysis of atmospheric concentrations of quinones and polycyclic aromatic hydrocarbons in vapour and particulate phases. *ATMOSPHERIC ENVIRONMENT* 77, 974-982. 10.1016/j.atmosenv.2013.05.080.
108. Wingfors, H., Hägglund, L., and Magnusson, R. (2011). Characterization of the size-distribution of aerosols and particle-bound content of oxygenated PAHs, PAHs, and n-alkanes in urban environments in Afghanistan. *Atmospheric Environment* 45, 4360-4369.
109. Chung, M.Y., Lazaro, R.A., Lim, D., Jackson, J., Lyon, J., Rendulic, D., and Hasson, A.S. (2006).

- Aerosol-borne quinones and reactive oxygen species generation by particulate matter extracts. *Environ Sci Technol* *40*, 4880-4886. 10.1021/es0515957.
110. Valavanidis, A., Fiotakis, K., Vlahogianni, T., Papadimitriou, V., and Pantikaki, V. (2006). Determination of selective quinones and quinoid radicals in airborne particulate matter and vehicular exhaust particles. *Environmental Chemistry* *3*, 118-123.
 111. Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., and Monks, T.J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chemical research in toxicology* *13*, 135-160.
 112. Shinkai, Y., Iwamoto, N., Miura, T., Ishii, T., Cho, A.K., and Kumagai, Y. (2012). Redox cycling of 1, 2-naphthoquinone by thioredoxin1 through Cys32 and Cys35 causes inhibition of its catalytic activity and activation of ASK1/p38 signaling. *Chemical research in toxicology* *25*, 1222-1230.
 113. Gibney, E.R., and Nolan, C.M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb)* *105*, 4-13. 10.1038/hdy.2010.54.
 114. Orta, M.L., Calderón-Montaño, J.M., Domínguez, I., Pastor, N., Burgos-Morón, E., López-Lázaro, M., Cortés, F., Mateos, S., and Helleday, T. (2013). 5-Aza-2'-deoxycytidine causes replication lesions that require Fanconi anemia-dependent homologous recombination for repair. *Nucleic Acids Res* *41*, 5827-5836. 10.1093/nar/gkt270.
 115. Luster, A.D. (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* *338*, 436-445. 10.1056/nejm199802123380706.
 116. Gerard, C., and Rollins, B.J. (2001). Chemokines and disease. *Nature immunology* *2*, 108-115.
 117. Ben-Baruch, A. (2008). Organ selectivity in metastasis: regulation by chemokines and their receptors. *Clinical & experimental metastasis* *25*, 345-356.
 118. Strieter, R.M., Gomperts, B.N., and Keane, M.P. (2007). The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *The Journal of clinical investigation* *117*, 549-556.
 119. Arenberg, D.A., Keane, M.P., DiGiovine, B., Kunkel, S.L., Morris, S.B., Xue, Y.-Y., Burdick, M.D., Glass, M.C., Iannettoni, M.D., and Strieter, R.M. (1998). Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer. *The Journal of clinical investigation* *102*, 465-472.
 120. Subat, S., Mogushi, K., Yasen, M., Kohda, T., Ishikawa, Y., and Tanaka, H. (2019). Identification of genes and pathways, including the CXCL2 axis, altered by DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* *145*, 675-684.
 121. Ramos, E.A., Grochoski, M., Braun-Prado, K., Seniski, G.G., Cavalli, I.J., Ribeiro, E.M., Camargo, A.A., Costa, F.F., and Klassen, G. (2011). Epigenetic changes of CXCR4 and its ligand CXCL12 as prognostic factors for sporadic breast cancer. *PloS one* *6*, e29461.
 122. Song, E.Y., Shurin, M.R., Tourkova, I.L., Gutkin, D.W., and Shurin, G.V. (2010). Epigenetic mechanisms of promigratory chemokine CXCL14 regulation in human prostate cancer cells. *Cancer research* *70*, 4394-4401.
 123. Mizushima, T., Kubota, S., Iijima, Y., Takasugi, N., and Uehara, T. (2024). Transcriptome analysis in various cell lines exposed to nitric oxide. *J Toxicol Sci* *49*, 281-288. 10.2131/jts.49.281.

124. Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, C., and Klopp, C. (2014). jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15, 293. 10.1186/1471-2105-15-293.
125. Le Quément, C., Guénon, I., Gillon, J.Y., Lagente, V., and Boichot, E. (2008). MMP-12 induces IL-8/CXCL8 secretion through EGFR and ERK1/2 activation in epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L1076-1084. 10.1152/ajplung.00489.2007.
126. Paul, T., Schumann, C., Rüdiger, S., Boeck, S., Heinemann, V., Kächele, V., Steffens, M., Scholl, C., Hichert, V., Seufferlein, T., and Stingl, J.C. (2014). Cytokine regulation by epidermal growth factor receptor inhibitors and epidermal growth factor receptor inhibitor associated skin toxicity in cancer patients. *Eur J Cancer* 50, 1855-1863. 10.1016/j.ejca.2014.04.026.
127. Beei, C., Iwamoto, N., Inaba, T., Shinkai, Y., and Kumagai, Y. (2013). Activation of EGFR/MEK/ERK/AP-1 signaling mediated by 1,2-naphthoquinone, an atmospheric electrophile, in human pulmonary A549 cells. *J Toxicol Sci* 38, 793-797. 10.2131/jts.38.793.
128. Karin, M. (1999). How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18, 6867-6874. 10.1038/sj.onc.1203219.
129. Sumi, D., Akimori, M., Inoue, K., Takano, H., and Kumagai, Y. (2010). 1,2-Naphthoquinone suppresses lipopolysaccharide-dependent activation of IKK β /NF- κ B/NO signaling: an alternative mechanism for the disturbance of inducible NO synthase-catalyzed NO formation. *J Toxicol Sci* 35, 891-898. 10.2131/jts.35.891.
130. Zhang, X., Zhang, Y., Wang, C., and Wang, X. (2023). TET (Ten-eleven translocation) family proteins: structure, biological functions and applications. *Signal Transduct Target Ther* 8, 297. 10.1038/s41392-023-01537-x.
131. Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.P., Robert, F., Alberdi, A., et al. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 360, 2289-2301. 10.1056/NEJMoa0810069.
132. Kosmider, O., Gelsi-Boyer, V., Ciudad, M., Racœur, C., Jooste, V., Vey, N., Quesnel, B., Fenaux, P., Bastie, J.N., Beyne-Rauzy, O., et al. (2009). TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 94, 1676-1681. 10.3324/haematol.2009.011205.
133. Cimmino, L., Dolgalev, I., Wang, Y., Yoshimi, A., Martin, G.H., Wang, J., Ng, V., Xia, B., Witkowski, M.T., Mitchell-Flack, M., et al. (2017). Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression. *Cell* 170, 1079-1095.e1020. 10.1016/j.cell.2017.07.032.
134. Lu, Y., Zhang, R., Zhang, X., Zhang, B., and Yao, Q. (2020). Curcumin may reverse 5-fluorouracil resistance on colonic cancer cells by regulating TET1-NKD-Wnt signal pathway to inhibit the EMT progress. *Biomed Pharmacother* 129, 110381. 10.1016/j.biopha.2020.110381.
135. Zuo, M., He, J., Yin, Q., He, X., Liu, Y., Liu, J., Liu, S., and Ma, L. (2023). Oxidative stress-induced TET1 upregulation mediates active DNA demethylation in human gastric epithelial cells. *J Toxicol Sci* 48, 273-283. 10.2131/jts.48.273.
136. Jones, P.A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13, 484-492. 10.1038/nrg3230.

137. Cho, J.W., Shim, H.S., Lee, C.Y., Park, S.Y., Hong, M.H., Lee, I., and Kim, H.R. (2022). The importance of enhancer methylation for epigenetic regulation of tumorigenesis in squamous lung cancer. *Exp Mol Med* 54, 12-22. 10.1038/s12276-021-00718-4.
138. Kreibich, E., and Krebs, A.R. (2023). Relevance of DNA methylation at enhancers for the acquisition of cell identities. *FEBS Lett* 597, 1805-1817. 10.1002/1873-3468.14686.
139. Héberlé, É., and Bardet, A.F. (2019). Sensitivity of transcription factors to DNA methylation. *Essays Biochem* 63, 727-741. 10.1042/ebc20190033.
140. Yin, Y., Morgunova, E., Jolma, A., Kaasinen, E., Sahu, B., Khund-Sayeed, S., Das, P.K., Kivioja, T., Dave, K., and Zhong, F. (2017). Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science* 356, eaaj2239.
141. Zuo, Z., Roy, B., Chang, Y.K., Granas, D., and Stormo, G.D. (2017). Measuring quantitative effects of methylation on transcription factor–DNA binding affinity. *Science advances* 3, eaao1799.
142. Kreibich, E., Kleinendorst, R., Barzaghi, G., Kaspar, S., and Krebs, A.R. (2023). Single-molecule footprinting identifies context-dependent regulation of enhancers by DNA methylation. *Mol Cell* 83, 787-802.e789. 10.1016/j.molcel.2023.01.017.
143. Sharkey, D.J., Tremellen, K.P., Briggs, N.E., Dekker, G.A., and Robertson, S.A. (2017). Seminal plasma pro-inflammatory cytokines interferon- γ (IFNG) and C-X-C motif chemokine ligand 8 (CXCL8) fluctuate over time within men. *Hum Reprod* 32, 1373-1381. 10.1093/humrep/dex106.
144. Favaro, F., Luciano-Mateo, F., Moreno-Caceres, J., Hernández-Madrigal, M., Both, D., Montironi, C., Püschel, F., Nadal, E., Eldering, E., and Muñoz-Pinedo, C. (2022). TRAIL receptors promote constitutive and inducible IL-8 secretion in non-small cell lung carcinoma. *Cell Death Dis* 13, 1046. 10.1038/s41419-022-05495-0.
145. Liu, X., Wu, S., Yang, Y., Zhao, M., Zhu, G., and Hou, Z. (2017). The prognostic landscape of tumor-infiltrating immune cell and immunomodulators in lung cancer. *Biomed Pharmacother* 95, 55-61. 10.1016/j.biopha.2017.08.003.
146. Singh, S., Sadanandam, A., and Singh, R.K. (2007). Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 26, 453-467. 10.1007/s10555-007-9068-9.
147. Franklin, W., Lowell, F.C., Michelson, A.L., and Schiller, I.W. (1956). Chronic obstructive pulmonary emphysema; a disease of smokers. *Ann Intern Med* 45, 268-274. 10.7326/0003-4819-45-2-268.

参考文献

本研究内容は原著論文として、以下のように発表した。

Epigenetic Regulation of CXC Chemokine Expression by Environmental Electrophiles Through DNA Methyltransferase Inhibition

Tsuchida T, Kubota S, Kamiuezono S, Takasugi N, Ito A, Kumagai Y, Uehara T.

International Journal of Molecular Sciences., 2024, 25(21), 11592; doi: 10.3390/ijms252111592

謝辞

終わりに臨み、本研究の遂行に際してご指導およびご教鞭を賜りました岡山大学 学術研究院医歯薬学域 薬効解析学 上原 孝 教授, 高杉 展正 准教授, 久保田 翔 助教に謹んで感謝の意を表します。

また、本博士論文を審査していただき、有益なご助言を賜りました岡山大学 学術研究院医歯薬学域 環境生物薬学 三好 伸一 教授, 臨床基礎統合薬学 山本 和宏 教授, 膜輸送分子生物学 宮地 孝明 准教授に厚く御礼申し上げます。

さらに、LC-MS/MS 解析による 1,2-NQ の修飾部位同定にご協力をいただきました東京薬科大学 生命科学部 分子生命科学科 細胞情報科学 伊藤 昭博 教授, 理化学研究所 脳神経科学研究センター (理研 CBS) 研究基盤開発部門 生体物質分析支援ユニット 大月 香氏, 藏田 紫乃氏, RNA-seq によるトランスクリプトーム解析にご協力をいただきました山口大学 大学研究推進機構 総合科学実験センター 遺伝子実験施設・医学系研究科 水上洋一 教授, 本研究の遂行に際してご助言を賜りました九州大学 大学院薬学研究院 熊谷 嘉人 先生に心より御礼申し上げます。

本研究は JST 科学技術イノベーション創出に向けた大学フェロシップ創設事業 JPMJFS2128 および JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2126 の支援を受けたものであり深く感謝申し上げます。

加えて、様々なご協力をいただきました薬効解析学教室の皆様, 研究活動をサポートし、温かく見守ってくださった秘書の松本 真里さん, 末吉 寿恵さんに心より感謝申し上げます。

最後に、研究の道に進むことに理解を示し、研究に専念できる環境を与えてくださった両親に感謝し、私の謝辞とさせていただきます。

令和7年3月 土田 知貴