

機関番号：37401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790128

研究課題名（和文） セレン結合性タンパク質欠損マウスを用いたダイオキシン毒性発現機構の解明

研究課題名（英文） The study of toxic mechanisms of dioxins using selenium-binding protein deficient mouse.

研究代表者

石田 卓巳（ISHIDA TAKUMI）

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：10301342

研究成果の概要（和文）：ダイオキシン類誘導性セレン結合性タンパク質（SeBP）の生理的機能を解明し、ダイオキシン毒性との関連性を明らかにするため SeBP 欠損マウスを作成した。SeBP の欠損は、マウスの外観や成長速度に影響を及ぼさなかった。しかし、20 週令目において、欠損マウスの卵巣重量が、野生型に比べ有意に増加した。以上の結果から、SeBP は加齢に伴う卵巣がんの発症における抑制因子として働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The biological roles of dioxin-inducible selenium-binding protein (SeBP) remain controversial. To address this issue, the SeBP-deficient mice were developed. The notable differences of phenotype and growth curve were not observed between wild-type and SeBP-deficient mice. However, the ovary weight in adult SeBP-deficient mice was significantly increased compared with that in adult wild-type mice. Thus, it is suggested that SeBP is one of suppressive factors of ovary tumor occurred with aging.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：毒性学、薬物代謝学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ダイオキシン、セレン結合性タンパク質、欠損マウス、卵巣

1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン類は、現在でも環境中に広く分布する汚染物質であり、その環境動態は社会的な注目を集めている。ダイオキシン類の曝露に伴い、体重増加抑制、肝肥大、免疫抑制、発ガンプロモーション作用など、多岐に亘る影響が報告されている。また、胎児期における曝露では、出生後の成長障害や性行動異常といった、いわゆる後世代影響が引き起こされることが知られており、曝露時期、曝露量、年齢、性別、

動物種など様々な要因に依存した障害がダイオキシン類への曝露によって引き起こされている。これら障害のほとんどは、細胞の可溶性画分に存在する芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor: AhR) を介して引き起こされることは周知の事実である。AhR は核内移行性の転写調節因子であり、ダイオキシン類などの外因性リガンドの結合に伴い活性化され、多くの機能性タンパク質の発現を変動させる。発現変動を受けるタ

ンパク質としては、薬物代謝酵素である cytochrome P450 1A1 やサイトカインである tumor necrosis factor α などこれまでに数多く報告されており、転写制御機構を含めた詳細な解析がなされている。しかし、これらの情報にも関わらず、Ahr により発現変動を受けるタンパク質とダイオキシン毒性との繋がりが明らかとなったものは少なく、さらに AhR を介さないとされるダイオキシン中毒症状も報告されている。以上のような背景から、ダイオキシン類中毒症状の発症機構については未だ解明されていない点が多く、ダイオキシン類中毒症状に対する有効な予防法や治療法の開発も達成されていない。

機能性タンパク質の発現変動とダイオキシン毒性との関連性を明らかにすることは、毒性発現機構の解明に向けた有効な手段である。そこで、申請者は、ダイオキシン類曝露時におけるラット肝臓の機能性タンパク質の発現変動を、二次元電気泳動により解析した。その結果、可溶性画分に存在するセレン結合性タンパク質 (selenium-binding protein: SeBP) が AhR や酸化ストレスを介して顕著に誘導されることを明らかにした (1, 2, 3, 4)。本タンパク質の生理作用は不明である。しかし、ダイオキシン類によって顕著に誘導されることから、その毒性と深く関与していると推測された。

2. 研究の目的

本研究は、ダイオキシン類誘導性 SeBP の生理的機能を解明し、ダイオキシン類中毒症状との関連性を明らかにすることを目的とした。また、この目的を達成する手段として、SeBP 欠損マウスの開発を行った。

SeBP は、生体内微量必須元素であるセレンとの結合を指標として発見されたタンパク質である。本タンパク質は、マウスやヒトなどの哺乳動物のみならず、線虫やシロイヌナズナなど下等真核生物にも見いだされており、種を超えて高いホモロジーを有する分子種の存在が報告されている。また、SeBP は、同様に可溶性画分に存在するアセトアミノフェン結合性タンパク質 (acetaminophen-binding protein: AAPBP) と高い相同性を示すことが明らかとなっている。解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェンは、過剰摂取時において肝細胞壊死を伴う重篤な肝障害を引き起こす。AAPBP は、アセトアミノフェンによる肝障害発症時において、代謝活性化されたアセトアミノフェンが結合する主要な標的タンパク質の 1 つとして報告されたタンパク質である。さらに、アセトアミノフェン活性代謝物との結合量と肝障害との程度の間に関連性が認められることから、AAPBP は、細胞機能維持、もしくは生体防御機構において主要な役割を担っていると推測されている。

SeBP の生理的機能については、アミノ酸配列の解析、およびプロテオミクス解析の結果から、

1) セレンの制ガン効果への関与 (5)、2) 細胞内酸化還元バランスへの関与 (6)、3) ゴルジ装置における小胞体輸送の活性化 (7)、4) 細胞の進展運動への関与 (8) さらに、個体の性成熟 (9) や老化 (10) への関与などが推測されている。しかし、これらは全て断片的な情報であり、それぞれの結果がどのように繋がりをもつのかについてはほとんど分かっていない。さらに、SeBP の生理的機能に関しては不明であるため、ダイオキシン毒性との関連性についても未解明な点が多く残っている。しかし、ダイオキシン類による SeBP の誘導は、これまで注目されていなかったことから、その生理的機能の解明は、ダイオキシン中毒症状に対する有効な予防法や治療法の開発に向け新規の情報を提示できると思われる。先にも述べたように、本研究は、SeBP 欠損マウスを用いて、ダイオキシン類誘導性 SeBP の生理的機能を解明することを目的とした。また、この結果を基に、ダイオキシン類による毒性発現機構の解明、並びにダイオキシン類中毒症状に対する有効な予防法や治療法の開発に向けた情報の発信を試みた。

3. 研究の方法

SeBP 欠損マウスの作成は、ユニーク株式会社との協力のもと行った。初めに、マウスのゲノムにおける SeBP 遺伝子を欠損させるため、マウスのゲノムデータベースより検索した SeBP の塩基配列を基に、Exon 3 から Exon 12 までをネオマイシン耐性遺伝子カセットで置換した targeting vector を構築した。そののち、エレクトロポレーションにて targeting vector を ES 細胞 (C57BL/6 系統) 内にインジェクションし、ネオマイシン耐性の有無と genotyping の結果を指標として positive clone を選別した。次に、得られた positive clone を仮親マウスにインジェクションして出産させ、得られた出生児の毛色と genotyping の結果を指標としてキメラマウスを選別した。さらに、得られたキメラマウスと野生型の C57BL/6 系マウスを交配させて得た児マウスを genotyping し、ヘテロ型の SeBP 欠損マウス (F1 ヘテロマウス) を選別した。得られた F1 ヘテロマウスの雄と雌、それぞれ 1 匹ずつをケージ内で数日間飼育し matching を行った。その際、生殖行動が確認された雌から個別飼育に切り替え、出産後の離乳期 (約 3 週令) まで児マウスと共に飼育した。離乳期に到達した児マウスは、genotyping による遺伝子型の確認を行ったのち、野生型マウス、ヘテロ型 SeBP 欠損マウス、およびホモ型 SeBP 欠損マウス (便宜上、これを SeBP 欠損マウスと呼ぶ) のそれぞれに選別され、別のケージにて集団飼育された。本方法にて得られた

ヘテロ型 SeBP 欠損マウス、および SeBP ノックアウトマウスは、性成熟後にそれぞれ交配させ、系統の維持、並びに実験に供する SeBP ノックアウトマウスの産生に用いられた。また、この交配の際に生まれた野生型マウスは、本研究における対照群として実験に供した。

4. 研究成果

本研究にて得られた SeBP 欠損マウスの毛並みや形体は、野生型マウスやヘテロ型 SeBP 欠損マウスと比べほぼ同じであり、明らかな違いは認められなかった。また、20 週令目における野生型マウスと SeBP 欠損マウスの体重を比較した結果、雄では SeBP 欠損マウスにおいて有意な減少が認められたものの、雌では顕著な差は認められなかった (表 1)。

表 1. SeBP 欠損マウスにおける体重と臓器重量 (20 週令)

性/臓器	相対臓器重量 (% of body weight)	
	野生型	SeBP 欠損型
雌		
体重†	24.6 ± 1.0	23.4 ± 0.4
肝臓	3.99 ± 0.12	3.94 ± 0.10
腎臓	0.549 ± 0.014	0.584 ± 0.025
脾臓	0.376 ± 0.031	0.380 ± 0.026
卵巣	0.013 ± 0.001	0.019 ± 0.002*
子宮	0.064 ± 0.009	0.077 ± 0.025
胸腺	0.208 ± 0.017	0.195 ± 0.022
肺	0.713 ± 0.105	0.673 ± 0.056
心臓	0.453 ± 0.027	0.485 ± 0.046
脳	1.87 ± 0.07	1.98 ± 0.07
雄		
体重†	34.1 ± 0.43	30.0 ± 0.3***
肝臓	4.94 ± 0.14	4.38 ± 0.15*
腎臓	0.660 ± 0.014	0.600 ± 0.023*
脾臓	0.324 ± 0.030	0.251 ± 0.075
精巣	0.331 ± 0.011	0.358 ± 0.011*
胃	0.498 ± 0.008	0.507 ± 0.019
胸腺	0.086 ± 0.005	0.113 ± 0.003**
肺	0.559 ± 0.038	0.489 ± 0.027
心臓	0.463 ± 0.015	0.417 ± 0.019
脳	1.38 ± 0.02	1.50 ± 0.02**

† 実測値 (g)。

各値とも 6 - 7 個体の平均値 ± S.E.M で表示。
有意差: *P < 0.05; **P < 0.01 and ***P < 0.001

次に 20 週令目における野生型マウスと SeBP 欠損マウスの臓器重量を測定した。その結果、雄では肝臓と腎臓において有意な減少が、精巣、胸腺、および脳において有意な増加が認められた。一方、雌では卵巣において有意な増加が認められた。SeBP の欠損が、臓器特異的に重量を変動させた原因は不明である。しかし、

例えば卵巣については、ガン化することで SeBP の発現量が減少するとの報告がなされている。臓器重量の増加が腫瘍化によるものか否かについては議論の余地があるが、一般的に臓器にガンが生じた場合、ガン細胞の増殖促進に伴う臓器肥大が起こると予想される。従って、本研究により得られた結果は、上記の報告を支持するものであると考えられる。すなわち、加齢とともに発症した卵巣のガン化が、SeBP の欠損により促進され、その結果として卵巣重量の増加が引き起こされたのではないだろうか。また、これを根拠として、SeBP の抗腫瘍因子としての役割が推定される。現在、この卵巣重量の増加が、腫瘍形成に起因するものか否かについて組織学的な解析を展開している。さらに、他の臓器についても機構解明を進める予定である。

さらに、SeBP 欠損の生体への影響を詳細に検証するため、血中のタンパク質 (総タンパク質およびアルブミン) 含量と脂質 (総コレステロール、およびトリグリセリド) 含量、血糖値、AST/ALT 活性、甲状腺ホルモン水準 (チロキシン含量)、並びにステロイドホルモン水準 (コルチゾル、プロゲステロン、エストラジオール、およびテストステロン含量) を測定した (表 2)。

表 2. 血液成分に対する SeBP 欠損の影響 (20 週令)

性/臓器	含量	
	野生型	SeBP 欠損型
雌		
総タンパク質 (g/dL)	7.07 ± 0.50	7.53 ± 0.95
アルブミン (g/dL)	3.00 ± 0.10	3.08 ± 0.25
AST (IU/L)	421 ± 82	653 ± 190
ALT (IU/L)	51.2 ± 6.6	70.5 ± 21.2
総コレステロール (mg/dL)	88.7 ± 3.0	79.7 ± 2.8
グルコース (mg/dL)	26.8 ± 3.9	20.2 ± 3.2
トリグリセリド (mg/dL)	125 ± 7	116 ± 6
チロキシン (µg/dL)	7.47 ± 0.74	6.13 ± 0.40
コルチゾル (µg/dL)	3.30 ± 0.55	2.25 ± 0.39
プロゲステロン (ng/mL)	2.60 ± 0.39	3.33 ± 1.02
エストラジオール (pg/mL)	62.3 ± 12.2	73.3 ± 15.2
テストステロン (ng/dL)	228 ± 11	228 ± 13

各値とも 6 - 7 個体の平均値 ± S.E.M で表示。

雌の場合、SeBP の欠損に伴い、総タンパク質量と肝障害指標 (AST、および ALT) におい

て増加傾向が、血糖値、脂質含量、および甲状腺ホルモン水準において減少傾向が見られた。また、ステロイドホルモン水準については、プロゲステロンとエストラジオールについては増加傾向が、コルチゾールについては減少傾向が見られ、テストステロンについては、ほとんど差は認められなかった。これらの結果が意味することについては、議論の余地が多い。また、これらの結果は、いずれも有意差を示すには至らなかったが、これに関して、マウスの血漿サンプルが微量であることから、それに起因する測定値の不正確さが影響を及ぼしている可能性も否定できない。従って、これらの問題を解決するため、検体の追加に伴う測定精度の向上を目指すとともに、雄における解析を進めることが今後の課題であると思われた。

本研究の結果から、SeBP は、個体の phenotype に影響を及ぼさないものの、子宮ガンなどの発症における抑制因子としての働きが予想された。このように、SeBP の生理的機能の解明に向けノックアウトマウスを開発し、さらに、具体的な現象を挙げ言及した報告は本研究が世界で初めてである。また、本研究成果は、ガン、性分化、老化など様々な研究分野に対して新たな知見を提示するものであると考えられる。さらに、ダイオキシンの発ガンプロモーション作用も報告されていることから、今後は SeBP の欠損とダイオキシン曝露時におけるガン発症との関連性にも注目し研究を展開する予定である。

1) Ishida, T. et al., J. Health Sci., 47:

575-578 (2001). 2) Ishida, T. et al., Environ. Toxicol. Pharmacol., 6: 249-255 (1996). 3) Ishii, Y. et al., Toxicol. Lett., 87: 1-9 (1996). 4) Ishii, Y. et al., Chemosphere, 32: 509-515 (1996). 5) Morrison, D. G. et al., In Vivo, 3: 167-172 (1989). 6) Jamba, L. et al., Mol. Cell. Biochem., 177: 169-175 (1997). 7) Porat, A. et al., J. Biol. Chem., 275: 14457-14465 (2000). 8) Miyaguchi, K. et al., Cell. Biol., 121: 371-376 (2004). 9) Roff, C. F. et al., Endocrinology, 133: 2913-2923 (1993). 10) Cho, Y. M. et al., Proteomics, 3: 1883-1894 (2003).

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)

[学会発表] (計 1 件)

1. 辻本 小百合, 石田 卓巳, 武田 知起, 石井 祐次, 山田 英之, 卵巣増殖抑制因子としてのセレン結合性タンパク質: 遺伝子欠損マウスの作成とその表現型解析, 日本薬学会第 131 年会 (2011 年 3 月, 静岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 卓巳 (ISHIDA TAKUMI)
崇城大学・薬学部・准教授
研究者番号: 10301342