

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

これまでの一連の研究から、ヒト *DNA methyltransferase (DNMT)* 遺伝子形質転換酵母（ヒト *DNMT* 酵母）で顕在化した凝集性を指標にエピジェネティック変異原（エピ変異原）の可視化検出が可能であること明らかにしているが、今年度の本分担研究では、凝集遺伝子 *FL01* プロモーター活性を指標としたエピ変異原検出系の構築を目指した。*FL01* プロモーターを用いたレポーターアッセイ系は精度、客観性、定量性さらには簡便さ等、目視観察による凝集性を指標としたエピ変異原評価系よりも優れておりその有用性は高い。レポーター遺伝子には非破壊で測定可能な Green fluorescent protein（GFP）遺伝子を用い、被検物質には昨年度の研究でエピ変異原であることを明らかにしたアリザリンの類縁体となるプルプリンを使用した。酵母凝集性に対するプルプリンの作用を検討した結果、凝集促進作用と *FL01* 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、プルプ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、プルプリン処理時における核染色像の異常も観察された。*FL01* レポーター活性に及ぼすプルプリンの効果については、凝集性に対する効果と矛盾ない濃度依存的な GFP 蛍光強度の上昇が確認された。プルプリンが *FL01* レポーター活性に示した本効果はアリザリン処理においても認められた。

以上の結果は、凝集試験より簡便でかつ定量性が担保されたエピ変異原検出系の代替法として *FL01* レポーターアッセイ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、*FL01* レポーターアッセイ

A. 研究目的

発がんに関与するエピジェネティックな変異（エピ変異）は、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、その解析にはハイスループット化が容易ではない生化学的手法を用いざるを得ない現状がある。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ものと定義でき、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、エピ変異原の検出系には少なくとも主要なエピジェネティック制御と考えられている DNA メチル化およびヒストン修飾、またそれを介したヌクレオソーム構造の変化を誘発する化学物質（エピ変異原）を検出できることが求められる。昨年度では、DNA methyltransferase（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 遺伝子形質転換酵母 (ヒト *DNMT* 酵母) の凝集性を指標に検出できる可能性を示した。すなわち、この結果はヒト *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を示していると換言できる。

本年度では、昨年度までの結果を踏まえ、凝集性と比較してより定量的でかつ頑健性が期待できる凝集遺伝子 (*FL01* 遺伝子) のプロモーターを用いたレポーターアッセイによるエピ変異原検出システムの構築を試みた。

B. 研究方法

1. 酵母株

出芽酵母 *S. cerevisiae* YPH250 株 (*MATa trp1- 1 his3- 200 leu2- 1 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- 200 leu2- 1 lys2-801 trp1- 1 ura3-52* pYES2CT pYES3CT) を、YPH250/pY2hD1_ pY3hD3B (*MATa ade2-101 his3- 200 leu2- 1 lys2-801 trp1- 1 ura3-52* pY2hD1 pY3hD3B) 株をヒト *DNMT* 酵母として使用しているが、本年度はコントロール株のみを使用した。

2. 使用した化学物質

ブルプリンはシグマ-アルドリッチから、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. *FL01* レポータープラスミドの構築

Green fluorescent protein (GFP) 変異体 (*eGFP*) をレポーター遺伝子 (Appl Microbiol Biotechnol. 2010 Sep;88(1):277-82.) として

FL01 レポータープラスミドを構築した。酵母シヤトルベクター-pRS313 ベクターのマルチクローニングサイトの *SmaI* および *SacI* 部位に *eGFP* 遺伝子を挿入後、その上流 (*SaII*-*EcoRV* サイト) に PCR にて増幅した *FL01* プロモーター領域のフラグメント (-1,000 - -1) を導入し、p313F1GYeGFP プラスミドを構築した。なお、使用したプライマーは表 1 の通りである。

4. 培地

Synthetic Dextrose (SD) -Trp/-Ura もしくは -Trp/-Ura/-His 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%、もしくは -Trp/-Ura/-His DO Supplement (Clontech, USA) 0.07%、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) を終濃度が 2.0% になるよう加えて 4 で保存した。

5. 凝集試験

SD -Trp/-Ura 液体培地において、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。

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

6. Reverse-Transcription (RT)-PCR 解析

SD -Trp/-Ura 液体培地において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。

7. Western blot

SD -Trp/-Ura 液体培地において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。

8. 核の蛍光染色

SD -Trp/-Ura 液体培地において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。

9. *FL01* レポーターアッセイ

レポータープラスミド p313F1GYeGFP を形質転換したコントロール株を用いてアッセイを行なった。SD -Trp/-Ura/-His 液体培地において対数増殖期後期まで培養(24-26 時間培養)した酵母細胞を回収後洗浄し蛍光(Excitation, 485 nm; Emission, 535 nm)を測定した。測定には TriStar² LB 942 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany)を使用

した。なお、蛍光強度は濁度(OD600)で補正した。

10. 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. プルプリンが酵母凝集性と *FL01* 発現に及ぼす影響

アリザリンの類縁体であるプルプリンが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、プルプリン濃度(0 - 500 nM)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 *FL01* の発現量についてもプルプリン濃度(0 - 1,000 nM)依存的に誘導されることが確認された(図 1B)。

2. プルプリンがヒストンに及ぼす影響

凝集促進作用を有することをすでに報告しているアリザリンは、コアヒストン構成成分の 1 つヒストン H3 を減少させる(Mutagenesis. 2016 Nov;31(6):687-693.)。今回プルプリンによるヒストンへの影響を Western blot 法により解析した結果、プルプリン(0 - 1,000 nM)処理によってもヒストン H3 量が減少することが明らかとなった(図 2)。

3. プルプ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様状態となることが推測される。そこで、プルプリン(500 nM)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、プルプ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3)。

4. アントラセン類縁体が *FL01* レポーター活性に及ぼす影響

プルプリンが *FL01* mRNA の転写を誘導し凝集性促進作用も示したことから、*FL01* プロモーター誘導性レポーター活性に及ぼすプルプリンの影響を検討した。その結果、プルプリン(0 - 250 nM) の濃度依存的な GFP 蛍光強度の上昇が認められた。同様の活性上昇はアリザリン(0 - 2.0 μM) においても確認された。一方、凝集促進作用がないアントラセン(0 - 400 μM) 処理時では、同様の活性上昇作用は認められなかった(図4)。

D. 考 察

エピ変異原検出系を構築することを目的に、本年度は酵母のエピ変異原応答性凝集反応に関与する凝集遺伝子 *FL01* のプロモーターを用いたエピ変異原応答性レポーターアッセイの構築を行った。検討の結果、凝集反応促進作用を有するアリザリンの類縁体プルプリンが、濃度依存的に凝集性と同レポーター活性を誘導することを明らかにした。アリザリンについても同様のレポーター活性の誘導能が確認された。一方、基本骨格のみを有し凝集性に影響を及ぼさないアントラセンは *FL01* レポーター活性に影響を及ぼさない結果が得られたことから、本レポーターアッセイはエピ変異原に特異的に応答することが推測された。

工業用染料として使用されているプルプリンについては、エイムス試験陰性との報告もあるが、凝集性及び *FL01* レポーター活性ともに促進作用を示す。さらに、アリザリンと同様に

コアヒストンの H3 をバルクレベルでの減少と、DNA の DAPI 染色像異常(拡散した核)が確認された事実から、プルプリンもアリザリンと同様にヒストンを作用点にもつエピ変異原である可能性が強く示唆される。したがって、プルプリンによるエピジェネティクス制御の攪乱による発がん促進作用については留意する必要があると考える。

本研究において開発された *FL01* レポーターアッセイのレポーター遺伝子には GFP を使用している。本蛍光タンパク質由来の蛍光強度の測定には、基質(補因子)を必要としない特徴がある。また、凝集試験と比較して数値化が容易でアッセイに要する時間も大幅に短縮(約 50% 減)している。加えて培養スケールの縮小によりアッセイに必要な剤の必要量も節約できる可能性も有する。最終年度にエピ変異原の短期スクリーニング系としての凝集試験以上にハイスループット性並びに精度の向上が期待できる *FL01* レポーターアッセイ系のプロトタイプが構築できたことは、今後必要になると予想される本エピ変異原試験系の妥当性評価を効率的に進める上で大きな成果と考える。

E. 結 論

今年度は、アリザリンの類縁体であるプルプリンを被検物質として、エピ変異原応答性凝集反応に関与する酵母凝集遺伝子(*FL01* 遺伝子)のプロモーターを用いたレポーターアッセイ系の構築を試みた。その結果、アリザリンと同様に凝集反応促進性を示すプルプリンの濃度依存的な *FL01* レポーター活性の上昇が確認された。以上の結果は、構築した *FL01* レポーター活性を指標に、簡便にエピ変異原活性を検知できることを示唆している。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

1. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M.: Detection of epigenetic mutagens including anthracene-derived compounds using yeast *FLO1* promoter GFP reporter gene assay, *Mutagenesis* **32**, 429-435 (2017).
2. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M: Functional role of DNA methylation at the *FLO1* promoter in budding yeast, *FEMS Microbiol. Lett.* **364**, doi: 10.1093/femsle/fnx221 (2017).

学会発表

1. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M.: Detection of epigenetic mutagens by GFP reporter activity driven by yeast *FLO1* promoter, Environmental Mutagenesis & Genomics Society 48th Annual Meeting (2017, 9 口ーリー・米国).
2. 杉山圭一: エピジェネティック変異原試験系の開発、日本環境変異原学会第 46 回大会 (2017・東京) (2017, 11) .

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

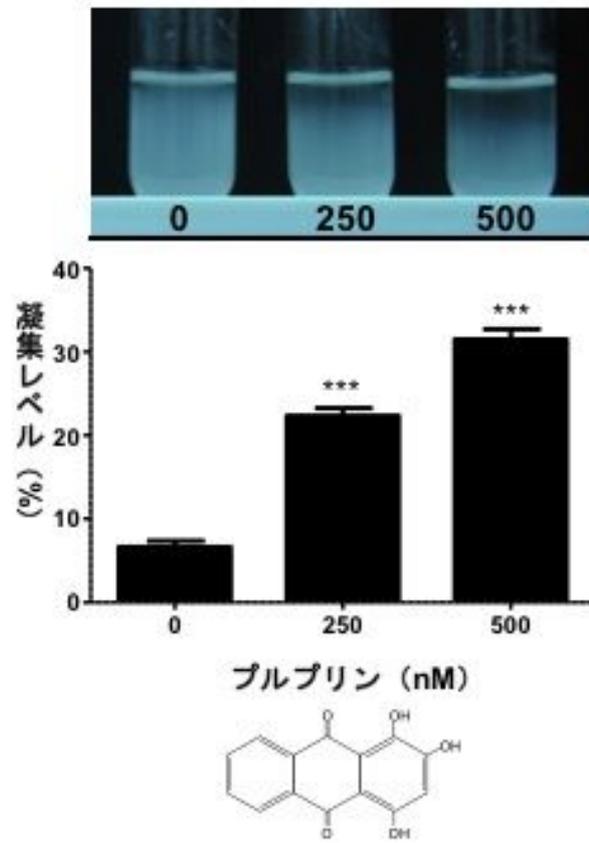
表1 *FL01* プロモーター増幅に使用したプライマー

	DNA 配列
Forward	5' - CCCGTCGACAAAAAGTGCATTTATTTAG -3'
Reverse	5' - GGGAAGCTTTTTGGATGTTCTGTTTACTGGTGACAAGA -3'

表2 RT-PCR に使用したプライマー

ターゲット遺伝子	Primer名	DNA配列
<i>FL01</i>	RT1A (Forward)	5' - CTCATCGCTATATGTTTTTTGG -3'
	RT1B (Reverse)	5' - CGAGTAAACAACCTTCATTGG -3'
<i>ACT1</i>	RTactA (Forward)	5' - ATTCTGAGGTTGCTGCTTTGG -3'
	RTactB (Reverse)	5' - GAAGATTGAGCAGCGGTTTGC -3'

A



B

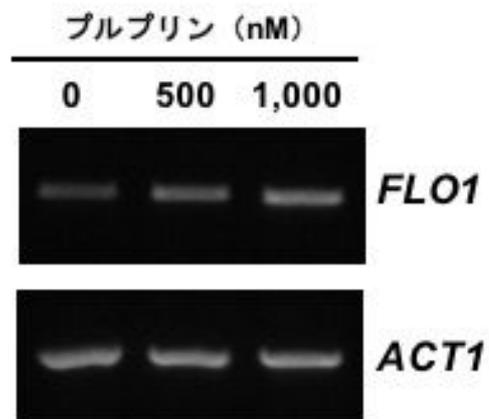


図1 プルプリンが凝集反応に及ぼす影響
A: 凝集試験, B: RT-PCR

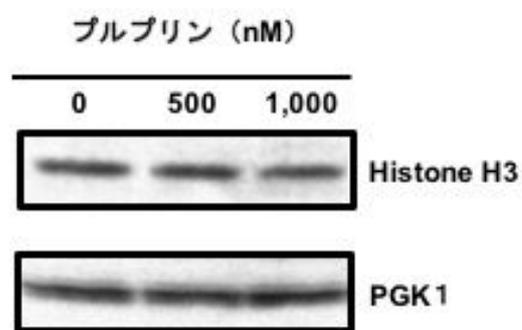


図2 プルプリンが細胞内ヒストン H3 量に及ぼす影響

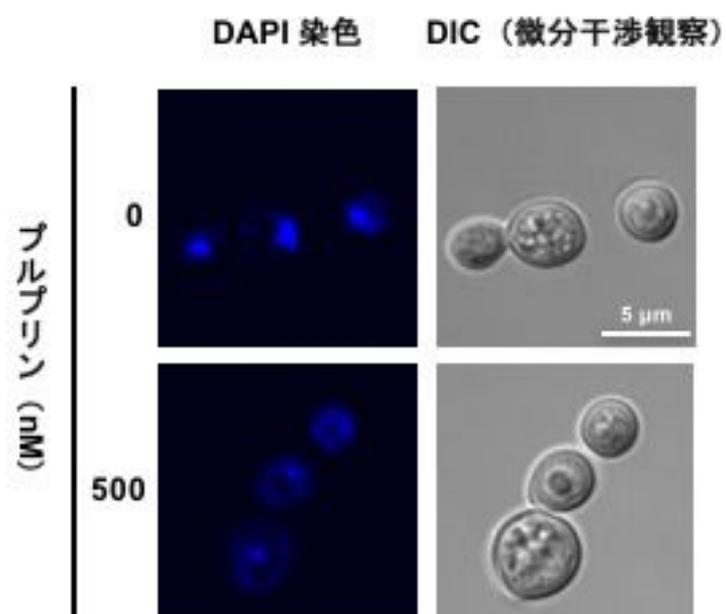
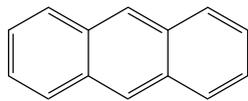
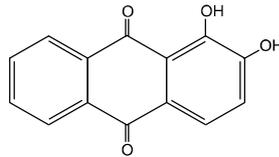


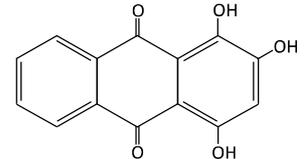
図3 アリザリンが核染色像に及ぼす影響



Anthracene



Alizarin



Purpurin

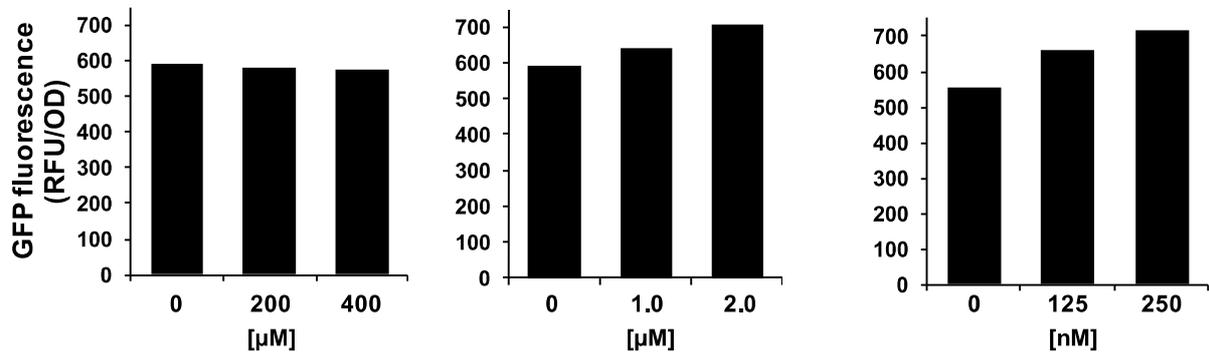


図4 アントラセン類縁化合物が *FL01* レポーター活性に及ぼす影響