

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分
平成29年3月20日現在

多元的オミックス解析による化学物質—細胞内受容体

シグナル伝達攪乱の種差の解明

Multiple Omics Analysis to Understand the Species Differences
in Chemical-intracellular Receptor Signaling Disruption

課題番号：26220103

岩田 久人 (IWATA HISATO)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授



研究の概要

本研究では、多様な生物の細胞内受容体を介したシグナル伝達系を対象に、化学物質による系の攪乱を「網羅的」に解析できる基盤を構築する。さらにそれを利用して、生理作用・恒常性維持機能への影響を評価すると共に、化学物質による系攪乱の種差の原因となる感受性規定因子を決定する。

研究分野：環境学

キーワード：トキシコロジー・内分泌攪乱物質

1. 研究開始当初の背景

化学物質に対する感受性・反応には大きな種差が存在する。したがって、多様な生物種のリスクを評価するには、先ずは生物種自身の反応を測定する必要がある。細胞内受容体は体内の化学的信号を生物的信号に変換するメディエーターであり、このシグナル伝達系の種差が化学物質に対する感受性差や応答の多様性を説明する一要因として考えられている。

一方、投与実験・試料入手の方法論的・倫理的な困難さ故に、実験モデル動物以外の生物の反応を測定するのは容易ではない。その結果、化学物質の生態毒性試験の必要性は激増しているが、大半の化学物質の評価は未試験のままとなっている。細胞内受容体の多能性に関して魚類や鳥類を含む多様な生物種に一般化できるほどの知見は得られていない。加えて、環境（野生・伴侶）動物種の細胞内受容体シグナル伝達系の全体像を解析できるツールは現在なく、化学物質による細胞内受容体を介した影響の多様性を検証する障壁となっている。

2. 研究の目的

本研究では、多様な生物の細胞内受容体を介したシグナル伝達系を対象に、化学物質による系の攪乱を「網羅的」に解析できる基盤を構築する。さらにそれを利用して、生理作用・恒常性維持機能への影響を評価するとともに、化学物質による系攪乱の種差の原因となる感受性規定因子を決定することが目的である。

3. 研究の方法

本研究では、魚類・鳥類・哺乳類を含む実験モデル動物や環境（野生・伴侶）動物を対象に、化学物質による細胞内受容体シグナル伝達系の攪乱に焦点を絞って研究する。化学物質曝露によって惹起される細胞内受容体を介した「多元的オーム」の変化を網羅的に測定し、種差を規定する要因をゲノム・遺伝子・タンパク質レベルで特定するため、以下の5つのサブテーマ（A～E）に取り組むことを計画した。

- A) 環境（野生・伴侶）動物個体群に蓄積した化学物質のエクスポーズ解析
- B) エクスポーズと細胞内受容体の相互作用の網羅的解析
- C) 実験モデル動物の多元的オミックス解析とパスウェイ解析
- D) 環境（野生・伴侶）動物種の多元的オミックス解析とパスウェイ解析
- E) 細胞内受容体シグナル伝達系の感受性規定因子の探索

4. これまでの成果

- 各サブテーマの成果を以下に要約した。
- A) 魚類・鳥類・哺乳類の代表的環境（野生・伴侶）動物種を対象とし、化学物質の体内分布・トキシコキネティクスを明らかにした。リン酸エステル系難燃剤・生活関連物質・医薬品については、新たに高感度・高選択的な分析法を開発した。さらに、2次元ガスクロマトグラフ飛行時間型高分解能質量分析計を駆使し、これまで未同定であった新規環境汚染物質を含め、有機ハロゲン化合物・PAHsのスクリーニング技術も開発した。
 - B) 魚類・鳥類・哺乳類を含む各動物種の細

胞内受容体を発現させた *in vitro* レポーター遺伝子アッセイ (*iv*-RGA) 系を構築した。さらに、上記 A) で検出された化学物質を *iv*-RGA 系およびゼブラフィッシュ胚に暴露させて濃度依存的な受容体転写活性化能を測定し、各受容体の活性化能を指標とした相対活性値を算出した。加えて、被験物質のエストロゲン受容体リガンドポケットの結合状態を *in silico* 解析することで、*in vitro* および *in vivo* 実験系でのエストロゲン活性が評価できることを示した。

C) ニワトリ卵や妊娠ラットにビスフェノール A (BPA) を投与し、雛・新生仔の肝臓の次世代シーケンス解析・パスウェイ解析をおこなった。その結果、BPA の発現期曝露は脂質合成・脂肪酸代謝関連遺伝子の発現を介して性特異的に仔の発育に影響することが示唆された。また、BPA が鳥類・哺乳類で共通して肝臓の DNA 複製や細胞周期へも影響していることを明らかにした。

D) PCBs を *in vivo* 曝露したイヌの肝臓を対象に、トランスクリプトームとメタボロームを解析した。その結果、PCBs 曝露群では、アセチル CoA から脂肪酸を合成する過程で働く不飽和化酵素の発現量が減少し、伸長酵素の発現量が増加していたことから、長鎖飽和脂肪酸合成が亢進されることによる非アルコール性脂肪性肝疾患様症状の誘導が示唆された。その他、ダイオキシンを曝露したマダイ胚のトランスクリプトームへの影響や、バイカルアザラシ野生個体群の肝臓を対象に残留性有機汚染物質蓄積によるトランスクリプトームへの影響も調査した。

E) マダイ芳香族炭化水素受容体 (AHR2) 遺伝子の 5' 上流域を機能解析し、5' 上流域には AHR 応答配列が含まれ、その配列はマダイ AHR2 タンパク質によって活性化されることを明らかにした。その結果、AHR2 による AHR2 遺伝子の自己誘導機構が AHR シグナルを増幅し、マダイのダイオキシン感受性を高めていることを示した。また、113 鳥種の AHR1 遺伝子型と生態学的情報の関係を two-way クラスタ分析で解析し、鳥類 AHR1 遺伝子のダイオキシン感受性を規定する二つのアミノ酸残基は、自然由来ダイオキシン類の耐性獲得のために変異したと推察した。この他、ダイオキシン感受性が異なる近交系マウス 2 系統 (C3H/*lpr*・MRL/*lpr*) にダイオキシンを投与し、肝臓プロテオームを解析した。その結果、C3H/*lpr* 系統では、ダイオキシン曝露により活性酸素種の除去に関与する酵素群が誘導されるとともに、内因性 AHR リガンドの生成が促進されて AHR を活性化するため、ダイオキシンに対する反応を高感度化していると推定した。

5. 今後の計画

各サブテーマの計画を以下に示した。

A) 新規に開発した分析法を野生生物の臓

器・組織に適用し、汚染実態を明らかにする。また医薬品の分析対象種を増やし、生物蓄積の種特異性をより包括的に解明したい。

B) 多くの化学物質を対象に、*in silico* 解析で得られる受容体相互作用エネルギーと、*in vitro*・*in vivo* 実験系で得られる受容体活性値の関係から、構造活性相関を導きたい。

C) ニワトリ胚やラット新生仔を対象に、nano-LC を用いた新規プロテオーム分析法を適用し、タンパク質発現レベルでの影響の解析に取り組む。

D) 鯨類由来の細胞を用いた化学物質の暴露試験を実施し、これら細胞をオミックス解析・パスウェイ解析に供する。

E) 受容体と相互作用するタンパク質の質的・量的な違いについて、免疫沈降法と MALDI-TOF/TOF 質量分析法を組み合わせた実験系で検証する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1) Iida, M., Fujii, S., Uchida, M., Nakamura, H., Kagami, Y., Agusa, T., Hirano, M., Bak, S. M., Kim, E. Y. and Iwata, H. (2016): Identification of aryl hydrocarbon receptor signaling pathways altered in TCDD-treated red seabream embryos by transcriptome analysis, *Aquatic Toxicology*, 177, 156-170.

2) Hwang, J. H., Park, J. Y., Park, H. J., Bak, S. M., Hirano, M., Iwata, H., Park, Y. S. and Kim, E. Y. (2016): Ecological factors drive natural selection pressure of avian aryl hydrocarbon receptor 1 genotypes, *Scientific Reports*, 6(27526), 2045-2322.

3) Bak, S. M., Iida, M., Soshilov, A. A., Denison, M. S., Iwata, H. and Kim, E. Y. (2016): Auto-induction mechanism of aryl hydrocarbon receptor 2 (AHR2) gene by TCDD-activated AHR1 and AHR2 in the red seabream (*Pagrus major*), *Archives of Toxicology*, 91(1), 301-312.

4) Nguyen, H. T., Tsuchiya, M. C., Yoo, J., Iida, M., Agusa, T., Hirano, M., Kim, E. Y., Miyazaki, T., Nose, M. and Iwata, H. (2016): Strain differences in the proteome of dioxin-sensitive and dioxin-resistant mice treated with 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-*p*-dioxin, *Archives of Toxicology*, 1-20.

5) Nomiyama, K., Hirakawa, S., Eguchi, A., Kanbara, C., Imaeda, D., Yoo, J., Kunisue, T., Kim, E. Y., Iwata, H. and Tanabe, S. (2014): Toxicological assessment of polychlorinated biphenyls and their metabolites in the liver of Baikal seal (*Pusa sibirica*), *Environmental Science & Technology*, 48, 13530-13539.

ホームページ等

<http://ecotoxiwata.jp/en/index.html>