

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12213

研究課題名(和文) 生体外異物代謝におけるグルクロン酸抱合の進化と細胞内デリバリーに対する機能解明

研究課題名(英文) Species differences and evolution of phase II conjugation reaction and its cellular function

研究代表者

池中 良徳 (Ikenaka, Yoshinori)

北海道大学・獣医学研究科・准教授

研究者番号：40543509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：当該研究では、比較生物学・系統解析により、脊椎動物におけるグルクロン酸抱合酵素(UGT)の種差を明らかにする事で、その生体内での役割と分子メカニズムについて解明することを試みた。その結果、UGT1A6活性が低いと報告されていたネコ以外にも、鯨脚類で極めてその活性が低い事が明らかになった。更に、ネコやアザラシではUGT1Aに加えUGT2B活性が低く、偽遺伝子化している事が示唆された。この結果から、グルクロン酸抱合は哺乳動物にとって極めて重要な解毒反応であると共に、欠損している動物では化学物質にとってのハイリスクアニマルであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：UGTs are among the most important xenobiotic metabolizing enzymes that conjugate a wide range of endogenous and exogenous compounds. Previous studies showed that Felidae species and Pinnipedia species have very low UGT activities toward some phenolic compounds because of the UGT1A6 pseudogene and small numbers of UGT1A isozymes. In addition to the UGT1As, UGT2Bs isozymes also conjugate various endogenous and exogenous compounds. Results of UGT activity measurement indicated cats and pinniped species had very low activities toward these substrates. Furthermore, Felidae species had the same nonsense mutation in UGT2B, which suggested that Felidae UGT2B31 was also a pseudogene in addition to UGT1A6. Together with the lower activity of UGT1As, these findings of lower activity of UGT2B suggested that Felidae and some pinniped species have very low UGT activity toward a wide range of chemicals.

研究分野：環境毒性学

キーワード：異物代謝第II相抱合反応 グルクロン酸 UGT 生物種差

1. 研究開始当初の背景

環境汚染物質などの生体外異物は、細胞内に取り込まれた後、どのようにして細胞外に排泄されるのか、未だ十分に理解されていない。一般的に脂溶性である外来化学物質は、第相(酸化)第相(抱合化)反応による代謝を受け、細胞膜に存在するトランスポーターにより細胞外へ排泄される(第相)。しかし、主に滑面小胞体上で生産される抱合化合物が、広大な細胞内でどのように極性を持ち、どのようにトランスポーターまでデリバリーされるのか、その分子メカニズムは未だに不明である。

そこで当該研究は、第相抱合体自身が細胞内輸送シグナルとしての役割を担っていると仮説を立て、未だ明らかになっていない代謝産物の細胞内デリバリーシステムの解明を試みる。また、哺乳類において何故グルクロン酸が薬物代謝に使われるようになったのか、比較生物学・系統進化学的解析を実施する。ここで、哺乳動物では、異物代謝第相反応におけるグルクロン酸抱合の寄与は大きい。しかし、異物代謝において何故グルクロン酸が用いられるようになったのか、未だ比較生物学的・進化学的解析は行われていない。申請者らの先行研究で多環芳香族である Pyrene を甲殻類に投与した結果、グルコース6位がカルボン酸化(グルクロン酸)ではなく、硫酸化であるグルコース-6-硫酸抱合体として排泄していることを始めて明らかにした(Ikenaka et al. BBRC 2008)。一方、無脊椎動物を含め各種生物の抱合反応をメタ解析した結果、グルクロン酸抱合を行っているのは脊椎動物のみであり、旧口動物では主にグルコース抱合体又は他のグリコシド抱合体として排泄していることを明らかにした(Ikenaka et al. Aqu Tox 2007)。これらの結果は、ヒトを含む哺乳類が特徴的にグルクロン酸を異物代謝に用いるよう進化したことを示唆している。

2. 研究の目的

そこで当該研究では、第相抱合反応の中で特にヒトの医薬品代謝の4割に参与すると報告されているグルクロン酸抱合体に注目し、グルクロン酸の細胞内デリバリーにおけるシグナル付加としての機能を明らかにする。更に、何故グルクロン酸が脊椎動物の異物代謝に特徴的に用いられるようになったのか、比較生物・系統進化学的解析を行い、仮説の代謝システム構築の起源を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

グルクロン酸転移酵素(UGT)について、比較生物学解析を行い、グルクロン酸抱合を行う生物種について、スクリーニングを行った。これにより、グルクロン酸が何故抱合反応に用いられるようになったのか、系統学的な解析を行った。

一方、当初予定していた蛍光分子イメージングによる化学物質の細胞内動態の観察では、蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡で十分な感度を得ることが出来なかったため、成果を得る事が出来なかった。そのため、当該研究では、グルクロン酸抱合反応の比較生物学・系統学的アプローチに重点を置いて研究を進めた。

4. 研究成果：グルクロン酸抱合反応の比較生物学・系統学的アプローチ：Pyrene 投与による各種生物の結合能スクリーニングおよび UGP-Sugar 転移酵素(UGT)の系統解析

(1) Pyrene を用いた第 II 相抱合体の種横断的スクリーニング：魚類

当該研究では、グルクロン酸抱合体が進化的にどのように構築されてきたのかを明らかにするため、比較生物学・系統進化学的解析を行う。多くの場合、脊椎動物に比べ他の下位動物では異物代謝系の転写・調節が単純であるため、これら生物の異物排泄システムを詳細に解析する事を試みた。申請者らの先行研究により、昆虫や甲殻類等の旧口動物ではグルクロン酸抱合体は検出されなかったことから、新口動物(棘皮動物や脊索動物)に注目し、Pyrene 曝露実験を行った。

メダカやゼブラフィッシュを含む14種の魚類を用いた Pyrene 曝露実験から、魚類においても Pyrene 抱合反応に大きな種差がある事が観察された(図1)。

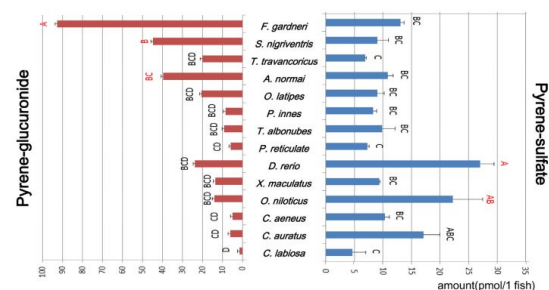


図1: 14種の魚類で観察された抱合反応の種差

一方、14種の魚類中でも *Colisa labiosa* は UGT 活性が他の魚類に比べ極めて低い事が明らかになった。更に、*C. labiosa* では、硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体以外の抱合体として Pyrene を排泄している事が明らかに

なった。この抱合体は UFP-Sugar と考えられるが、今回の研究実施期間では構造解析を完了することは出来なかったが、魚類が現在まで知見の無い新規抱合体として Pyrene を排泄する事を世界に先駆け明らかにできた。

(2) Pyrene を用いた第 II 相抱合体の種横断的スクリーニング：哺乳類

当該研究では、更に哺乳類の尿から Pyrene 抱合体の検出法を開発し、16 種の哺乳類の尿中の Pyrene 抱合体のスクリーニングを実施した。その結果、これまでの報告を支持するように、ネコやフェレットで極めて低い UGT 活性が観察された。一方、ブタではこれまでの獣医学で硫酸抱合活性がほぼ無いと考えられてきたが、当該研究の結果、ラットと同程度ある事が明らかになった。これは、過去の研究が V_{max} (最大反応速度) で評価していたのに対し、当該研究ではより生体内に近い V_{max}/K_m (酵素効率) で評価したためである。更に、当該研究ではアフリカヘッジホッグの硫酸抱合活性が極めて低い事も明らかになることが出来た。この原因として、SULT (硫酸転移酵素) の補酵素である PAPS の濃度が低い事、また SULT 自身の発現量が低い事が明らかになった。

(3) 食肉目の UGT の進化・系統解析

主に比較生物学・系統解析により、グルクロン酸抱合酵素 (UGT) の種差を明らかにした。哺乳動物では、異物代謝第 II 相反応におけるグルクロン酸抱合の寄与は大きい。しかし、異物代謝において何故グルクロン酸が用いられるようになったのか、未だ比較生物学的・進化学的解析は行われていない。そこで、UGT 活性が低いと報告されている食肉目を中心に新鮮肝を採取し、肝ミクロソーム画分を用いた代謝活性試験を行った。その結果、従来まで UGT1A6 活性が低いと報告されていたネコ以外にも、キタオットセイやカスピカイアザラシなどの鯨脚類で極めてその活性が低い事が明らかになった。また、遺伝子構造解析であるシンテニー解析を行った結果、これらの動物では、UGT1A6 に加え、UGT1A7 や 9 等、異物代謝に関与する UGT に欠損が生じている事が明らかになった。更に、ステロイド代謝や

種々の薬剤の代謝に関与する UGT2 ファミリーにも注目し、解析を行った結果、イヌでは複数の UGT2B 分子種が存在し、肝臓において高い活性を持つことが示唆された。

一方、ネコでは UGT2B 活性が低く、分子種数が少ない、もしくは偽遺伝子化している可能性が示唆された。更に、鯨脚類でも UGT2B サブファミリーの分子種数が少ない事が示唆され、特にアザラシ科に属するゼニガタアザラシやカスピカイアザラシでは顕著な低活性が確認された。

この結果は、UGT1A6 の偽遺伝子化と併せ、ネコおよび一部の鯨脚類の UGT 活性が全般的に低い事を示している。

(3) まとめ

以上の結果、数種の哺乳動物は UGT の欠損が確認された一方、これらの種は化学物質に対する感受性が極めて高くなる事も明らかになった。即ち、脊椎動物にとって、グルクロン酸抱合は非常に重要な反応である事が改めて確認された。それでは、何故哺乳類は無脊椎動物では種反応では無いグルクロン酸抱合体を用いて代謝を行うのだろうか。ここで、陸生哺乳類に芳香族化合物類を投与すると、代謝初期にはその硫酸抱合体が主に排泄されるが、時間経過と共にグルクロン酸抱合体が主代謝産物となることが知られている (Zamek-Gliszczyński et al. 2006)。この原因として、硫酸抱合反応に必要な活性硫酸 (3'-phosphor-adenosine-5-phosphor-sulfate (PAPS)) が枯渇するためと言われている。一方、グルクロン酸抱合体は、グルコース抱合体から派生した抱合体であり、グルコースベースの抱合体と言える。つまり、我々陸生哺乳類もまた陸生無脊椎動物同様、グルコース抱合体を主代謝産物として排泄する生物であり、その原因の一つが硫酸 (PAPS) の枯渇による硫酸抱合反応の律速であると考えられる。一方、水圏は地球全体の硫黄 (S) の 95% が硫酸イオン (SO_4^{2-}) の形で存在すると言われるほど硫酸イオンが豊富な環境である (Bowen 1979)。すなわち、水生生物では、活性硫酸がその体内から枯渇する可能性が低く、グルコースベースの抱合体を生成する必要性が低いのかも知れない。生物は進化の過程で様々な生息環境にさらされて生き延びて来た。抱合体の多岐にわたる反応は、各生物がそれぞれの生息環境に適応し、獲得してきた痕跡なのかもしれない。一方、我々が過去に明らかにした、無脊椎動物であるエビでは、グルコースに対し、硫酸が付加されたグルコース 硫酸抱合体として

図2: 食肉目のUGT(グルクロン酸転移酵素)による解毒能の評価



化学物質を排泄することが明らかになっている。何故これらの甲殻類は脊椎動物では生成しないような抱合体を生成するのだろうか。そこで本研究では、グルコースへの硫酸付加反応の意義について詳しく考察した。まず、硫酸が付加することにより変化する分子の性質として、その分子全体が負にチャージすることが挙げられる。さらに、この負のチャージは全ての生体内環境で維持されると考えられる。この負チャージにより、分子形状の変化、水溶性の増加、イオン性の分子間相互作用の促進等が生じ、これらが生物活性に影響をおよぼす要因になると考えられる(Strott 2002, Hooper et al. 1996)。さらに、膜タンパク質である Multixenobiotic Resistance Protein (MRP) や P-glycoprotein などの ABC transporters は、Phase- 生成物が細胞膜から排泄される際、重要な役割を果たすことが報告されている(動物における Phase- 反応)(Keppler et al. 1998, Cole et al. 1998, Bard 2000)。とりわけ、MRP は organic anion transporters であり、グルタチオン(GSH)やグルクロン酸、硫酸抱合体に対し、高い活性を持つことが知られている(Cummings et al. 2004, Kool et al. 1999, Geier et al. 2007)。グルコース抱合体への硫酸付加は、分子全体を負にチャージし、MRP のようなトランスポーターを活性化し、xenobiotics の排泄を促進させているのかも知れない。一方、第六章で示した通り、脊椎動物が生成するグルクロン酸抱合体もまたグルコース抱合体から派生した抱合体である。このグルコースからグルクロン酸への変換反応(グルコースの6位の水酸基をカルボン酸にする)もまた、硫酸付加と同様、分子を負にチャージする反応である。動物における Phase- 反応は、xenobiotics の水溶性を上昇させることだけでなく、分子全体を負にチャージすることがその排泄のシグナルとして重要な意義を持つかもしれない。

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12件)

Saengtienchai A, Ikenaka Y, Bortey-Sam N, Jermnark U, Mizukawa H, Kawai YK, Nakayama SMM, Ishizuka M, The African hedgehog (*Atelerix albiventris*): low phase I and phase II metabolism activities, Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol, 査読

有, Vol. 190, 2016, pp 38-47
DOI: 10.1016/j.cbpc.2016.08.005

Takehi M, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Kawai YK, Watanabe KP, Mizukawa H, Nomiyama K, Tanabe S, Ishizuka M, Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT) xenobiotic metabolizing activity and genetic evolution in Pinniped species, Tox Sci, 査読有, Vol. 147, 2015, pp 360-369
DOI: 1093/toxsci/kfv144

Ikenaka Y, Nakayama SMM, Oguri M, Saengtienchai A, Mizukawa H, Kobayashi J, Darwish WS, Ishizuka M, Are red gourami (*Colisa labiosa*) low xenobiotic metabolizers? Elucidation of in vivo pharmacokinetics of pyrene as a model substrate, Environmen Toxicol Pharmacol, Vol. 138, 2015, pp255-263

他9件

[学会発表](計11件)

アクソルン サエンティエンチャイ、ハリネズミは化学物質高感受性種? African hedgehog (*Atelerix albiventris*)で観察された低薬物代謝能、第43回日本毒性学会学術年会、2016年6月30日、ウインクあいち、愛知県名古屋市

近藤誉充、野生動物及び実験動物におけるグルクロン酸抱合酵素の動物種差解明、第159回日本獣医学会学術集会、2016年9月7日、日本大学生物資源科学部、神奈川県藤沢市

新屋惣、鳥類におけるグルクロン酸抱合酵素による薬物代謝、第22回日本野生動物医学学会、2016年9月17日、宮崎市民プラザ、宮崎県宮崎市

近藤誉充、UGT2B サブファミリーに着目した食肉目におけるグルクロン酸抱合能の動物種差解明、平成28年度内外環境応答・代謝酵素研究会、2016年9月17日、静岡県立大学薬学部、静岡県静岡市

池中良徳、第II相抱合反応の種差: 食肉目におけるグルクロン酸抱合酵素の進化と遺伝子構造、第24回環境化学討論会、2015年6月25日、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

Yoshinori Ikenaka, Phase II xenobiotic metabolism in carnivora-UGT activity and genome-structure in Pinniped species, 7th SETAC Africa Conference, 2015年10月6日, Langebaan, South Africa

他5件

〔その他〕

毒性学教室 HP

<http://tox.vetmed.hokudai.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

池中 良徳 (Ikenaka Yoshinori)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：40543509

(2)研究分担者

水川 葉月 (Mizukawa Hazuki)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：60612661

中山 翔太 (Shouta Nakayama)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：90647629