

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

polyclonal anti-DNMT1 (ab19905; Abcam, Cambridge, UK)、rabbit polyclonal anti-DNMT3A (SC-20703; Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Santa Cruz, CA, USA)、mouse monoclonal anti-DNMT3B (IMG-184A; Imgenex Corporation, San Diego, CA, USA)およびmouse monoclonal anti- $\beta$ -actin (Abcam)の各1次抗体を用いてWestern blotを行った。なお、2次抗体には、anti-rabbit/mouse Immunoglobulin G antibodies (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA, USA)を使用した。

#### 4. 増殖および凝集試験

各培地にてDNMT阻害剤である5-アザ-2'-デオキシチジン(5AZ)存在下もしくは非存在下にて30度で振盪培養を行い、経時的に濁度(OD600)を測定した。相対的凝集活性(Relative flocculation activity)は、試験管の直径(T)と凝集の直径(F)を測定し、次式を用いて算出した。

$$\text{Relative flocculation activity} = 100 \times (F/T)$$

#### 5. Reverse-Transcription (RT)-PCR 解析

酵母細胞よりRNAを抽出後、Super Script® One-Step RT-PCR with Platinum® Taq(Life technologies, USA)を使用しRT-PCRを行った。なお、使用したプライマーは以下の通りである。*FLO1*, 5'-CTCATCGCTATATGTTTTTGG-3' (forward) および 5'-CGAGTAAACAACCTTCATTGG-3' (reverse); *FLO11*, 5'-GTCACGACGGCTATTCCAACCACAGTTATTACC-3' (forward) および 5'-GAATACAACCTGGAAGAGCGAGTAGCAACCAC-3' (reverse); *ACT1*, 5'-ATTCTGAGGTTGCTGCTTTGG-3' (forward) および 5'-G AAGATTGAGCAGCGGTTTTGC-3' (reverse)。

### C. 研究結果

1. ヒト *DNMT* 酵母における *DNMT* の発現確認  
育種したヒト *DNMT* 酵母 YPH250/pY2hD1\_pY3hD3A および、YPH250/pY2hD1\_pY3hD3B における各 *DNMT* の発現をWestern blotにより確認した。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、SG培地で培養後24時間までの発現プロファイルを解析した。その結果、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。YPH250/pY2hD1\_pY3hD3B 株では、*DNMT1* については16時間からの発現を認めた(図1)。

#### 2. ヒト *DNMT* 酵母の増殖曲線

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SD培地における増殖レベルを確認した。その結果、SD培地において、ヒト *DNMT* 酵母である YPH250/pY2hD1\_pY3hD3A および、YPH250/pY2hD1\_pY3hD3B は、ベクターコントロールである YPH250/pY2\_3 に比べて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  $\mu$ M)では、認められた増殖抑制は解除されなかった(図2A)。

ヒト *DNMT* 酵母育種に使用した発現ベクターは *GAL1* プロモーターであり、ガラクトースを炭素源とした培地(SG培地)において各 *DNMT* の発現が確認されている(図1)。そこでSG培地におけるヒト *DNMT* 酵母の増殖レベルを検証した。その結果、SD培地で得られた結果と同様に、ベクターコントロールである YPH250/pY2\_3 の増殖レベルに比べ、ヒト *DNMT* 酵母の YPH250/pY2hD1\_pY3hD3A および YPH250/pY2hD1\_pY3hD3B の増殖は遅延・抑制されていることが確認された。しかし、同増殖阻害は、SD培地での結果と同様に、5AZ(100  $\mu$ M)では解除されなかった(図2B)。

#### 3. ヒト *DNMT* 酵母の凝集反応

酵母の増殖阻害の原因の一つとして凝集が予想されるため、SG 培地におけるヒト *DNMT* 酵母の凝集レベルを確認した。その結果、ベクターコントロールの YPH250/pY2\_3、ヒト *DNMT* 酵母である YPH250/pY2hD1\_pY3hD3A、YPH250/pY2hD1\_pY3hD3B の両株ともに凝集は確認されなかった。

一方、増殖試験において SG 培地と同様に SD 培地においてもヒト *DNMT* 酵母の増殖阻害が確認されたことから、SD 培地におけるヒト *DNMT* 酵母の凝集試験を行い、増殖状態を確認した。その結果、驚いたことに SD 培地においては、ヒト *DNMT* 酵母である YPH250/pY2hD1\_pY3hD3A、YPH250/pY2hD1\_pY3hD3B の両株においてのみ、凝集が誘発されることが明らかとなった (図 3)。

#### 4. ヒト *DNMT* 酵母の凝集におよぼす 5AZ の影響

SD 培地において、ヒト *DNMT* 酵母が凝集性を示したことから、次に SD 培地で認められた凝集に対する *DNMT* 阻害剤の影響を検討した。その結果、5AZ 濃度依存的にヒト *DNMT* 酵母の凝集が抑制されることが明らかとなった。YPH250/pY2hD1\_pY3hD3A、YPH250/pY2hD1\_pY3hD3B の両株とも 100  $\mu$ M から有意に認められ、200  $\mu$ M ではその凝集は完全に抑制された(図 4)。

#### 5. *FLO1/FLO11* の RT-PCR 解析

ヒト *DNMT* 酵母の凝集性因子 Flocculin 遺伝子群(*FLO1/FLO11*)の転写レベルを、RT-PCR により解析した。*Flo11* とハウスキーピング遺伝子である *ACT1* mRNA レベルは、検討した 3 株 (YPH250/pY2\_3、YPH250/pY2hD1\_pY3hD3A、YPH250/pY2hD1\_pY3hD3B)では差は認められなかった。一方、ベクターコントロールである YPH250/pY2\_3 と比べ、ヒト *DNMT* 酵母である

YPH250/pY2hD1\_pY3hD3A、YPH250/pY2hD1\_pY3hD3B では *FLO1*mRNA の転写量が亢進していることが明らかとなった(図 5A)。

*FLO1* mRNA 量がヒト *DNMT* 酵母では亢進していたことから、その亢進に対する *DNMT* 阻害剤の影響を検討した。5AZ (200  $\mu$ M) 存在下において、ヒト *DNMT* 酵母である YPH250/pY2hD1\_pY3hD3A、YPH250/pY2hD1\_pY3hD3B の *FLO1*mRNA レベルの亢進は抑制されることが明らかとなった(図 5B)。

## D. 考 察

エピ変異原検出系を世界に先駆けて構築することを目的に、ゲノム DNA メチル化レベルが低いとされる真核生物、出芽酵母 *S. cerevisiae* にヒト *DNMT* 遺伝子をトランスジェニックした「ヒト *DNMT* 酵母」2 株 (YPH250/pY2hD1\_pY3hD3A、YPH250/pY2hD1\_pY3hD3B) をプラットフォームに、初年度は *DNMT* 阻害剤に対する応答性を検討した。その結果、グルコースを C 源とする培地においてヒト *DNMT* 酵母は凝集性を呈し、同表現型は *DNMT* 阻害剤である 5AZ により濃度依存的に抑制された(図 3, 4)。哺乳類細胞において *DNMT* は、DNA 複製時にシトシンのホモログとしてゲノムに取り込まれた 5AZ と核内で共有結合し分解を受けるとされる (Br. J. Haematol., 126 (2004), pp. 629–636)。したがって、本結果はヒト *DNMT* 酵母細胞内において発現したヒト *DNMT* が酵母核内のゲノム DNA をメチル化することを、またその凝集反応は可塑性を保持しつつゲノム DNA メチル化により制御されることを示唆する。また、今回育種した 2 株のヒト *DNMT* 酵母は共に凝集性を獲得したことから、両酵母細胞内でそれぞれ発現している *de novo* *DNMT* の *DNMT3A* もしくは *3B* は、凝集に関わる遺伝子領域の同じ遺伝子座のシトシンにメチル基を付加することでその凝集性を制御している可能性も推測される。

ヒト *DNMT* 酵母は、SD および SG の両培地において増殖遅延・抑制を示した(図 2)。ヒト *DNMT* 発現コンストラクトは *GAL1* プロモーター制御下にあることから、本結果は SD 培地においても漏出的にヒト *DNMT* が発現している可能性を示唆する。さらに、酵母 YPH250 株細胞内におけるヒト *DNMT* 発現は細胞周期に影響をおよぼすこと、またその影響は 100  $\mu$ M 5AZ 存在下では変化が認められなかった事実を総合的に考察すると、ヒト *DNMT* 酵母ゲノム上の細胞周期に関わる遺伝子(サイクリン、サイクリン依存性キナーゼなど)の発現制御を *DNMT* は不可逆にかく乱していることも予想させる。DNA メチル化によるエピジェネティックな制御は哺乳類細胞では各種ヒストン修飾による制御機構より比較的安定とされる (Science, 351 (2016), pp. 720–724)。したがって、5AZ によりヒト *DNMT* 酵母が示す生育障害が回復しないとする本研究結果は、これまでの哺乳類細胞で得られた知見と矛盾しないとも言える。

酵母の凝集に關与する遺伝子群として Flocculin が知られている。出芽酵母のゲノム解析で使用されたリファレンス株 S288C から派生したとされる YPH250 株は、Flocculin 遺伝子である *FLO1/FLO11* の転写因子の 1 つ *FLO8* にナンセンス変異を持つとされる (Genetics, 144 (1996), pp. 967–978)。したがって、通常 YPH250 株は凝集性を示さない。今回の解析から、*FLO1* 遺伝子の転写がヒト *DNMT* 酵母で亢進しその誘導が 5AZ により抑制されたことから、5AZ 抑制性ヒト *DNMT* 酵母凝集反応は *FLO1* により誘導されていることが強く示唆される。さらに *FLO1* 遺伝子のプロモーターが *DNMT3A* および *3B* の両酵素により DNA メチル化を受ける可能性もこの解析から推測される。これは、2 種類の *de novo* DNA メチル化酵素が上述のとおりヒト *DNMT* 酵母細胞内のゲノム上で同じ遺伝子座 (CpG 配列) をメチル化する可能性を指摘したことと一致す

る。

今回育種した、酵母 YPH250 株をベースとした 2 株のヒト *DNMT* 酵母は、野生株と異なる表現型として凝集性を示した。ヒト *DNMT* 酵母において凝集性関連遺伝子の 1 つ *FLO1* は 5AZ によりその誘導が抑制されることから、哺乳類細胞で一般的に認められる制御とは逆に *FLO1* プロモーター領域はメチル化により活性化されること、また比較的安定なエピジェネティック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る。これは、ヒト *DNMT* 酵母の *FLO1* プロモーター領域の大きな特徴と考えられる。また、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ると仮定した場合、一般的に各種薬剤に対して哺乳類細胞より感受性が低いとされる酵母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。試験法として本研究を考察した場合、検出に Ames 試験と同様に特殊な機材を必要としないバイオマーカーを同定できた本研究は、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であり、また動物愛護管理法が定める「3R」にも資する点で有用性は高いとも言えよう。

## E. 結論

本研究では、内在性 *DNMT* を持たないとされる出芽酵母 *S. cerevisiae* にヒト *DNMT* 遺伝子を形質転換し、エピ変異原である *DNMT* 阻害剤の検出系の構築を試みた。育種したヒト *DNMT* 酵母はグルコース培地において凝集性を示し、その表現型は *DNMT* 阻害剤である 5AZ により濃度依存的に抑制された。以上の結果は、凝集性をバイオマーカーにヒト *DNMT* 酵母をエピ変異原のスクリーニング系に応用できることを示している。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 誌上発表

1. 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, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **456**, 689-694 (2015).

### 学会発表

1. 杉山圭一、古沢博子、清水雅富、本間正充：酵母凝集反応を利用した新規なエピ変異原可視化検出系の開発、日本農芸化学会大会講演要旨集（2016・札幌）（2016, 3 札幌）。
2. Sugiyama, K., Furusawa, H. and Honma, M.: Epigenetic modifiers are visibly detectable by human DNMTs transgenic yeast, International Symposium for RIKEN Epigenetics Program 2016 (2016.2 和光)。
3. 杉山圭一、古沢博子、本間正充：In vivo DNAメチル化酵素阻害可視化システムの開発、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会プログラム（2015・神戸）445（2015, 12 神戸）。
4. 杉山圭一、古沢博子、本間正充：酵母をプラットフォームとしたエピジェネティック変異原検出系構築の試み、日本環境変異原学会第44回大会（福岡）プログラム・要旨集（2015・福岡）103（2015, 11 福岡）。
5. Sugiyama, K., Furusawa, H. and Honma, M.: Molecular breeding of yeasts for detection of DNA methyltransferase inhibitor, Environmental Mutagenesis and Genomics Society 46<sup>th</sup> Annual Meeting (2015, 9 ニューオリンズ・米国)。

6. 清水雅富、グルーズ ピーター、細田明美、碓井之雄、杉山圭一、本間正充： $\omega$ -3系多価不飽和脂肪酸の過酸化反応によって産生されるアルデヒド類による変異原性試験、第57回日本脂質生化学会（2015, 5 東京）。
7. Gruz, P., Shimizu, M., Hosoda, A., Kojo, A., Usui, Y., Sugiyama, K. and Honma, M.: Mutagenicity of polyunsaturated fatty acid peroxidation products in the standard Ames assay, 12th Asian Congress of Nutrition (2015, 5 横浜)。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 使用した菌株

| Strain name           | Genotypes   |
|-----------------------|---|
| YPH250/pY2_3          | MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 p[2μ URA3] p[2μ TRP1]                |
| YPH250/pY2hD1_pY3hD3A | MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 p[2μ URA3 hDNMT1] p[2μ TRP1 hDNMT3A] |
| YPH250/pY2hD1_pY3hD3B | MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 p[2μ URA3 hDNMT1] p[2μ TRP1 hDNMT3B] |

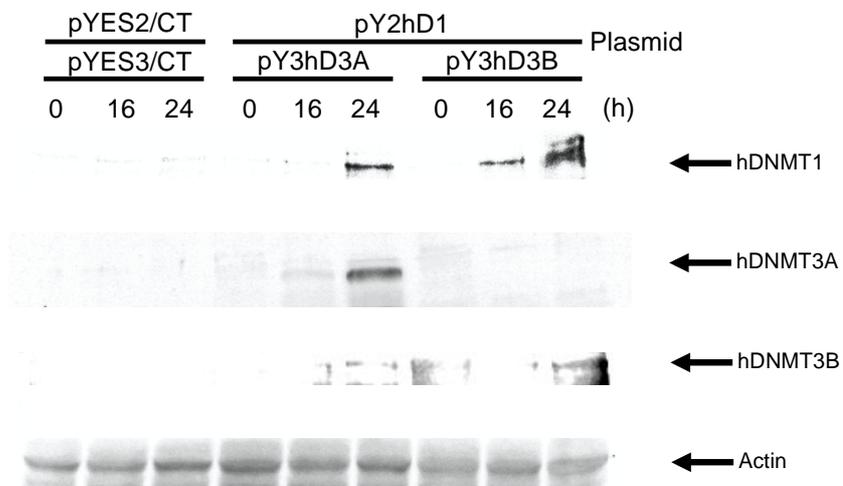
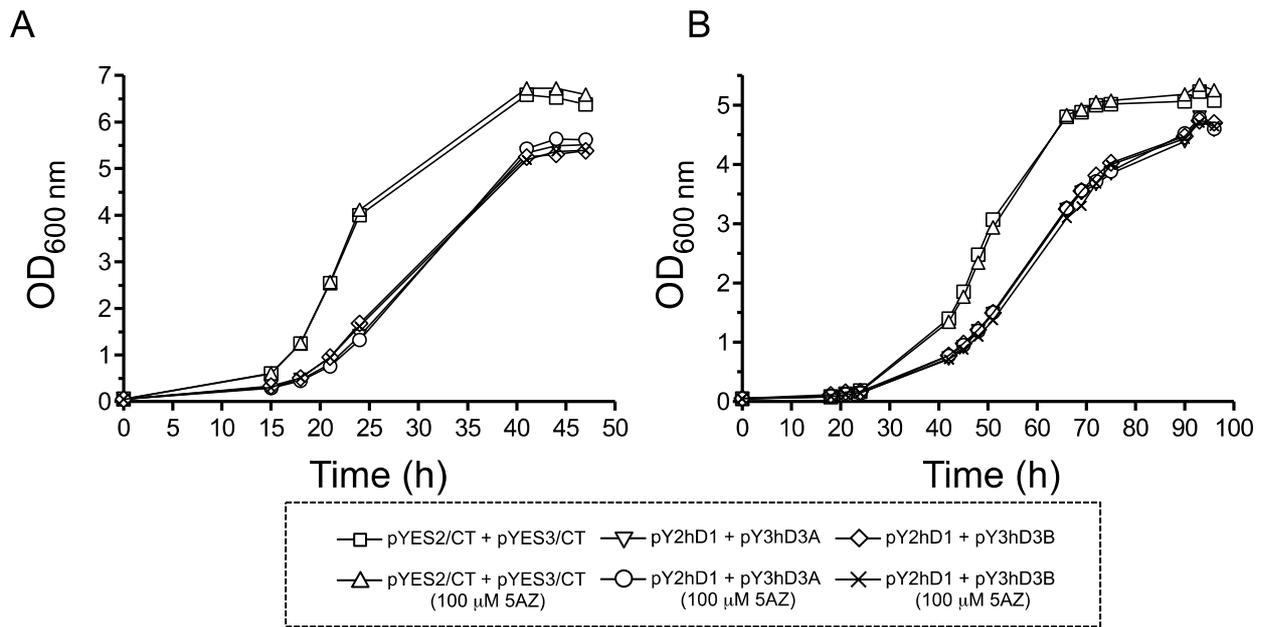
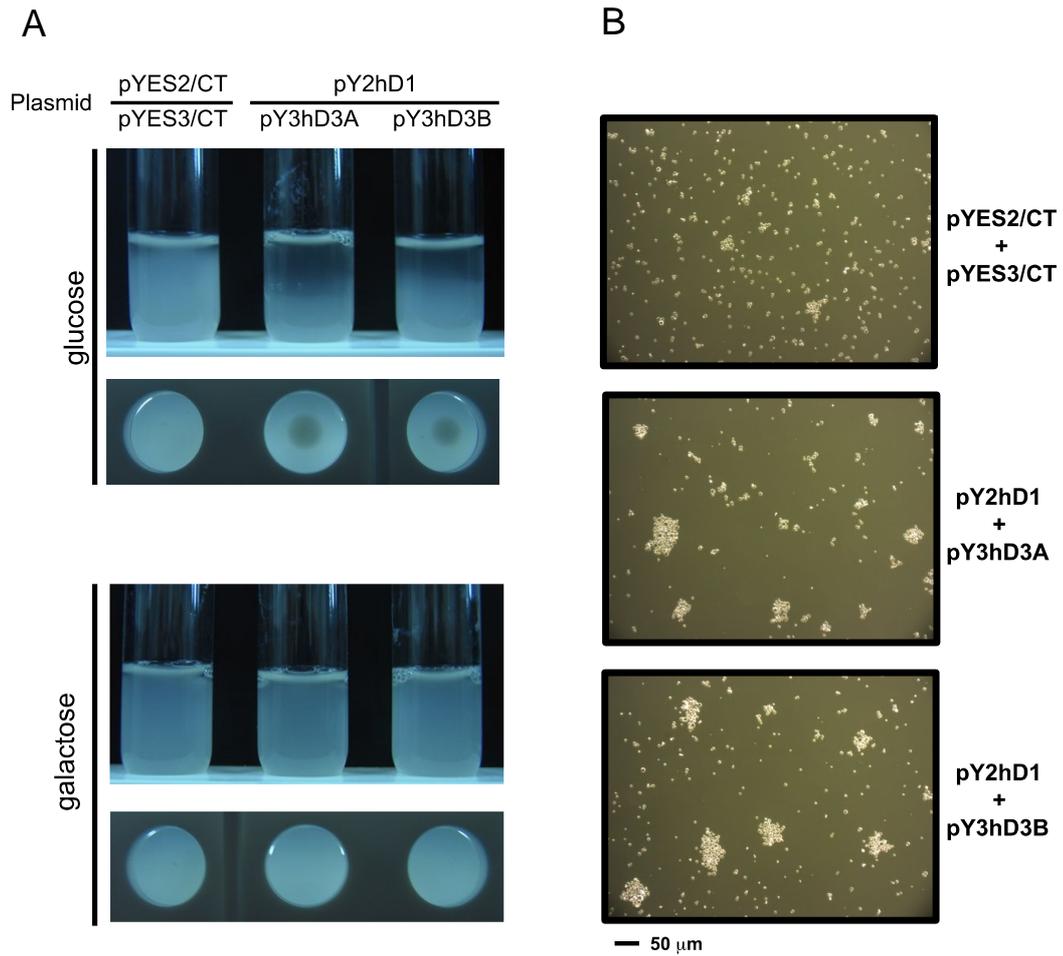


図 1 各ヒト DNMT 酵母の DNMT 発現レベル



**図2 各ヒト DNMT 酵母の増殖曲線**  
**A: グルコース培地 (SD 培地), B: ガラクトース培地 (SG 培地)**



**図3 各ヒト DNMT 酵母の増殖状態**

**A: 各酵母の培養試験管, B: SD 培地での各酵母のデジタル顕微鏡写真**

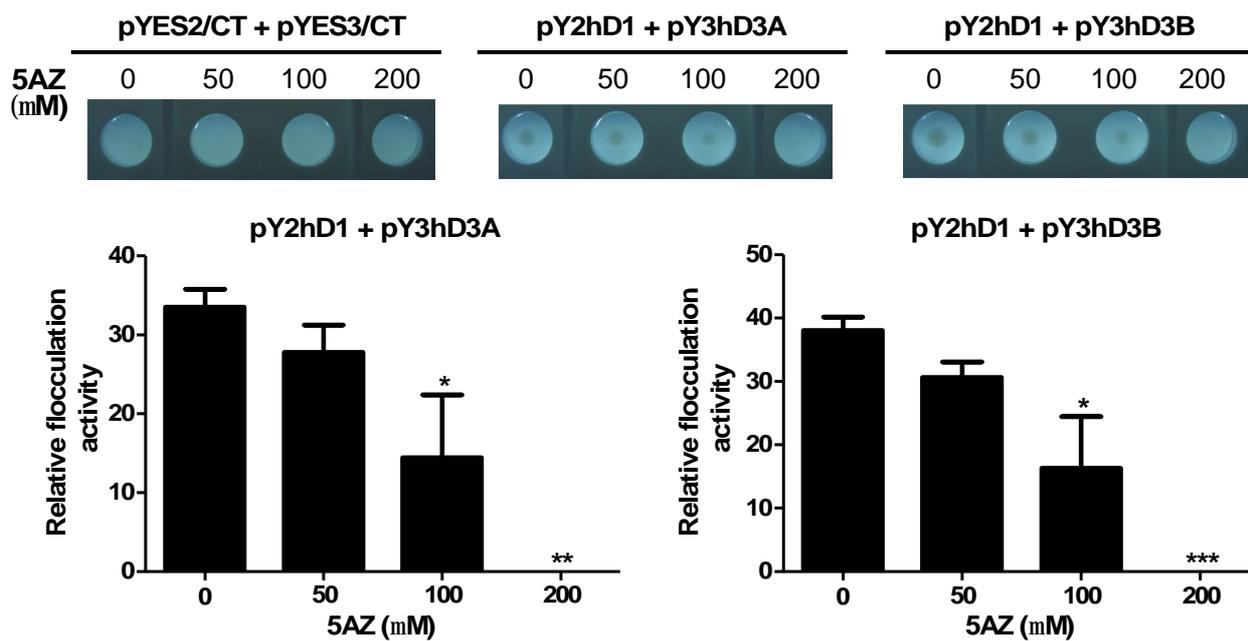
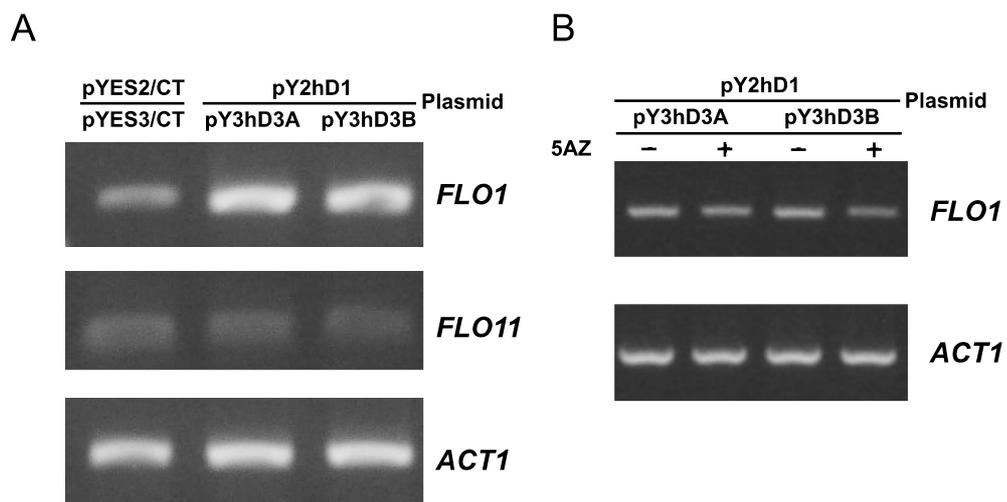


図4 ヒト DNMT 酵母の凝集におよぼす 5AZ の影響



**図5 Flocculin 遺伝子の転写レベル**

**A: 各酵母での Flocculin 遺伝子の転写レベル**

**B: *FLO1* 遺伝子の転写レベルにおよぼす 5AZ の影響**

