

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

令和元年度 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 部長

研究要旨

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エピジェネティック毒性試験法「FLO assay」の妥当性を検証する研究を実施している。本年度は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 の類縁化合物であり発がん性の懸念があるシトリニンを被検物質として FLO assay を行なった。その結果、シトリニンはオクラトキシン A と同様のエピジェネティック作用を有する可能性が明らかとなった。本結果は、発がん性予測の精緻化に FLO assay が利用できる可能性を示唆している。

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、研究分担者が開発したエピジェネティック変異原検出系「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の類縁化合物と考えられ発がん性が危惧されるかび毒シトリニンのエピジェネティック作用の評価を行い、発がん性AOPへのFLO assay活用の妥当性を検証した（Fig. 1）。

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。使用した株および関連情報はTable 1および2に示す。

B.2. 使用した化学物質

シトリニンは和光純薬工業（株）より購入した。シトリニンは現在IARCでグループ3（Not classifiable as to its carcinogenicity to humans）と分類されている。

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°C 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°Cで保存した。

B.4. 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. *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.6. 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) に対するシトリニンの作用を検討した。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.7. 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. シトリニンが *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を受ける。そこで FLO assay としてまずシトリニン (0.5-4.0 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、シトリニンは 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) の両株において *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、レポータープラスミド pFIGSTpA (DNA メチル化低感受性となる CpG-reduced *FLO1* プロモーターを有する) を有する株では減弱した (Fig. 2)。

C.2. シトリニン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 として次にシトリニンが凝集性に及ぼす影響を *DNMT* yeast で検討した。その結果、シトリニン (0.5-2.0 μM) 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. 3)。

C.3. DNA メチル化酵素に及ぼすシトリニンの影響

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。シトリニン (4, 40 μM) 存在下における *M.SssI* の酵素活性を *in vitro* で検討した結果、シトリニンの濃度依存的に同 DNA メチル化活性が抑制される可能性を認めた (Fig. 4)。

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の類縁化合物かび毒シトリニンが被検物質として、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。その結果、シトリニンは*FLO1*レポーター活性と凝集性を濃度依存的に抑制した。本結果は、DNAメチル化阻害作用を有すると考えられるオクラトキシンAによる両抑制作用と同様の作用がシトリニンにも認められたことを意味する。さらに本研究から、DNAメチル化低感受性*FLO1*プロモーター活性に対してはシトリニンによる顕著な抑制作用は確認できず、*in vitro*のDNAメチルレーションにおいては同かび毒存在下においてDNAメチル化酵素活性が阻害される可能性も明らかとなった。以上の結果は、シトリニンがオクラトキシンAと同様にDNAメチル化阻害を作用機序 (Mode of Action: MoA) 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おり、げっ歯類に対する発がん作用に同作用が関与している可能性を示唆している。両かび毒がげっ歯類において共に発がん作用を有している事実とも矛盾はない。

E. 結論

本研究において、発がん性が危惧されるかび毒シトリニン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、シトリニンが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、

FLO assayが化学発がんの予測精緻化に活用できる可能性を示している。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Sugiyama, K., Furusawa, H. and Honma, M: Detection of epigenetic effects of citrinin using a yeast-based bioassay, *Mycotoxin Res.* 2019;**35**, 363-36. doi: 10.1007/s12550-019-00361-z.

F.2. 学会発表

1. Sugiyama, K., Furusawa, H., Kinoshita, M., Takino, M. and Honma, M: Detection of epigenotoxicity of mycotoxin ochratoxin A with *DNMT* yeast, 47th Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (2019). P. 76, Poster presentation, 5-21-2019, Rennes, France.

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

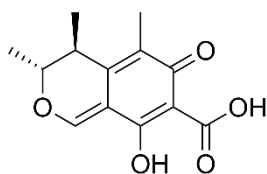
なし

Table 1 使用したプラスミド

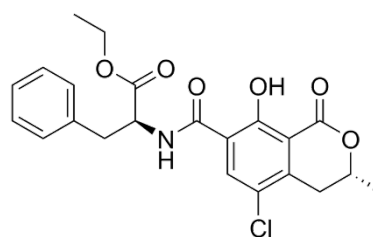
Plasmid	Description
pY2CThD1	pYES2/CT harboring human <i>DNMT1</i> cDNA
pY3CThD3B	pYES3/CT harboring human <i>DNMT3B</i> cDNA
pYES2/CT	<i>E.coli-Saccharomyces</i> shuttle plasmid, carrying <i>GAL1</i> promoter, 2 μ -type, <i>URA3</i> marker
pYES3/CT	<i>E.coli-Saccharomyces</i> shuttle plasmid, carrying <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- M his3- A200 leu2- M lys2-801 ade2-101 ura3-52</i>	pYES2/CT, pYES3/CT	empty-vector control strain
YPH250	<i>MATa trp1- M his3- A200 leu2- M 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	



シトリニン



オクラトキシン A

Fig. 1

シトリニンとオクラトキシン A の構造

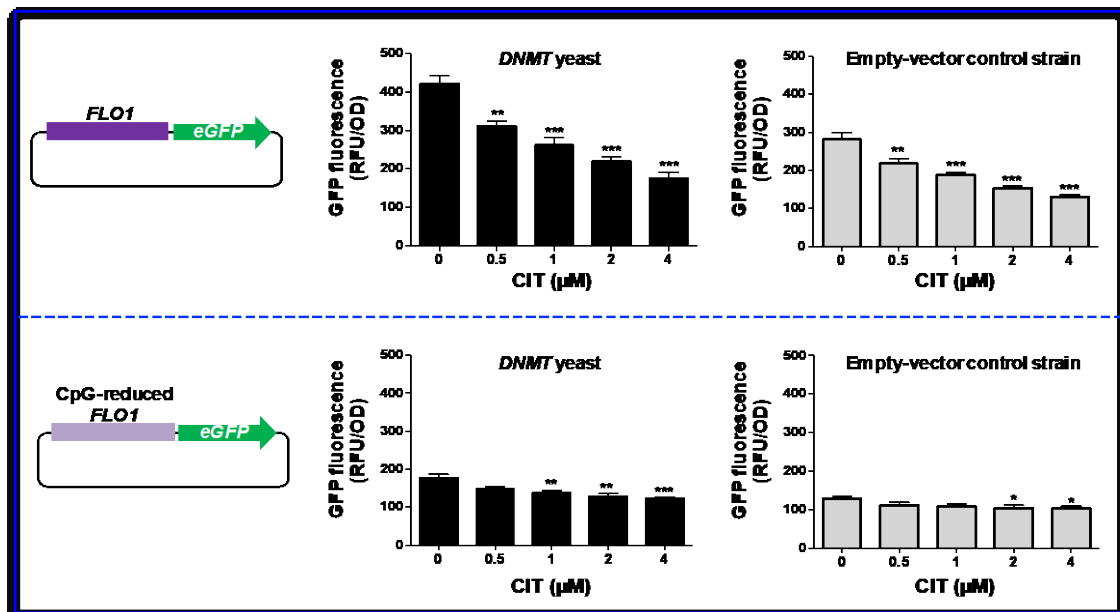


Fig. 2
FLO1 レポーター活性に対するシトリニン (CIT) の効果 左記のプラスミドマップは使用したプラスミドを示す

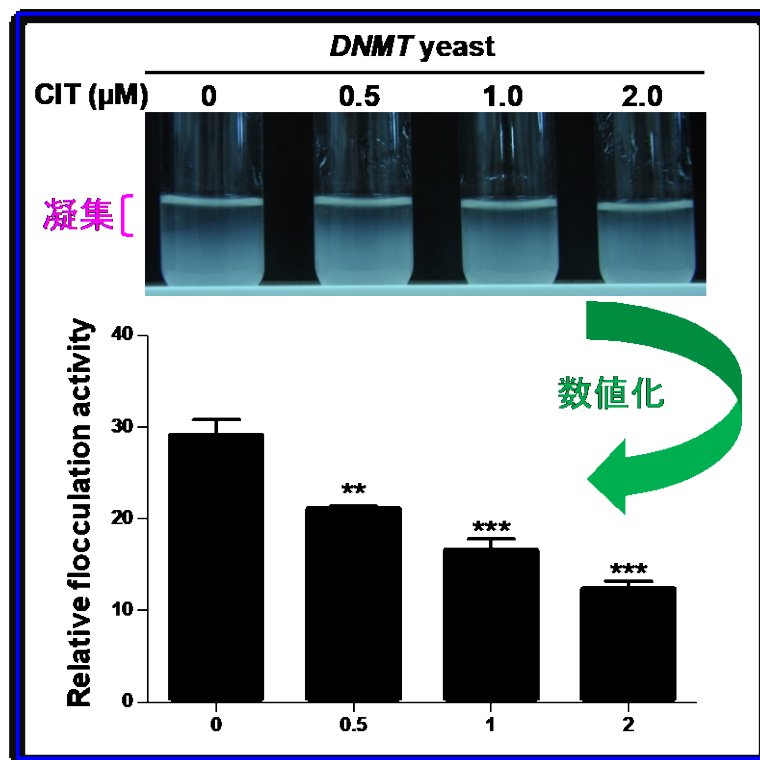


Fig. 3
 凝集性に及ぼすシトリニン (CIT) の作用

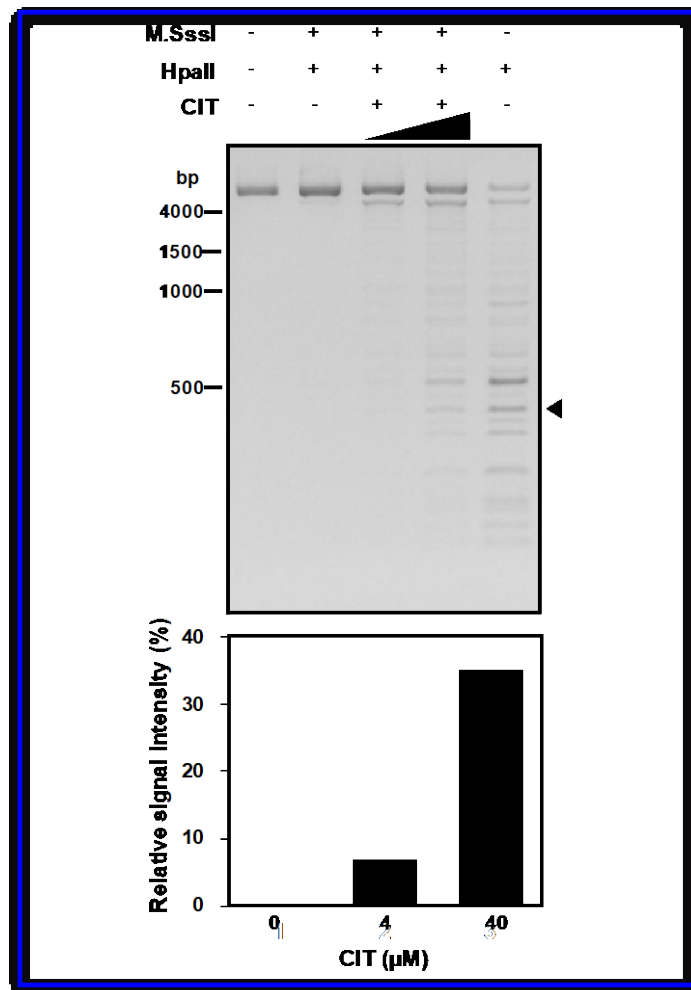


Fig. 4

シトリン (CIT) が *M.SssI* 活性に及ぼす影響 下部のグラフは、ゲル写真における黒三角の 404bp のバンド強度を数値化し CIT による *M.SssI* への影響を数値化した結果