

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K11661

研究課題名（和文）包括的エピジェネティック変異原検出系の次世代化とその応用

研究課題名（英文）Improvement and application of universal detection system for epigenetic mutagen

研究代表者

杉山 圭一（Sugiyama, Kei-ichi）

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・部長

研究者番号：80356237

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：発がんに関わるエピジェネティック状態の変化を引き起こす化学物質のユニバーサルな検出系として、酵母凝集性を指標とした「FLO assay」を提唱している。このFLO assayのエンドポイントである凝集遺伝子FL01プロモーター活性の同配列改変による精度向上と、検出系の妥当性確認が本研究の目的である。検討の結果、エピジェネティック修飾剤高感受性変異型FL01プロモーターの取得には至らなかったが、自然環境中に存在する化学物質から新たにエピジェネティック修飾剤を同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティック制御に影響を及ぼす化学物質は発がんを促進する可能性が指摘されているが、その簡便な検出系の確立には至っていない。本研究では、そのプロトタイプと位置付けられるFLO assayの改善と実用性について検討を行った結果、本アッセイ系が環境中からエピジェネティック修飾作用を新たに検出できるポテンシャルを有することが確認された。この事実は、少なくともFLO assayがエピジェネティック修飾剤のファーストスクリーニング系として有用であることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：FLO assay using yeast flocculation as a detection system for chemicals that cause changes in epigenetic regulation related to carcinogenesis. The purpose of this study is to improve and validate the FLO assay utilizing activity of the flocculation gene FL01 promoter, which is an endpoint of this assay. As a result of the study, it was impossible to obtain a mutant FL01 promoter to allow for highly sensitive detection of epigenetic modifiers, but a novel epigenetic modifier within the natural environment has been identified using FLO assay.

研究分野：ゲノム安全学

キーワード：エピジェネティック修飾剤 バイオアッセイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、エピジェネティック制御に影響を及ぼす化学物質のユニバーサルな検出系として、「FLO assay」を提唱している。ゲノムにおけるエピジェネティック状態の変化は発がんの促進に関与する可能性があり、その簡便な検出系は化学物質の安全性を確保する上で有用と考えられるが、FLO assay は培養が容易な微生物である酵母の凝集性を指標としていることから有望な候補と期待される。一方で、本アッセイ系を社会実装するには妥当性を含め更なる検証が必要であることも事実である。

2. 研究の目的

研究代表者は、発がんに関わるエピジェネティック制御の変化(変異)を引き起こす化学物質のユニバーサルな検出に、エピジェネティック変化に応答する酵母凝集性が利用できることを報告している。本凝集性に関わる遺伝子 FLO1 プロモーターを用いたレポーターシステム (FLO assay) を活用し、精度が担保されかつ有用性が向上したエピジェネティック作用検出システムの構築を目標に本研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 凝集試験

ヒト DNA メチル化酵素遺伝子を形質転換した酵母株 (DNMT 酵母) を対数増殖期中期から定常期初期まで培養を行い、培養液を 5 分間静置し沈降する酵母細胞を画像処理により数値化した。

(2) レポーターアッセイ

凝集遺伝子 FLO1 のレポータープラスミドを形質転換した DNMT 酵母株を用いてアッセイを行なった。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) を測定し濁度で補正した。測定には TriStar2 LB 942 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany) を使用した。

(3) in vitro メチレーションアッセイ

プラスミド pUC19 を基質として、DNA メチル化酵素には M.SssI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) を用い制限酵素 Hpa II の感受性を指標に DNA メチル化酵素活性を検出した。

(4) ゲノム DNA メチレーション解析

ヒト胚性腎細胞 HEK293 を用い、ゲノムの DNA メチレーションレベルを ELISA で定量した。ELISA には、MethylFlash Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (Epigentek, Farmingdale, NY, USA) を使用した。

4. 研究成果

(1) 凝集性に及ぼすかび毒フモニシン B1 の影響

FLO assay における指標の 1 つが凝集である。すでに一部のかび毒がエピジェネティック作用を有することを報告しているが、本研究において、発がん性が懸念されるかび毒フモニシン B1 が DNMT 酵母で顕在化する凝集能に対し濃度依存的な促進作用を有することを見出

した。

(2) FLO1 レポーター活性に及ぼすかび毒フモニシン B1 の影響

DNMT 酵母の凝集性には凝集遺伝子 FLO1 の転写亢進が関与していることを明らかにしている。FLO assay のもう1つの指標ともなる凝集遺伝子 FLO1 のレポータープラスミドを形質転換した DNMT 酵母株を用いての FLO1 レポーター活性を測定した結果、フモニシン B1 濃度依存的に FLO1 レポーター活性が上昇することを確認した。さらに、DNA メチル化を受けるとされる CpG (5'-CG-3') モチーフに変異を導入した変異型 FLO1 プロモーターを用いたレポーターアッセイにおいては、フモニシン B1 によるレポーター活性上昇は認められないことも確認した。

DNMT 酵母の凝集性は凝集遺伝子 FLO1 が関与しており、その転写は同プロモーター領域内の DNA メチル化により正に制御されている可能性を報告している。したがって、以上の結果は、フモニシン B1 により FLO1 プロモーター内 CpG 配列のシトシン塩基のメチレーションが亢進されることで、同活性と凝集性が上昇したことを示唆するものと考えられる。

(3) DNA メチル化酵素活性に及ぼすフモニシン B1 の影響

制限酵素 Hpa II は認識サイトにメチル化部位を有するメチル化感受性酵素である。微生物由来の DNA メチル化酵素 M.SssI による Hpa II 切断阻害レベルは、フモニシン B1 濃度依存的に上昇する結果を得た。

(4) 哺乳類動物細胞のゲノム DNA メチレーションレベルに及ぼすフモニシン B1 の影響 ヒト胚性腎細胞 HEK293 のゲノム DNA メチレーションレベルをフモニシン B1 は亢進させる作用を示した。

以上、本研究から FLO assay により新たに環境中に存在する化学物質からエピジェネティック作用を有する物質としてフモニシン B1 が同定された。また、同定されたフモニシン B1 のエピジェネティック作用は DNA メチル化の促進作用であることも推測された。今回同定したエピジェネティック修飾剤は、遺伝毒性が不明瞭でありながら発がん性の懸念を有するかび毒であることから、FLO assay がエピジェネティック作用のかく乱により発がんを促進する物質の同定に有用であることも示唆している。一連の結果は、FLO assay の有用性向上に資するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugiyama Kei-ichi, Kinoshita Mawo, Furusawa Hiroko, Sato Kaoru, Honma Masamitsu	4. 巻 36
2. 論文標題 Epigenetic effect of the mycotoxin fumonisin B1 on DNA methylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 295 ~ 301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/mutage/geab019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugiyama Kei-ichi, Kinoshita Mawo, Gruz Petr, Kasamatsu Toshio, Honma Masamitsu	4. 巻 44
2. 論文標題 Bisphenol-A reduces DNA methylation after metabolic activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41021-022-00249-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 杉山圭一
2. 発表標題 かび毒を例としたエピジェネティック作用が誘発するゲノム不安定性
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 薫、木下麻緒、古沢博子、本間正充、杉山圭一
2. 発表標題 神経管障害のリスクファクターであるフモニシン B1 のエピジェネティックな作用
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山圭一
2. 発表標題 環境中から検出されるエピジェネティック変異原物質
3. 学会等名 2019年度日本環境変異原学会公開シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugiyama K, Furusawa H, Kinoshita M, Sato K, Honma M
2. 発表標題 Analysis of epigenetic effects of the mycotoxin Fumonisin B1 using FLO assay
3. 学会等名 The Joint Meeting of the 6th Asian Congress on Environmental Mutagens and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山圭一, 木下麻緒, 本間正充
2. 発表標題 酵母を用いた代謝活性化型エピ変異原検出法の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山圭一
2. 発表標題 ゲノム不安定性から見た食品の安全性
3. 学会等名 第42回日本食品・機械研究会年次大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------