

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 2 年度 分担研究報告書

遺伝毒性のAOP開発に関する研究

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。本年度は内分泌かく乱作用を有する BPA (Bisphenol A)を対象物質として代謝活性化条件も考慮した FLO assay を行った。その結果、BPA の代謝産物として同定されている MBP (4-methyl-2,4-bis(p-hydroxyphenyl) pent-1-ene)に DNA メチル化阻害作用が認められる可能性を見いだした。本結果は、FLO アッセイが代謝も考慮した *in vitro* 試験系として活用できることを示唆している。

A. 研究目的

現在、経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）において、毒性評価に有害性発現経路（AOP: Adverse Outcome Pathway）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、内分泌かく乱物質として知られる BPA (Bisphenol A)とその代謝物である MBP (4-methyl-2,4-bis(p-hydroxyphenyl) pent-1-ene) のエピジェネティック作用を検討し (Fig. 1)、FLO assay が代謝物も含めたエピジェネティックな作用を検出する *in vitro* 試験系として有用か検証するための基礎データの集積を図った。

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。使用した株及び関連情報は Table 1 及び 2 に示す。

B.2. 使用した化学物質

BPA は東京化成工業（株）より購入した。MBP は Organochem Research and Consulting Ltd (Budapest) より購入した。化学物質の代謝活性化に使用した S9 mix (S-9MIX エームス試験用 凍結 S-9MIX 8 x 10ML) は家田貿易（株）より購入した。

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

ネオトクレーブ (121°C 20 min) 後、20% グルコース (Wako, Osaka, Japan)を最終濃度が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、MBP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の範囲で振とう培養を行い、凝集レベルを確認した。

B.5. FLOIレポーターアッセイ

被検物質溶解液をS9 mix存在下で37°C20分間処理することで代謝活性化を行なった。非代謝活性化条件には、S9 mixの代わりに0.2 mM Nap buffer (pH7.4) を用いた。

代謝活性化処理/未処理済のBPAもしくはMBP存在下、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。蛍光強度は濁度 (OD600) で補正した。なお、S9 mixによる培養液の混濁を避けるため培養は30°Cにて全て静置で行った。

B.6. 統計処理

一元配置分散分析を行った後、Dunnnett'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)

本研究課題については *in vitro* の試験系により実施されており、国立医薬品食品衛生研究所「動物実験等の適正な実施に関する規程」に該当しない。

C. 研究結果

C.1. BPA が FLOI レポーター活性に及ぼす影響

酵母の凝集遺伝子 *FLOI* 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 S9 mix 存在下もしくは非存在下で BPA (2.5-40 μ M) が *FLOI* 発現におよぼす影響を、*FLOI* 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、*DNMT yeast* (DNA メチル化酵素 (*DNMT*) 遺伝子形質転換酵母) において BPA は S9 mix 処理時でのみ *FLOI* レポーター活性を抑制した (Fig. 2)。

C.2. MBP が凝集に及ぼす影響

DNMT yeast は *FLOI* 発現が亢進し誘導型凝集性を示す。S9 mix 存在下で BPA が *FLOI* プロモーター誘導性レポーター活性を抑制したことから、FLO assay として次に MBP が凝集性に及ぼす影響を *DNMT yeast* で検討した。その結果、MBP (10-20 μ M) の用量依存的に凝集性が抑制される傾向を確認した (Fig. 3)。

C.3. MBP が FLOI レポーター活性に及ぼす影響

DNMT yeast において MBP が *FLOI* レポーター活性に及ぼす影響を確認した。その結果、MBP は 20 もしくは 40 μ M において同活性を有意に抑制することが明らかとなった (Fig. 4)。

D. 考察

本研究は、代謝活性化を受けたBPAにより生じる代謝産物であるMBPがエピジェネティックな制御をかく乱することを示唆している。また、本結果は、生体内において代謝物が同かく乱作用を示す可能性と、FLO

assayを基盤にS9 mixを用いることで代謝物からエピジェネティック作用を検出することが可能であることも示している。

E. 結論

DNMT酵母において、*FLO1* 転写レベルはS9 mix存在下でのみBPAにより抑制されることが明らかとなった。代謝活性化処理されたBPAにより得られたこれらFLO assayの結果は、S9 mix非存在下でMBPを被検物質としたFLO assayの結果からも支持されることが考えられる。以上の結果は、本研究においてBPAの代謝産物のMBP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が代謝を考慮した*in vitro*エピジェネティック作用検出系として利用できる可能性も示している。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

なし

F.2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

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</i> - <i>Saccharomyces</i> shuttle plasmid, carrying <i>GAL1</i> promoter, 2 μ -type, <i>URA3</i> marker
pYES3/CT	<i>E.coli</i> - <i>Saccharomyces</i> shuttle plasmid, carrying <i>GAL1</i> promoter, 2 μ -type, <i>TRP1</i> marker
pF1GS	<i>FLO1</i> -GFP. 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-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 ade2-101 ura3-52</i>	pY2CThD1, pY3CThD3B	<i>DNMT</i> yeast
YPH250	<i>DNMT</i> yeast	pF1GS	

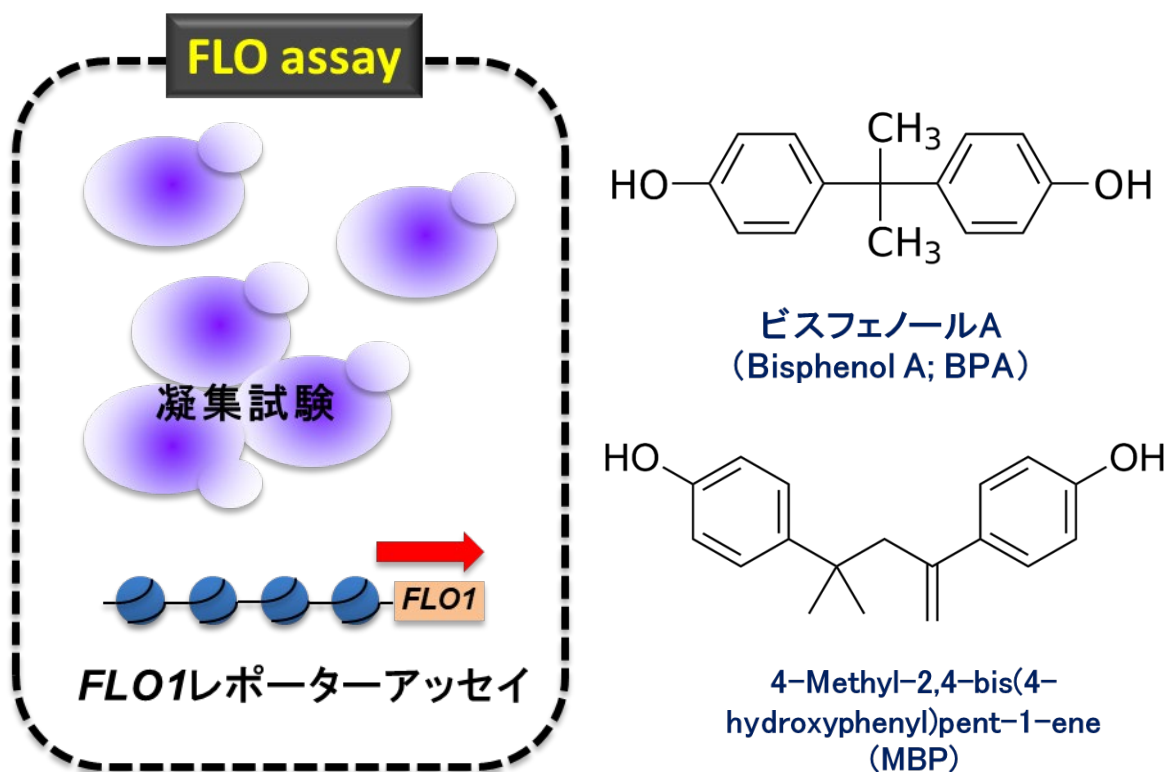


Fig. 1

FLO assay と BPA 及び MBP の構造

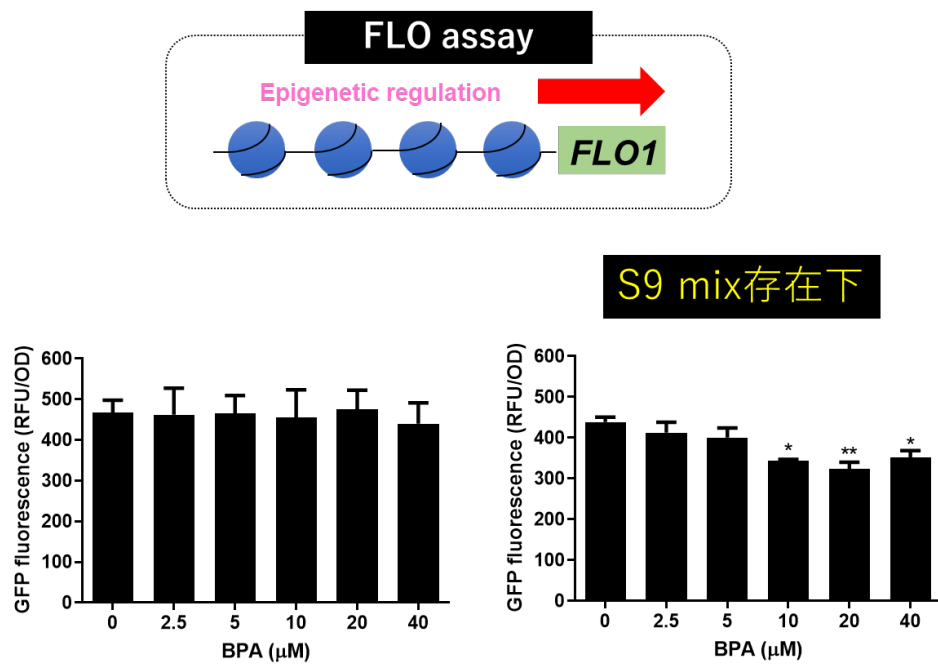


Fig. 2

FLO1 レポーター活性に対する BPA の効果

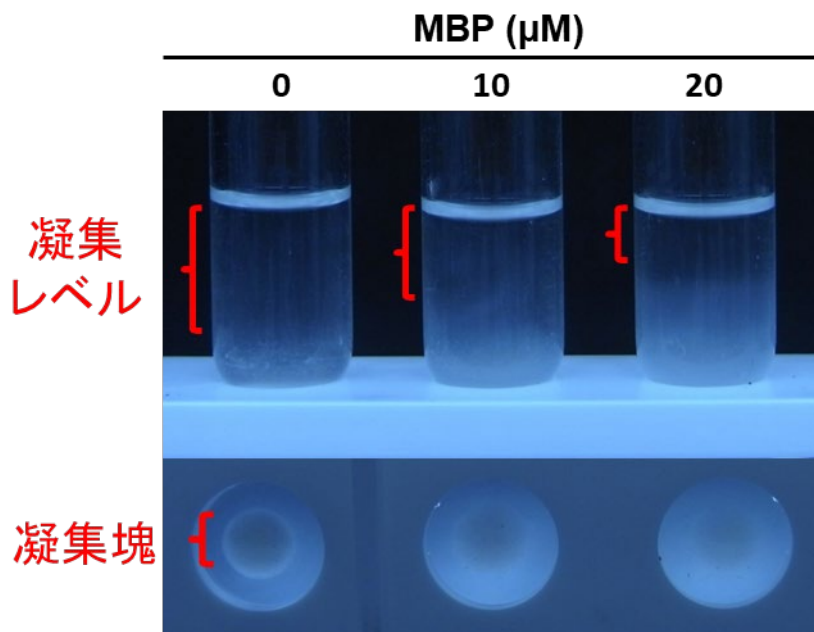


Fig. 3

凝集性に及ぼす MBP の影響

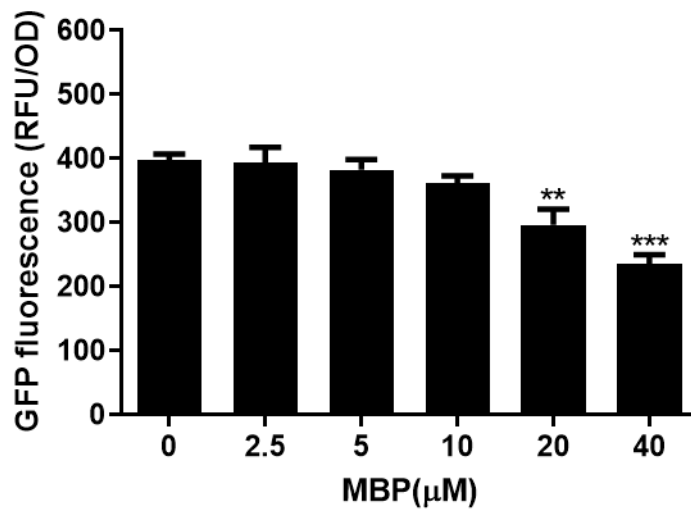
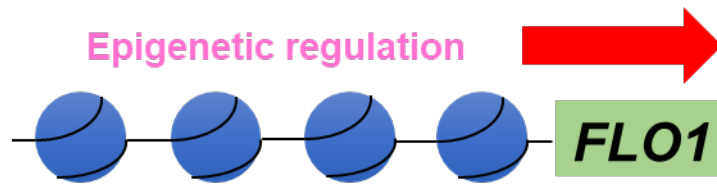


Fig. 4

FLO1 レポーター活性に対する MBP の効果