

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (A)
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17208030
 研究課題名 (和文) 水圏生物の核内受容体 CAR を利用した化学物質のハイスループット
 リスク評価
 研究課題名 (英文) High-throughput risk assay of chemicals using a nuclear receptor,
 CAR from aquatic animals
 研究代表者 岩田 久人 (IWATA HISATO)
 愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授
 研究者番号：10271652

研究成果の概要：

バイカルアザラシの核内受容体 constitutive androstane receptor (CAR) と反応する化学物質をスクリーニングしたところ、PCB や DDT は CAR とよく反応することが明らかとなった。これらの結果から、過去にラットやマウスなどの齧歯類で得られた CAR に関する知見は、難分解性有機汚染物質 (POPs) に対する反応差の観点から、水棲哺乳類などの野生生物に単純に外挿できないことがわかった。一方で本研究の結果は、各野生生物種の CAR 遺伝子を用いて構築した *in vitro* アッセイ系により、対象種固有の POPs のリスクが評価できる可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2006年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
総計	33,800,000	10,140,000	43,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：constitutive androstane receptor, PCB, DDT, POPs, アザラシ

1. 研究開始当初の背景

魚食性鳥類や水棲哺乳動物を含む水圏生物の個体数減少の一要因として、化学物質による環境汚染の関与が指摘されているが、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、現在使用されている化学物質が多様であり、試験に時間

がかかることが挙げられる。また、すでに数種のモデル動物で明らかのように、化学物質に対する毒性発症の感受性はモデル動物種・系統間で大きく異なり、このことは野生動物種にも該当すると予想される。

申請者は、化学物質の潜在的な影響を評価するため、constitutive androstane receptor (CAR) を介する生体反応に着目

した。CAR は新規核レセプターである。齧歯類を用いた実験では、CAR は細胞内でアンドロゲン型の内因性抑制物質によって通常不活化されているが、PCB などの化学物質によって活性化されると、異物代謝酵素であるチトクローム P450 (CYP) 2B や 2C・3A などの発現レベルを増加させる。つまり、CAR は生体内のステロイド作用に関与しており、CAR を起点とする情報伝達機構は化学物質によってかく乱されるのである。そこで、代表的な水圏生物の CAR を介した情報伝達機構の化学物質による影響をハイスループットで解析できれば、その結果は化学物質のリスク評価に有効ではないかと考えた。

2. 研究の目的

生物種特異的な毒性影響について評価するためには、毒性発現に関与する遺伝子産物の遺伝情報や機能を系統的・生態学的に重要な生物種間で比較検討することが不可欠である。本申請は多種多様な化学物質の水圏生物に対する潜在的なリスクを評価するため、CAR を用いたハイスループットな化学物質スクリーニング法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 水圏生物 CAR の全長 cDNA クローニング：各動物種の超冷凍保存済み組織から mRNA を抽出し、RT-PCR 法および RACE 法によって、CAR の全長 cDNA の一次構造（遺伝子配列）の解析を試みる。

(2) CAR・レポーター遺伝子発現系による化学物質の転写活性化能の測定：各水圏生物の CAR cDNA クローンを用いたレポーター遺伝子発現系を構築し、転写活性化能を測定する。この測定により、各化学物質

の CAR に対するアゴニスト・アンタゴニストポテンシャルを評価する。

(3) 化学物質と CAR の結合能のハイスループット解析およびその種間比較：大量合成した CAR タンパクを精製後、センサーチップ上に固定し、化学物質との結合・解離過程について BIACORE センサーグラムを用いて測定する。

4. 研究成果

(1) バイカルアザラシ CAR の全長クローニング：バイカルアザラシ (*Pusa sibirica*) Constitutive Androstane Receptor (CAR) cDNA の全長クローニングに成功し、CAR が哺乳類種間で保存されていることを明らかにした。バイカルアザラシ CAR は 1047 塩基のオープンリーディングフレームを持ち、348 のアミノ酸をコードしていた。推定分子量は 39.4kDa であった。バイカルアザラシ CAR アミノ酸配列をこれまで報告されているヒト・サル・ラット・マウスの CAR と比較したところ、全長配列では 74-84% の相同性を示した。また、DNA 結合ドメインとリガンド結合ドメインを対象とした他哺乳類 CAR とのアミノ酸相同性は、それぞれ 85-86%・71-84% であり、相対的にリガンド結合ドメインの相同性が低かった。

(2) 化学物質によるバイカルアザラシ CAR の転写活性化能の解析：バイカルアザラシの CAR 発現ベクター、および哺乳類 CYP2B 遺伝子の上流域に共通して存在する CAR 応答配列を含むレポーターベクターを MCF-7 細胞に導入して *in vitro* レポーター遺伝子アッセイ系を構築し、内因性物質や難分解性有機汚染物質によるバイカルアザラシ CAR の転写活性化能を測定した。

レポーター遺伝子アッセイの結果、バイ

カルアザラシ CAR は哺乳類 CAR 共通のアンタゴニストとして知られている男性ホルモン代謝物の androstanol や androstenol、マウス CAR アゴニストであるエストロンや 17 β -エストラジオールに応答しないことが明らかになった。また、バイカルアザラシ CAR はヒト CAR アゴニストである CITCO により濃度依存的に活性化されたが、マウス CAR アゴニストである TCPOBOP には応答しなかった。

一方、環境汚染物質についても検討したところ、バイカルアザラシ CAR は代表的な有機塩素化合物である各 PCB 同族・異性体 (PCB99, 101, 105, 118, 138, 153, 156, 180, 187) や DDT 化合物 (*p, p'*-DDT, *p, p'*-DDE), *trans*-nonachlor によって活性化されることがわかった。さらに近年環境汚染が問題となっている有機臭素系難燃剤についても調査したところ、バイカルアザラシ CAR はヘキサブプロモシクロドデカン (HBCD) によって活性化されたが、ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) の一部の異性体では若干活性が抑制された。

バイカルアザラシで得られた結果をマウス CAR の結果と比較したところ、オルソ位に塩素が 2 個以上置換した PCB 異性体で処理することにより、バイカルアザラシ CAR はマウス CAR よりも敏感に応答する傾向が伺え、バイカルアザラシは PCB 暴露に対してマウスより高感受性であると考えられた。

(3) 化学物質とバイカルアザラシ CAR の相互作用を検出する系の開発：バイカルアザラシおよびマウス CAR タンパク質を得るために、まず両種 CAR リガンド結合領域 (LBD) を pEU-E01-GST-N2 (TEV) Vector に挿入し、CAR-LBD タンパク質発現プラスミドを作製した。次に、無細胞タンパク質

発現系により GST 融合 CAR-LBD タンパク質を発現させ、Glutathione Sepharose 4B および HiTrap Q HP カラムにより精製した。SRC1 タンパク質は ProteinOne 社より購入した。CAR-LBD と SRC1 のタンパク質相互作用は、ピアコア 2000 (Biacore) を用いて解析した。本研究では、まず CAR-LBD タンパク質と各濃度に調整した化学物質の混合液をアナライトとして用い、アザラシおよびマウス CAR と SRC1 のタンパク質相互作用に影響する化学物質のスクリーニングをおこなった。

バイカルアザラシ CAR と SRC1 のタンパク質相互作用は、CITCO・PCBs・*p, p'*-DDT・*p, p'*-DDE の濃度依存的に増加したが、Lithocholic acid では減少した。マウス CAR の場合、Estrone・Clotrimazole・TCPOBOP 存在下で SRC1 との相互作用は増加したが、Androstanol・Androstenol・Lithocholic acid 存在下では濃度依的に減少した。Estradiol・CITCO に関しては、SRC1 との相互作用がわずかに増加した。相互作用の明確な増加が検出された化学物質について、CAR と SRC1 相互作用の速度論的解析をおこなったところ、バイカルアザラシ CAR では DMSO 添加群と比べ PCBs 処理群で高い解離定数 (K_D) を示した。結合速度定数 (k_a) は PCBs 処理群と DMSO 添加群で差がなく、解離速度定数 (k_d) は PCBs 処理群で高値を示したことから、PCBs がバイカルアザラシ CAR と SRC1 相互作用の解離速度に影響していると推察された。一方マウス CAR では、Estrone・TCPOBOP 処理で K_D が増加し、Clotrimazole 処理では減少した。Estrone・TCPOBOP の場合、 $k_a \cdot k_d$ ともに DMSO 添加群と比較して高値を示したことから、これら化学物質は結合・解離の両方に影響すると考えられた。また

Clotrimazole では、DMSO 添加群と比べ kd がほぼ同様なのに対し、ka が約 10 倍高く、この物質は CAR と SRC1 の結合反応に影響することが示唆された。

本研究の結果より、バイカルアザラシ CAR とマウス CAR のリガンド選択性や応答性には明確な種差があり、このことは CAR リガンド結合ドメインにおけるアミノ酸配列の相同性が相対的に低いことに起因していると考えられた。本研究により、実験動物で得られた CAR 標的遺伝子転写活性化能に関する結果は、水棲哺乳類などの野生生物に単純に外挿できないことが示唆された。つまり CAR の機能特性の解明が有機塩素化合物や有機臭素系難燃剤に対する生物種固有のリスクや影響を評価するために重要であると考えられた。

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 20 件)

1. Lee, J.S., Kim, E.Y., Iwata, H. (2009) Dioxin activation of CYP1A5 promoter/enhancer regions from two avian species, common cormorant (*Phalacrocorax carbo*) and chicken (*Gallus gallus*): association with aryl hydrocarbon receptor 1 and 2 isoforms. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234, 1-13. 査読有
2. Kubota, A., Iwata, H. and Kim, E.Y. (2008) Catalytic function of avian cytochrome P450 1A4 and 1A5 (CYP1A4 and CYP1A5) enzymes heterologously expressed using *in vitro* yeast system. *Marine Environmental Research*, 66(1), 154-155. 査読有
3. Ishibashi, H., Iwata, H., Kim, E.Y., 他 7 名 (2008) Contamination and effects of perfluorochemicals in Baikal seal. 1. residue level, tissue distribution, and temporal trend. *Environmental Science & Technology*, 42, 2295-2301. 査読有
4. Ishibashi, H., Iwata, H., Kim, E.Y., 他 5 名 (2008) Contamination and effects of perfluorochemicals in Baikal seal. 2. molecular characterization, expression level, and transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor α . *Environmental Science & Technology*, 42, 2302-2308. 査読有
5. Hirakawa, S., Iwata, H., Takeshita, Y., Kim, E.Y., 他 6 名 (2007) Molecular characterization of cytochrome P450 1A1, 1A2, and 1B1, and effects of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners on their hepatic expression in Baikal seal. *Toxicological Sciences*, 97, 318-335. 査読有
6. Yasui, T., Kim, E.Y., Iwata, H., 他 4 名 (2007) Functional characterization and evolutionary history of two aryl hydrocarbon receptor isoforms (AhR1 and AhR2) from Avian Species. *Toxicological Sciences*, 99, 101-117. 査読有
7. Niimi, S., Kim, E.Y., Iwata, H., Watanabe, M.X., 他 3 名 (2007) Identification and hepatic expression profiles of cytochrome P450 1-4 isozymes in common minke whales. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 147(4), 667-81. 査読有
8. Lee, J.S., Kim, E.Y., Iwata, H., Tanabe, S. (2007) Molecular characterization and tissue distribution of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator isoforms, ARNT1 and ARNT2, and identification of novel splice variants in common cormorant (*Phalacrocorax carbo*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology and Pharmacology*, 145(3), 379-93. 査読有
9. Iwata, H., Kim, E.Y. 他 4 名 (2007) Chemical contamination in aquatic ecosystems. *Yakugaku Zasshi*, 127(3), 417-428. 査読有
10. Yamauchi, M., Kim, E.Y., Iwata, H., Shima, Y. and Tanabe, S. (2006) Toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in developing red seabream

- (*Pagrus major*) embryo: an association of morphological deformities with AHR1, AHR2 and CYP1A expressions. *Aquatic Toxicology*, 40, 6919-6927. 査読有
11. Kubota, A., Iwata, H., Goldstone, H. M. H., Kim, E. Y., Stegeman, J. J. and Tanabe, S. (2006) Cytochrome P450 1A4 and 1A5 in common cormorant (*Phalacrocorax carbo*): evolutionary relationships and functional implications associated with dioxin and related compounds. *Toxicological Sciences*, 92, 394-408. 査読有
 12. Kubota, A., Iwata, H., 他3名 (2006) Congener-specific toxicokinetics of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls in black-eared kites: cytochrome P4501A-dependent hepatic sequestration. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 1007-1016. 査読有
 13. Sakai, H., Iwata, H., Kim, E. Y., 他5名 (2006) Constitutive androstane receptor (CAR) as a potential sensing biomarker of persistent organic pollutants (POPs) in aquatic mammal: molecular characterization, expression level and ligand profiling in Baikal seal. *Toxicological Sciences*, 94, 57-70. 査読有
 14. Kunisue, T., Watanabe, M. X., Iwata, H., 他4名 (2006) PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in wild terrestrial mammals from Japan: congener specific accumulation and hepatic sequestration. *Environmental Pollution*, 140(3), 525-535. 査読有
 15. Watanabe, M. X., Iwata, H., 他3名 (2005) Bioaccumulation of organochlorines in crows from Indian open waste dumping site: evidence for direct transfer of dioxin-like congeners from the contaminated soil, *Environmental Science and Technology*, 39, 4421-4430. 査読有
 16. Kubota, A., Iwata, H., Tanabe, S., Yoneda, K. and Tobata, S. (2005) Hepatic CYP1A induction by dioxin-like compounds, and congener-specific metabolism and sequestration in wild common cormorants from Lake Biwa, Japan. *Environmental Science and Technology*, 39, 3611-3619. 査読有
 17. Watanabe, M. X., Iwata, H., Kim, E. Y., 他3名 (2005) Induction of cytochrome P450 1A5 mRNA, protein and enzymatic activities by dioxin-like compounds, and congener-specific metabolism and sequestration in the liver of wild jungle crow from Tokyo, Japan. *Toxicological Sciences*, 88, 384-399. 査読有
 18. Niimi, S., Watanabe, M. X., Kim, E. Y., Iwata, H., Yasunaga, G., Fujise, Y. and Tanabe, S. (2005) Molecular cloning and mRNA expression of cytochrome P4501A1 and 1A2 in the liver of common minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*). *Marine Pollution Bulletin*, 51, 784-793. 査読有
 19. Kim, E. Y., Iwata, H., 他5名 (2005) Aryl hydrocarbon receptor (AHR) and AHR nuclear translocator expression in Baikal seal and association with 2,3,7,8-TCDD toxic equivalents and CYP1 expression levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology and Pharmacology*, 141, 281-291. 査読有
 20. Yamauchi, M., Kim, E. Y., Iwata, H. and Tanabe, S. (2005) Molecular characterization of the aryl hydrocarbon receptors (AHR1 and AHR2) from red seabream (*Pagrus major*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology and Pharmacology*, 141, 177-187. 査読有
- [学会発表] (計10件)
1. Sakai, H., Iwata, H., Kim, E. Y., Petrov, E. A. and Tanabe, S. (2008): Molecular characterization of Baikal seal CYP2B/3A promoter/enhancer regions and their transactivation potencies by POPs. 5th SETAC World Congress, Sydney, Australia, August 4, Abstract CD.
 2. Hirakawa, S., Imaeda, D., Nakayama, K., Kim, E. Y., Kunisue, T., Tanabe, S., Petrov, E. A., Batoev, V. B. and Iwata, H. (2008): Effects of dioxins in wild Baikal seals: an implication from a toxicogenomic approach. 5th SETAC World Congress, Sydney, Australia, August 4,

- Abstract CD.
3. 酒井大樹・岩田久人・金 恩英・Petrov, E. A. ・田辺信介 (2008): バイカルアザラシCYP2BおよびCYP3Aプロモーター/エンハンサー領域の分子特性とPOPsによる転写活性化能, 環境ホルモン学会第11回研究発表会, 東京, 12月13日, 要旨集, 45.
 4. Sakai, H., Iwata, H., Kim, E. Y., Petrov, E. A. and Tanabe, S. (2008): Low Induction Potencies of Cytochrome P450 2B and 3A by Persistent Organic Pollutants in Baikal Seal (*Pusa sibirica*). *Biological Responses to Chemical Pollutants: Toward Establishing an Asian Network of Environmental Toxicology*, March 6, Matsuyama, Japan, Abstract Book, 47.
 5. Iwata, H., Kim, E. Y., Suda, T., Tanabe, S. and Petrov, E. A. (2008): Relative Potencies of Individual Dioxin-Like Compounds for *In Vitro* Cytochrome P450 1A1 Transactivation of Aryl Hydrocarbon Receptor from Baikal Seal. *Society of Toxicology 47th Annual Meeting*. Washington, March 18, Seattle, USA, Program 275.
 6. Iwata, H., Sakai, H., Kadota, M., Kim, E. Y., Tanabe, S., Batoev, V. B. and Petrov, E. A. (2007): Xenobiotic ligand profiles of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) in Baikal seal (*Pusa sibirica*). *14th International Symposium Pollutant Responses in Marine Organisms*, Brazil, May 9, Abstract Book, 33.
 7. Iwata, H., Ishibashi, H., Kim, E. Y., Tao, L., Kannan, K., Tanabe, S., Batoev, V. B. and Petrov, E. A. (2007): Contamination by perfluorinated compounds and effects on peroxisome proliferators-activated receptor alpha-Cytochrome P450 4A signaling pathway in Baikal seal (*Pusa sibirica*). *14th International Symposium Pollutant Responses in Marine Organisms*, Brazil, May 9, Abstract Book, 33.
 8. Sakai, H., Iwata, H., Kim, E. Y., Petrov, E. A. and Tanabe, S. (2007): Transactivation potentials of constitutive androstane/active receptor by persistent organic

pollutants and brominated flame retardants: a comparative study of Baikal Seal (*Pusa sibirica*) and mouse. *DIOXIN 2007 International Symposium*, Tokyo, Japan, Sept. 3, Abstracts Book, 41.

9. Iwata, H. and Kim, E. Y. (2007): Inter-species and -isoform differences in signaling pathways of aryl hydrocarbon receptors: A case study of fish and bird. *Special Seminar in Hanyang University*, Seoul, Korea, Nov. 21.
10. Iwata, H. and Kim, E. Y. (2007): Species diversity of AHR-CYP1A signaling pathways: Toward risk assessment of dioxin-like compounds in wildlife. *International Symposium on the Environmental Risks of Chemicals*, Saitama, Japan, December 10, Program and Abstracts, 34.

〔図書〕 (計2件)

1. 岩田久人・金 恩英 (2008) 第5章 生物反応を利用して化学物質汚染の危険性を検知する, 分子で読む環境汚染, 鈴木 聡編, 東海大学出版会, 122-157.
2. 岩田久人 (2006) 第6章 バイオマーカーによる影響評価, 化学物質の生態リスク評価と規制-農薬編-, 日本環境毒性学会, 畠山成久編, アイピーシー, 233-252.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 久人

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授
研究者番号: 10271652

(2) 研究分担者

金 恩英

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・

グローバル COE 准教授

研究者番号: 70419513

田辺 信介

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授

研究者番号: 60116952

(3) 連携研究者

なし