

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659132

研究課題名(和文)出芽酵母を使った化学物質のDNA変異原性試験系の開発

研究課題名(英文)Development of novel chemical mutagenesis assay using budding yeast

研究代表者

増本 博司(MASUMOTO, HIROSHI)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：80423151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：化学物質のDNA変異原性を調べることは細胞のがん化を予防するためにも必要である。従来変異原性テストは原核生物であるバクテリアを使用してきたが、本研究では真核生物にだけDNA変異原性を示す化学物質に対する出芽酵母を使ったDNA変異原性アッセイ法(AMS酵母)を構築した。AMS酵母は化学物質を排出させるポンプを破壊し化学物質を長く細胞内に滞留させることでDNA損傷をモニターできる。AMS酵母株を使うことで、DNA変異原性を示すことが知られている化学物質に加えて、バクテリアではDNA変異原性を示すことが知られていない化学物質に対してもDNA変異原性を示すことが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Exclusion of chemicals to cause DNA mutagenesis is important to prevent the incidence of cellular tumorigenesis. The AMS test using genetically-modified bacteria has been widely employed to monitor DNA mutagenesis of chemicals. However, this assay may not work to detect the chemicals to cause DNA mutagens for eukaryote only. We developed the novel AMS test using the budding yeast as a eukaryote (the AMS yeast). The AMS yeast has the deletion of genes encoding protein pump to exclude chemicals from cells and can monitor the DNA mutagenesis caused by chemicals. Using this AMS budding yeast strain, we can detect DNA mutagens has been detected by traditional AMS test only, but also chemicals to cause DNA mutagenesis restricted to eukaryote.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学；薬理学一般

キーワード：創薬；ゲノム薬理学

1. 研究開始当初の背景

人工的に合成される化学物質の中には細胞内の染色体 DNA に直接あるいは間接的に障害を引き起こし、発ガンなどの健康被害を引き起こすものが含まれる。化学物質の潜在的な DNA 損傷あるいは変異原性を調べるために、生物を使った化学物質の変異原性試験系が利用されている。サルモネラ菌を利用した Ams test あるいは大腸菌を利用した Umu test は培養の容易さ、低コストなどの観点から、原核生物であるバクテリアが利用されている。しかしながら真核生物と原核生物では染色体構造が全く違う。真核生物種特有のクロマチン構造の形成異常が間接的に DNA に損傷を与えることが知られている。このように真核生物特有の機能に影響を与え、直接的あるいは間接的に DNA 障害を引き起こす可能性のある化学物質の同定には従来のバクテリアを使った DNA 変異原性試験系は不向きである。

従来の試験法に加え、化学物質の持つ人体あるいは他の真核生物種への有害性を判断するためにも、真核生物を使った化学物質の DNA 変異原性を測る試験系があれば、幅広い化学物質に対してその DNA 変異原性を調べることができる。

2. 研究の目的

現在様々な分野で生み出される化学物質は DNA に損傷を与え、細胞、ひいては生体に毒性を引き起こし、ヒトの健康被害あるいは環境汚染の原因となっているものも少なくない。様々な研究機関・企業において、化学物質の DNA 変異原性を調べるために細菌(原核生物)を使った試験系が広く使用されている。しかしながら、従来の DNA 変異原性試験系では真核生物に特異的に DNA 損傷を与えてしまう化学物質の検出には適していない。

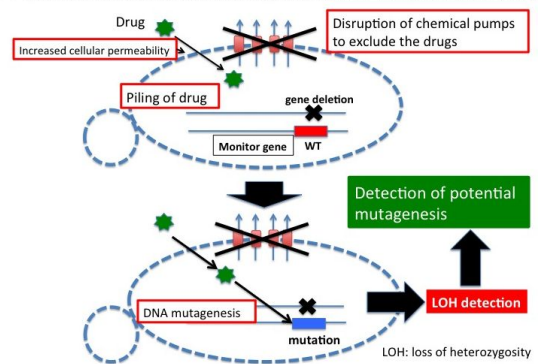
従来の試験法の欠点を補うために、本研究では単細胞真核生物である出芽酵母を使って新しい化学物質の DNA 変異原性試験法を開発する。

3. 研究の方法

DNA 変異原性試験に使用する酵母株の作製を試みた(図1)。出芽酵母は化学物質の細胞外への排出能力が非常に高く、化学物質の DNA 変異原性を調べるためには、高濃度の化学物質を投与する必要があった。しかしながら高濃度の化学物質の投与は、コスト高を引き起こす上に、DNA 変異原性以外に理由で細細胞死を引き起こす可能性があった。

まず細胞の化学物質に滞留を促進するため、化学物質の細胞外への排出能を司る膜ポンプと、植物の細胞壁に相当する酵母の莢膜の構成成分タンパクを破壊することを試みた(図1)。使用する出芽酵母株は細胞壁の構成因子をコードする *pmt2* 遺伝子お

図1 The strain construction of the budding yeast to monitor mutagenesis (AMS yeast)



よび化学物質の細胞外排出を行う ABC transporter 遺伝子発現を制御する転写遺伝子群 (*pdr1*, *pdr3*□ *pdr5*□ *yrr1*) を破壊した。

次に化学物質によって引き起こされる DNA 変異原性を検出する機構を導入した。DNA 変異もしくは DNA 鎖切断によって二倍値である二本の騒動染色体上のヘテロの遺伝子組(野生型/変異型)がホモの遺伝子組(変異型/変異型)へと切り替わる LOH (Loss of heterozygosity)を採用した(図1)。LOH が起こることで、細胞コロニーの色が白色から有色(赤色もしくは黒色)へと変化する。LOH の検出にはメチオニンの合成経路に關与する *MET15* 遺伝子を利用した。LOH を検出するために *MET15* 遺伝子の野生型/欠損型の相同遺伝子の組み合わせで使用する。野生型 *MET15* 遺伝子に DNA 変異等が導入され変異型に切り替わった場合、細胞コロニーが鉛入りの培地で白色から黒色へと変換することで確認できる。また赤色を呈する別の LOH の機構としてアデニンの合成経路の *ADE2* 遺伝子を採用した。ヘテロ野生型 *ADE2*/変異型 *ade2* では細胞コロニーは白色、LOH が起こり変異型 *ade2*/ *ade2* になると細胞コロニーは赤色を呈する。

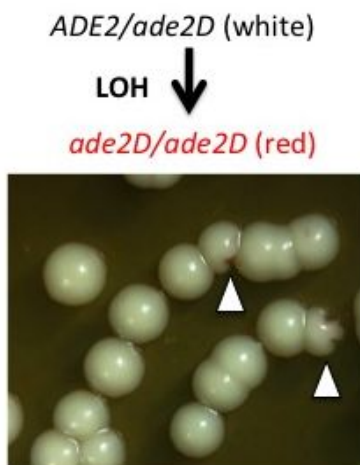
作製した酵母試験株が、化学物質が引き起こす LOH によって表現系の変化を示すか調べるために、DNA 変異原性を引き起こす様々な化学物質を投与した。(1) 抗がん剤である 4-NQO など DNA 鎖に直接損傷あるいは変異を与える化学物質、(2) 細胞内のデオキシリボヌクレオチド量を減少させるヒドロキシ尿素のような DNA に間接的に損傷・変異を加える化学物質、染色体構造の維持に寄与するヒストンデアセチラーゼ *Hst3*, *Hst4* の阻害剤ニコチンアミドなど真核生物だけに DNA に損傷・変異を与える化学物質、を LOH 試験に使用した。また細胞毒性を示すがゲノムの不安定性には寄与しない化学物質では、試験酵母株が LOH 表現系を示さないことも確認した。上記の試験を経た後、出芽酵母を使った新しい DNA 変異原性試験法として一般に利用してもらうために、その使用方法、酵母株、コントロールとなる化合物、試験に必要な化合物に対する感受性のデータを全てマニュアル化することを試みた。

4. 研究成果

まず作製した出芽酵母株(AMS 酵母株)を用いいくつかの化学物質を用いて化学物質の変異原性テストに利用できるかどうか、テストを行なった。この株は二つの特徴：DNA 変異源となり得る化学物質の露曝による DNA 変異 / 染色体腕の欠損を LOH として検出する。LOH が起こったことを示すため酵母細胞のコロニーの色の変化で表示する。本研究では DNA 損傷を引き起こす Methylmetanesulfate (MMS) およびヒドロキシ尿素を使って、AMS 酵母株コロニーの色が変化することを確認した。さらには Rhodamine 6G を用いて、化学物質の排出ポンプの破壊によって化学物質が細胞内に滞留し細胞毒性が生じることを、細胞のコロニー形成が起こらなくなることで確認した。ニコチンアミド(別名：ビタミン B3)は細胞増殖に必須であるが、NAD⁺依存性ヒストンデアセチラーゼの阻害剤として機能するために染色体の崩壊を起こすことが報告されている (*Genes Cells* 16, 467 (Apr, 2011))。AMS 酵母株を使うことによって低濃度のニコチンアミドによる DNA 障害能および細胞毒性を検出することができた(図2)。このように今回作製した AMS 酵母株は従来細胞毒性あるいは DNA 変異原性が報告されていなかった化学物質に対してその毒性を検出することが可能であることを示した。

しかしながら作製した酵母株は DNA 損傷剤ヒドロキシ尿素などの感受性に関してゲノムの不安定性を示す表現系が出にくい(細胞コロニーの赤色発色にて判断) DNA 損傷剤には DNA 損傷が起こっているにもかかわらず DNA 変異原性を示す表現系がでない、あるいは赤色コロニーの発生頻度が非常に低い、高濃度の化学物質の暴露は細胞死を引き起こし細胞コロニーの出現頻度が

図2 ニコチンアミド(Nicotinamide: NAM)で細胞を処理した場合にLOHが出現



+25mM NAM treatment

非常に低い、といった問題を抱えた。

今回作製した酵母株を作った DNA 変異原性テストは従来の微生物を利用したアッセイ法 (サルモネラ菌を使った Ams test, 大腸菌を使った Umu test) に比べ、その利便性において第一選択とならず、使用する化学物質が真核生物特異的に DNA 変異原性をもつのか補完的に確認するためのアッセイ法となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

発表者: 増本博司 **発表演題:** 出芽酵母を使った化学物質の変異原性試験系, **学会名:** 日本環境変異原学会 第 41 回大会, **発表日時:** 2012 年 11 月 29 日~30 日, **発表場所:** 静岡県コンベンションアーツセンター グランシップ

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://dpas.agbi.tsukuba.ac.jp/%7Eh3k56/Research.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
増本博司 (MASUMOTO, Hiroshi)
長崎大学・医学部共同利用研究センター・講師

研究者番号：80423151

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：