

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

化学物質の発がん性検出精緻化の観点からエピ遺伝毒性物質（エピ変異原）の検出系が求められているが、グローバルレベルで認められている試験系はない。今年度の本分担研究では、DNA メチル化阻害剤以外のエピ変異原に焦点をあて、昨年度に DNA methyltransferase (DNMT)阻害剤に応答性を示したヒト DNMT 遺伝子形質転換酵母（ヒト DNMT 酵母）の凝集性を指標にその応答性を検討した。Histone deacetylase (HDAC) 阻害剤である Trichostatin A (TSA) 存在下(0–50 μ M)において、濃度依存的な凝集性の誘発が認められた。ヒト DNMT 酵母が示す凝集性に関与すると考えられる凝集性関連遺伝子 FLO1 の mRNA レベルは、同様の濃度域において増加傾向が確認された。元既存添加物アカネ色素（平成 16 年に同名簿より削除）含有成分アリザリンは、発がんプロモーション作用が懸念される化学物質である。ヒト DNMT 酵母の凝集性に対するアリザリン（0–4.0 μ M）の影響を検討した結果、TSA と同様に凝集促進作用と FLO1 の mRNA レベル上昇を認めた。ヒストンへの影響を検討した結果、アリザリンはバルクレベルでコアヒストン H3 量を減少させることが明らかになった。また、アリザリン（4.0 μ M）処理時における核染色像の異常も観察された。TSA とアリザリンが凝集性に示した作用は、コントロール株となる非ヒト DNMT 酵母（発現用ベクターのみ形質転換した酵母）においてもほぼ同様の傾向として確認された。

以上の結果は、DNMT 阻害剤に加えヒストンを作用点とする化学物質についても、ヒト DNMT 酵母の凝集性を指標に検出できる可能性を示している。すなわち、本研究によりヒト DNMT 酵母の凝集性をエンドポイントに、ユニバーサルなエピ変異原の短期スクリーニング系の構築が可能であることが明らかとなった。

キーワード：エピ変異原、DNA methyltransferase、酵母、Trichostatin A、アリザリン

A. 研究目的

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）の関与も指摘されている。ジェネティック（遺伝的）な変化である突然変異とは異なり、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をかく乱する。エピ遺伝毒性物質（エピ変異原）のスクリーニング試験については、短期・長期に関わらず現時点では

確立されていない。

エピジェネティクスとは、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を指す。したがって、エピ変異原には、DNA とヒストンの複合体であるヌクレオソームに作用する化学物質が相当する。昨年度では、DNA メチル化阻害剤検出系を構築することを目的に、ヒト DNA methyltransferase (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。その結果、ヒト DNMT 酵母は凝集性を獲得し、同表現型は DNMT 阻害剤により抑制されることを報告した。

本年度では、昨年度の結果を踏まえ、DNMT 阻害剤以外の主要なエピ変異原となるヒストンに作用点を有する化学物質が凝集性に及ぼす影響を検討した。

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、コントロール株として、YPH250/pY2_3 (*MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 pYES2CT pYES3CT*)を、YPH250/pY2hD1_ pY3hD3A (*MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 pY2hD1 pY3hD3A*)株もしくは YPH250/pY2hD1_ pY3hD3B (*MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 pY2hD1 pY3hD3B*)株をヒト DNMT 酵母として使用した(表 1)。

2. 使用した化学物質

Trichostatin A (TSA) は東京化成工業(株)から、アリザリンおよびアントラセンは和光純薬工業(株)より購入した。

3. 培地

Synthetic Dextrose (SD) -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 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)を最終濃度が 2.0%になるよう加えて 4 で保存した。

4. 凝集試験

各被検物質存在下もしくは非存在下にて 30 度で対数増殖期中期から定常期初期まで振盪培養を行い、凝集レベルを相対的凝集活性として測定した。相対的凝集活性(Relative flocculation activity)は、培養液中の透明領域の高さ (T) と培養液全体の高さ (C) を測定し、次式を用いて算出した。

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

5. Reverse-Transcription (RT)-PCR 解析

対数増殖期中期から後期まで培養した酵母細胞より 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表 2 の通りである。

6. Western blot

対数増殖期後期まで培養した後、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-histone H3 (ab1791; Abcam, Cambridge, UK)および mouse monoclonal anti-β-actin (ab8224; 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。

7. 核の蛍光染色

対数増殖期後期まで培養した酵母細胞を 100 ng/mL の 4',6-diamidino-2-2-phenylindole (DAPI; 和光純薬工業(株))で染色した。蛍光観察には Olympus FluoView FV1000 with an IX81 inverted microscope (オリンパス(株))を使用した。

8. 統計処理

一元配置分散分析を行った後、Dunnett's *post hoc* test を用いて有意差検定をした。測定値は標準誤差で表示した。

C. 研究結果

1. TSA が酵母凝集性と *FLO1* 発現に及ぼす影響

Histone deacetylase (HDAC) 阻害剤である TSA がヒト *DNMT* 酵母および、コントロール株の凝集レベルに及ぼす影響を凝集試験により検討した。その結果、ヒト *DNMT* 酵母およびコントロール株両株において、TSA 濃度 (0–50 μM) 依存的な凝集促進作用が認められた (図 1A)。RT-PCR 解析の結果、凝集性関連遺伝子 *FLO1* の発現量についても TSA 濃度 (0–50 μM) 依存的に誘導されることが確認された (図 1B)。

2. アリザリンが酵母凝集性に及ぼす影響

元既存添加物アカネ色素に含まれる発がんプロモーション作用が懸念される化学物質アリザリンについて、凝集試験を実施した。その結果、ヒト *DNMT* 酵母、コントロールの両株に対して、アリザリンは濃度 (0–4.0 μM) 依存的に凝集反応を促進した。一方、がんプロモーション作用について明確な報告がないアリザリンの構造類縁体であるアントラセンにおいては、400 μM 処理時においても同様の作用は検出されなかった (図 2)。

ヒト *DNMT* 酵母、コントロールの両株に対して、アリザリンもしくはアントラセンが *FLO1* 発現に及ぼす影響を検討した結果、アリザリン存在下においてのみ濃度 (0–4.0 μM) 依存的な発現上昇が認められ、アントラセン (0–400 μM) 存在下では同様の作用は確認されなかった (図 3)。

3. アリザリンがヒストンに及ぼす影響

ヒト *DNMT* 酵母、コントロールの両株に対して、アリザリンは、TSA と同様の凝集性促進作用を示したことから、同剤によるヒストンへの影響を検討した。コアヒストン構成成分の 1 つヒストン H3 を Western blot 法により解析した結果、アリザリン (0–4.0 μM) 処理によりヒストン H3 量が減少することが明らかとなった。一方、アントラセン (0–40 μM) 存在下では同様の効果は認められなかった (図 4)。

4. アリザリンが核染色像に及ぼす影響

コアヒストン H3 量の減少により、核 DNA がユーロクロマチン状態となることが推測される。そこで、ヒト *DNMT* 酵母、コントロールの両株におけるアリザリン (4.0 μM) 処理時における DAPI による核染色像を観察した。通常、核 DNA は細胞内において多くはドット状として観察されるが、アリザリン存在下では拡散状態となる細胞が増えることが明らかとなった (図 5)。

D. 考察

エピ変異原検出系を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、出芽酵母にヒト *DNMT* 遺伝子を導入した「ヒト *DNMT* 酵母」をプラットフォームに、本年度は同酵母が特異的に示す表現型「凝集性」に対する DNMT 阻害剤以外のエピ変異原に対する応答性を検討した。その結果、HDAC 阻害剤 TSA により凝集性および *FLO1* 発現が濃度依存的に誘導されることが明らかとなった。本効果は、ヒト *DNMT* 酵母のみならずコントロール株においても観察された (図 1)。HDAC だけでなくヒストンメチル化酵素など各種ヒストン修飾酵素は、ヒトおよび酵母においてホモログが存在する。したがって、ヒストン修飾酵素阻害剤が両株で同様の作用を示すことは妥当と考えられる。また、酵母におけ

る HDAC である 2 遺伝子の破壊株 (*hda1, rpd3* 二重遺伝子破壊株) が強い凝集性を示すことが知られており (BBA. Gene. Regul. Mech., 1839 (2014), pp. 1242-1255) この既知報告とも矛盾しない。以上の結果は、ヒト *DNMT* 酵母とコントロール株の凝集性を指標にヒストン修飾酵素阻害剤の検出が可能であることを示唆している。

アリザリンは、元既存添加物アカネ色素に含まれる成分の一つであり、発がんプロモーション作用が指摘されている (Cancer Sci., 100 (2009), pp. 2261-2267)。発がんプロモーション作用は DNA の一次構造変化を伴わないとされており、エピ変異原のカテゴリーに含まれる可能性がある。本研究で得られた結果は、この可能性を支持するものである。すなわち、アリザリンが示すヒト *DNMT* 酵母とコントロール株を用いた凝集試験および *FLO1* 発現レベルへの影響は、TSA と類似しており、ヒストンへの影響が推測された (図 2,3)。さらに、アリザリン処理によりコアヒストンの H3 がバルクレベルで減少し、DNA の DAPI 染色像異常 (拡散した核) が確認された事実は、アリザリンがヒストンを作用点にもつエピ変異原である可能性を強く示すものである (図 4,5)。なお、凝集およびヒストン H3 に対するアリザリンの作用はアントラセンでは認められないことから、アリザリン分子が持つ官能基が凝集性に重要であることが予想される。

本研究から、アリザリンの凝集誘発性は TSA と異なりコントロール株においてより好感度に検出される可能性が認められた (図 1,2)。この違いはエピ変異原としての作用メカニズムの違いを反映している可能性がある。この違いは、酵母凝集性を指標としてエピ変異原検出した際、その作用機序を推測する上で貴重な知見となる可能性がある。

E. 結論

今年度は、*DNMT* 阻害剤抑制性ヒト *DNMT* 酵母の凝集性に及ぼす同阻害剤以外のエピ変異原の影響を検討した。その結果、HDAC 阻害剤の TSA については、濃度依存的に凝集反応が促進されることが明らかとなった。また、げっ歯類発がん試験陽性結果を示す元既存添加物アカネ色素に含まれる成分アリザリンによっても、濃度依存的な凝集促進作用が検出された。以上の結果は、育種した酵母の凝集性を指標に、ユニバーサルなエピ変異原検出系が構築できる可能性と、食品添加物を含む環境化学物質からエピ変異原活性を検知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., Furusawa, H., Shimizu, M., Grúz, P. and Honma, M.: Epigenetic mutagen as histone modulator can be detected by yeast flocculation, *Mutagenesis* **31**, 687-693 (2016).

学会発表

1. 杉山圭一、古沢博子、清水雅富、グローズ ピーター、本間正充: エピ変異原検出系としてのヒト *DNMT* 酵母の有用性の検討、日本環境変異原学会第 45 回大会プログラム・要旨集 pp. 127 (2016・つくば) (2016, 11)。
2. グローズ ピーター、清水雅富、山田雅巳、杉山圭一、本間正充: Ames テスター改変株を用いた過酸化脂質誘発性 GC 塩基置換に対する Y ファミリー DNA ポリメラーゼの役割、日本環境変異原学会第 45 回大会プログラム・要旨集 pp. 121 (2016・つくば) (2016, 11)。

3. 杉山圭一、古沢博子、清水雅富、グルーズ ピーター、本間正充 : DNA メチル化酵素阻害剤応答性凝集酵母に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の影響、第 89 回日本生化学会大会プログラム集 pp. 171(2016・仙台) (2016, 9) .
4. Sugiyama, K., Furusawa, H., Shimizu, M., Grúz, P. and Honma, M: Establishment of a universal

detection system for epimutagen using yeast carrying human DNA methyltransferase genes, European Environmental Mutagenesis and Genomics Society Annual Meeting 2016 (2016, 8 コペンハーゲン・デンマーク).

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]

表 2 使用したプライマー

ターゲット遺伝子	Primer名	DNA配列
<i>FLO1</i>	RT1A (Forward)	5' - CTCATCGCTATATGTTTTTGG - 3'
	RT1B (Reverse)	5' - CGAGTAAACAACCTTCATTGG - 3'
<i>ACT1</i>	RTactA (Forward)	5' - ATTCTGAGGTTGCTGCTTTTGG - 3'
	RTactB (Reverse)	5' - GAAGATTGAGCAGCGGTTTGC - 3'

Trichostatin A (TSA)

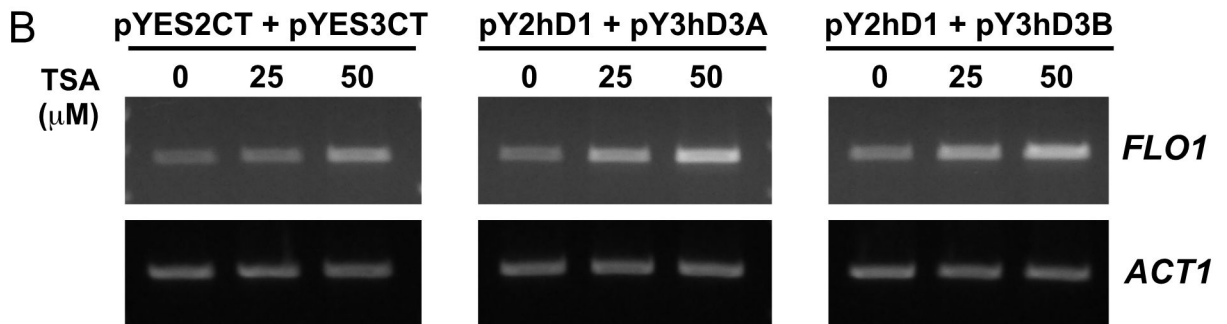
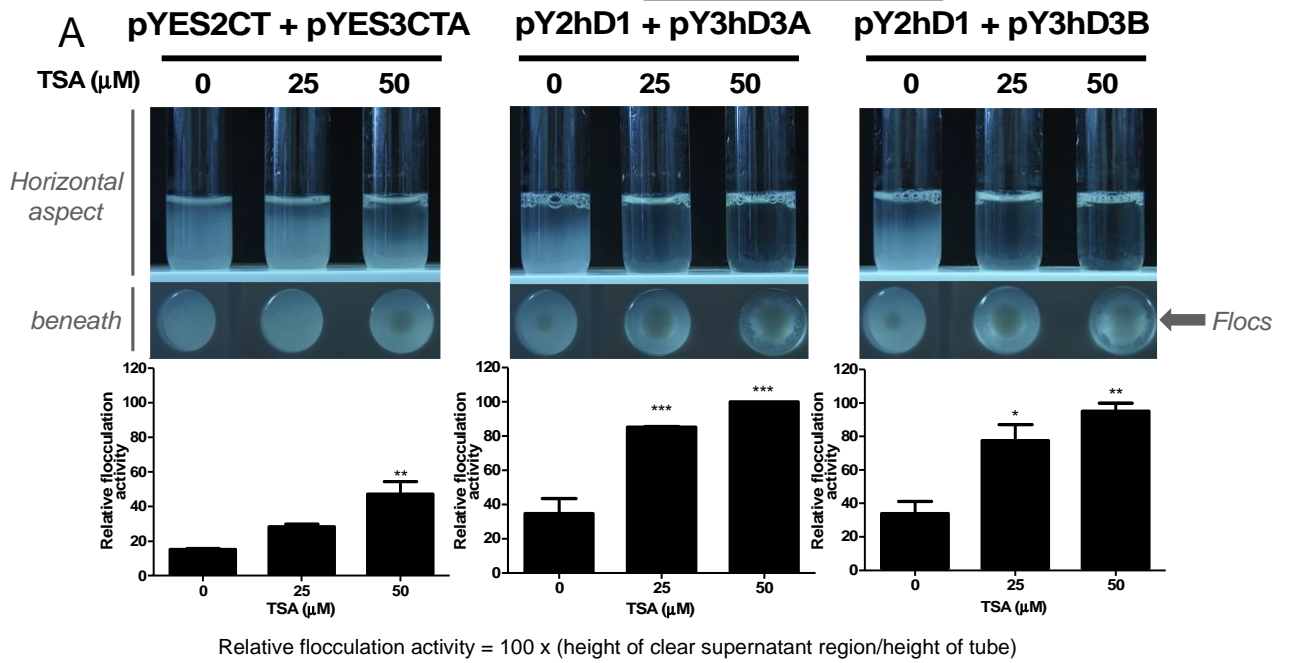
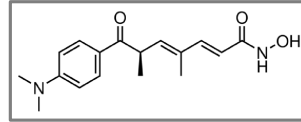


図1 TSAが凝集反応に及ぼす影響

A: 凝集試験, B: RT-PCR

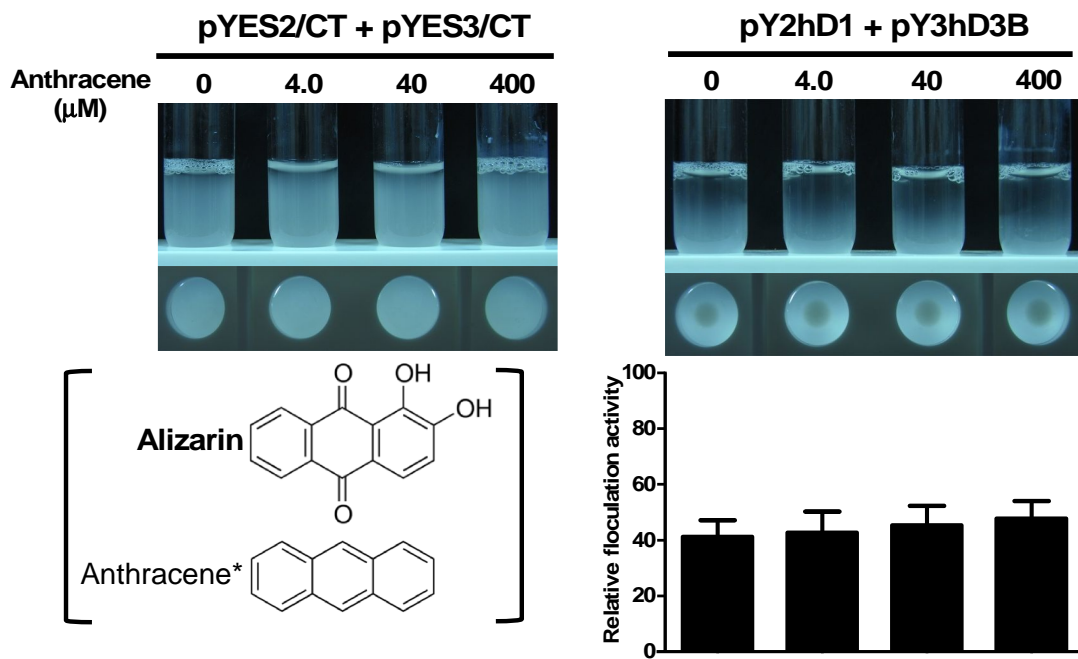
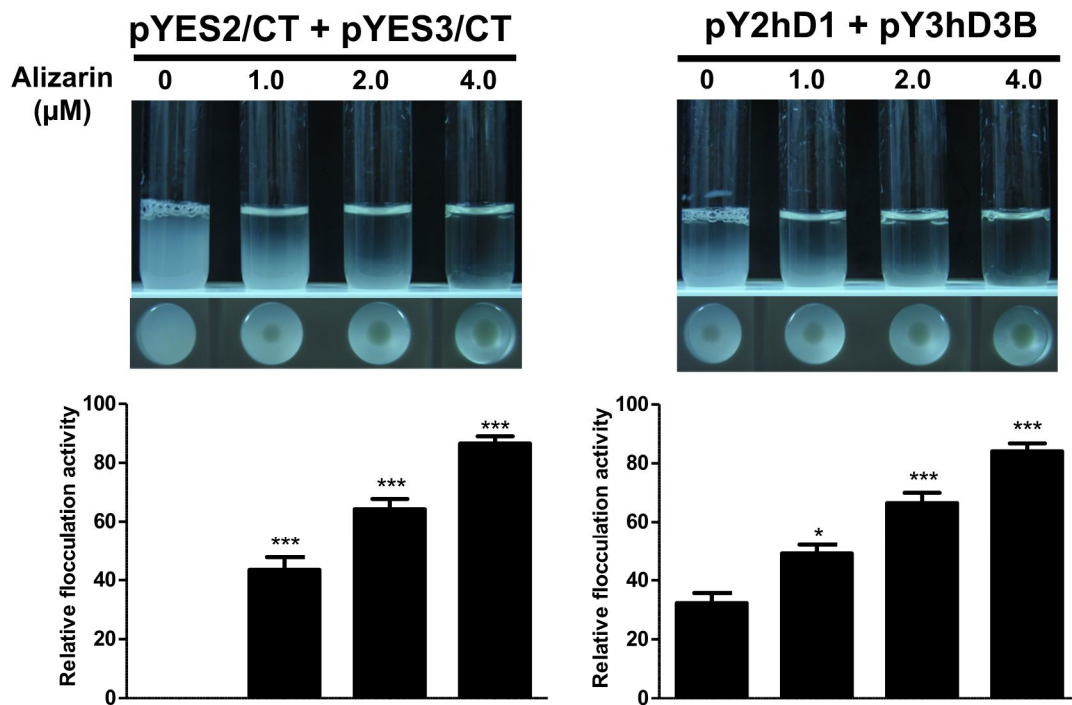


図2 アリザリンとアントラセンの化学構造式および同剤処理時の凝集試験結果

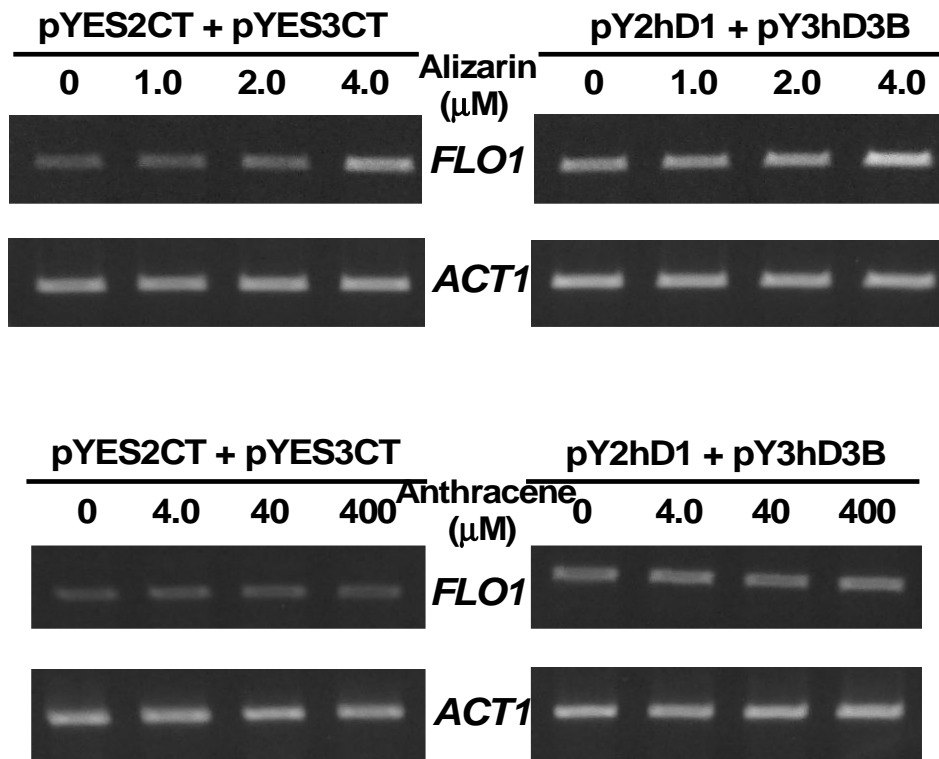


図3 アリザリンとアントラセンが *FLO1* 遺伝子の発現レベルに及ぼす影響

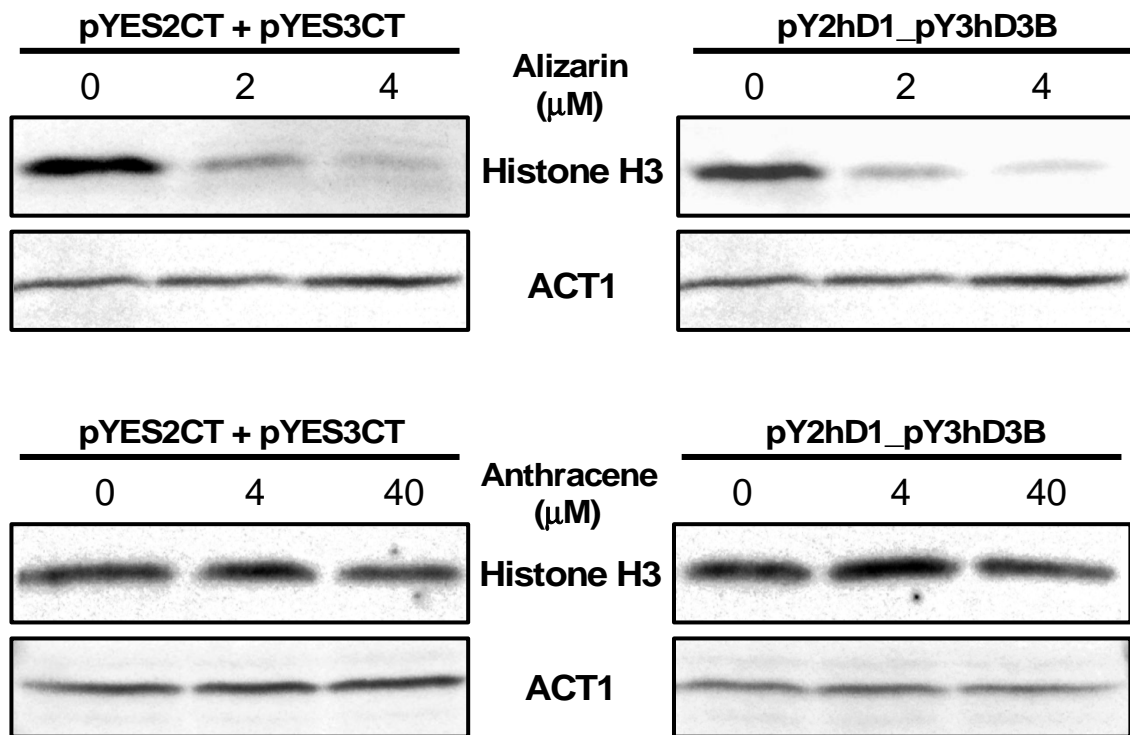


図4 アリザリンとアントラセンが細胞内ヒストン H3 量に及ぼす影響

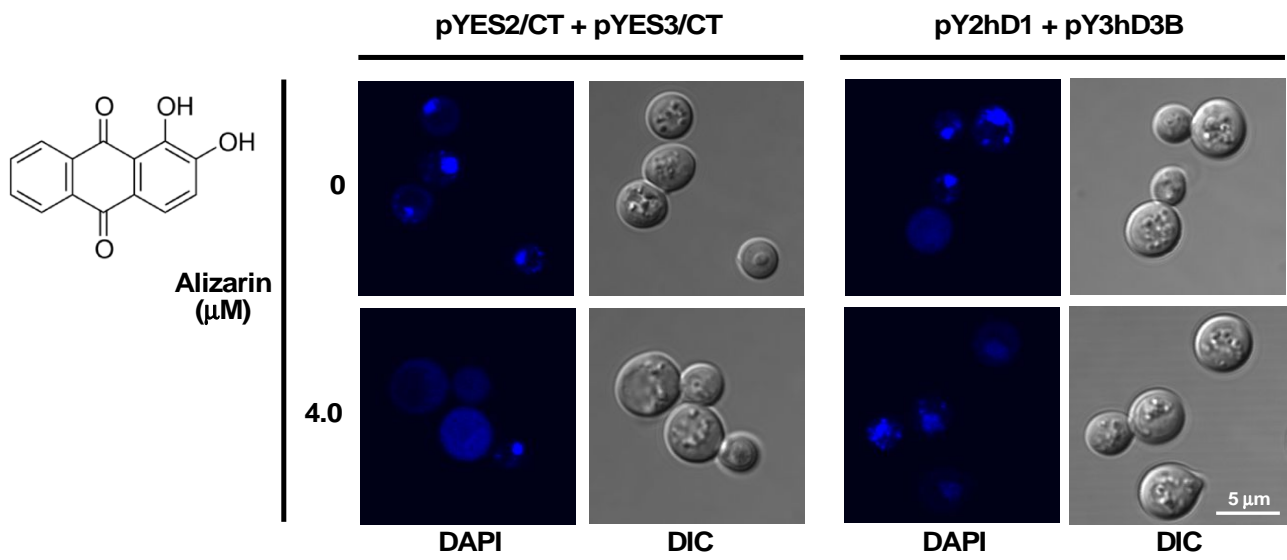


図5 アリザリンが核染色像に及ぼす影響

