

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECD プログラムにおいて TG と DA を開発するための AOP に関する研究

平成30年度 分担研究報告書

遺伝毒性の AOP 開発

研究分担者 杉山 圭一

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部 室長

研究要旨

遺伝毒性の有害性発現経路（AOP: Adverse Outcome Pathway）開発にあたり、同 AOP への組み込みを想定した新規エピジェネティック毒性試験法「FLO assay」に関する研究を実施した。本年度は被検物質として国際がん研究機関でグループ 2B（Possibly carcinogenic to humans）と分類されるかび毒オクラトキシン A を用いて、「FLO assay」の有用性を評価した。その結果、FLO assay は発がん性予測の精緻化に有効である可能性が示された。

A. 研究目的

現在、経済協力開発機構（OECD）において、毒性評価に有害性発現経路（AOP）の活用の検討が進められている。発がんに係わるエピジェネティック制御の攪乱を同AOPに組み込む有用性は高いと考えられる。

本研究では、研究分担者が独自開発に成功したエピジェネティック変異原検出系のプロトタイプ「FLO assay」を用いて、国際がん研究機関（IARC）でグループ 2B（Possibly carcinogenic to humans）と分類されるかび毒オクラトキシンAのエピジェネティック毒性評価を行い、発がん性AOPへのFLO assay活用の可能性を検証した。

B. 研究方法

B.1. 酵母株

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YPH250株は、University of California at Berkeley, CA, USAより入手した。使用した株の詳細はTable 1および2に示す。

B.2. 使用した化学物質

カビ毒オクラトキシンAとデオキシニバレノールは和光純薬工業（株）より購入した。デオキシニバレノールはIARCでグループ3（Not classifiable as to its carcinogenicity to humans）と分類される。

B.3. 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。

B4. 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。

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

B.5. 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以下の通りである。*FLO1*, 5' -CTCATCGCTATATGTTT TTGG-3' (forward) および 5' -CGAGT AAACAACCTTCATTGG-3' (reverse); *ACT1*, 5' -ATTCTGAGGTTGCTGCTTTG G-3' (forward) および 5' -GAAGATTG AGCAGCGGTTTGC-3' (reverse)。

B.6. *FLO1*レポーターアッセイ

使用した株およびレポータープラスミドはTable 1および2のとおりである。SD -Trp/-Ura/-His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。

B.7. *In vitro*メチレーションアッセイ

基質にプラスミドpUC19を用いて*M.SssI*メチラーゼ (New England Biolabs、

Ipswich, MA) に対するオクラトキシンAの作用を検討した。メチル化反応は37°Cで2時間行い、その後メチル化感受性制限酵素HpaII (New England Biolabs) で反応物を消化し、2%Tris-borate EDTAアガロースゲルで分析した。

B.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。

B.9. 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行った。測定値は標準誤差で表示した。

(倫理面への配慮)

本研究は微生物を用いた研究であり、当該項目は非該当に相当する。

C. 研究結果

C.1. オクラトキシン A が *FLO1* レポーター活性に及ぼす影響

酵母の凝集遺伝子 *FLO1* の発現はエピジェネティック制御に可逆的に応答する。そこでFLO assayとしてまずオクラトキシン A (12.5-50 μM) とデオキシニバレノール (50-200 μM) が *FLO1* 発現におよぼす影響を、*FLO1* プロモーター誘導性レポーター活性を指標に検討した。その結果、オクラトキシン A は Empty-vector control strain (コントロール株) と *DNMT* yeast (DNAメチル化酵素 (*DNMT*) 遺伝子形質転換酵

母)の両株共に *FLO1* レポーター活性を濃度依存的に抑制した。この抑制効果は、pFIGSTpA (プロモーターとして DNA メチル化低感受性 *FLO1* プロモーターを有する) では認められなかった。一方、デオキシニバレノール処理では *FLO1* レポーター活性への影響は確認されなかった (Fig. 1)。

C.2. オクラトキシン A が凝集に及ぼす影響

DNMT yeast は *FLO1* 発現が亢進し誘導型凝集性を示す。FLO assay として次にオクラトキシン A が凝集性に及ぼす影響を Empty-vector control strain と *DNMT* yeast の両株で検討した。その結果、凝集性を示す *DNMT* yeast においては、オクラトキシン A (12.5-50 μ M) の濃度依存的に凝集性が抑制されることが明らかとなった (Fig. 2)。

C.3. オクラトキシン A が *FLO1* mRNA レベルに及ぼす影響

Empty-vector control strain と *DNMT* yeast の両株を用いて、*FLO1* mRNA 転写レベルに対する OTA の作用を RT-PCR により確認した。その結果、オクラトキシン A (25-50 μ M) の濃度依存的に *FLO1* mRNA レベルが減少することが明らかとなった (Fig. 3)。

C.4. DNA メチル化酵素に及ぼすオクラトキシン A の影響

微生物由来の DNA メチル化酵素 *M.SssI* は、ヒト *DNMT* のアナログである。オクラトキシン A (50-200 μ M) 存在下における *M.SssI* の酵素活性を *in vitro* で検討した結果、オクラトキシン A の濃度上昇に伴い DNA メチル化活性の低下が認められるこ

とが確認された (Fig. 4)。

C.5. 酵母染色体構造に及ぼすオクラトキシン A の作用

オクラトキシン A が酵母核 DAPI 染色像に及ぼす影響を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、*DNMT* yeast において特徴的な拡散した核の DAPI 染色像が、40 μ M オクラトキシン A 処理により Empty-vector control strain の染色像に類似した状態に変化することが明らかとなった (Fig. 5)。

D. 考察

本研究では、IARC でグループ 2B (Possibly carcinogenic to humans) と分類されるオクラトキシン A とグループ 3 (Not classifiable as to its carcinogenicity to humans) のデオキシニバレノールの 2 種類のかび毒を被検物質として、それぞれのエピジェネティック変異原性を FLO assay (*FLO1* レポーターアッセイと凝集試験) を主要な指標として評価した。*FLO1* プロモーター誘導性レポーター活性に対してオクラトキシン A は濃度依存的に抑制したが、同効果はデオキシニバレノールでは認められなかった。また、オクラトキシン A による本抑制作用は DNA メチル化低感受性 *FLO1* プロモーター活性に対しては確認できなかった。*DNMT* yeast で顕在化する凝集性および *FLO1* mRNA レベルの上昇は共にオクラトキシン A により抑制され、*in vitro* のアッセイではオクラトキシン A により DNA メチル化酵素活性が阻害されることも明らかとなった。*DNMT* yeast で観察される異常な核染色像も、オクラトキシン A 処理によりコントロール株に類似した核染色像に変化することが確認された。以上の結果は、オクラトキシン A が DNA メチル化阻害を毒性機序と

するエピジェネティック変異原であることを示唆している。

E. 結論

オクラトキシンAはIARCでグループ2B (Possibly carcinogenic to humans) と分類される。本研究において、オクラトキシンAは可塑的にエピジェネティック制御を受ける酵母凝集遺伝子 *FLO1* の転写レベルを抑制することが明らかとなった。また、同抑制メカニズムがDNAメチル化阻害に起因する可能性も見出した。これら一連の結果はヒトへの発がん性が危惧されるオクラトキシンAが、DNAメチル化阻害を機序とするエピジェネティック変異原である可能性を示唆するものであり、今回エピジェネティック変異原検出に使用したFLO assayが発がん性予測の精緻化に活用できる可能性も示している。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Sugiyama KI, Furusawa H, Grúz P, Kinoshita M, Honma M. Inhibitory effect of ochratoxin A on DNMT-mediated flocculation of yeast. *Mutagenesis*. 2019 Mar 10. pii: gez002.doi: 10.1093/mutage/gez002.

F.2. 学会発表

1. 杉山圭一、古沢博子、木下麻緒、清水雅富、グルーズ ピーター、本間正充：迅速簡便かつ効率的なエピジェネティック変異原検出技術、第91回日本生化学会大会、2018/9/24、国内。

G. 知的財産権の出願・登録状況

G.1. 特許取得

なし

G.2. 実用新案登録

なし

G.3. その他

なし

Table 1 使用したプラスミド

Plasmid	Description
pY2CThD1	pYES2/CT harboring human <i>DNMT1</i> cDNA
pY3CThD3B	pYES3/CT harboring human <i>DNMT3B</i> cDNA
pYES2/CT	<i>E.coli-Saccharomyces</i> shuttle plasmid, carrying <i>GAL1</i> promoter, 2 μ -type, <i>URA3</i> marker
pYES3/CT	<i>E.coli-Saccharomyces</i> shuttle plasmid, carrying <i>GAL1</i> promoter, 2 μ -type, <i>TRP1</i> marker
pF1GS	<i>FLO1-GFP</i> . Parent: p313eGFP
pF1GSTpA	CpG reduced <i>FLO1-GFP</i> . Parent: p313eGFP
p313eGFP	pRS313 (<i>CEN</i> -type, <i>HIS3</i> marker) harboring a GFP variant

Table 2 使用した酵母株

Strain	Genotype	Plasmid	Name
YPH250	<i>MATa trp1- A1 his3-Δ200 leu2- A1 lys2-801 ade2-101 ura3-52</i>	pYES2/CT, pYES3/CT	empty-vector control strain
YPH250	<i>MATa trp1- A1 his3-Δ200 leu2- A1 lys2-801 ade2-101 ura3-52</i>	pY2CThD1, pY3CThD3B	<i>DNMT</i> yeast
YPH250	empty-vector control strain	pF1GS	
YPH250	empty-vector control strain	pF1GSTpA	
YPH250	empty-vector control strain	p313eGFP	
YPH250	<i>DNMT</i> yeast	pF1GS	
YPH250	<i>DNMT</i> yeast	pF1GSTpA	
YPH250	<i>DNMT</i> yeast	p313eGFP	

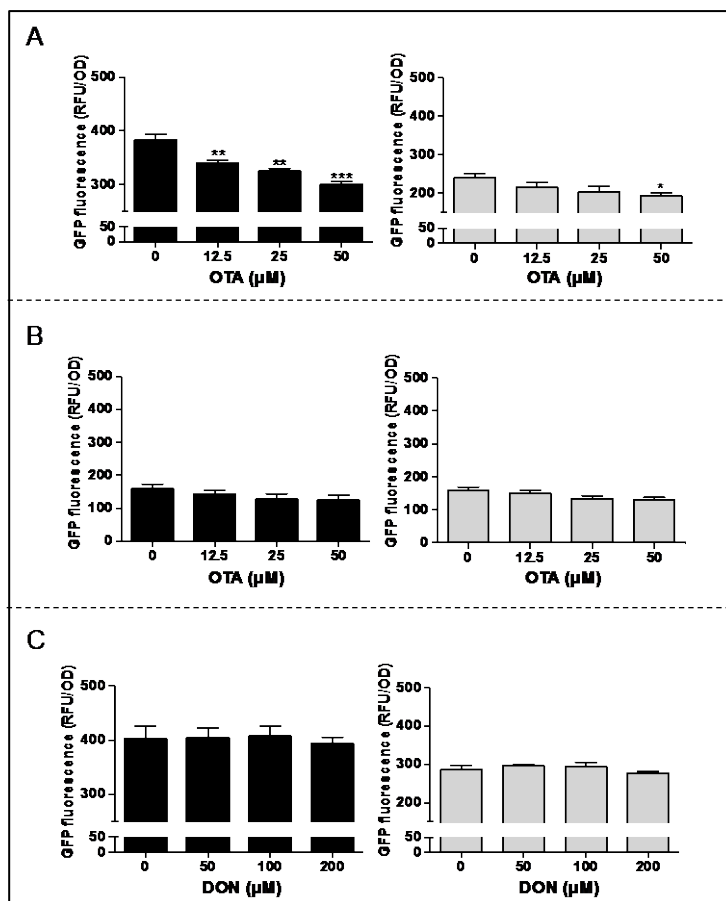


Fig. 1

FLO1 レポーター活性に対するオクラトキシン A (OTA) とデオキシニバレノール (DON) の効果 (A) pF1GS 形質転換 *DNMT* yeast (黒) または Empty-vector control strain (グ

レー) (B) pFIGSTpA 形質転換 *DNMT* yeast (黒) または Empty-vector control strain (グレー) (C) pF1GS 形質転換 *DNMT* yeast (黒) または Empty-vector control strain (グレー)

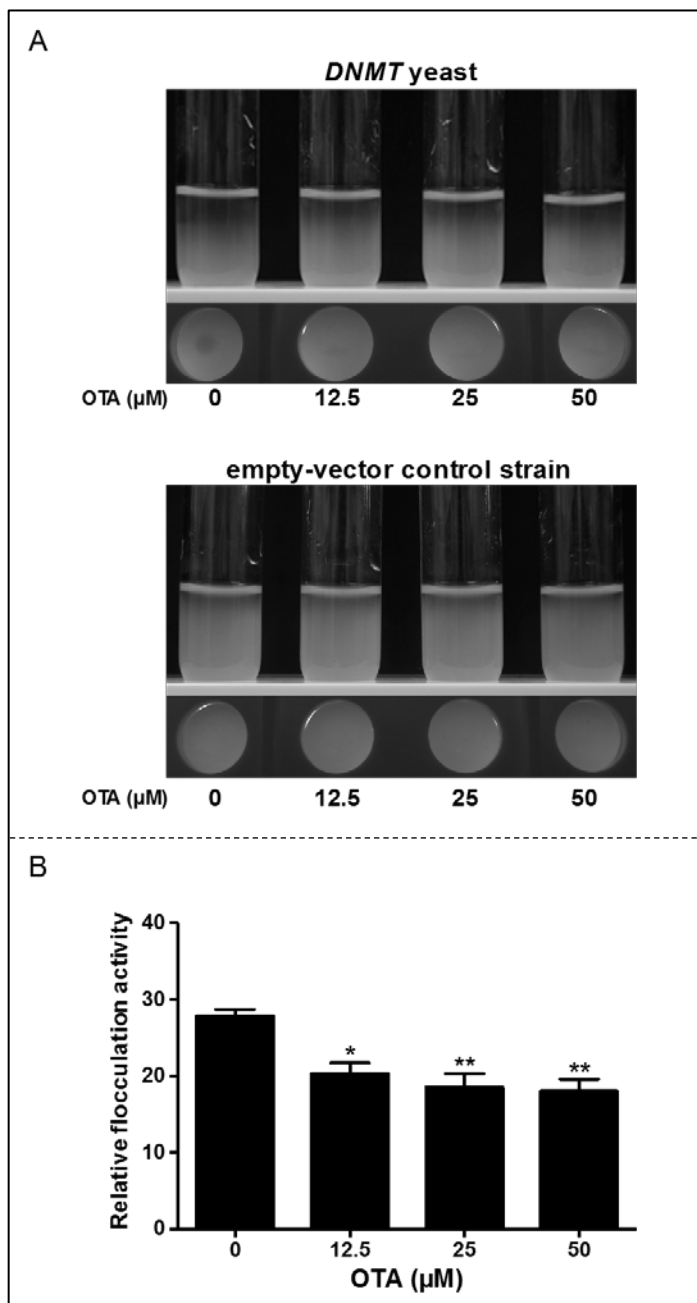


Fig. 2

凝集性に及ぼすオクラトキシン A (OTA) の作用 (A) 凝集写真 (B) *DNMT* yeast の相対的凝集活性

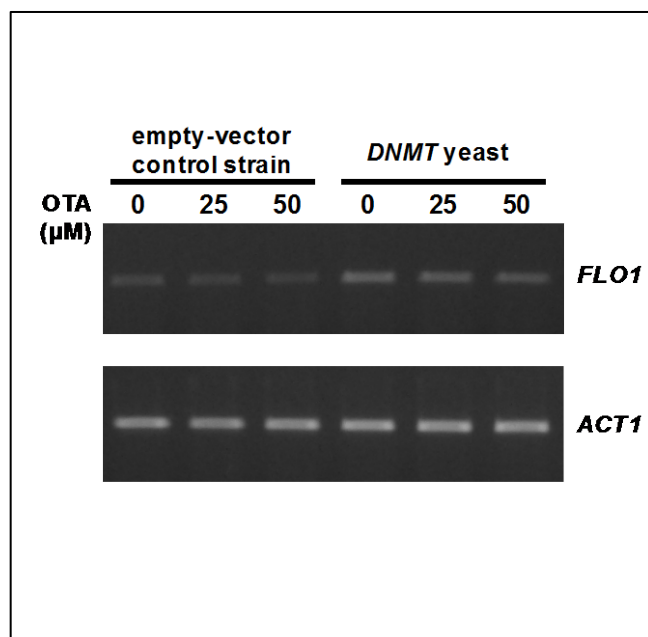


Fig. 3

FLO1 mRNA レベルに及ぼすオクラトキシシン A (OTA) の作用

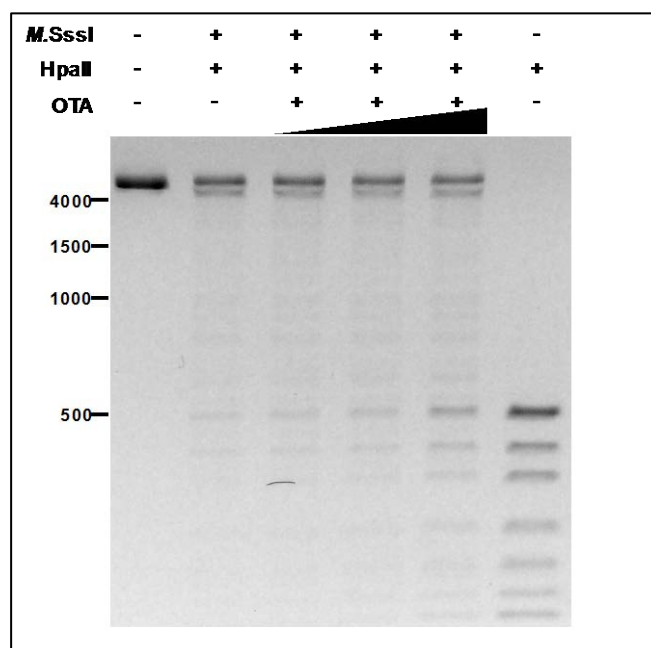


Fig. 4

オクラトキシシン A (OTA) が *M.SssI* 活性に及ぼす影響 左端の数字は DNA のサイズ (bp)

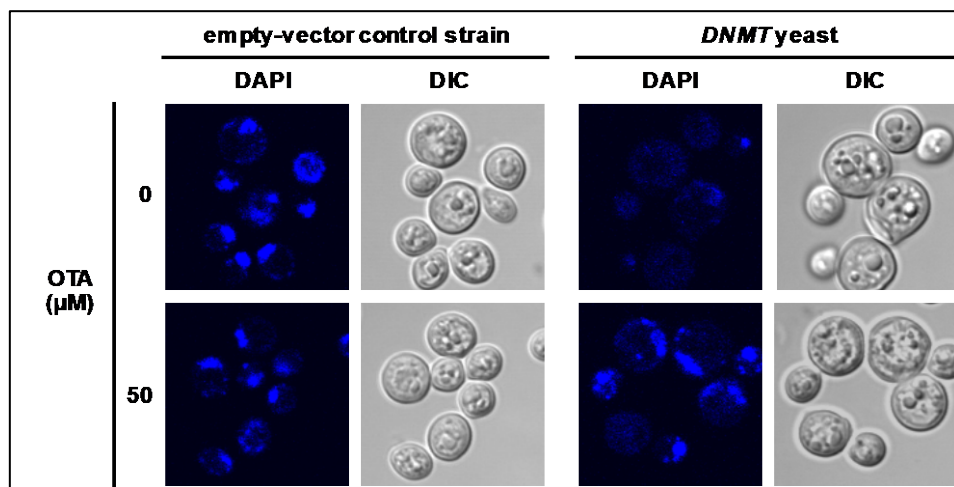


Fig. 5

オクラトキシン A (OTA) が酵母核染色像に及ぼす影響