

201522024A

別添1

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価のための

新戦略法に関する研究

(H27-食品-一般-002)

平成27年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

平成28(2016)年 4月

目 次

I. 総括研究報告書 (別添 3)

| | |
|-----------------------------------|---|
| 食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価のための新戦略法に関する研究 | 1 |
| 本間 正充 | |

II. 分担研究報告書 (別添 4)

| | |
|------------------------------|-----|
| バルキーDNA 付加体の遺伝子変異誘発に関する基礎的研究 | 1 1 |
| 安井 学 | |

| | |
|-----------------|-----|
| エピ遺伝毒性物質の評価系の開発 | 1 7 |
| 杉山 圭一 | |

| | |
|-----------------------------------|-----|
| DNA アダクトの定性・定量評価とアダクトのカタログ化に関する研究 | 2 9 |
| 戸塚 ゆ加里 | |

| | |
|--------------------------------------|-----|
| 重要な DNA アダクトの合成と、ターゲットベクターへの導入に関する研究 | 3 3 |
| 高村 岳樹 | |

| | |
|-----------------------|-----|
| 重要な DNA アダクトの合成に関する研究 | 3 7 |
| 正田 卓司 | |

| | |
|---------------------------|-----|
| III.研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 5) | 5 1 |
|---------------------------|-----|

| | |
|-----------------|-----|
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 5 3 |
|-----------------|-----|

I. 総括研究報告書

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価のための新戦略法に関する研究

研究代表者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究要旨

遺伝毒性試験は発がん性物質のスクリーニング試験であると同時に、その遺伝毒性メカニズムが、発がん性リスク評価の上で重要な情報となる。本研究では、OECD が提唱する「化学物質と生体の相互作用から個体での毒性発現までのメカニズムを関連づけて説明する手法（AOP）」を取り入れた新たな遺伝毒性評価ストラテジーと、階層からなる追跡型試験系を開発し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。主な研究のテーマは、発がん AOP の分子初期事象である「化学物質→DNA 付加体→突然変異」のプロセスから、(A)「化学物質→DNA 付加体」と、(B)「DNA 付加体→突然変異」を分離し、独立に定性、定量的に解析する試験系を構築すること。(C) 発がん AOP からはずれるエピ遺伝毒性物質の検出系の開発である。

(A) 化学物質→DNA 付加体に関する研究：①職業性胆管がんの原因物質であることが示唆されている 1,2-ジクロロプロパン（DCP）をバクテリアに気相曝露し、DNA 付加体の網羅的解析手法を用いて、DCP に由来する付加体の探索を行ったところ、Name22 の DNA 付加体が DCP 曝露に特徴的なものとしてスクリーニングされた。②PhIP のデオキシグアノシン(dG)-C8 付加体を得るため、簡便な方法の構築を行った。原料となる dG 修飾体はシリル保護をすることにより dG を効率的に臭素化できる新たな方法を見出した。③高い発がん性を有する 2-アミノアセチルフルオレン付加体（dG-C8-AAF）と、MeIQx の付加体（dG-C8-MeIQx）の合成を試み、MeIQx の塩基への導入に成功した。

(B) DNA 付加体→突然変異に関する研究：バルキー付加体を TATAM 法で解析することを目的として、シクロブタンピリミジンダイマー（CPD）をバルキー付加体のモデルとして選択し、その突然変異誘発頻度とスペクトラムを調べた。その結果、CPD のベクターをゲノム導入すると、CPD 部位でタンデムな塩基欠失が主に起きた。よって、バルキーDNA 付加体も TATAM 系に適用できることが分かった。

(C) エピ遺伝毒性物質の検出と評価に関する研究：エピ変異原の 1 つ DNA メチル化阻害剤に焦点をあて、酵母を用いて同阻害剤の検出系の開発を試みた。その結果、育種したヒト DNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子群を形質転換した酵母（ヒト DNMT 酵母）が示す凝集が、DNA メチル化阻害剤に応答することが明らかとなった。本結果は、エピ変異原の短期スクリーニングに、ヒト DNMT 酵母が利用可能であることを示唆している。

キーワード：遺伝毒性、化学発がん物質、DNA 付加体、AOP、IATA

研究分担者

| | |
|-------|-----------------------------------|
| 安井 学 | 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 主任研究官 |
| 杉山圭一 | 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長 |
| 戸塚ゆかり | 国立がん研究センター研究所 発がん・予防研究分野 ユニット長 |
| 高村岳樹 | 神奈川工科大学工学部 分子生物学研究室 教授 |
| 正田卓司 | 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 主任研究官 |

A. 研究目的

食品の安全性に対して、多くの国民が関心を寄せている今日、食品添加物や残留農薬等の食品中に含まれる微量の化学物質の安全性が問題となっている。多くの化学物質の毒性は、健康リスクを評価する場合、理論的、実証的研究から、これ以下であれば健康影響が見られないレベル、すなわち閾値がある用量反応モデルが用いられてきた。これにより一日摂取許容量(Acceptable Daily Intake; ADI)を定めることができる。しかしながら、その化学物質の発がん性が問題となり、さらに遺伝毒性が認められるとやっかいである。他の毒性と異なり遺伝毒性には閾値がないとされているため、摂取量をゼロにしない限り、健康リスクもゼロのならないとの論理から ADI を設定することができない。ここに遺伝毒性発がん物質のリスク管理の問題点がある。同様の問題は、福島第一原発事故からの低レベル放射線の発がんリスクの議論においても焦点となっている。我々は日常的に、食物を通して多くの発がん物質を摂取しており、また、太陽からの紫外線、自然環境からの放射線も先史からの発がん因子である。さらに、現代社会で生活する限り、工業製品等からの微量の発がん可能性物質の暴露を避けることはできない。現在必要なのは、食品中に含まれる化学物質の危険性とそのリスクを国民に対して合

理的、且つ高い透明性をもって、説明可能な評価方法と管理方法を確立することである。このための重要な研究は、リスクをもたらすハザードのメカニズムの解明と、定量化であると考え(Hazard Characterization)。

遺伝毒性試験は発がん性物質のスクリーニング試験であると同時に、発がん性が認められた場合には、その遺伝毒性メカニズムが安全性評価の上で重要な情報となる。また、遺伝毒性発がん物質のリスク評価においても、近年では、ある一定レベル以下のリスクであれば許容されるという考えが浸透しつつあるが、この場合でも、適切な遺伝毒性メカニズムと、定量評価による透明性の高い説明が求められている。これまでの一般的な遺伝毒性試験としてはエームス試験(バクテリア; 遺伝子変異)、染色体異常試験(哺乳類; 染色体構造異常)、小核試験(げっ歯類動物; 染色体構造および数的異常)が利用されてきた。これらの組み合わせ試験は、異なる生物種、複数のエンドポイントを用いることにより、様々なタイプの遺伝毒性物質を広範に検出するためにデザインされたものである。しかしながら、この結果から発がんに関連する遺伝毒性メカニズムの情報は得ることは困難であり、また、試験結果自体も発がん性との相関性が低い。本研究では、これまでの既成概念を破り、最新の情報と分子生物学的技術に基づく評価系を構築し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。

OECD では化学物質と生体(組織)の相互作用から個体での毒性発現を関連づけて説明する手法(AOP)と、それに基づく統合的試験法と評価方法(IATA)を提唱し、化学物質の安全性評価の合理化と、実験動物削減を目指している。本研究では、発がん AOP の分子初期事象(MIE)である「化学物質→DNA 付加体→突然変異」に注目し、この MIE プロセスを追跡し、定性、定量的に解析する試験系を構築し、メカニズムと定量性に基いた新たな遺伝毒性 IATA を開発することを目的とする。本研究では、1. DNA 付加体検出、2. 付加体合成、3. 遺伝子ターゲットによるゲノ

ム中への付加体の導入、が技術の核心である。特に、3の技術に関しては、わずか1分子のDNA付加体をゲノム中に導入し、その結果生じる突然変異の定性・定量的に解析することができる。1分子のDNA損傷は究極的な低用量モデルであり、本試験系でDNA付加体が突然変異をもたらさなければ、そのDNA付加体(損傷)は閾値を持つか、閾値が無くとも突然変異を引き起こさないことを理論的に証明したことになる。

また、本研究班ではDNA付加体形成が認められず、発がんAOPのスキームに載らない非遺伝毒性発がん物質の評価法にも取り組んでいる。これら化学物質はDNAの一次構造に変化を与えず、がんや他の疾患を引き起こすエピ遺伝毒性物質と考えられる。エピ遺伝毒性物質に反応する新たなトランスジェニック生物を作成し、エピ遺伝毒性物質の評価系の開発も行った。

本研究班は上記の目的を達成するため、5名の分担研究者が以下の研究に本年度取り組んだ。

1) DNA付加体の遺伝子変異誘発に関する基礎的研究(安井):

1分子のDNA付加体をゲノム中に導入し、その運命を定性・定量的に解析できるTATAM法の開発に成功した。これまでに、数種類の酸化的DNA損傷(8-オキシ-7,8-ジヒドロ-2'-デオキシグアノシン付加体など)について、ATAM実験法によってゲノム導入し、それらの遺伝子変異誘発機構を調べることができた。しかしながら、酸化的DNA損傷の分子サイズは、小さいものが多く、ヘテロサイクリックアミン類のDNA損傷のようにサイズの大きい、いわゆるバルキーDNA付加体についてはまだ調べていない。本年度は、そのバルキー付加体として、すぐに市販で購入可能なシクロブタンピリミジンダイマー(CPD)を1つ含んだターゲティングベクターを構築することから始め、それをTATAM系でゲノムの特定部位に導入し、そのCPDが引き起こす突然変異誘発頻度とスペクトラムを解析した。

2) エピ遺伝毒性物質の評価系の開発(杉山):

発がんメカニズムとして、近年エピジェネティ

ックな変異(エピ変異)の関与が示唆されている。しかし、エピ変異原の短期スクリーニング試験法は、現時点では確立されてはいない。エピジェネティックな制御機構を担うDNAメチル化酵素(DNAメチルトランスフェラーゼ; DNMT)は、哺乳類細胞のゲノム上のシトシンを新規にメチル化する酵素であるDNMT3Aおよび3Bと、複製により生ずる片鎖がメチル化されたヘミメチル化5'-CpG-3'配列(CpG)をメチル化するDNMT1の計3種類の酵素が同定されている。一方、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)ではDNMT遺伝子は同定されておらず、ゲノムのメチレーションレベルも低いとされる。そこで本研究では、DNAメチル化阻害剤検出系を構築することを目的に、ヒトDNMT遺伝子形質転換酵母を作出し、DNMT阻害剤に対する応答性を検討した。

3) DNAアダクトの定性・定量評価とアダクトのカタログ化に関する研究(戸塚):

ジクロロメタンやジクロロエタン等のハロゲン系炭化水素は主に工業溶剤として幅広く使用されている。また、ジクロロメタンおよび1,2-ジクロロプロパン(DCP)は、最近、職業性胆管がんの原因物質であることが示唆されているが、これらハロゲン系炭化水素と印刷業従事者で多発するヒト胆道がんとの関係は未だ良くわかっていない。これらハロゲン系炭化水素の発がんメカニズムの解明や曝露の指標として有用な、ハロゲン系炭化水素由来のDNA付加体の解析を目的として、質量分析器機を用いたDNA付加体の網羅解析法(DNAアダクトーム法)を用いて検討を行った。

4) DNAアダクトの合成と、ターゲットベクターへの導入に関する研究(高村):

ヒトが暴露する可能性のある変異・発がん性物質は様々である。焼肉などの加熱食品中に含まれるがん原性ヘテロサイクリックアミンの一つである2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP)は、Ames試験などバクテリアを用いる変異原性試験では、比較的低い変異原性を

示すが、ラットに対し大腸がんや乳がんを誘発することが知られている。また APC 遺伝子に変異を誘発することが明らかとなっている。PhIP の突然変異誘発能を TATAM 試験系で解析し、その変異原性を明らかにする目的で、PhIP 修飾オリゴヌクレオチドの合成を試みた。

5) 重要な DNA アダクトの合成に関する研究(正田) :

生物は常に多種多様な化学物質にさらされており、それら化学物質が生体分子と結合することで、その生体分子の正常な機能は破壊される。DNA アダクトの生成機構をはじめ、その除去機構、除去後の修復機構などの詳細を明らかにすることは極めて重要である。安井らが開発した TATAM 法は、DNA 損傷と発がん性を定量的に解析できる手法である。そこで本研究では、TATAM 法に必要な DNA アダクト含有オリゴ DNA を供給するために、その DNA アダクトおよびそのホスホアミダイト体の合成を行うこととした。本年度はアミノフルオレン付加体 (dG-C8-AAF) および MeIQ_x 付加体 (dG-C8-MeIQ_x) を選択し、それぞれの合成中間体についての反応条件検討を行った。

B. 研究方法

1) DNA 付加体の遺伝子変異誘発に関する基礎的研究(安井) :

コントロールのターゲティングベクター-pvIT、および CPD を含むターゲティングベクター-pcITCPD を、それぞれ pCBASce ベクターと共に TSCER122 細胞にコトランスフェクションした。培養フラスコで 3 日間培養した後 (37°C, 5 % CO₂)、その細胞を 1~5 x 10³ cells/mL に調整し、HAT 試薬の存在下、96 穴マイクロプレートでさらに 2 週間培養した。その後、TK 復帰細胞のクローンを回収し、各クローンのゲノム DNA から CPD 部位だった周辺のシーケンスを行い、その突然変異誘発スペクトルおよび頻度を決定した。解析する対象 DNA 配列は、付加体を導入した部位とその前後 4 塩基であり、塩基の変異や欠失など

を検出した。

2) エピ遺伝毒性物質の評価系の開発(杉山) :

出芽酵母 *S. cerevisiae* YPH250 株に de novo DNMT である 3A (DNMT3A) もしくは 3B (DNMT3B) の cDNA を導入した発現プラスミドを各々構築し、DNMT1 と各 de novo DNMT 遺伝子発現プラスミドを、出芽酵母に co-transformation し形質転換体 (ヒト DNMT 酵母) 2 株を得た。ウエスタンブロットにより各 DNMT の発現を確認した後、増殖特性および DNMT 阻害剤 5-アザ-2'-デオキシシチジン (5AZ) に対する両形質転換体が示す表現型を検討した。また、同定した表現型に関与する可能性のある遺伝子の転写レベルを (RT)-PCR 解析により検証した。

3) DNA アダクトの定性・定量評価とアダクトのカタログ化に関する研究(戸塚) :

Ames 試験に用いるネズミチフス菌株である、TA100 に 1,2-DCP(6000ppm, 15000ppm) を 4 時間気層曝露した後にバクテリアを回収し、ゲノム DNA の抽出を行った。DNA を各種ヌクレアーゼによりモノヌクレオシドに分解し、生成する DNA 付加体を質量分析機器 (AB SCIEX, Triple-TOF TT6600) を用いて網羅的に解析した。得られたデータを主成分 (PCA) 解析により解析し、1,2-DCP 曝露に相関する付加体の抽出を実施した。

4) DNA アダクトの合成と、ターゲットベクターへの導入に関する研究(高村) :

PhIP の部位特異的修飾オリゴヌクレオチドを合成する目的で、まず、対象となる PhIP 付加体について検討した。PhIP の付加体については、2 種類の存在が知られているが、その化学構造が明らかになっているのは一般的なデオキシグアノシン (dG) の 8 位の修飾体 (dG-C8 付加体) のみである。そこで、PhIP の dG-C8 の付加体を有するオリゴヌクレオチドの合成を試みた。

5) 重要な DNA アダクトの合成に関する研究(正田) :

TATAM 法に必要な DNA アダクト含有オリゴ

DNA を供給するために、その DAN アダクトおよびそのホスホロアミダイト体の合成を行うこととした。本年度はアミノフルオレン付加体 (dG-C8-AAF) および MeIQx 付加体 (dG-C8-MeIQx) を選択し、それぞれの合成中間体についての反応条件検討を行った。試薬は和光純薬、東京化成、関東化学から購入し、特に精製せずにそのまま用いた。化合物の精製には中圧分取液体クロマトグラフ (EPCLC-W-Prep, 山善) を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は多くは文献調査、バクテリア、酵母、哺乳類培養細胞による *in vitro* 試験に基づくものであり、倫理上の問題はない。

C. 研究結果

1) DNA 付加体の遺伝子変異誘発に関する基礎的研究 (安井):

バルキーDNA 付加体のモデル物質として、CPD 付加体を TATAM 実験系に供し、CPD によって引き起こされる突然変異誘発頻度とスペクトラムを調べた。合計 204 復帰クローンが、CPD を含むターゲティングベクターとの相同組み替えによって、CPD がゲノムに導入された。そのうち約 92% (187 クローン) が、もとの DNA 配列に修復され、残りの 17 クローンから塩基変異が観察された。最も優位に検出された塩基変異は、CPD 部位にタンデムの塩基欠失 (5'・TTAA Δ Δ CTCC) が 11 クローン検出 (5.4%, 11/204) された。残りの 6 クローンは、それぞれ異なる変異スペクトラムを示した。一方、CPD を含まないコントロールベクターをゲノム導入した時は、その DNA 配列 (5'・TTAATTCTCC) で塩基変異が起きないことを確認した。

2) エピ遺伝毒性物質の評価系の開発 (杉山):

育種したヒト DNMT 酵母における各 DNMT の発現を Western blot により解析した。発現誘導にはガラクトース誘導性の GAL1 プロモーターを用いていることから、ガラクトース培地 (SG

培地) での発現プロファイルを解析したところ、両ヒト DNMT 酵母において、24 時間で各 DNMT の発現が確認された。ヒト DNMT 酵母の増殖特性について、通常の酵母の培養に使用されるグルコースを炭素源としたグルコース培地 (SD 培地) も含め検討したところ、SG および SD 両培地においてベクターコントロール株と比較しヒト DNMT 酵母の増殖速度の低下が観察された。ただし、DNMT 阻害剤である 5AZ (100 μM) では、認められた増殖抑制は解除されなかった。一方、ヒト DNMT 酵母は SD 培地において凝集性を示すこと、また本表現型は DNMT 阻害剤 5AZ (100 μM) により有意に抑制され、200 μM の 5AZ 存在下では凝集性は完全に消失することを見出した。さらに、出芽酵母の凝集性に関与する FLO1 遺伝子の mRNA レベルがヒト DNMT 酵母において特異的に亢進し、5AZ (200 μM) 存在下では抑制されることも RT-PCR により確認した。

3) DNA アダクトの定性・定量評価とアダクトのカタログ化に関する研究 (戸塚):

DCP を曝露したバクテリア DNA のアダクトーム解析を行なった。主成分解析を行なったところ、曝露群ごとにクラスターに分類されることがわかった。次に PCA 解析の Loading plot の結果から、DCP に関連する付加体の探索を行ったところ、Name22 の DNA 付加体が DCP 曝露と関連する候補として同定された。現在、この付加体の化学構造の同定について検討を行っている。

4) DNA アダクトの合成と、ターゲットベクターへの導入に関する研究 (高村):

最初に、PhIP のデオキシグアノシン(dG)-C8 付加体を得るため、簡便な方法を検討した。付加体合成の原料となる臭素化 dG 誘導体は、シリル保護 dG を酢酸溶媒中プロモスクシンイミドを加える事で効率よく生成物が得られることが明らかとなった。Pd 触媒、Xantphos、炭酸セシウムを用い、さらに DMSO を溶媒として 150 ° C で反応させ、保護基のついた dG-C8-PhIP の付加体を 40~60% の収率で得ることができた。得られた化合物はさらに、ジクロロメタン溶媒中 5% トリ

クロロ酢酸を処理して、DMTr 基を脱保護し、さらに、Pd black を用いて水素添加によりベンジル基を脱保護した。得られたアミダイトを用いてオリゴ合成を試みたが、残存する phosphorodiamidate の影響のため現時点では合成品を得ることはできなかった。

5) 重要な DNA アダクトの合成に関する研究(正田) :

アミノフルオレン付加体 (dG-C8-AAF) については、試薬の当量数、反応時間を検討したが 8 位アセチル基の導入に難航し、目的化合物を得ることができなかった。試薬を過剰に加える事で脱 DMTr 化や脱リボース化が起こることを確認した。一方、その検討過程において、6 位保護基が必要ないことを明らかにすることができた。MeIQx 付加体 (dG-C8-MeIQx) については、2 位保護基の有無について検討した。反応には 2 位保護が必要ではないが、精製に 2 位保護基がある方がよいことを明らかとした。反応溶媒には microwave を用いた場合、THF が最適であることが明らかになった。

D. 考 察

遺伝毒性試験は発がん性物質のスクリーニング試験であると同時に、その遺伝毒性メカニズムが、発がん性リスク評価の上で重要な情報となる。本研究では、OECD が提唱する「化学物質と生体の相互作用から個体での毒性発現までのメカニズムを関連づけて説明する手法 (AOP)」を取り入れた新たな遺伝毒性評価戦略と、階層からなる追跡型試験系を開発し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。主な研究のテーマは、発がんの AOP の分子初期事象である「化学物質→DNA 付加体→突然変異」のプロセスから、(A)「化学物質→DNA 付加体」と、(B)「DNA 付加体→突然変異」を分離し、独立に定性、定量的に解析する試験系を構築すること。(C) 発がん AOP からはずれるエピ遺伝毒性物質の検出系の開発である。

(A) の「化学物質→DNA 付加体」のに関して

は、国立がんセンターの戸塚が、化学物質に曝露された生物個体 DNA をマスペクトルメトリーで解析し、化学物質によって形成される DNA 付加体の解析と、主要な DNA 付加体のカタログ化を目指している。今年度は DCP に着目した。DCP を扱う印刷業従事者で、胆道がんが多発することが報告されて以来、その遺伝毒性の有無と強さが問題となっている。DCP は多くの *in vivo* 遺伝毒性試験で陰性と報告されているが、肝臓での試験データは不十分である。また、エーム試験においては TA100 株でわずかな突然変異の誘発が報告されており、遺伝毒性は否定できない状況にある。今回、DCP を曝露した TA100 株で特定の付加体 (Name22) が検出されたことは、本物質が DNA 損傷性を示すことを示唆するものである。今後、この DNA 付加体の同定と、ヒトへの曝露によっても同様な付加体が生じるのかが注目される。また、付加体が同定された場合、TATAM 法を用いてその変異原性を評価したい。

(B) の「DNA 付加体→突然変異」に研究に関しては、国立衛研の安井らが開発した TATAM 法による解析が重要である。本年度は TATAM を用いて CPD 付加体がもたらす突然変異のスペクトルを解析した。CPD は、紫外線照射によって形成する代表的な DNA 付加体の一つであり、すでにその突然変異誘発頻度とスペクトラムが調べられている。報告では COS7 細胞が用いられ、CPD 部位で 5' -TT の 3' 側の T→C と T→A の塩基変異が約 2% で検出された。それは本研究で得られた CPD の変異スペクトラムと異なった。その原因として予想できることは、本研究はゲノムの染色体上に CPD を導入して調べているのに対して、報告では CPD をプラスミドに導入してエピゾーマルな条件で調べていることである。また、使用された細胞種が違うことも原因として挙げられる。その原因を明らかにするには、CPD の DNA 修復に関連する遺伝子の破壊細胞を構築して、CPD の DNA 修復機構を調べる必要があると考えられ

た。

神奈川工科大学の高村と、国立衛研の正田は同定された DNA 付加体を化学合成し、オリゴヌクレオチド化する研究を行っている。合成に成功した DNA 付加体オリゴヌクレオチドは安井らによって TATAM 解析することになっている。本年度、高村は、焼肉などの加熱食品中に含まれるがん原性ヘテロサイクリックアミンの一つである PhIP 付加体を含む修飾オリゴヌクレオチドの合成を試みた。試験既報の方法に改良を加える事で、より簡便に目的化合物を合成することを試みた。原料となる dG 修飾体はシリル保護をした dG を臭素化する新たな方法論を見出した。しかしながら、他は既報通りの方法論が現時点では最適であった。無保護の核酸塩基をダイレクトに修飾することが可能となれば、より効率的な合成が可能となるが、これについては引き続き検討することとした。いっぽう得られたアミダイトは一定量の原料の混入が確認されており、これはオリゴ合成の妨害成分となりうる、より、効率的な精製法の確立が必要であり、研究を継続する。

正田は加熱食品中に含まれる発がん物質であるヘテロサイクリックアミンである 2-aminofluorene 付加体 (dG-C8-AAF) と、MeIQx の付加体 (dG-C8-MeIQx) の合成を試みた。dG-C8-AAF の合成については、8 位は周囲を嵩高い構造に囲まれていることから、試薬との反応性が低くなっていることが考えられる。また、脱 DMTr 化や脱リボース化は試薬に含まれる影響が考えられる。より詳細な検討を続けることで、目的化合物が得られる可能性は示唆されたが、本化合物の合成は断念することとした。dG-C8-MeIQx の合成については、反応溶媒を 1,4-dioxane から THF に帰ることで反応効率及び収率の向上が認められたことから、反応効率には化合物の溶媒への溶解性が大きく影響するのだと考えられた。dG-C8-MeIQx の合成に成功したことから今後ホスホロアミダイト体の合成及びオリゴ DNA

の合成を行う。

(C) の発がん AOP からはずれるエピ遺伝毒性物質の検出系の開発に関しては、国立衛研の杉山が、ヒト DNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子群を形質転換した酵母 (ヒト DNMT 酵母) が示す凝集反応を指標とした DNA メチル化阻害作用をもつ薬剤の検出に成功した。ヒト DNMT 酵母において凝集性関連遺伝子の 1 つ FLO1 が 5AZ によりその誘導が抑制される事実から、哺乳類細胞とは逆に FLO1 プロモーター領域はメチル化により転写が活性化されること、また比較的安定な制御と考えられる DNA メチル化が同プロモーター領域では可逆的であることが示唆された。これは、ヒト DNMT 酵母の FLO1 プロモーター領域の大きな特徴であり、かつアドバンテージである。また、SD 培地での漏出的と推測される DNMT の酵素活性により凝集性が惹起されていると仮定した場合、薬剤に対する感受性が他の真核細胞と比較し低いとされる酵母細胞特有のバイオアッセイ時の問題点を補っている可能性がある。エームス試験と同様に検出に高額な設備を要しないヒト DNMT 酵母の凝集反応は、食品添加物等の化学物質全般のスクリーニング毒性試験系として好適と考えられる。また動物愛護管理法が定める 3R の原則に資することも大きなメリットと言える。

E. 結論

本研究では、新たな遺伝毒性発がん物質の評価法として、化学物質と生体分子の相互作用から、個体・集団レベルでの毒性発現 (Adverse Outcome Pathway; AOP) までの一連の生物学的な反応を関連づけ、それに基づく統合的試験法と評価方法 (Integrated Approaches to Testing and Assessment; IATA) を開発し、化学物質の安全性評価の科学的合理化と、実験動物削減を目指す。化学物質による発がんの AOP の分子初期事象 (Molecular Initial Event; MIE) は、遺伝毒性・変異原性で有り、このプロセスは「化学物質→DNA 付加体 (損傷) →突然変異」に集約される

(図 1)。

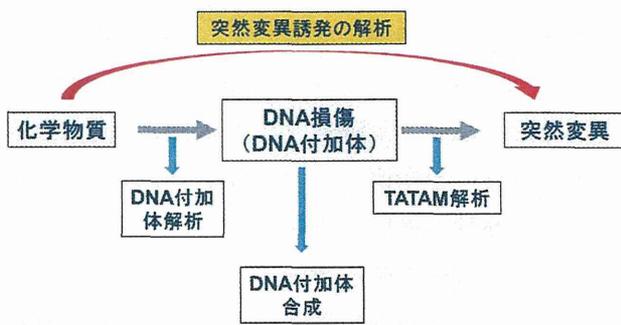


図 1

本研究班で本年度は、DNA 付加体解析（戸塚）、DNA 付加体合成（高村、正田）、TATAM 解析（安井）が研究を分担し、一定の成果を得た。今後、これら個々の研究成果が有機的に融合し、研究が発展することが期待できる。

一方、この仮定された MIE が定性・定量的に正当であるかを検証する必要があると考えられる。そのためには「化学物質→突然変異を」のデータを取得、解析する必要がある（図 1）。次年度は、実際の *in vitro* 試験、もしくは文献情報により対象とする化学物質の遺伝子突然変異誘発能に関する情報を収集する。最終的にはこれら研究結果と、化学物質構造から、*in silico* で化学物質の変異原性を予測するモデルを開発し、試験の迅速化、3R に貢献することを目指す。

また、この MIE を化学物質の遺伝毒性評価の新たなスキームにする（図 2）。

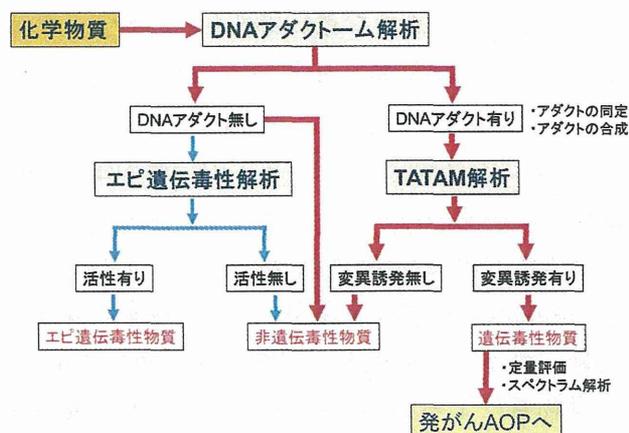


図 2

DNA 付加体解析により、特定な付加体が検出されなければ、非遺伝毒性物質とすることができる。この場合、エピ遺伝毒性の可能性が残されているので、本研究班で開発中のエピ遺伝毒性解析を行い、非遺伝毒性発がん物質の可能性を検討する。一方、DNA 付加体が検出されたからといっても、変異原性があるわけではない。修復や、損傷乗り越え DNA 合成がおきれば突然変異は起こさない。おそらく、大部分の DNA 付加体は修復されるが、その一部は修復されず、突然変異を引き起こすものと考えられる。TATAM 法はこれら性質を定性・定量的に解析できる。十分で特徴的な突然変異がみとめられた場合、本化学物質は遺伝毒性物質（遺伝毒性変異原物質）と判断され、次の発がん AOP のスキームに載る。また、TATAM 法で明らかな突然変異誘発が認められない場合、本化学物質は遺伝毒性非変異原物質（非遺伝毒性物質）とし、発がんの懸念は無いと判断することができる。

このような分子レベルで可視化された変異メカニズムの情報の蓄積が、最終的に *in silico* で化学物質の変異原性・発がん性の定量的予測を実現させるものとする。変異原性は化学物質にあるのではなく、化学物質によって引き起こされる DNA 付加体（損傷）にある。この当たり前の考え方は、遺伝毒性（変異原性）の評価の合理化にも繋がると考える。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

1. Honma M: Evaluation of the *in vivo* genotoxicity of Allura Red AC (Food Red No. 40). Food and Chemical Toxicology. 84, 270-275 (2015)
2. Kanemaru Y, Suzuki T, Niimi N, Grúz P, Matsumoto K, Adachi N, Honma M,

- Nohmi T. Catalytic and non-catalytic roles of DNA polymerase κ in the protection of human cells against genotoxic stresses. *Environ Mol Mutagen.* 56, 650-662 (2015)
3. Keka IS, Mohiuddin, Maede Y, Rahman MM, Sakuma T, Honma M, Yamamoto T, Takeda S, Sasanuma H. Smarcal1 promotes double-strand-break repair by nonhomologous end-joining. *Nucleic Acids Res.* 43, 6359-72 (2015)
 4. Sassa A, Kamoshita N, Kanemaru Y, Honma M, and Yasui M, Xeroderma Pigmentosum Group A Suppresses Mutagenesis Caused by Clustered Oxidative DNA Adducts in the Human Genome. *PLoS ONE* 10, e0142218 (2015)
 5. Sugiyama K, Takamune M, Furusawa H, and Honma M, Human DNA methyltransferase gene-transformed yeasts display an inducible flocculation inhibited by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 456, 689-694 (2015)
- (2015.9)
4. Honma M, Kanemaru Y, Kamoshita N., Suzuki T, Arakawa T, Yasui M : Tracing the fate of site-specifically introduced oxidative DNA damage in the human genome. 14th International Workshop on Radiation Damage to DNA (2016.3)
 - 5.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

学会発表

1. 本間正充 : OECD テストガイドラインの変更点. JEMS・MMS 研究会 第 66 回定例会 (2015.6)
2. Honma M, Suzuki T : DNA Double Strand Break Repair in BLM Deficient Human Cells.
3. 本間正充 : 部位特異的損傷をゲノム中に導入したヒト細胞における突然変異誘発機構の研究 (日本環境変異原学会学会賞受賞講演) 第 44 回日本環境変異原学会(2015. 11)46th Annual Meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society

II. 分担研究報告書

平成 27 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価のための新戦略法に関する研究

分担研究課題名：バルキーDNA付加体の遺伝子変異誘発に関する基礎的研究

研究分担者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 主任研究官

研究要旨

本研究では、ヒトリンパ芽球細胞のゲノム内に DNA 損傷を部位特異的に導入し、その損傷の DNA 修復および遺伝的影響を *in vivo* で追跡できる TATAM 実験系を用いている。その DNA 損傷の導入場所、分子数、そして化学構造が、すべて既知の条件であるため、得られた結果の因果関係が明確である。これまでに、数種類の酸化的 DNA 損傷（8-オキソ-7,8-ジヒドロ-2'-デオキシグアノシン付加体など）について、ゲノム導入し、それらの遺伝子変異誘発機構を調べることができた。しかしながら、酸化的 DNA 損傷の分子サイズは小さいものが多く、例えば、食品中（焼け焦げに含まれるヘテロサイクリックアミン類など）に含まれる発がん性物質の DNA 損傷には、サイズの大きい、いわゆるバルキーDNA付加体が存在する。本年度は、バルキー付加体を TATAM 実験系で調べることを目的として、市販で購入可能で、すぐに実験することができるシクロブタンピリミジンダイマー（CPD）をバルキー付加体のモデルとして選択し、その突然変異誘発頻度とスペクトラムを調べた。その結果、コントロール（CPD 部位がチミン・チミンになっている）のターゲティングベクターをゲノム導入して調べた時は、突然変異誘発がまったく観察されなかった。一方、CPD のベクターをゲノム導入すると、CPD 部位でタンデムな塩基欠失が主に起きた。よって、バルキーDNA付加体も TATAM 系に適用できることが分かった。

キーワード:バルキーDNA付加体, シクロブタンピリミジンダイマー

A. 研究目的

ヒトの発がんの原因として、従来から食品が重要な因子であると言われている。食品中には、原材料の成分、加熱・調理中に生成される物質、食品添加物、そして原材料等に微量に含まれる残留農薬や動物用医薬品、さらにプラスチック容器等の溶出物なども含まれていると考えられる。つまり、毎日の食餌の中に発がん性物質が存在していることは否定できない。

食品中の発がん性物質として最も注目され、研究が進んでいるものは、魚肉類の焼け焦げに含

まれるヘテロサイクリックアミン類（HCA）である。HCA は、DNA と反応し DNA 付加体を形成させ、発がんに至らせる遺伝毒性発がん物質に分類される。事実、焼け焦げに含まれる発がん性を示す物質として、PhIP, MeIQ, Trp-P-1 などの HCA が同定されており、それらはラットなどの実験動物の臓器にがんを高頻度に形成させることが知られている。その発がん機構に、HCA の DNA 付加体が強く関与していると考えられる。

本研究では、ヒトリンパ芽球細胞のゲノム内に DNA 損傷を部位特異的に導入し、その損傷の

DNA 修復および遺伝的影響を *in vivo* で追跡できる TATAM 実験系を用いている。その DNA 損傷の導入場所、分子数、そして化学構造が、すべて既知の条件であるため、得られた結果の因果関係が明確である (Yasui, M. *et al.*, *DNA repair* 15, 11-20 (2014))。これまでに、数種類の酸化 DNA 損傷 (8-オキソ-7,8-ジヒドロ-2'-デオキシグアノシン付加体など) について、ゲノム導入し、それらの遺伝子変異誘発機構を調べることができた。しかしながら、酸化 DNA 損傷の分子サイズは、小さいものが多く、HCA の DNA 損傷のようにサイズの大きい、いわゆるバルキー DNA 付加体についてはまだ調べていない。

よって本研究では、そのバルキー付加体として、すぐに市販で購入可能な *cis-syn* thymine-thymine cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) を 1 つ含んだターゲティングベクターを構築することから始め、それを TATAM 系でゲノムの特定部位に導入し、その CPD が引き起こす突然変異誘発頻度とスペクトラムを解析した。なお、HCA のバルキー付加体については、現在、本班の分担研究者によって化学的に合成され、予定通り進行すれば、次年度に HCA のバルキー付加体を TATAM 解析する。

B. 研究方法

1. 細胞培養

ヒトリンパ芽球細胞 TSCER122 は、TK6 細胞株を由来とする細胞である (Honma, M. *et al.*, *Environ. Mol. Mutagenesis* 42, 288-298 (2003), Yasui, M. *et al.*, *DNA repair* 15, 11-20 (2014))。細胞は、10% 馬血清 (JRH Bioscience), 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ピルビン酸ナトリウム (和光純薬工業(株)), 100 U/mL ペニシリン, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン (ナカライテスク(株)) を含む RPMI 培地 (ナカライテスク(株)) で培養した (37 度, 5% CO_2)。

2. CPD を部位特異的に含むターゲティングベクターの構築

代表的なバルキー付加体である CPD を 1 つ含むターゲティングベクターを作製した。その手法として、北海道医療大学 荒川俊哉博士らが確立した PCR を基礎とする 5'-メチルシトシンを含む修飾ベクターの作製法 (Arakawa, T. *et al.*, *Anal. Biochem.* 416, 211-217(2011)) を参考にし、それをさらに改良した方法によって CPD を含むターゲティングベクターを構築した (Yasui, M. *et al.*, *DNA repair* 15, 11-20 (2014))。

部位特異的に CPD を 1 分子含む DNA オリゴマーは、(株)日本バイオサービスから購入した。その他、ビオチン修飾やリン酸化、そして無修飾の DNA オリゴマーは、(株)シグマジェノシスから購入した。チミジンキナーゼ遺伝子 (*TK*) 配列の一部を有する pTK15 プラスミド (Honma, M. *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen* 42, 288-298) を用意し、*TK* の相同的な配列を含む 5' 末端から CPD 修飾プライマー領域の前方までを PCR する組とその後方までを PCR する組、そして、3' 末端からも同様の PCR を行い、計 4 組の PCR 産物を用意した。各 PCR 生成物の一方の 5' 末端 DNA には、ビオチン付加が施してあり、引き続き、ビオチン-アビジン反応を利用して、それぞれの一本鎖 DNA (ビオチン付加の無い DNA 鎖) を分離した後、それらをアニーリングさせ、ライゲーションを行うことにより直鎖状二本鎖プラスミド

(pvIT^{CPD}) を作製した。これと同様の方法で、正常塩基 5'-TT が入ったコントロールターゲティングベクター (pvIT) も用意した。

3. ヒト培養細胞を用いる TATAM 実験系の概要

TSCER122 細胞 (*TK*^{-/-}) は、TK6 細胞から *TK* のエキソン 5 を欠き、その欠失部位の上流に I-SceI 認識配列 18 bp

(5'-ATTACCCTGTTATCCCTA) を 1 つ持っている。その配列は、本来のヒトゲノムに無いため、その培養細胞に I-SceI を発現させるベクター

(pCBASce) を導入すれば、I-SceI 酵素の切断により、ゲノムの 1 ヶ所だけに二本鎖切断を形成させることができる。その I-SceI 切断部位では、

DNA 修復されやすくなっているため、そこに相同配列を持ち、且つ DNA 付加体を含むターゲティングベクターを導入すれば、相同組み換えにより、エキソン5と付加体が同時にゲノム内に入る。その時、細胞は $TK^{-/-}$ から $TK^{+/-}$ になるため、HAT セレクションによって TK 復帰細胞だけ（つまり付加体が導入された細胞だけ）を回収することができ、後のシーケンス解析等に供することが可能である（図 1）。

細胞ゲノムへの導入は、Lonza 社製 Cell Line Nucleofector の手法に従っておこなった。5 x 10⁶ cells/100 μ L に調整した TSCER122 細胞に、pCBASce 50 μ g と pvIT^{CPD} ターゲティングベクター 1 μ g を同時にトランスフェクションし、75 cm² の培養フラスコで 3 日間培養（37°C, 5% CO₂）した。次に、その細胞を 1~5 x 10³ cells/mL に調整し、HAT 試薬を添加後、96 穴マイクロプレートでさらに 2 週間培養することによって、復帰細胞のクローン（ $TK^{+/-}$ ）を回収した。その後、各クローンのゲノム DNA を抽出し、CPD 部位だった周辺のシーケンスを行い、その突然変異誘発スペクトルおよび頻度を決定した。解析する配列は、付加体を導入した部位とその前後 4 塩基について、塩基の変異や欠失などを解析した（5'-TTAATTCTCC/GGAGAATTAA-3'）。実験回数は 1 回（1 トランスフェクション）である。

C. 研究結果

コントロール（CPD 部位が TT になっている）のターゲティングベクター-pvIT、および CPD を含むターゲティングベクター-pcIT^{CPD} をそれぞれ TSCER122 細胞に導入し、TK 復帰頻度を調べたところ、どちらも 10⁻³ オーダーで類似の値であった。これは、CPD がゲノムにインテグレートされる際に、おそらく影響がないものと推測できた。

バルキーDNA 付加体のモデルとして、CPD 付加体を TATAM 実験系に供し、CPD によって引き起こされる突然変異誘発頻度とスペクトラムを調べた（表 1）。合計 228 復帰クローンについてシーケンスを行い、そのうち 204 クローンが

CPD を含むターゲティングベクターと相同組み換えによって、CPD がゲノムに導入された。その約 92%（187 クローン）が、もとの DNA 配列に修復され、残りの 17 クローンから塩基変異が観察された。最も優位に検出された塩基変異は、CPD 部位にタンデムの塩基欠失（5'-TTAA $\Delta\Delta$ CTCC）が 11 クローン検出（5.4%, 11/204）された。残りの 6 クローンのうち、2 つは 5'-TTAA $\Delta\Delta$ CTCC となっていたが、その他の 4 つは、それぞれ異なる変異スペクトラムを示した（表 1）。なお CPD を含まないコントロールベクター-pvIT をゲノム導入した時は、対象となる DNA 配列（5'-TTAATTCTCC）に塩基変異が起きないことを確認した。

D. 考察

CPD は、紫外線照射によって形成する代表的な DNA 付加体の一つであり、すでにその突然変異誘発頻度とスペクトラムが調べられている

（Gentil, A. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 24, 1837-1840(1996)）。その論文では COS7 細胞が用いられ、CPD 部位で 5'-TT の 3'側の T→C と T→A の塩基変異（それぞれ 5'-TC, 5'-TA）がどちらも約 2%以下の頻度で検出されただけで、その他の変異は無かった。一方、本研究で得られた CPD の変異スペクトラムは、タンデム塩基欠失（5'- $\Delta\Delta$ ）が最も多く検出されたため、Gentil らの結果と異なることが分かった。その原因として予想できることは、本研究ではゲノムの染色体上に CPD を導入して調べているのに対して、Gentil らは CPD をプラスミドに導入してエピソーマルな条件で調べていることである。また、使用された細胞種が異なることも原因として挙げられる。

一方、CPD の突然変異誘発頻度のトータルは、本研究は 8.3%, 前述の Gentil らは 2.4%であり、CPD の突然変異誘発頻度が数%しか起きないという点では一致している。それは、CPD に対して DNA ポリメラーゼ η (POLH) が、正確に乗り越え DNA 合成をするからであると考えられる。もし、POLH 欠損細胞を用いた時、CPD はどのような

突然変異誘発頻度とスペクトラムを示すだろうか？。この疑問に対して、すでに Hendel らによって報告されている (Hendel, A. *et al.*, *DNA repair* 7, 1636-1646(2008))。POLH が欠損している *XPV* 患者の組織から株化された繊維芽細胞 (POLH^{-/-}) を用いて、CPD で起こる突然変異誘発頻度とスペクトラムを調べた。その結果、POLH^{+/+}細胞の塩基変異頻度より POLH^{-/-}細胞のそれは、統計的に有意に上昇し、その変異スペクトラムは塩基置換による変異が優位であり、塩基欠失はほぼ無かった。つまり、それらの変異スペクトラムは、CPD 部位のタンデム塩基欠失が優位となった本研究の変異スペクトラムと異なることが分かった (表 1)。その原因として、Hendel らは CPD をプラスミドに導入してエピソーマルな条件で繊維芽細胞を用いて調べており、本研究で使用している実験系とは異なることが予想されるが、現状では、なぜ本研究の変異スペクトルが既報と一致しないのか原因は分からない。これを明らかにするには、まず TSCER122 細胞の POLH 発現レベルを調べることで、そして、CPD の DNA 修復に関連する遺伝子の破壊細胞を構築して、TATAM 実験を繰り返し行うことによって、CPD の DNA 修復機構を調べる必要があると考えられる。

E. 結論

バルキーDNA 付加体を TATAM 実験系で調べることを目的として、バルキー付加体の中から CPD の DNA 付加体をモデル物質として選択し、その突然変異誘発頻度とスペクトラムを調べた。CPD 部位で起きる突然変異誘発スペクトラムに関して、本研究ではタンデムの塩基欠失が優位に検出された。よって、バルキーDNA 付加体も TATAM 系に適用できることが分かった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sassa A, Kamoshita N, Kanemaru Y, Honma M, Yasui M. (2015) Xeroderma Pigmentosum Group A Suppresses Mutagenesis Caused by Clustered Oxidative DNA Adducts in the Human Genome. *PLOS ONE* 10(11), e0142218 (2015).

2. 学会発表

- 1) 安井学, 佐々彰, 鴨下渚, 本間正充; DNA 損傷 1 分子の部位特異的なゲノム導入とその遺伝的影響の解析. 宇宙生物科学会, 東京 (2015 年 9 月)
- 2) 佐々彰, 鴨下渚, 兼丸祐紀, 本間正充, 安井学; ヒトリンパ球細胞のゲノムに導入したシトシン修飾体の潜在的な突然変異誘発能. 第 44 回日本環境変異原学会, 福岡 (2015 年 11 月)
- 3) 佐々彰, 鴨下渚, 兼丸祐紀, 本間正充, 安井学; ヌクレオチド除去修復は酸化的クラスターDNA 損傷によって誘発される突然変異を抑制する. 第 44 回日本環境変異原学会, 福岡 (2015 年 11 月)
- 4) Honma M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T, Sasa A, Yasui M; Tracing the fate of site-specifically introduced oxidative dna damage in the human genome. 14th International Workshop on Radiation Damage to DNA,メルボルン (2016 年 3 月)

H. 知的所有権の取得状況

なし

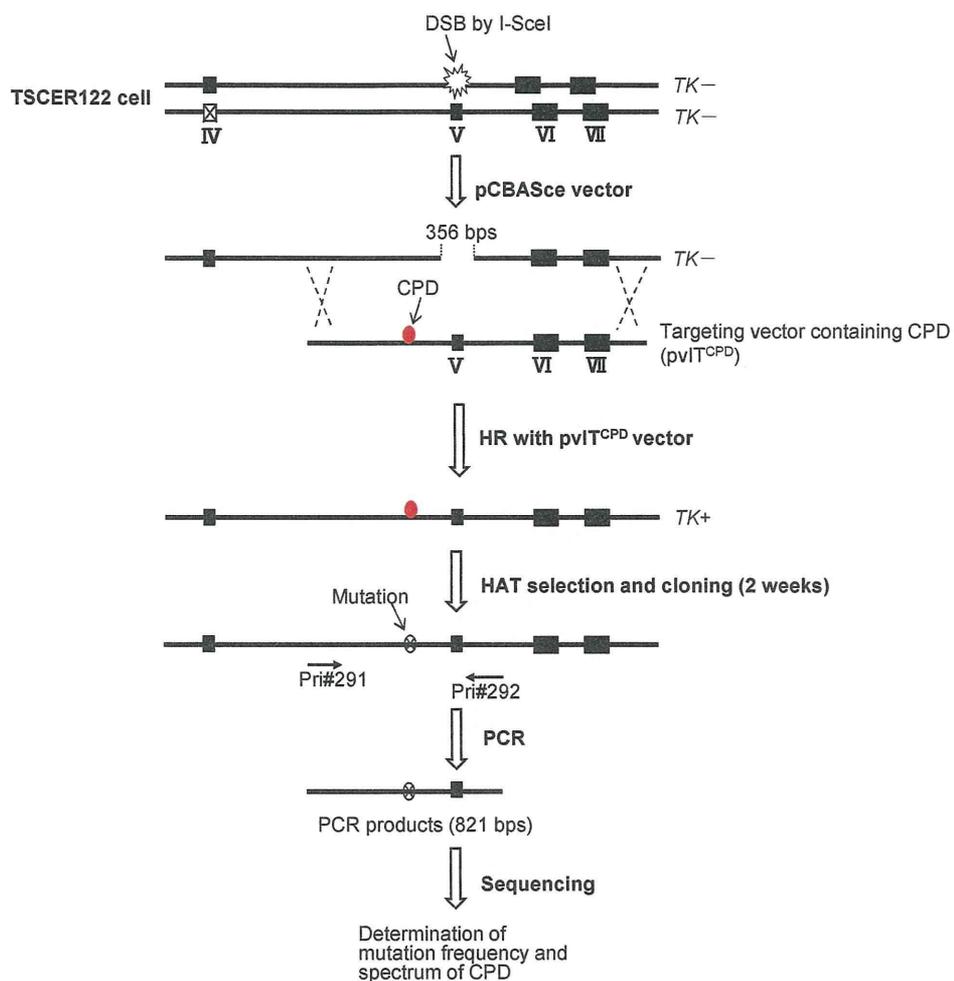


図 1. TATAM 実験系の概要

Table 1. Mutation spectra induced by integration of pvIT^{CPD}

| Targeting vector | ID number of 96-well microplate | TK revertants analyzed | CPD-integrated revertants | No mutation | Targeted and non-targeted mutation at CPD site ^a | | Total mutation | ND ^b |
|--------------------------------|---------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------|---|-----------|----------------|-----------------|
| | | | | | Original seq. | Number | | |
| pvIT ^{CPD} | 1 | 77 | 69 | 68 | 5' TTAAT <u>TT</u> CTCC | | 1 | 3 |
| | | | | | 5' TTAA Δ Δ CTCC | 1 | | |
| | 2 | 74 | 68 | 57 | 5' TTAA Δ Δ CTCC | 7 | 11 | 3 |
| | | | | | 5' TTA Δ AA Δ CTCC | 2 | | |
| | | | | | 5' TTAATGCTCC | 1 | | |
| | 3 | 77 | 67 | 62 | 5' TTA Δ TTCTCC | 1 | 5 | 1 |
| 5' TTAA Δ Δ CTCC | | | | | 3 | | | |
| 5' TTAAATCTCC | | | | | 1 | | | |
| Total | | 228 | 204 (100%) | 187 (91.7%) | | 17 (8.3%) | 7 | |

^aUnderline indicates CPD site and Δ indicates one-base deletion. ^bNot detected.

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価のための新戦略法に関する研究

分担研究課題名：エピ遺伝毒性物質の評価系の開発

研究分担者： 杉山圭一 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

研究要旨

エピ遺伝毒性物質（エピ変異原）の検出系が化学物質の発がん性の観点から求められているが、現時点で有効なスクリーニングはない。本分担研究では、エピ変異原の1つ DNA メチル化阻害剤に焦点をあて、真核微生物の酵母を用いて同阻害剤の検出系の構築を試みた。DNA 維持メチル化活性を有するヒト DNA methyltransferase 1 (DNMT1)、*de novo* DNMT である 3A (DNMT3A) もしくは 3B (DNMT3B) の cDNA を導入した発現プラスミドを各々構築し、*DNMT1* と各 *de novo DNMT* 遺伝子発現プラスミドを、DNA メチル化レベルが哺乳類と比較し低いとされる出芽酵母に co-transformation し形質転換体（ヒト *DNMT* 酵母）を得た。Western blot により各 DNMT の発現を確認した後、DNMT 阻害剤 5-アザ-2'-デオキシシチジン（5AZ）に対する両形質転換体が示す表現型を解析した。その結果、同形質転換体が獲得した表現型である凝集反応を両剤は濃度依存的に抑制した。したがって、ヒト *DNMT* 酵母が示す凝集性は、DNMT 阻害剤特異的に抑制される表現型と判断した。また、出芽酵母の凝集性に関与する *FLO1* 遺伝子の mRNA レベルがヒト *DNMT* 酵母において亢進し、5AZ 存在下では抑制されたことから、今回作出した酵母ゲノム上の *FLO1* プロモーターは、DNA メチル化制御を受けながら可塑性も維持していることが推測された。以上の結果は、エピジェネティック変異原を検出できる短期スクリーニングシステムに、育種したヒト *DNMT* 酵母が利用可能であることを示唆している。

キーワード：エピ変異原、DNA methyltransferase、酵母、凝集

A. 研究目的

発がん性は人健康影響における最も重要な評価対象の1つである。遺伝毒性試験は、現在わが国における新規化学物質の発がん性評価の短期スクリーニング試験として活用されている試験である。遺伝毒性試験とは、体細胞および生殖細胞に発がんの原因ともなる突然変異を誘発し、ヒトの健康へ深刻な影響を及ぼす可能性がある物質を同定する試験である。代表的な試験法として、細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）や哺乳類細胞を用いる染色体異常試験などがある。

一方で、発がんメカニズムとして、近年エピジェネティックな変異（エピ変異）の関与も示唆されている。ジェネティック（遺伝的）な変化である突然変異と異なり、エピ変異は、クロマチンへの後天的な修飾異常により遺伝子発現の変化を惹起する。非遺伝毒性発がん物質の分子機序の1つと考えられるエピ遺伝毒性物質（エピ変異原）の短期スクリーニング試験法は、これまでのところ確立されていないのが現状である。

エピジェネティクスは、DNA の塩基配列非依存的な遺伝子発現制御を対象とする遺伝学領域

と定義される。しがたってエピ変異原には、DNA とヒストンの複合体であるクロマチンの基本ユニットであるヌクレオソームに作用する化学物質が該当する。ヌクレオソーム構造を規定する因子として DNA 上の 5' -CpG-3' 配列 (CpG) 内シトシンのピリミジン環の 5 位のメチル化 (DNA メチル化) と、ヒストンのアセチル化、メチル化およびリン酸化等の化学修飾 (ヒストン修飾) が知られている。DNA メチル化酵素 (DNA methyltransferase; DNMT) は、哺乳類細胞においてはシトシンを新規にメチル化する酵素である DNMT3A および DNMT3B と、複製により生ずる片鎖がメチル化されたヘミメチル化 CpG をメチル化する DNMT1 の計 3 種類の酵素が同定されている。一般的に、遺伝子のプロモーター領域における CpG 配列が高メチル化状態である場合、その下流にある遺伝子の発現は抑制されると考えられている。

真核生物である出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、他の真核生物と比較して培養および遺伝子組換えが容易であるという特徴を有する。一方、*S. cerevisiae* では DNMT 遺伝子は同定されておらず、ゲノムのメチレーションレベルも低いとされる。そこで本研究では、酵母をプラットフォームとして、まずは DNA メチル化阻害剤検出系を構築することを目的に、ヒト *DNMT* 遺伝子形質転換酵母 (ヒト *DNMT* 酵母) を作出し、DNMT 阻害剤に対する応答性を検討した。

B. 研究方法

1. 酵母株

出芽酵母 *S. cerevisiae* YPH250 株 (*MATa trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 ade2-101 ura3-52*) は、University of California at Berkeley, CA, USA より入手した。本研究では、コントロールとして、YPH250/pY2_3 (*MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 pYES2CT pYES3CT*)、また

YPH250/pY2hD1_pY3hD3A (*MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 pY2hD1 pY3hD3A*)、YPH250/pY2hD1_pY3hD3B (*MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 pY2hD1 pY3hD3B*) の 2 株は、ヒト *DNMT* 遺伝子形質転換酵母として使用した (表 1)。各 DNMT 発現プラスミド (*GAL1* プロモーター) は、以下の通り構築した。ヒト *DNMT1*、*DNMT3A* および *DNMT3B* の各オープンリーディングフレーム領域を PCR により増幅し発現ベクター pYES2/CT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) もしくは pYES3/CT (Invitrogen) のマルチクローニングサイトに挿入した。ヒト *DNMT1* 発現プラスミド pY2CThD1 は、*DNMT1* cDNA (BC144093) を鋳型に増幅した。ヒト *DNMT3A* 発現プラスミド pY3CThD3A は、*DNMT3A* cDNA (BC043617) を鋳型に増幅した。ヒト *DNMT3B* 発現プラスミド pY3CThD3B は、*DNMT3B* cDNA (BC111933) を鋳型に増幅した。なお、構築した各発現プラスミドは、DNA シーケンスによりその配列を確認した。

2. 培地

Synthetic Dextrose (SD) -Trp/-Ura および Synthetic Galactose (SG) -Trp/-Ura 最少液体培地は以下の通りに調製した。MilliQ 水に -Trp/-Ura DO Supplement (Clontech, USA) 0.072%、Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (Becton and Dickinson, USA) 0.67% を加えオートクレーブ (121°C 20 min) 後、20% グルコース (Wako, Osaka, Japan) もしくは 20% ガラクトース (SIGMA-ALDRICH, USA) を終濃度が 2.0% になるよう加えて 4°C で保存した。

3. Western blot

SG 培地にて 30 度で振盪培養した培養液から集菌、洗浄後、ガラスビーズで細胞を破碎し細胞抽出液を得た。得られたサンプルに対して、rabbit