

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15848

研究課題名（和文）被子植物の多様化に適応した鳥類と哺乳類の異物代謝系の収斂進化の検証

研究課題名（英文）The convergent evolution of metabolic systems in birds and mammals for adaptation to diversification of flowering plants

研究代表者

川合 佑典（Kawai, Yusuke）

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：10709546

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では鳥類と哺乳類における薬物代謝に関わるグルクロン酸抱合酵素（UGT）遺伝子の進化史を明らかにすることを目的として、哺乳類でのUGT遺伝子の分子進化解析、およびニワトリを鳥類のモデル動物としたUGT遺伝子の誘導、抱合活性測定、タンパク質の異種発現を行った。本研究の結果から被子植物の出現以前に存在した多環芳香族炭化水素などの化学物質への反応は哺乳類、鳥類で維持されていること、被子植物の出現が特に有胎盤類UGT2Bサブファミリーの出現と多様化に大きく影響を与えたことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究で植物由来の化学物質に曝露される可能性が低い肉食動物はグルクロン酸抱合酵素（UGT）遺伝子の数が少なくグルクロン酸抱合活性が低いなど、食性と異物代謝能に関連があることが示唆されてきた。本研究ではこれまでの研究を被子植物の出現という視点で拡張させることで、鳥類および有胎盤類と有袋類が被子植物の出現と多様化に対し異なるUGT遺伝子を用いて適応している可能性を示した。またニワトリUGTの分子種ごとにその抱合活性測定を行い哺乳類UGTと比較できる環境を整えたことは発展性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify the evolutionary history of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) involved in the xenobiotic metabolism in birds and mammals, we analyzed the molecular evolution of UGT genes in mammals and used chickens as avian models to induce UGT genes, measure glucuronide conjugation activity, and express the UGT isozymes in yeast cells. The results of this study suggest that responses to chemicals such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) that existed before the emergence of flowering plants are maintained in mammals and birds, and that the emergence of flowering plants has greatly influenced the emergence and diversification of eutherian UGT2B genes in particular.

研究分野：獣医毒性学

キーワード：グルクロン酸抱合酵素 UGT 異物代謝 鳥類

## 1. 研究開始当初の背景

毒性化学物質を無毒化し体外に排泄するためのシステムである異物代謝系を生物は保有している。異物代謝系の異物代謝系の第 II 相反応に関わるグルクロン酸抱合反応ではグルクロン酸抱合酵素(UGT)が外来化学物質にグルクロン酸を抱合し水溶性を高めることで排泄を促進する。これまでの研究によって、哺乳類のグルクロン酸抱合反応が食性の影響を受けて進化していることが示唆されていた (Shrestha et al. PLoS One 2011)。申請者らも、グルクロン酸抱合と食性の関係に注目し、哺乳類、鳥類ともに肉食性の動物で医薬品へのグルクロン酸抱合活性が弱く、植物食・雑食性の動物ではグルクロン酸抱合活性が強い傾向にあることを明らかにしていた (Kawai et al. Comp Biochem Physiol C 2019)。これらの研究は、植物を食べない肉食性の動物では植物由来の化学物質を代謝する必要がなくなり、不要になった UGT 遺伝子が偽遺伝子化や遺伝子欠損によって失われ、グルクロン酸抱合活性が低下しているという視点で行なわれたものであった。哺乳類と鳥類では食性とグルクロン酸抱合の関係に類似点が見られる一方で、鳥類 UGT 遺伝子スーパーファミリーを網羅的に解析し哺乳類と比較すると、哺乳類では UGT1A サブファミリーと UGT2B サブファミリーが主に異物代謝に関わる一方で、鳥類では UGT1E サブファミリーのみが異物代謝に関わっている可能性が高く、UGT 遺伝子の哺乳類と鳥類での独自進化の傾向が明らかとなった (Kawai et al. PLoS One 2018)。

## 2. 研究の目的

哺乳類で UGT1 および UGT2 ファミリーが異物代謝に関わり、鳥類では UGT1 ファミリーのみが異物代謝に関わる違いが見られたことから、申請者は被子植物の出現と多様化に注目した。被子植物は現在の植物種の大半を占める分類群であり、様々な植物由来化学物質の源となっている (Walling J Plant Growth Regul 2000)。植物食の動物はこれら化学物質から生体を防御する必要がある。被子植物の出現と多様化は哺乳類と鳥類が分岐した後、起こったイベントであることから (Soltis et al. Proc R Soc Lond b 2019)、哺乳類と鳥類は被子植物の化学物質に独立して適応したことになる。本研究では、「被子植物の出現と多様化に対し、哺乳類と鳥類の異物代謝系が収斂進化した」という仮説をたて、その検証を試みる。

## 3. 研究の方法

仮説の検証のため、[1]公開ゲノム情報を用い、哺乳類 UGT1 ファミリーおよび UGT2 ファミリーを網羅的に調べ、特に鳥類との違いの一つである UGT2B サブファミリーの出現に注目し解析を行った。また鳥類のモデル動物としてニワトリを用い、[2-1]哺乳類では Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) を介して UGT1A1、UGT1A6 など誘導することが知られている sudan III を経口投与し、鳥類において UGT の誘導が起こるか確認した。さらに[2-2] sudan III を投与したニワトリの肝臓で化学物質の抱合活性が亢進するか検討した。また[2-3] 酵母細胞を用いて、ニワトリ UGT の各アイソザイムの異種発現を行った。

## 4. 研究成果

### 4 - 1 - 1. 哺乳類 UGT2B サブファミリーは有胎盤類において出現し多様化した

単孔類、有袋類、有胎盤類を含む哺乳類 67 種の公開ゲノムデータベースを BLAST により探索し、UGT1 ファミリー、および UGT2 ファミリーの系統推定および淘汰圧推定を行った。その結果、哺乳類において有胎盤類の系統でヒトやマウスで異物代謝に関わると考えられている UGT2B が出現、各系統で多様化したことが示された。

染色体上の位置関係およびエキソン構造を調べた結果、UGT1 ファミリーでは哺乳類、鳥類ともにアイソザイム間で第 2-第 5 エキソンが共通し、第 1 エキシンの違いがアイソザイムの違いとなる遺伝子構造を共有していた (図 1)。UGT2 ファミリーでは鳥類、単孔類、有袋類においてアイソザイム間で共通の第 2-第 6 エキソンを持ち、第 1 エキシンの違いがアイソザイムの違いとなる遺伝子構造を維持していた一方で、有胎盤類において一部のアイソザイムでは第 2-第 6 エキソンがまとまって遺伝子重複し、数を増減させていた (図 1)。

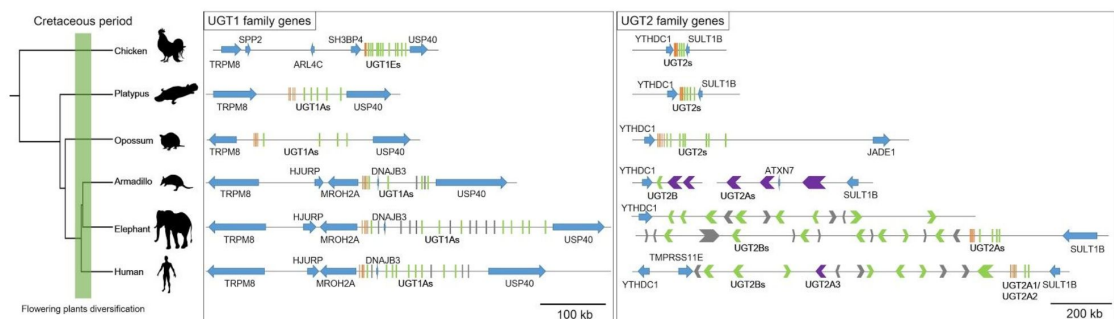


図 1. 哺乳類の主要な分岐に対応した種と UGT1 ファミリーおよび UGT2 ファミリーのエキソン構造。バリエーションによりアイソザイムを構成する第 1 エキシソンを緑色の四角で、各アイソザ

イムで共通の第 2 エキソン以下を橙色の四角で示す。アイソザイムごとにすべてのエキソンが異なる UGT2 遺伝子を矢頭 (紫色 : UGT2A、緑色 : UGT2B) で示す。

4 - 1 - 2. UGT2B 遺伝子数は食性の影響を受け、一部植物食の動物で正の淘汰を受けている UGT1A1 グループ、UGT1A2-UGT1A5 グループ、UGT1A6 グループ、UGT1A7-UGT1A10 グループ、有袋類 UGT2 グループ、UGT2A グループ、および UGT2B グループにおいて、各食性における遺伝子数を比較したところ、UGT2B グループでのみ肉食と雑・植物食間で遺伝子数に有意な差があった。また植物食の有袋類 UGT2 遺伝子および有胎盤類の UGT2B 遺伝子においては一部、正の淘汰が起こっていたことが検出された。

哺乳類の公開ゲノムデータベースの解析からは、有胎盤類の系統において UGT2B 遺伝子が発見しその遺伝子数の多様化が食性の影響を受け起きたことが示された、また有袋類の系統では UGT2 ファミリーが鳥類と同様の遺伝子構造を維持しつつ遺伝子数の多様化が食性の影響を受け起きていることが示唆された。有袋類と有胎盤類は被子植物の出現以前に分岐していることから、これらの結果は、被子植物の影響を受けて動物の UGT 遺伝子が独自に同様の進化をするという仮説を支持するものであった。

#### 4 - 2 - 1. AhR を介すると考えられる UGT 遺伝子の誘導

Sudan III を経口投与したニワトリの肝臓では UGT1E8、UGT1E7、UGT2-1 の mRNA 発現量が最高濃度でそれぞれ 9.1 倍、2.2 倍、1.5 倍と有意に増加した (図 2)。また小腸においては UGT1E8、UGT1E7 が最高濃度で 2.1 倍、1.5 倍、有意に増加した (図 3)。

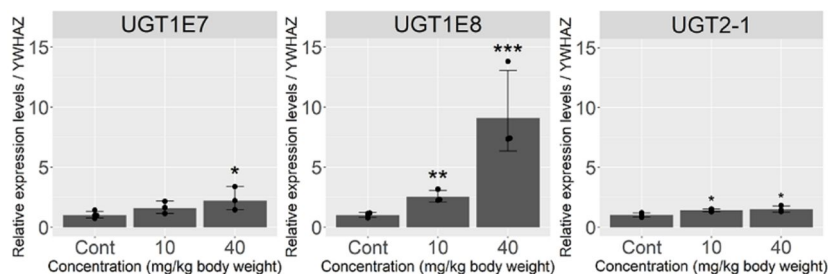


図 2. Sudan III 経口投与による肝臓における UGT1E7、UGT1E8、UGT2-1 の mRNA 発現量変動。コントロール群を 1 としたときの相対発現量を示す。各群 4 個体を用い Dunnett 検定により多重比較を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

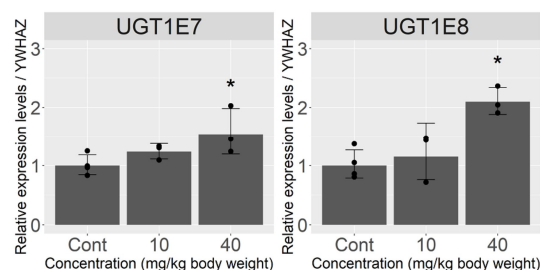


図 3. Sudan III 経口投与による小腸における UGT1E7、UGT1E8 の mRNA 発現量変動。コントロール群を 1 としたときの相対発現量を示す。各群 4 個体を用い Dunnett 検定により多重比較を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

#### 4 - 2 - 2. Sudan III を経口投与したニワトリ肝臓での 4-MU 抱合活性の亢進

Sudan III を経口投与したニワトリの肝臓を用いてマイクロソームを調製し、一般的 UGT の基質として用いられる 4-メチルウンベリフェロン(4-MU)の抱合活性を測定した。コントロール群と比較して、sudan III 投与群の 4-MU 抱合活性は有意に亢進した (図 4)。

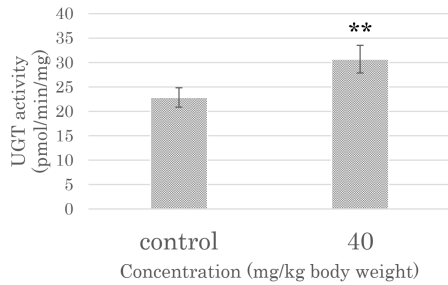


図 4. ニワトリ肝臓ミクロソームを用いた 4-MU 抱合活性の測定。コントロール群( コーン油投与群)と sudan III を 40 mg/kg body weight で経口投与した群の肝臓ミクロソームを用い(N=4)、4-MU の抱合活性を測定した値を示す。比較は t 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

#### 4 - 2 - 3

公開ゲノムデータベースをもとにニワトリが持つと考えられる UGT1 ファミリーおよび UGT2 ファミリー遺伝子について全アイソザイムを酵母細胞で異種発現した。各種 UGT アイソザイムについて 4-MU への抱合活性を測定したところ UGT1E4、UGT1E6、UGT1E8、UGT1E10、UGT1E11、UGT1E13、UGT1E14、UGT2-1、UGT2-2 について活性が確認された。

ニワトリを用いた投与実験により、哺乳類と同様に一部の UGT ファミリーは AhR を介した誘導を受けていることが示唆された。AhR は多環芳香族炭化水素等、燃焼に伴い生じる化学物質を認識する受容体である。多環芳香族炭化水素は、鳥類、哺乳類の共通祖先も曝露されていた可能性が高いことから、AhR を介した誘導は共通祖先から維持されてきたことが考えられる。またニワトリを用いた投与実験および、酵母を用いたニワトリ UGT 遺伝子の異種発現により sudan III 投与によってニワトリの UGT1E8 が大きく誘導され、肝臓での 4-MU の代謝に影響を与えていることが示唆された。本研究により得られた酵母発現 UGT タンパク質と *in vivo* 誘導実験を組み合わせることでニワトリにおける薬物代謝の理解が進むことが期待できる。

#### 4 - 3 まとめ

本研究により、哺乳類と鳥類の UGT の進化史において、被子植物の出現が重要な役割を果たしたことが示唆された。また本研究によってニワトリ UGT の酵母発現タンパク質が得られた。これら酵母発現タンパク質を使用し、被子植物由来の化学物質への抱合活性測定を行うことで、鳥類と哺乳類の異物代謝の進化と植物進化の関係についてさらなる理解が得られると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川合佑典
2. 発表標題 鳥類における異物代謝遺伝子（シトクロムP450, グルクロン酸抱合酵素）の種差と進化
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川合佑典、池中良徳、中山翔太、久保田彰、石塚真由美
2. 発表標題 ゲノムデータベースを利用した脊椎動物がもつグルクロン酸抱合遺伝子の進化解析
3. 学会等名 第23回環境ホルモン学会研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	生城 真一  (Ikushiro Shinichi)  (50244679)	富山県立大学・工学部生物工学科・教授   (23201)	
研究協力者	池中 良徳  (Ikenaka Yoshinori)  (40543509)	北海道大学・獣医学研究院・教授   (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------