

## 化学物質による細胞内受容体-異物代謝酵素シグナル伝達系攪乱の感受性支配因子の解明

Clarification of factors governing sensitivity of disruption of intracellular receptor-xenobiotic metabolizing enzyme signaling pathways by chemical substances

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

多様な生物種の細胞内受容体と異物代謝酵素シトクロム P450 (CYP) を対象に、高度化したリガンドおよび基質スクリーニングのためのアッセイ系の構築と化学物質に対する反応の網羅的な解析をおこなう。その結果を基にして、細胞内受容体と CYP に内在する感受性規定因子について解明する。さらに、細胞内受容体と CYP 以外の感受性規定因子の探索も試みる。

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線／化学物質影響科学

キーワード：感受性

### 1. 研究開始当初の背景

野生生物の多くの種について適切なリスク評価は依然として実施されていない。リスク評価が困難な理由として、野生生物の試料は実験動物のように容易に入手できないことが挙げられる。つまり野生動物を対象とする有害性評価試験が難しいので、モデル動物を使った試験結果を外挿せざるをえなくなり、その結果として有害性が正しく評価できないのである。なぜ正しく評価できないのか。それは、化学物質に対する毒性発症の感受性に種差・系統差が存在するからである。この感受性差を説明する一要因として、細胞内受容体を起点とするシグナル伝達の差が考えられる。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、化学物質による細胞内受容体-異物代謝酵素シグナル伝達系の攪乱を指標として、感受性の種差を規定する分子機構について解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

具体的には、多様な生物種を対象に、以下の4つのサブテーマに取り組む。

- A) 細胞内受容体と相互作用する化学物質の網羅的解析
- B) CYP 依存的な化学物質の代謝経路および代謝物の網羅的解析
- C) 細胞内受容体および CYP に内在する感受

### 性規定因子の解明

D) 細胞内受容体および CYP 以外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は以下のように要約できる。

A) 無脊椎動物・硬骨魚類・両生類・は虫類・鳥類・水棲ほ乳類・陸棲ほ乳類の組織から、いくつかの細胞内受容体 [aryl hydrocarbon receptor (AHR)・constitutive androstane receptor (CAR)・pregnane X receptor (PXR)・peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)・ecdysone receptor (EcR)・estrogen receptor (ER)] の全長 cDNA クローンの抽出に成功した。これら cDNA を用いて *in vitro* 系で蛋白質を大量発現させ、リガンド候補化学物質のスクリーニングのためのレポーター遺伝子アッセイ・表面プラズモン共鳴 (SPR) アッセイ・蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) アッセイ法を構築した。

B) カワウ肝臓の cDNA ライブラリーから得た4種類の CYP2 cDNA の塩基配列を基にゲノムデータベースを検索し、鳥類・爬虫類から130にも及ぶ CYP2 遺伝子を同定した。加えて酵母発現系により cDNA クローン化した各 CYP1 蛋白質を発現させることができた。また、各生物種由来の CYP1 蛋白質による化学物質代謝能を評価するため、本発現系から

得られたリコンビナント CYP1 蛋白質を用いて、モデル化合物としてメトキシ・エトキシ・ペントキシ・ベンジロキシ・レゾルフィン、環境汚染物質としてポリ塩化ビフェニル (PCB)・ベンゾ[a]ピレンを、内因性物質としてエストロジェンを基質とした代謝経路および代謝産物測定系を構築した。

C) 鳥類の種を超えて組み合わせた AHR1 と CYP1A5 遺伝子プロモーターのペアを導入した *in vitro* レポーター遺伝子アッセイにより、CYP1A5 遺伝子プロモーターの構造よりも、AHR1 の構造がダイオキシン類による CYP1A5 遺伝子の転写活性化に寄与することを示した。鳥類 AHR およびその抑制因子である AHR レプレッサー (AHR2) の変異体を作製し、鳥類で AHR シグナル伝達系を支配する AHR および AHR2 特異的な領域を特定した。このほか、AHR が結合する dioxin responsive element (DRE) クラスター配列の二本鎖 DNA を bait にした pull-down 法により、AHR/DRE と結合する核蛋白質を、ダイオキシン鈍感系統マウスと敏感系統マウスで比較した。その結果、MALDI-TOF/TOF 質量分析装置を用いて、敏感系統マウス特異的に結合する核蛋白質の同定に成功した。

D) 化学物質に対して互いに異なる生体反応を示す近交系マウス MRL/lpr と C3H/lpr、およびその両系統の F2 を 20 世代以上兄妹交配させて確立した組換え近交系マウス MXH/lpr (13 系統) を対象に、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の投与実験を実施した。各系統マウスの表現形質 (脾臓の Cyp1a1 mRNA 発現誘導の 50% 影響濃度) とマイクロサテライトマーカーの遺伝子型の関係を量的遺伝子座 (quantitative trait loci: QTL) 解析し、TCDD の応答遺伝子座を決定した。

## 5. 今後の計画

各サブテーマの今後の計画を以下に示した。

A) これまでに構築してきたレポーター遺伝子アッセイ・SPR アッセイ・FRET アッセイ系を利用して、より多くの化学物質のスクリーニングを試みる。

B) CYP1 分子種だけではなく、他の CYP 分子種 (CYP2 および CYP3) も含めて発現蛋白質の種類を増やし、包括的な代謝実験系を確立する。

C) 上記サブテーマ A および B で得られた結果を基に、*in silico* 解析をおこない、化学物質と細胞内受容体・CYP との各相互作用を支配するアミノ酸の候補を推定する。次いで、*in silico* 解析で絞り込んだアミノ酸を変異させた発現蛋白質を用いて、上記サブテーマ A および B で確立したアッセイをおこない、候補アミノ酸の寄与を検証する。

D) TCDD 処理したマウス由来の試料は既に採取済みであるので、これらの Cyp1a1

mRNA 発現量を測定し、各個体の用量-応答曲線から EC<sub>50</sub> を算出する。一方、同じ個体についてサテライトマーカー多型を有する遺伝子座位の遺伝子型を決定する。その後、これまでに解析したデータと合わせて QTL 解析をおこない、さらに遺伝子座を絞り込む予定である。

## 6. これまでの発表論文 (受賞等も含む)

1) Thuruthippallil, L. M., Kim, E. Y., Ishibashi, H. and Iwata, H. (2012): *In vitro* transactivation potencies of black-footed albatross (*Phoebastria nigripes*) AHR1 and AHR2 by dioxins to predict CYP1A expression in the wild population. *Environmental Science and Technology*, 46(1), 525-533.

2) Kubota, A., Stegeman, J. J., Goldstone, J. V., Nelson, D. R., Kim, E. Y., Tanabe, S. and Iwata, H. (2011): Cytochrome P450 CYP2 genes in the common cormorant: Evolutionary relationships with 130 diapsid CYP2 clan sequences and chemical effects on their expression. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 153(3), 280-289.

3) Ishibashi, H., Kim, E. Y. and Iwata, H. (2011): Transactivation potencies of the Baikal seal (*Pusa sibirica*) peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  by perfluoroalkyl carboxylates and sulfonates: estimation of PFOA induction equivalency factors. *Environmental Science and Technology*, 45(7), 3123-3130.

4) Lee, J. S., Kim, E. Y., Nomaru, K. and Iwata, H. (2011): Molecular and functional characterization of aryl hydrocarbon receptor repressor from the chicken (*Gallus gallus*): interspecies similarities and differences, *Toxicological Sciences*, 119(2), 319-334.

5) Sakai, H., Kim, E. Y., Petrov, E. A., Tanabe, S. and Iwata, H. (2009): Transactivation potencies of Baikal seal constitutive active/androstane receptor by persistent organic pollutants and brominated flame retardants. *Environmental Science and Technology*, 43(16), 6391-6397.

## 第 16 回生態学琵琶湖賞受賞

ホームページ等

岩田研究室のサイト

日本語版 : <http://ecotoxiwata.jp/>

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

基盤研究 (S) の紹介サイト

<http://ecotoxiwata.jp/sr-s.html>