

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790673

研究課題名（和文） 化学物質評価のためのヒト型P450を持つメダカの作製

研究課題名（英文） Generation of human P450 medaka for assessment of chemicals.

研究代表者

吉岡 範幸 (YOSHIOKA NORIYUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70365229

研究成果の概要（和文）：

TILLING 法により、CYP1A 遺伝子を欠損したメダカを作製した。RT-PCR、ウェスタンブロット、酵素活性測定では、完全に CYP1A の機能が喪失していた。野生型のメダカに比べて数十倍低い濃度の多環芳香族炭化水素により死亡し、CYP1A プロモーター下に EGFP を結合したトランスジェニック個体では、化学物質曝露量に比例した蛍光が認められた。本系統は、ヒト CYP1A 多型による化学物質感受性を評価するために有用である。

研究成果の概要（英文）：

We generated the medaka lacking *cy1a* gene by TILLING. RT-PCR, Western blot analysis, and EROD (ethoxyresorufin-O-deethylase) assay revealed that the CYP1A activity was completely abrogated in these mutants. The *cy1a*-deficient medaka died when exposed to several scores times lower concentration of PAHs, indicating that the sensitivity of these mutant medaka to PAHs has been greatly enhanced. These mutants are proven useful for the evaluation of the polymorphic individuals with various extent of chemical sensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：CYP1A、メダカ、多環芳香族炭化水素

1. 研究開始当初の背景

現在、化学物質の発癌性検出にはラットやマウス等のげっ歯類を用いた長期発癌性試験が行われている。しかし、発癌性を評価すべき化学物質は膨大な数であり、それらすべてを実施しようとすれば莫大な費用と時間

を要する。さらに、欧州をはじめとして、化学物質の毒性評価に対する動物の使用は厳しくなる傾向にあり、代替試験法が求められている。また、容易に発癌性を検索する方法として古くからサルモネラ菌の復帰変異を利用するエームズテスト等の遺伝毒性試験が行われてきた。このテストは、P450に

よる代謝活性化の影響を加味するために、哺乳動物のマイクロソーム画分を加えるなどの工夫がされているが、原核生物を用いており、ヒトへの外挿性が問題になっている。

魚類は、多産であるので検体数を容易に増やすことができる。動物愛護の観点からの規制から免れる傾向にあり、倫理的な問題が比較的小さい。飼育スペースや維持コストが小さいので、化学物質の複合曝露や慢性影響を調べることが比較的容易である。といった、様々な利点があることで知られる。

そこで、従来の発癌性試験の代替もしくは補足となる好発癌性メダカを作製したい。シトクロム P450 は、薬物代謝の第一相反応を触媒する最も重要な酵素であり、一原子酸素添加反応を触媒する。これが、酸化、水酸化、脱アルキル化、脱アミノ化、エポキシ化など様々な反応を引き起こし、化学物質が解毒される。一方、多環炭化水素の例に見られるように、P450 により化学物質が逆に代謝活性化され、生体内で発癌物質へ転換されることも知られている。P450 は基質特異性が低く、動物種差によるアミノ酸配列の違いによっても基質特異性が大きく異なる。このことが、毒性試験結果のヒトへの外挿を困難にし、P450 の解析に実験動物を使う上での障壁になっている。

2. 研究の目的

好発癌モデルメダカを作製するための第一段階として、遺伝子破壊メダカ作製技術を用い、シトクロム P450 の一つ CYP1A をノックアウトしたメダカを作成する。作製したメダカが CYP1A を完全に破壊したかどうか検証後、その基質である多環芳香族炭化水素に対する生体影響を評価する。さらには、がん抑制遺伝子である p53 遺伝子破壊メダカと交配させる。これらのメダカは、CYP1A 遺伝子を欠損したメダカにヒト型 CYP1A 遺伝子を導入することにより、ヒト型酵素による PAHs の代謝、遺伝子多型による感受性評価が可能となり、また、メダカにおいてもヒトやマウスのような哺乳動物と同様、PAH による発がん機構に CYP1A による代謝活性化と DNA 付加体の形成が必要であるかどうかを評価することが可能である。

3. 研究の方法

メダカ TILLING ライブラリーは、ENU (アルキル化剤) により点変異を誘発した変異メダカ約 6,000 尾よりなる。このライブラリーから CYP1A 遺伝子が破壊されたメダカをシーケンスにより選別し、変異を持った個

体を凍結精子より得る。(図 1) 作製したメダカが CYP1A 遺伝子を破壊できたかどうか RT-PCR、ウェスタンブロットで確認する。さらに CYP1A の基質である EROD をメダカ胚に曝露し代謝の有無を調べた。

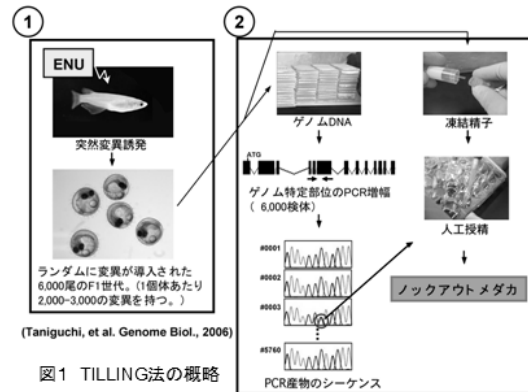


図 1 TILLING法の概略

曝露実験には PAH である β -ナフトフラボン (BNF)、3-メチルコラントレン (3-MC) 等を被検物質と用い、野生株と CYP1A ノックアウトメダカで感受性の違いを確認した。さらには BNF による心嚢浮腫の 50% 影響量を求め、実際に何倍感受性が変化したか求めた。また、作成した CYP1A ノックアウトメダカとがん抑制遺伝子である p53 遺伝子破壊メダカを交配させた。

心嚢浮腫の面積の測定には、まず受精 5 時間後の胚を所定の化学物質に 1 時間曝露した後、培養液で洗浄し、28°C で 8 日間培養した。半固形状のメチルセルロースに胚を埋め込み、実体顕微鏡 (SZX16、オリンパス社) で側面像を取得した。心嚢の面積は ImageJ により解析した。

4. 研究成果

(1) 変異体の作製

ランダムミュータジェネシスによる点突然変異を誘導した個体群をハイスループットスクリーニングし、目的とする遺伝子の変異体を選別する TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genome) 法という方法により、脊椎動物の主要な第 I 相解毒代謝酵素である cyp1a 遺伝子を欠損したメダカを作製した。cyp1a はヒトを始めとする哺乳動物では、遺伝子重複のため cyp1a1 と cyp1a2 の 2 種類存在するが、メダカでは 1 遺伝子しか存在しない。開始コドンを含む第 2 エキソンに PCR プライマーを設計し、増幅した 6,000 種類の PCR 産物のハイスループットサンガーシーケンスにより、cyp1a 遺伝子のスプライシング部位に変異を持つ個体を得ることができた。RT-PCR によるスプライシングの異常が確認され、(図 2) ウェスタンブロットではタンパク質の発現が抑えられていた (図 3)。

一般に P450 タンパクは、カルボキシ末端に酵素活性に必要なヘムを配位するシステインを持っており、スプライシング不良によりこの残基を欠失すると酵素活性がなくなることが予想される。実際に CYP1A の基質であるエトキシレゾルフィン（EROD）を野生型および変異型メダカ胚に与えたところ、後者ではエトキシレゾルフィンが代謝されず、完全に CYP1A 遺伝子が破壊されていることが確認された（図 4）。（EROD、Ethoxyresorufin-O-deethylase アッセイは、CYP1A の酵素活性測定法として広く使われる。）

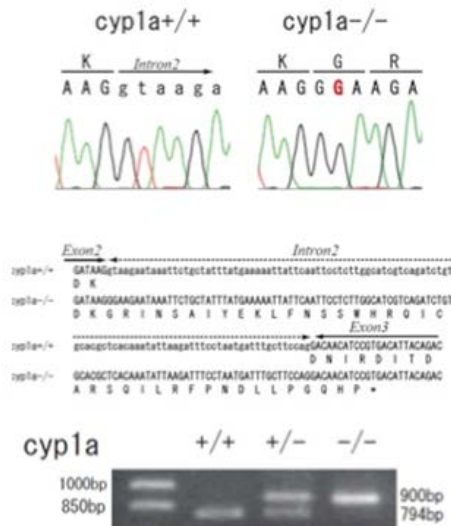


図2. スプライシング異常の変異体

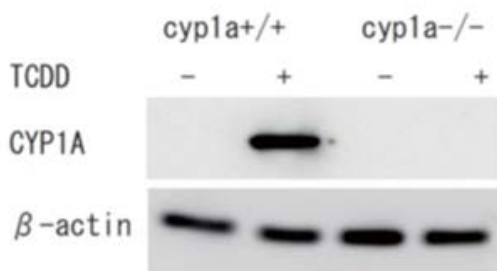


図3. ウェスタンブロットによる蛋白の発現

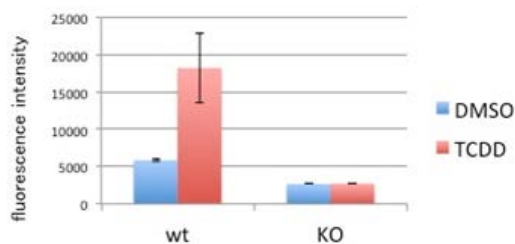


図4. EROD 活性

(2) 環境化学物質曝露の影響

多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) は、原油やコールタールに含まれるヘテロ原子や置換基を含まない芳香環が縮合した炭化水素の総称である。ベンゾ (a) ピレンはタバコの煙に含まれる典型的な PAH の一種であるが、良く知られるように、PAH の一部はヒトにおいて発がん性を有している。また、メダカやゼブラフィッシュ胚への影響として特徴的な病変は心嚢浮腫である（図 5）。これは、AhR の活性化によって COX2 を介したアラキドン酸経路が活性化し、心臓周囲で炎症が起こるためである。PAH の一種である 3 メチルコラントレン (3-MC) や、PAH ではないが AhR に結合しこれを活性化させるリガンドとして知られる β ナフトフラボン (β -naphthoflavone, BNF) による心嚢浮腫（心嚢浮腫の面積）を測定すると、CYP1A ノックアウトメダカが野生株と比べてより低濃度で影響が認められた（図 6）。

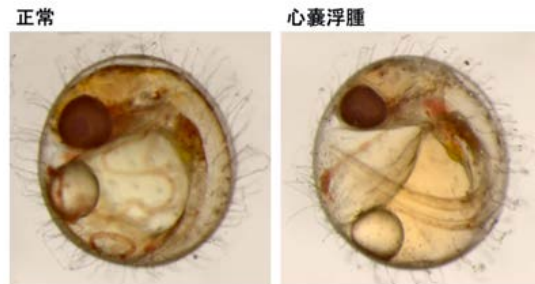


図5. PAHによるメダカ的心嚢浮腫

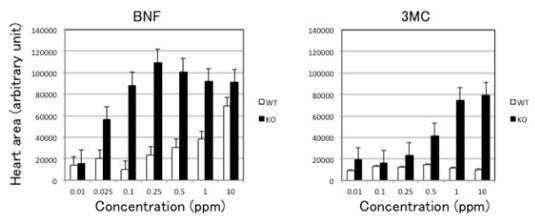


図6.PAHによる心嚢浮腫の比較

さらに、BNF による心嚢浮腫の量反応曲線を作成（図 7）し、その 50% 影響量をみると CYP 1A ノックアウトメダカは野生株と比較して約 2.7 倍、感受性が高くなっていることが解った。

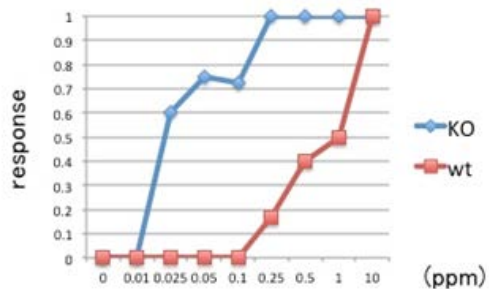


図7. BNFによる心嚢浮腫の量反応曲線

表 1. BNFによる50% 影響量(ED50)

	ED50 (ppm)	95% CI
KO	0.029	0.013 - 0.047
wt	0.795	0.429 - 3.219

また、CYP1A ノックアウトメダカと p53 遺伝子破壊メダカを交配させた F1 は現在飼育中である。

(3) まとめ

CYP1A は P450 に属する代表的な酵素で、多環芳香族炭化水素などの化学物質の解毒酵素として知られている。AhR というダイオキシン受容体に異物が結合すると、AhR は核内に移行し、CYP1A などの一連の解毒代謝酵素を転写活性化する。異物は CYP1A により酸素付加などの化学修飾が行われた後、グルクロンサン抱合酵素などの第二相の酵素によりさらに修飾を受け、生体外へ排出される。

TILLING 法というランダムミュータジェネシスを応用した方法により、CYP1A 遺伝子を欠損したメダカを作製することに成功した。このメダカは、RT-PCR による転写物の測定、ウェスタンブロットによるタンパク質の定量、エトキシレゾルフインによる酵素活性測定により、完全に CYP1A の機能を喪失していることが証明された。

メダカは小型の脊椎動物で、多数の化学物質の毒性評価に非常に適している。多くの化学物質は、大気汚染の場合は降雨により、また、土壌汚染の場合は地下水や河川への流入により、水圏に移行することがある。水生動物は食物連鎖により化学物質を生体濃縮し、最終的にそれらが人により摂取されるので、魚類における解毒代謝系の解明は非常に重要である。

CYP1A 遺伝子を欠損したメダカは、野生型のメダカに比べて数十倍低い濃度の多環芳香族炭化水素により死亡し、化学物質に対する毒性が増大していることが明らかになった。この個体に対する毒性評価のために、CYP1A プロモーター下に蛍光タンパク質 EGFP を結合したコンストラクトを作製し、野生型の個体に顕微注入して、トランスジェニック個体を作製することに成功した。この個体は、化学物質曝露量に比例して蛍光強度が変化し、ヒトの CYP1A 多型による化学物質感受性の多様性を評価するために非常に有用な系統であると結論付けられた。

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)

- (1) 谷口善仁、吉岡範幸、小型魚類活用による創薬、日本臨牀、査読無、70 巻、2012、413-417

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 谷口善仁、吉岡範幸、大前和幸、cyp1a 欠損メダカの化学物質高感受性、日本衛生学会、2013 年 3 月 25 日、金沢
- (2) 谷口善仁、中島あゆみ、吉岡範幸、大前和幸、Chemical hypersensitivity of cyp1a-deficient medaka fish、日本分子生物学会、2012 年 12 月 14 日、福岡
- (3) 吉岡範幸、原田裕美、大前和幸、谷口善仁、Chemical hypersensitivity of cyp1a-deficient medaka fish、小型魚類研究会、2012 年 9 月 22 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 範幸 (YOSHIOKA NORIYUKI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：70365229