

平成21年 5月31日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19510069
 研究課題名（和文） 内分泌攪乱物質に応答する魚類シトクロム P450 転写調節因子群の
 クロストーク評価
 研究課題名（英文） Cross talk evaluation of fishy aryl hydrocarbon receptors that affect
 transcription of cytochrome P450 induced by endocrine disruptor
 研究代表者
 上西 由翁（KAMINISHI YOSHIO）
 鹿児島大学・水産学部・准教授
 研究者番号：60347086

研究成果の概要：

ニホンウナギ AhR 遺伝子における部分塩基配列の決定とその演繹アミノ酸配列の機能領域の解析から、ニホンウナギには少なくとも AhR1、AhR2 (α, β)、AhR3 (α, β) の5分子種の AhR 遺伝子が存在していた。リアルタイム PCR 法による解析においては、AhR1 では肝臓と心臓で、AhR2 では肝臓、心臓、腎臓で誘導的発現が見られたが、鰓で発現が抑制された。また、AhR3 ではすべての組織で高い構成的発現が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：水産環境化学

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：AhR、CYP、ウナギ、内分泌攪乱物質

1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン類や 3-メチルコラントレン (3MC) のように脂溶性が高く難分解性の物質は、生物濃縮を通して水圏生物の魚類に高濃度で蓄積する。シトクロム P450 (CYP) の中で CYP1 ファミリーは、これらの物質を水溶化して解毒する際の 1 次代謝に重要な働きをもつことが知られている。現在までに当研究室では、魚類 CYP1A, 1B, 1C 遺伝子の 16 分子種を今までにクローニングし、さらに、ニホンウナギを中心として転写調節領域の機能を調べてきた。

今までの研究成果をまとめると、3MC (あるいは類似体の β -ナフトフラボン(NF)) を魚類の腹腔内に注入すると、①それぞれの CYP1 サブファミリーは組織特異的に mRNA の発現性を示すこと、②陸上動物では報告されていない新規の CYP1C サブファミリーを魚類が有していること、③CYP1 遺伝子の転写に異物応答配列 (XRE) や興味あることに魚類ではエストロゲン受容体様様の応答配列 (ERE) の領域が関与していることを明らかにした。

CYP1 遺伝子の発現については、ダイオキシン類や 3MC のような物質が AhR (Aryl-hydrocarbon Receptor) 等とヘテロダイマーを形成し、遺伝子上の XRE に結合することで、転写を誘導していることが既にわかっている。AhR は、bHLH (basic helix-loop-helix) および PAS (Per AhR / Arnt-Sim) ドメインをもつ転写調節因子ファミリーに属し、遺伝子の転写過程において発現ネットワークを担っているといわれている。従来、地上に存在し得なかった化学物質も含め、莫大な生体外物質に限られた CYP を交通整理しながら転写させる役割を担うのが bHLH-PAS ファミリーである。

哺乳類では AhR 遺伝子は 1 種類であるのに対して、魚類では 2 分子種 (あるいは 3 分子種) の AhR1, AhR2, (AhR3) を有しているようだが、その役割等についての情報は少ない。併せて、魚類のダイオキシン類における感受性は魚種ごとに異なるといわれているが、哺乳類とは異なる AhR や CYP1 が魚類には存在するために、複数の AhR を使い分けた CYP1 の誘導的発現、すなわちクロストーク評価に関する興味を持たれる。

2. 研究の目的

シトクロム P450 (CYP) は遺伝子データベースからみて、ヒトで 56、フグで 49 の分子種をもつと推定されている。今まで地上に存在し得なかった化学物質も含め現在、何万種類もの化学物質が存在し、これらが生体外異物として体内に取り入れられた際に応答するのが多くの場合 CYP であり、莫大な生体外物質に対して、限られた CYP を交通整

理しながら転写させる役割を担うのが bHLH-PAS ファミリーに属する AhR である。

本研究では、ダイオキシン類に対して感受性が高いといわれている魚類の CYP1A, 1B1, 1C1 分子種の転写発現に、哺乳類とは異なる AhR 分子種をもつ魚類がどのように対応しているかを検討する。

これら CYP と AhR の遺伝子発現がどのような関係にあるか調べることで、最終的には多様な環境汚染物質に暴露される魚類の異物応答機構を解明・分類化できる一助になると考えている。

3. 研究の方法

(1) 試料魚および遺伝子の抽出

①試料魚として 1 尾約 250g のウナギの成魚を用いる。1 回あたりの実験には対照区、試験区ともに 3 尾のウナギを使用した。

②CYP1 および AhR 等の誘導剤として β -ナフトフラボン (NF) を使用する。誘導方法として、24 時間絶食したウナギの腹腔内に体重 1kg 当たり 100mg となるように注入する。24 時間後に肝臓、腎臓、腸、エラ等を取り出し、使用するまで -80°C で保管した。

③DNA および RNA の抽出は、Fuji 自動核酸抽出システムあるいは ISOGEN を用いて行った。標的遺伝子のクローニングでは、Total RNA から mRNA を精製し、オリゴ dT(30) を用いて cDNA を合成した。

(2) AhR 遺伝子のクローニング

①AhR1 あるいは AhR2 に共通した領域でプライマーを設計し、Degenerate PCR により部分塩基配列を得た。

②Degenerate PCR で得られた部分塩基配列をもとに、5' および 3' RACE 法 (Clontec 社) にて未知領域を増幅し、さらに増幅産物から塩基配列を求めた。

③ウナギ AhR 塩基配列から演繹アミノ酸を算出し、その相同性をヒト、マウス、鳥類、魚類と比較し、リガンド結合ドメイン内の特定アミノ酸を推定した。

(3) CYP1A, 1B1, 1C1 のプロモーター領域における転写活性に関わる応答領域の解析

ウナギ CYP1B1 および CYP1C1 の 5' 上流領域の転写調節領域を用いて、段階的にノックアウトした遺伝子-GFP 系のベクターをメダカの卵にマイクロインジェクションし、GFP をレポータージーンとして β -NF に対する XRE などの転写活性に関わる応答領域の解析を行った。

(4) 遺伝子発現量の測定

ウナギ 18S rRNA 遺伝子 (rDNA) をハウ

スキージング遺伝子として、AhR1~3 および CYP1A, 1B1, 1C1 の mRNA 発現量を RT - Real Time PCR 法で確認した。実験には SYBR Green を用いて、比較 Ct 法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) により分析した。すなわち、 ΔCt (= 標的遺伝子 / 内部標準遺伝子) で標準化した後、 $\Delta\Delta Ct$ (= 誘導区 ΔCt / 対照区 ΔCt) で算出した。

4. 研究成果

(1) ウナギ AhR 遺伝子のクローニング

① Degenerate PCR で分離された 3 分子種
既に報告されているヒト AhR、ヤツメウナギ AhR1、マダイとカダヤシの AhR1, AhR2 遺伝子配列をもとにアライメントを行い、相同性の高い bHLH と PAS ドメイン後方の領域で Degenerate PCR のために複数の縮重プライマーを設計した。Degenerate PCR では、いくつかのプライマーの組合せにより 3 つの PCR 産物を得ることができた。部分塩基配列を調べた結果、次の図のような系統関係をもった異なる 3 つの AhR 遺伝子であることがわかった。

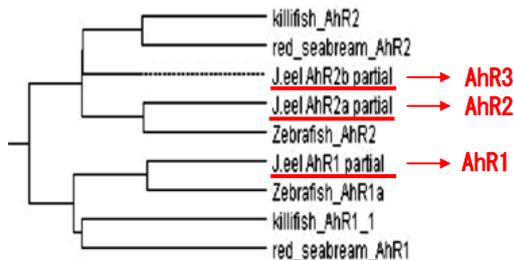


図 Degenerate PCR で得られた 3 つの AhR 遺伝子

解析した遺伝子は AhR1 と AhR2 でクラスターを形成していたが、後述するように AhR2 に属する 2 つの遺伝子(図中では a, b)には RACE PCR において、それぞれに 2 分子種が確認された。そこで今回は、分子種名の混乱を避けるために AhR1, AhR2, AhR3 と便宜上、区別して表記した。

② RACE 法による塩基配列の決定と分子種の同定

AhR1~AhR3 の部分塩基配列をもとにして 5' RACE PCR を行ったところ、次のような結果を得た。3' RACE PCR については現在、検討中である。

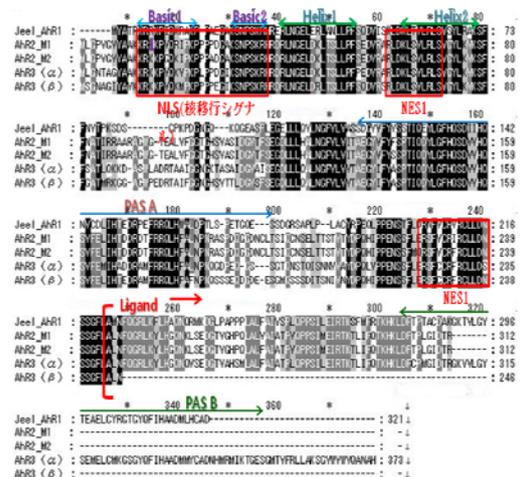
AhR1 の部分配列から 5' RACE プライマーを設計して 5' RACE PCR を行った結果、5'側の非翻訳領域 569bp を含む 1, 532bp の塩基配列が明らかになった。推定される演繹アミノ酸は 321 残基であった。

AhR2 においては、5' RACE PCR で 5'側の非翻訳領域 281bp を含む 1, 218bp の 2 つの異なる塩基配列 (α , β) を得ることができた。推定される演繹アミノ酸配列は両者ともに 312

残基であるが、アミノ酸配列で 8 残基 (塩基配列で 11 塩基) が異なっていた。

AhR3 の 5' RACE PCR において、鎖長の異なる 2 つの PCR 産物 (α , β) を得た。AhR3 (α) では、非翻訳領域 183bp を含む 1, 304bp の塩基 (373 アミノ酸残基) を示した。また、AhR3 (β) では AhR3 (α) と相同性はあるものの全く異なる 1, 033bp の配列を有していた。

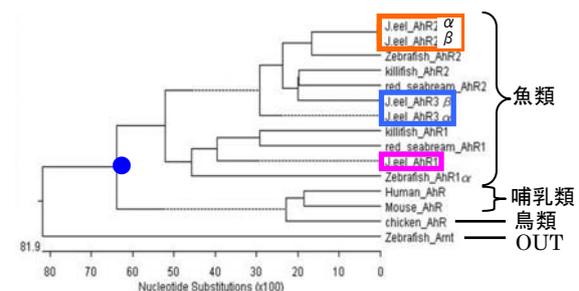
得られた演繹アミノ酸配列より機能領域を調べた結果、次のように 5 分子種のすべてにおいて AhR に特有の機能領域を有していた。



以上のように、ニホンウナギにおいては、AhR1, AhR2 (α , β), AhR3 (α , β) と少なくとも 5 分子種の AhR 遺伝子が存在していることがわかった。従来の結果では、哺乳類で AhR 遺伝子は 1 種類、魚類ではマダイやカダヤシで AhR1 と AhR2 の 2 分子種が報告されていたが、本研究ではさらに多様な AhR 遺伝子が魚類には存在していることが示された。

③ AhR アミノ酸配列の分子進化系統樹

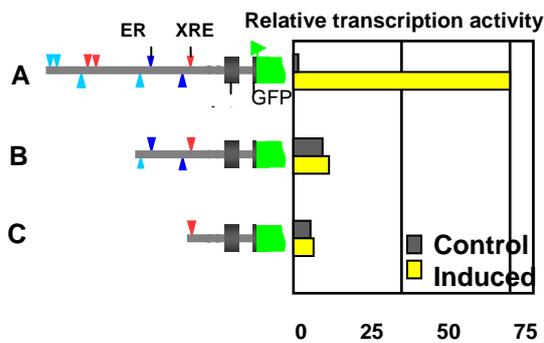
哺乳類、鳥類、魚類の AhR アミノ酸配列をもとに分子進化系統を解析した結果、AhR 遺伝子は、哺乳類と鳥類のグループと魚類のグループの共通祖先において生物種の分岐(図中の青丸)を起こしていたと思われる。その後、魚類のなかで AhR 遺伝子は多様化したと思われる。このように、生物種の分岐が先に起こったために、哺乳類では 1 種類の AhR 遺伝子しか存在しないと推察される。



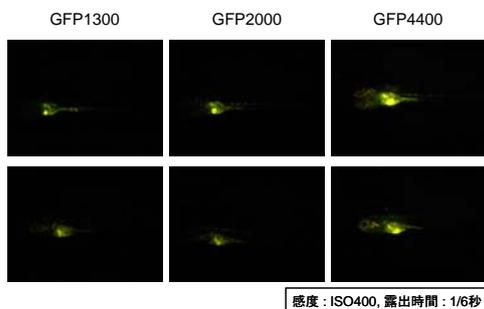
(2) CYP1A, 1B1, 1C1 のプロモーター領域における転写活性に関わる応答領域の解析

ウナギ CYP1A の転写に関しては既に報告したように、TATA box から 1600bp 上流域の XRE の欠失は転写活性を低下させ、AhR に応答する異物応答配列 XRE が転写に影響していた。

次に、ウナギ CYP1B1 遺伝子の 5' 上流域の解析を行った結果、-5189bp までに XRE 配列 6 個の存在を確認した。(A) XRE を 3 個と ERE を 1 組を含む -3400bp ~ +793bp、(B) XRE を 1 個と ERE を 1 組を含む -2100bp ~ +793bp、(C) XRE 1 個を含む -680bp ~ +793bp と、長さが異なる 3 種類の 5' 上流と GFP 遺伝子を用いて作成した DNA コンストラクトをメダカの卵に導入して、孵化したトランスジェニックメダカで薬物誘導による XRE の機能解析を行った。その結果、遠位の 2 個の XRE 配列が存在した -2100bp ~ -3400bp の領域が β -NF による誘導および構成的発現の負の制御に重要な働きを示していると思われた。



同様に、ウナギ CYP1C1 遺伝子の 5' 上流域の約 -5000bp に対しても 3 種類の GFP 融合遺伝子を作成してトランスジェニックメダカを用いて XRE の機能解析したところ、CYP1A, 1B1 よりも遠位にあたる -2000bp ~ -4000bp 付近の XRE がレポーター遺伝子の GFP の強い誘導発現に関与していることが示唆された。



このように CYP1 ファミリーの転写には異物応答配列である XRE が関与しており、これらのシスエレメントを認識し、誘導的な発現

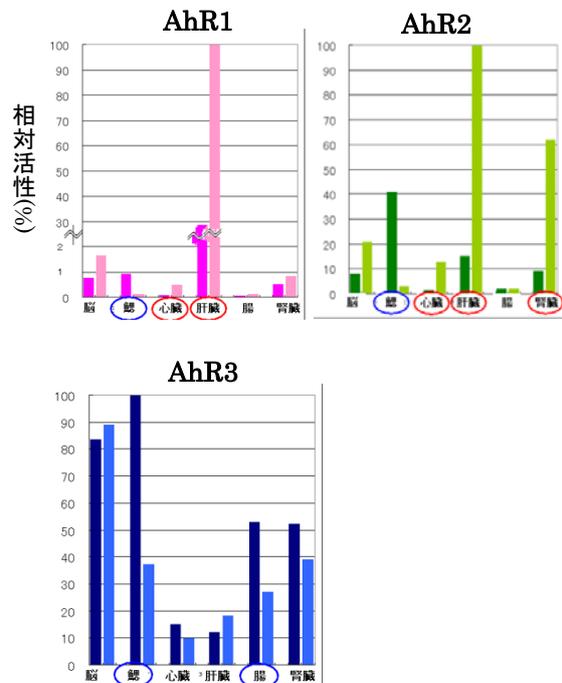
関わる AhR が重要な役割を担っていると考えられる。そこで、それぞれの AhR の転写量について、次に検討した。

(3) AhR および CYP1 遺伝子発現量の測定

二ホンウナギ、各組織（脳、鰓、心臓、肝臓、腸、腎臓）の対照区と誘導区をサンプルとして cDNA を調製し、リアルタイム PCR を行った。計算は比較 Ct 法で行ったが、それぞれの図では最大値を 100 とした相対値で表記した。

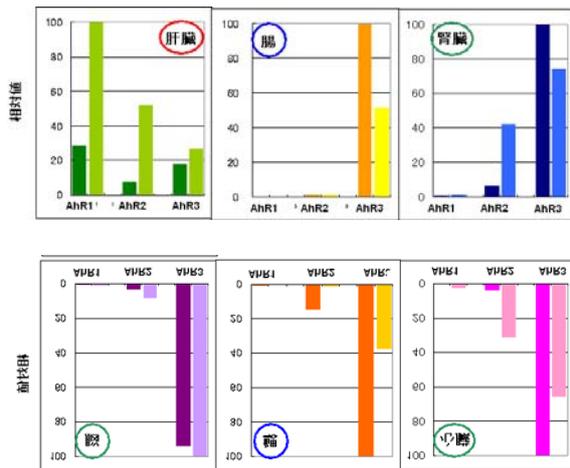
① AhR 分子種別の転写発現量

18S rRNA を内部標準にしたウナギのリアルタイム PCR を行い、脳、鰓、心臓、肝臓、腸、腎臓の 6 つの臓器から AhR の転写発現量を調べた結果、全体的に AhR3 で高い構成的がみられた。AhR1 と AhR2 では特に、肝臓で最も高い誘導発現が見られたが、他には心臓と腎臓でも誘導的な発現が確認できた。



② 組織別 AhR の転写発現量

二ホンウナギの各組織の発現を調べたところ、肝臓、腎臓、脳、心臓の AhR1 と AhR2 において誘導的な発現が見られ、特に、肝臓では AhR1 が顕著に発現していた。また、誘導的な発現が少なかった腎臓でも AhR2 では高い発現が見られた。一方、鰓や腸では、ほとんど誘導的な発現が認められず、逆に鰓ではすべての AhR1、AhR2、AhR3 で構成的（あるいは抑制的）発現を示した。



6. 研究組織

(1) 研究代表者

上西 由翁 (KAMINISHI YOSHIO)

鹿児島大学・水産学部・准教授

研究者番号：60347086

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

③ニホンウナギ CYP1 の転写活性

CYP1A, 1A9, 1B1, 1C1 に固有の塩基配列からリアルタイム PCR のプライマーを設計し、それぞれの転写活性を測定した。

AhR と同様に、各組織（脳、鰓、心臓、肝臓、腸、腎臓）の対照区と誘導区をサンプルとして転写量を測定したところ、対照区においては全ての組織においてそれぞれの CYP1 でほぼ一定の構成的発現を示していた。β-NF による誘導では、肝臓において顕著な転写量の増加が認められ、CYP1A と CYP1A9 で 100 倍以上、CYP1C1 で 12 倍であった。

過去に 3MC で誘導を行い、ノーザン・ハイブリダイゼーションで転写の増減を調べた結果では、腸においても CYP1A で誘導的な発現がみられたが、今回の β-NF では腸においてもほとんど変化がなかった。誘導物質の違いが影響していることが示唆されたが、さらに追試で確認する必要がある。

このようにリアルタイム PCR における結果では、β-NF の存在下において AhR1 あるいは AhR2 が肝臓における CYP1 の誘導的な発現に関与していたと思われる。また、AhR3 は、全ての組織において強い構成的発現を持っていることや誘導剤の存在で抑制的に働くことから、CYP1 や AhR1, 2 の初期の段階での誘導的な発現に関与している可能性も示唆された。

以上の研究成果を取りまとめて、近いうちに投稿する予定でいる。

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 1 件)

李 同哲 (研究指導の大学院生) : ニホンウナギ AhR の cDNA クローニングとリアルタイム PCR を用いた遺伝子発現の分析、2008 年度鹿児島大学水産学部修士論文