

機関番号：33910

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510069

研究課題名（和文）解毒代謝経路の探求 —経路で働く新規遺伝子の発見とその機能解析

研究課題名（英文）Exploration for a Detox Pathway —Discovery and Characterization of New Genes in the Pathway

研究代表者

三輪 錠司 (MIWA JOHJI)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：80321686

研究成果の概要（和文）：私たちは日常幾多の有害物質に曝されている。また生体内では代謝によって活性酸素などの有害物質が必然的に生成されている。これらは解毒酵素によって無害化され体外へ排泄される。本研究の目的は有害物質が体内で無毒化されていく経路を分子レベルで解明することである。モデル動物 *C. elegans* を使った実験の結果、XREP-1/XREP-3 が無毒化に極めて重要な働きをしていることを発見した。XREP-1/XREP-3 は、ヒトなどの Keap1/Nfr2 と酷似しており、*C. elegans* での結果はヒトにも当てはまると期待できる。

研究成果の概要（英文）：We are constantly exposed to harmful substances from foods and environments. Besides, our body also produces such metabolites quite unkind to our own tissues, cells, and genetic materials as reactive oxygen species. We do have innate defense systems, however, against these assaults. One of them involves a detoxifying (detox) enzyme system, where harmful substances are first recognized, captured, transformed, and finally expelled outside the body. We explored this system using the model animal *C. elegans* and have found that an XREP-1/XREP-3 pair plays a vital role in the detox system. XREP-1 functions as a sensor to recognize harmful substances and XREP-3 as a processor to initiate the production of detox enzymes. This pair resembles the mammalian Keap1/Nfr2 pair, indicating that a similar system is working in the human body.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：トキシコロジー、生体異物代謝

1. 研究開始当初の背景

食品中に含まれる有害物質アクリルアミドは神経毒性や発癌性を有し、また組織や細胞に損傷を与えて動物の寿命を短くしている。体内に取り込まれたアクリルアミドを解毒する役割を果たしているのが、グルタチオ

ン S-トランスフェラーゼ (GST) やグルクロン酸転移酵素 (UGT) といった解毒代謝酵素である。これら酵素はヒトを含む生物に広く共通した生体防衛機構を形成しており、様々な有害物質を解毒代謝する役割を果たしている。しかし、生体内に取り込まれた有害物

質を検出するセンサー（生体異物レセプター）から、解毒代謝酵素を発現誘導させるまでの経路については、不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、モデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans*（以下、線虫）を用いて、有害物質に応答して発現する GST の発現経路を個体、細胞および分子レベルで明らかにしてゆくことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) GST の発現を GFP (Green Fluorescence Protein) の蛍光で視覚化させた組み換え体線虫から、GST 発現に異常が起こった変異体を多数分離した (図 1)。

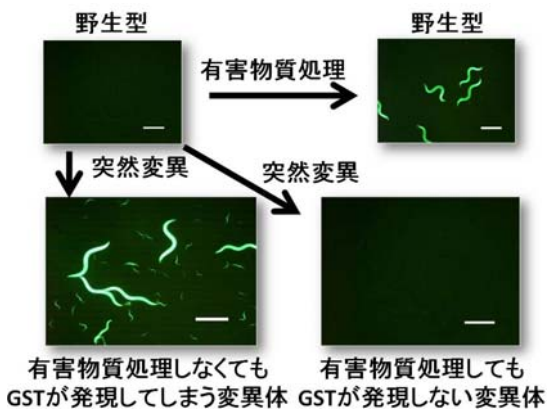


図 1. GST のひとつ GST-4 の発現を緑色蛍光で視覚化した線虫。野生型株は、有害物質に応答して GFP の蛍光を発する。この株をもとに、有害物質処理しなくても蛍光を発する株、有害物質処理しても蛍光を発しない株、の 2 種類の異常発現パターンを示す変異体を分離した。スケールバーは 500 μm 。

(2) 分離した変異体を相補性試験により遺伝子グループに分け、原因遺伝子を同定した。同定した遺伝子の働きについて、個体、細胞、分子レベルで調査をおこなった。

4. 研究成果

(1) GST の発現を GFP の蛍光で視覚化した組み換え体線虫は、ふだん有害物質が無いばあい、GST の発現が見られない。有害物質を処理すると、GST 発現が誘導され、体全体から蛍光を発するようになる。この組み換え体線虫から、GST 発現に異常を起こした変異体を独立に 23 株分離し、4 つの遺伝子グループ *xrep* (*xenobiotics response pathways*) *-1* (16 株), *-2* (5 株), *-3* (1 株), *-4* (1 株) に分けることができた。変異体 *xrep-1* と *xrep-3* は、有害物質が無くても体全体で GST を発現

してしまう異常表現型を示し、*xrep-2* は、有害物質が無くても筋肉で GST を発現してしまう異常表現型を示した。また、*xrep-4* は、有害物質を処理しても GST 発現が見られない異常表現型を示した。この研究成果により、はじめて動物個体レベルで解毒酵素の発現メカニズムを調べることができるようになった。

(2) 異株間の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) を利用した SNP マッピング法、およびレスキュー法により、*xrep-1* は WD リピートタンパクをコードする遺伝子であることがわかった。XREP-1 は体全体で発現しており、通常は GST の発現を抑制しているが、有害物質が生体内に入ってくると、抑制を解き、GST を発現させる働きを持つことがわかった (図 2)。解毒代謝経路の解明という、非常にインパクトの大きな分野であるため、世界中の研究グループからも関連した研究成果が発表されつつあった (現在もそうである)。しかし、遺伝学的手法を採用した本研究は、特定の遺伝子を予め想定する必要のない独創的な方法論を展開しており、新規遺伝子を発見できる確立は非常に高い。

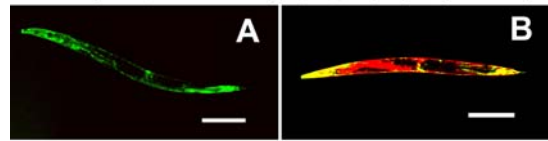


図 2. XREP-1 の発現を緑色蛍光で、GST-4 の発現を赤色蛍光で視覚化した線虫。(A) 有害物質が無いとき、XREP-1 は GST の発現を抑制しているが、(B) 有害物質で処理するとその抑制がはずれて、体全体で GST を発現させる。スケールバーは 50 μm 。

(3) XREP-1 によって発現制御されているターゲット遺伝子を発見するために、GeneChip を用いた網羅的解析をおこなった。RNAi 法により *xrep-1* の働きをノックダウンさせた場合、有害物質が無くても GST や UGT といった非常に多くの解毒代謝酵素の発現が誘導されることがわかった。それら解毒代謝酵素を蛍光タンパク質で標識した組み換え体線虫株を用いても、個体レベルで同様に発現が誘導されることが確認できた。

(4) SNP マッピング法およびレスキュー法により、*xrep-3* は塩基性ロイジンジッパー型転写因子をコードする遺伝子であることがわかった。XREP-3 は、有害物質の存在下で GST や UGT の発現を誘導する働きを持ち、RNAi 法により *xrep-3* の働きをノックダウンすると、

有害物質による GST 発現誘導も阻害される (図 3)。また、*xrep-1* 変異による GST 発現誘導も、*xrep-3* をノックダウンすることで阻害できた。したがって、XREP-3 は XREP-1 の下流で働いていることがわかった。XREP-1/XREP-3 ペアは、ヒトなどの Keap1/Nrf2 ペアと酷似しており、今後線虫で明らかとなる解毒代謝経路は、ヒトにも当てはまると期待できる。

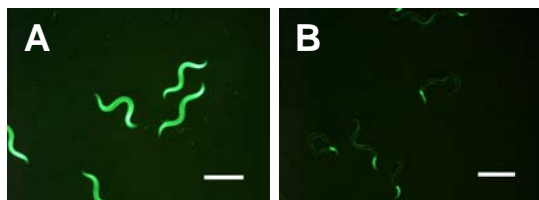


図 3. GST-4 の発現を緑色蛍光で標識した線虫。(A) GST は有害物質で処理すると発現誘導される。(B) *xrep-3* をノックダウンさせると、有害物質による GST 発現誘導も阻害される。ただし、咽頭筋と体壁筋での発現は阻害されない。スケールバーは 500 μm 。

(5) ある一定濃度のアクリルアミドを、一定時間だけ線虫に処理したばあい、悪影響なく GST の発現を誘導させる効果がある。このようなアクリルアミド処理をした線虫は、農薬アルジカルブに対する耐性が付与された。さらにこの反応は、XREP-1/XREP-3 の経路を介する反応であることもわかった。摂取する量および時間をコントロールすれば、食品有害物質アクリルアミドも有益物質としての効能をもつ。すなわち、毒と薬は紙一重であり、摂取量を変えるだけで毒にも薬にもなるのである。

(6) 線虫を用いた分子遺伝学的手法により、解毒代謝経路で働く新規遺伝子を発見し、それらが経路上どのような役割を果たしているのか、さらに経路の反応が動物個体レベルにどう反映されるのかを詳細に調べることができた。また、これら線虫遺伝子ペアと相似関係にある遺伝子ペアがヒトにも存在し、同様に解毒代謝経路で働くこともわかった。すなわち、線虫を用いた本研究によってヒトを含む動物の解毒代謝経路を解明してゆくための基盤が確立されたと考える。

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 8 件)

- ① 三輪錠司、長谷川浩一、毒即是薬 薬即是毒 —ホルメティック回路による生体

防衛、生物の科学、査読無、1月号、2011、98-104、

- ② 三輪錠司、毒と薬は紙一重 —ホルメティック食品—、青淵、査読無、11月号、2010、12-14
- ③ Koichi Hasegawa, Johji Miwa, Genetic and cellular characterization of *Caenorhabditis elegans* mutants abnormal in the regulation of many phase II enzymes, PLoS ONE、査読有、Vol. 5、2010、e11194
- ④ Koichi Hasegawa, Satsuki Miwa, Kaname Tsutsumiuchi, Johji Miwa, Allyl isothiocyanate that induces GST and UGT expression confers oxidative stress resistance on *C. elegans*, as demonstrated by nematode biosensor, PLoS ONE、査読有、Vol. 5、2010、e9267

[学会発表] (計 17 件)

- ① 三輪錠司、線虫学が *C. elegans* を取り込む日を目指して、第 55 回日本応用動物昆虫学会大会、2011 年 3 月 29 日、九州大学 (福岡市)
- ② Koichi Hasegawa, Johji Miwa, Acrylamide confers aldicarb resistance on *Caenorhabditis elegans* via the XREP-1/SKN-1 system、第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 9 日、神戸国際展示場 (神戸市)
- ③ Koichi Hasegawa, Johji Miwa, Genetic characterization of mutants in xenobiotics response pathways, The 4th Ease Asia *C. elegans* Meeting、2010 年 7 月 12 日、国立オリンピック記念青少年総合センター (東京都)

[図書] (計 2 件)

- ① Koichi Hasegawa, Johji Miwa, Springer, Pine Wilt Disease、2008、Embryology and Cytology of *Bursaphelenchus xylophilus*, pp 81-104 (全 459 ページ)
- ② Koichi Hasegawa, Johji Miwa, Springer, Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystem、2008、Developmental Biology and Cytogenetics of *Bursaphelenchus xylophilus*, pp 91-100 (全 405 ページ)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 1 件)

名称：線虫を用いたタンパク質の生産方法
発明者：三輪錠司、長谷川浩一
権利者：中部大学
種類：特許
番号：特願 2008-304499
出願年月日：2008 年 11 月 28 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
http://stu.isc.chubu.ac.jp/bio/public/Environ_Bio/lab/miwa_lab/top.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三輪 錠司 (MIWA JOHJI)
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号：80321686

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し