

機関番号：14501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21780125
 研究課題名（和文） メタボローム解析によるアリール炭化水素受容体依存的な生体内代謝変動の評価
 研究課題名（英文） Metabolomics-based evaluation of aryl-hydrocarbon receptor-dependent variation of metabolites
 研究代表者
 西海 信 (NISHIUMI SHIN)
 神戸大学・医学研究科・特命助教
 研究者番号：20514706

研究成果の概要（和文）：アリール炭化水素受容体（AhR）はリガンドが結合することにより活性化され、その結果として様々な遺伝子を制御することが知られているものの、その生体機能は明らかにされていない。そこで、生体内代謝物を網羅的に解析するメタボローム解析により、AhR が生体にどのような影響を与えるか検討した。その結果、AhR が活性化することにより、様々な生体内代謝物が変動すること、さらに、AhR 発現の有無によっても代謝物プロファイルが異なることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is known to be activated by its ligands, resulting in regulation of various genes. However, the biological functions of AhR have been not elucidated yet. Therefore, the influence of AhR on the biological functions was investigated by the metabolome analysis, which is the comprehensive analysis of metabolites. As a result, it was demonstrated that the activation of AhR leads to alteration of various metabolites. In addition, it was found that the metabolite profile is different between the presence and absence of AhR expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：アリール炭化水素受容体、メタボローム解析、代謝物

1. 研究開始当初の背景

アリール炭化水素受容体（AhR）は様々な組織において、その細胞内の細胞質で hsp90、p23、XAP2 と呼ばれるタンパク質と複合体を形成して存在しており、AhR のリガンドが AhR に結合することにより、AhR は核内に移行する。核内で AhR は AhR 輸送担体（Arnt）と呼

ばれるタンパク質とヘテロダイマーを形成し、それが転写因子として DNA に結合することで様々な遺伝子の発現を制御する (Denison et al., J Biol Chem. 1986, 261, 10189-10195; Elferink et al., J Biol Chem. 1990, 265, 20708-20712)。このリガンドの AhR への結合による一連の反応は AhR の形質

転換と呼ばれている。AhR は別名ダイオキシン受容体とも言われ、ダイオキシン類の毒性は、このAhRの形質転換を介して誘導されることが明らかにされている (Fernandez-Salguero et al., *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996, 140, 173-179)。研究代表者もまた、ダイオキシン類のひとつである2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシン (TCDD) が細胞内で代謝異常を引き起こし、その結果、インスリン抵抗性や体重減少を誘発する消耗性症候群を引き起こすことを確認している。さらに、AhRの形質転換が細胞内の代謝反応で中心的な役割を担うリン酸化シグナル伝達経路、例えば、分裂促進因子活性化タンパク質リン酸化酵素経路に影響を与えることも最近の研究で明らかにされつつある (Henklová P et al., *Chem Biol Interact.* 2008, 172, 93-104)。また、AhR遺伝子欠損マウスを用いた研究により、AhRは免疫機能や生殖機能に関与することが示された (Fernandez-Salguero et al., *Science* 1995; Abbott et al., *Toxicol Appl Pharmacol* 1999)。AhR遺伝子欠損マウスは血管の繊維化や肝臓中の脂質蓄積、そして大腸がん等を発症することも明らかにされている (Fernandez-Salguero et al., *Science* 1995; Schmidt et al., *PNAS*1996)。このことは、AhRは生体内の恒常性維持に大きく関わっており、その機能にはAhRの生体内リガンドの関与が大きいと思われる。生体内代謝の制御が生体内恒常性維持につながることから、AhRの外因性リガンドによる、ならびにAhR遺伝子欠損によるAhRの機能不全は代謝異常につながるが大いに予想される。しかしながら、AhR外因性リガンドがAhRの形質転換を介してどのような代謝異常を誘導し、また、毒性が発揮するのかなどの詳細についてはほとんど知られていない。これらの解析を実施するためには、現在まで用いてきた分子生物学的手法に加えて、代謝産物を網羅的に解析する必要があると着想した。

研究代表者はまた、化学構造の異なる様々な食用植物成分がダイオキシン類のAhRの形質転換を制御することができ、さらに、その抑制機構も多様に存在することを見出した。また、動物個体レベルにおいても食用植物成分によるAhR形質転換抑制効果を確認している。そこで、AhRの外因性リガンドが引き起こす細胞内の代謝異常に対して食用植物成分がどのように影響するのかを動物モデルを用いたメタボローム解析により検討し、AhR形質転換抑制機構と代謝異常への作用との関係性について明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、AhRの外因性リガンドにより誘導される細胞内代謝産物を、メタボローム

解析により網羅的に解析した。さらに、その代謝産物の産生がAhR依存性であるのか否かについて比較検討を行うことで、AhRを起点とした生体内代謝制御機構について明らかにする。また、これまでに同定してきた様々なAhRの形質転換制御因子が、AhR外因性リガンド特異的な代謝産物の変動に対しどのような影響を与えるのかを明らかにすることで、AhRの形質転換抑制機構と代謝産物との関係性について検討した。さらに、AhRの外因性リガンドによる代謝産物の産生経路に関わる酵素を同定することでその代謝産物産生経路を明らかにし、その産生経路とAhRの形質転換との関連について検討することで、AhRの形質転換抑制成分の作用部位を同定することを試みた。

3. 研究の方法

(1) メタボローム解析によるAhR依存性代謝産物の変動についての検討

①メタボローム解析システムの確立

AhRの外因性リガンドが侵入した細胞においては、代謝異常が引き起こされることで様々な代謝産物が変動することが予想される。そこで、AhR遺伝子欠損培養細胞株、およびその野生型細胞株を用いてAhRの外因性リガンドにより誘導される受容体特異的、ならびに、非特異的代謝産物について検討した。

具体的には、AhR遺伝子欠損培養細胞株とその野生型細胞株からそれぞれ、低分子代謝産物を抽出する。また、各細胞株について、AhRの外因性リガンド処理群を設定する。抽出された代謝産物を用いてガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) による測定を実施した。各群において、クロマトグラムの結果を比較解析することで、AhR依存性なピークならびにAhRの外因性リガンド依存性なピークを見出し、そのピークに帰属する化合物の決定をGC/MSのライブラリー検索により実施した。このような実験により、GCMSによるメタボローム解析システムの確立を試みた。

②マウスを用いたメタボローム解析

次に、免疫機能や生殖機能の低下、血管の繊維化、肝臓中の脂質蓄積

(Fernandez-Salguero et al., *Science* 1995; Abbott et al., *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; Schmidt et al., *PNAS* 1996) などの表現形を示すことが知られているAhR遺伝子欠損マウスを用いてメタボローム解析を実施した。

具体的には、AhR遺伝子欠損マウス、ならびに、その野生型マウスであるC57BL/6マウスを組織学的検討や免疫学的検討を行い、AhR遺伝子欠損マウスの表現形として知られている免疫機能の低下や肝臓中脂質含量の低下について確認を行った。また、各マウス

について AhR リガンドを投与する群を設定し、上記と同様に組織学的検討や免疫学的検討を実施した。続いて、各群マウスから血清や組織を摘出し、低分子代謝産物を抽出した。

(1) -①で確立した GCMS によるメタボローム解析システムを実施することで、代謝産物の変動について検討し、AhR、ならびに、AhR リガンドにより制御されている代謝経路について評価した。

(2) メタボローム解析による AhR の形質転換制御成分の作用部位についての検討

①AhR 形質転換制御成分の代謝産物の変動に与える影響との相関性の主成分分析による検討

研究代表者はこれまでに、様々な化学構造の異なる食用植物成分が AhR の形質転換を制御できることから、AhR の形質転換制御機構も多様に存在すると想定してきた。これら多様に存在する AhR の形質転換制御成分による作用機序を検討するため、様々な AhR 形質転換抑制成分を、AhR リガンドとともに作用させ、網羅的メタボローム解析を実施した。

具体的には、C57BL/6 マウスにこれまでに研究代表者が明らかにした AhR の形質転換制御成分を投与した後に、AhR の外因性リガンドを投与し、血清を採取した。血清中から低分子代謝産物を抽出し、GC/MS による測定を実施した。得られたクロマトグラムを主成分分析により比較解析を行う。その結果より、AhR リガンド特異的な代謝産物の変動パターンを検討した。さらには、AhR 形質転換制御成分を加えることによる AhR 外因性リガンド特異的な代謝産物の変動パターンの制御を確認し、その制御パターンと AhR リガンドの化学構造との相関性について評価した。

②AhR 形質転換制御成分の代謝産物産生経路への作用部位の決定

上記 (2) -①で得られた GC/MS によるクロマトグラムの結果から、AhR 形質転換制御成分の作用部位について明らかし、AhR 形質転換制御成分の化学構造と作用部位との関係性について評価した。

4. 研究成果

AhR は、様々な組織に発現しているが、その生体機能はほとんど明らかとされていない。AhR のリガンドとしては、環境汚染物質であるダイオキシン類やタバコの煙に含まれる芳香族炭化水素などの外因性の化合物がよく知られているものの、その生体内リガンドについての情報もほとんどないのが現状である。本研究では、細胞内代謝産物を網羅的に、かつ包括的に解析するメタボローム解析を実施することにより、AhR リガンドによ

る毒性発現機構を細胞内代謝の観点から検討した。はじめに、AhR 発現培養細胞株と AhR 欠損培養細胞株を用いた検討により、GCMS によるメタボローム解析におけるサンプル前処理方法、GCMS 測定条件、GCMS 測定データ処理方法を確立した。さらに、AhR 欠損培養細胞株を用いた実験において、AhR の活性化を介して変動する生体内代謝産物を数種同定した。そこで、この GCMS メタボローム解析システムを用いて、次に、マウス実験を実施した。

C57BL/6 マウスに AhR のリガンドである 3-メチルコランスレンを腹腔内投与し、肝臓、ならびに、血清を回収した。続いて、それらから生体内代謝産物を抽出し、質量分析計を用いたメタボローム解析を実施した。その結果、アスパラギン酸やグルタミン酸など様々なアミノ酸が 3-メチルコランスレン処理により増加することが明らかとなった。また、クエン酸回路に関与するフマル酸やリンゴ酸の増加も確認できた。一方、エネルギー産生の源となりうる糖に関しては、3-メチルコランスレン処理により減少するという予備実験データを得ることができた。これらの結果は、AhR リガンドが生体に作用することで、エネルギー産生に関わる代謝経路が変動していることを示唆している。

このメタボローム解析の結果から、AhR の形質転換が肝臓において毒性発現に寄与する可能性を見出したことから、次に、AhR の外因性リガンドを C57BL/6 マウスに投与し、マウスの病態について評価した。その結果、AhR の外因性リガンドによる AhR の形質転換は、肝臓の脂肪化を誘発することを見出した。この結果は、AhR の形質転換により肝臓中代謝物プロファイルが変動し、その結果、脂溶性代謝物である脂質の肝臓内での蓄積が誘発された可能性を示唆している。

また、AhR が関係する疾患について検討した結果、AhR 遺伝子欠損マウスでは腸炎が発症されやすいことを確認した。我々はこれまでに、腸炎の発症に、アミノ酸を中心とした代謝物の変動が関与していることを見出しており、AhR 遺伝子の欠損により、腸組織における低分子代謝物バランスが崩壊し、その結果として、AhR 遺伝子欠損マウスにおいて腸炎が発症されやすくなった可能性が考えられる。

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 4 件)

①Furumatsu K., Nishiimi S., Kawano Y., Ooi M., Yoshie T., Shiomi Y., Kutsumi H.,

Ashida H., Fujii-Kuriyama Y., Azuma T., Yoshida M. A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis. Digestive Diseases and Sciences (in press)

- ② Nishiumi S., Yoshida M., Azuma T., Yoshida K., Ashida H. (2010) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs an insulin signaling pathway through the induction of tumor necrosis factor · in adipocytes. Toxicological Sciences, 115, 482-491.
- ③ Kawano Y., Nishiumi S., Tanaka S., Nobutani K., Miki A., Yano Y., Seo Y., Kutsumi H., Ashida H., Azuma T. Yoshida M. (2010) Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces hepatic steatosis via the upregulation of fatty acid transport. Archives of Biochemistry and Biophysics, 504, 221-227.
- ④ Mukai R., Shirai Y., Saito N., Fukuda I., Nishiumi S., Yoshida K. I., Ashida H. (2010) Suppression mechanisms of flavonoids on aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. Archives of Biochemistry and Biophysics, 501, 134-141.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/gi/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西海 信 (NISHIUMI SHIN)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号： 20514706

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者