

令和元年5月14日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00561

研究課題名(和文) エピ変異可視化システムの創成

研究課題名(英文) Development of visible detection system for epimutation

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・室長

研究者番号：80356237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムDNAのメチル化異常など発がん等の疾病に関与するとされるエピジェネティック変異(エピ変異)については、グローバルレベルで有効性が確認された検出システムは確立されていない。本研究では、エピ変異を簡便に検出可能とする微生物ベースの試験系確立を目的としている。独自に発見した表現型となるDNAメチル化酵素遺伝子形質転換酵母の凝集反応を基盤に、凝集遺伝子FL01プロモーターを用いたエピ変異検出系の構築を進めた。その結果、酵母凝集反応を指標にエピ変異を簡便に可視化できる可能性を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発がんの予測に有効な遺伝毒性試験の結果をより精緻化できる潜在能力を有すると期待されるエピジェネティック毒性試験系について、そのプロトタイプを独自の着想に基づき構築しかつその有効性を認めた点は、今後の化学物質による発がん性評価を考える上で新たな視座を与える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：With regard to epigenetic mutation that are considered to be involved in diseases such as carcinogenesis, there is no validated detection system for epigenetic mutation. In this study, we attempted to construct a bioassay system that can easily detect epigenetic mutation with a microorganism. Budding yeast is an eukaryotic single-celled microorganism. It has been found that the yeasts transformed with cDNAs of human DNA methyltransferase genes apparently show a flocculation phenotype. Therefore, we tried to construct an epigenetic mutation detection system based on a reporter assay using the FL01 flocculation gene. In this study, our findings suggest that yeast flocculation is a useful marker for the detection of epigenetic mutation.

研究分野：毒性学

キーワード：エピジェネティック毒性 酵母 凝集 FL01

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学物質に対する遺伝毒性評価にグローバルレベルで頻用されている試験として、コストパフォーマンスに優れている Ames 試験がある。一方で、発がんには遺伝毒性により惹起されるイニシエーションに加え、プロモーション作用を評価することも発がん性をより正確に予測する上で有効と考えられている。プロモーションに関与すると考えられるエピジェネティック毒性は、毒性分野において重要な研究領域として認知されているが、国際的に妥当性が認められた同毒性の検出系は現時点では確立されてはいない。

2. 研究の目的

エピジェネティック制御は、狭義には DNA のメチル化とヒストン修飾、またこれら状態に付随し誘発されるクロマチンの構造変化と定義可能である。これら動態変化を誘発するエピジェネティックな変化(エピジェネティック変異)を哺乳類動物細胞で簡便に検出するには、培養時間・経費の観点から克服すべき課題は多いと推測される。膨大な数の化学物質が環境中に存在する現在、エピジェネティック毒性を有する可能性のある物質を迅速簡便に検出する必要性は高いと考えられ、それには既知の知見を基盤にしつつも独創性の高い試験系の開発が望まれているとも換言できる。

真核微生物の酵母細胞は DNA メチル化酵素遺伝子が同定されていないが、ヒト DNA メチル化酵素(DNMT) 遺伝子を形質転換することで、明確に顕在化する表現型として凝集性を示す。本研究では、この独自に発見した酵母凝集反応を応用して、エピジェネティック変異(エピ変異)の可視化システムの創成を目指した。

3. 研究の方法

(1) 凝集試験

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) Reverse-Transcription (RT)-PCR 解析

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)を用いて RT-PCR を行い、凝集遺伝子 *FL01* の発現レベルを解析した。

(3) レポーターアッセイ

FL01 プロモーターを用いた GFP レポータープラスミドを形質転換した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 GFP の蛍光(Excitation, 485 nm; Emission, 535 nm)を測定し濁度で補正した。蛍光の測定には TriStar² LB 942 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany)を使用した。

4. 研究成果

(1) 凝集性におよぼす DNA メチル化阻害剤の影響

DNMT 遺伝子を形質転換した酵母株が示す凝集能に対する *DNMT* 阻害剤の影響を検討した。その結果、凝集試験において DNA メチル化阻害剤である 5-アザ-2'-デオキシシチジンの濃度依存的に凝集レベルが減少することが明らかとなった。また RT-PCR 解析から、凝集遺伝子 *FL01* の転写レベルも 5-アザ-2'-デオキシシチジンにより抑制されることが明らかとなった。以上の結果は、*FL01* 遺伝子のプロモーターが可塑性を保持した状態で DNA メチル化に応答する可能性を

示している。

(2) 凝集性におよぼすヒストン脱アセチル化阻害剤の影響

DNA メチル化阻害剤以外のエピジェネティック変異原として、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A を用い同化学物質が凝集性におよぼす影響を検討した。その結果、凝集試験においてはトリコスタチン A により凝集レベルが同濃度依存的に促進されることが明らかとなった。また RT-PCR 解析から、*FL01* 遺伝子の転写レベルも凝集試験と同様にトリコスタチン A 存在下で増加傾向を示すことが明らかとなった。以上の結果は、*FL01* 遺伝子のプロモーターが可塑性を保持した状態でヒストン脱アセチル化に応答する可能性を示しており、*FL01* プロモーターが主要なエピジェネティック制御の攪乱に対して可逆的に応答することを否定しない結果でもある。

(3) レポーターアッセイ系の構築

解析の結果、DNA メチル化阻害剤 5-アザ-2'-デオキシシチジンの濃度依存的に *FL01* レポーター活性が減少することが明らかとなった。本結果は、*FL01* レポーターアッセイにより DNA メチル化阻害能が簡便にかつ定量的に検出できることを示唆しており、その意義は大きいと考えている。

(4) 環境からのエピジェネティック変異原の検出

発がん性が疑われているかび毒のオクラトキシン A が凝集におよぼす影響を検討した。その結果、オクラトキシン A 存在下で凝集レベルの低下が確認され、また RT-PCR 解析により *FL01* 遺伝子の転写もオクラトキシン A により抑制されることが明らかとなった。*FL01* レポーター活性も RT-PCR 解析の結果と同様に減少傾向が確認されたことから、オクラトキシン A は DNA メチル化阻害能を有する可能性が高いことが示唆された。

(5) 総括

本研究から、酵母細胞の凝集能を指標にエピ変異の影響を可視化(検出)できる可能性があることが示唆された。今後は、得られた一連の研究成果の妥当性を検証しつつ、実用化に向けた応用研究を進める必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

1. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P., Kinoshita, M. and Honma, M: Inhibitory effect of ochratoxin A on DNMT-mediated flocculation of yeast, *Mutagenesis* (in printing). doi: 10.1093/mutage/gez002.
2. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M: Functional role of DNA methylation at the *FL01* promoter in budding yeast, *FEMS Microbiol. Lett.* **364**, doi: 10.1093/femsle/fnx221 (2017).
3. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M: Detection of epigenetic mutagens including anthracene-derived compounds using yeast *FL01* promoter GFP reporter gene assay, *Mutagenesis* **32**, 429-435 (2017). doi: 10.1093/mutage/gex009.
4. Sugiyama, K., Furusawa, H., Shimizu, M., Grúz, P. and Honma, M: Epigenetic mutagen as histone modulator can be detected by yeast flocculation, *Mutagenesis* **31**, 687-693

〔学会発表〕(計12件)

1. 杉山圭一、古沢博子、木下麻緒、グルーズ ピーター、本間正充：ヒト *DNMT* 酵母による環境中からのエピジェネティック変異原様活性の検出、日本環境変異原学会第 47 回大会 (2018, 11)。
2. 杉山圭一、古沢博子、グルーズ ピーター、本間正充：DNA メチル化が出芽酵母の *FL01* プロモーター活性に及ぼす影響、酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会 (2018, 9)。
3. 杉山圭一、古沢博子、グルーズ ピーター、本間正充：酵母凝集遺伝子 *FL01* プロモーター活性を指標とした DNMT 阻害様活性の検出、第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会 (2018, 5)。
4. 杉山圭一、古沢博子、グルーズ ピーター、本間正充：出芽酵母の凝集関連遺伝子 *FL01* プロモーターにおける DNA メチル化の影響、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017, 12)。
5. 杉山圭一、古沢博子、グルーズ ピーター、本間正充：酵母凝集反応を指標としたエピ変異原スクリーニング系の開発、第 11 回日本エピジェネティクス研究会年会 (2017, 5)。
6. 杉山圭一、古沢博子、グルーズ ピーター、本間正充：酵母凝集反応を利用した新規エピジェネティック変異原検出法の開発、日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017, 3)。
7. Sugiyama, K., Furusawa, H. and Honma, M: Effect of epigenetic modifiers on the flocculation of human *DNMT* gene-transformed yeasts, 14th International Congress on Yeasts (2016, 9)。
8. 杉山圭一、古沢博子、清水雅富、グルーズ ピーター、本間正充：酵母凝集反応をエンドポイントとしたエピ変異原検出系、酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会 (2016, 9)。
9. 杉山圭一、古沢博子、清水雅富、本間正充：酵母凝集反応を利用した新規なエピ変異原可視化検出系の開発、日本農芸化学会大会 (2016, 3)。
10. Sugiyama, K., Furusawa, H. and Honma, M: Epigenetic modifiers are visibly detectable by human DNMTs transgenic yeast, International Symposium for RIKEN Epigenetics Program 2016 (2016, 2)。
11. 杉山圭一、古沢博子、本間正充：*In vivo* DNA メチル化酵素阻害可視化システムの開発、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (2015, 12)。
12. 杉山圭一、古沢博子、本間正充：酵母をプラットフォームとしたエピジェネティック変異原検出系構築の試み、日本環境変異原学会第 44 回大会 (2015, 11)。

6. 研究組織

(1) 研究分担者
該当なし

(2) 研究協力者
該当なし