

平成 30 年 6 月 30 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460377

研究課題名(和文)メタボロミクスによるAhRの内因性リガンドの探索

研究課題名(英文)Search for AhR endogenous ligands by metabolomics

研究代表者

谷口 善仁(Taniguchi, Yoshihito)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：00324616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：第一相解毒酵素であり、生物種間で高度に保存されているCYP1Aを破壊したメダカをTILLING法により作製した。この変異型メダカは、野生型メダカの10分の1の濃度の多環芳香族炭化水素に反応する。非暴露の通常飼育環境下でもAhRシグナル伝達系が顕著に亢進しており、CYP1Aによって代謝される内因性リガンドの存在が示唆された。メタボローム解析の結果、CYP1Aが核酸代謝に関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Medaka deficient for CYP1A, a highly conserved phase I detoxifying enzyme, was created by TILLING method. This CYP1A 'knockout' medaka reacted to lower (about one tenth) concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons than their wild type littermates. Interestingly, AhR signaling pathway is dramatically activated in unexposed CYP1A knockouts compared to the wild type, suggesting that there are endogenous ligands for AhR that are metabolized by CYP1A in vivo. The metabolome analysis revealed that CYP1A is possibly involved in nucleic acid metabolism.

研究分野：環境医学

キーワード：CYP1A P450 多環芳香族炭化水素 ダイオキシン AhR メダカ 変異体 メタボローム

### 1. 研究開始当初の背景

シトクロム P450 は大きなファミリーを構成する酸化酵素である。中でも CYP1A は脊椎動物でよく保存されており、ベンゾピレンに代表される多環芳香族炭素 (polyaromatic hydrocarbon, PAH) などの異物の解毒や代謝活性化に関わることが知られている。平板構造を持つ PAH やダイオキシンは受容体である AhR (aryl hydrocarbon receptor) に結合し、CYP1A などの解毒代謝に關与する遺伝子群を転写活性化させる。しかし、これらの化学物質は主に産業革命以降に環境中に放出されるようになったものであり、生体における AhR-CYP1A 代謝経路の本来の役割は明らかにされていない。

現在までに内因性および食餌由来の AhR リガンド候補として、インジルピン、ピリルピン、7-ケトコレステロール、カンタキサンチン、12(R)HETE、キヌレン酸などが知られている。しかし、これらの化学物質は生体内にごく微量しか存在しないか、あるいは AhR 活性化の程度が弱く、また、多くの場合、AhR の活性化は培養細胞などで確認されたものであり、生理的な意義も不明である。

### 2. 研究の目的

哺乳動物では *cyp1a* 遺伝子は重複しているが、*cyp1a1/cyp1a2* ダブルノックアウトマウスは特に生存に影響が見られない (Dragin, et al. BBRC, 2007)。 *cyp1a* のように生物種間で保存されている経路の解析は、比較生物学的アプローチが有効である。本研究では、遺伝子改変が可能で、*cyp1a* 遺伝子をゲノム上に一つしか持たず、比較的単純な構造をしているニホンメダカを用いて、魚類における CYP1A タンパク質の役割を明らかにすることを目的とする。研究成果は、環境保全やヒト健康影響評価に役立つことが期待される。

### 3. 研究の方法

メダカは脊椎動物でありながらシンプルな構造をしており、また、ゲノムもヒトの四分の一のサイズである。小型魚類は、体外発生をすること、多産性、小型で曝露実験が容易であること、実験に際して倫理的な問題が少ないなど、哺乳動物を用いた実験と比べて有利な点がある。研究代表者の谷口らは、突然変異誘発剤による飽和変異の後、特定ロカスの点変異をスクリーニングすることにより、目的とする遺伝子の破壊体を作成することに成功した (Taniguchi, et al. Genome Biol., 2006)。この TILLING 法と呼ばれる逆遺伝学的方法を用いて、現在までに数十種類の遺伝子破壊メダカが作製されている。

本研究では、TILLING 法により *cyp1a* 変異体メダカを作成し、CYP1A の発現誘導経路である芳香族炭化水素受容体 (AhR; ダイオキシン受容体とも呼ばれる) に結合・活性化する化学物質に対する感受性の評価を行った。また、メダカ *cyp1a* プロモーター下

に蛍光タンパク質を接続したトランスジェニックを作成し、*cyp1a* KO と組み合わせることにより、化学物質の簡便かつ高感度な検出系を確立した。さらに、*cyp1a* ホモ接合体の肝臓のメタボロームおよびトランスクリプトーム解析を行い、魚類における CYP1A の役割を解析した。

### 4. 研究成果

(1) TILLING 法により *cyp1a* 遺伝子を破壊したメダカを作製した。ニホンメダカの *cyp1a* 遺伝子の第 2 エキソンのアンプリコンシーケンスを行った結果、31 個のミスセンス変異、12 個のサイレント変異、5 個のイントロンの変異に加えて、1 個のスプライスドナー部位の点変異体が見られた。戻し交配を行った後、兄妹交配を行ってホモ接合体 (KO) を作成した。RT-PCR を行った結果、KO では第 2 イントロンのスプライシング不全のため、リードスルーによるフレームシフトが起こり、C 末端を欠いたタンパク質ができることが予測された。魚類 CYP1A タンパク質に対する抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った結果、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾパラダイオキシン (TCDD) に暴露した胚では、*cyp1a* mRNA の発現は誘導されるものの、CYP1A の全長タンパク質は検出されないことが確認された。CYP1A は他の P450 シトクロムタンパク質同様、C 末端に酵素活性部位が存在するので、KO における truncate されたタンパク質は酵素活性を失っていることが予想された。CYP1A の基質である 7-エトキシレゾルフィンに胚を暴露して O-脱エチル化 (EROD) 活性を調べたところ、KO 胚では 7-エトキシレゾルフィン分解に伴う蛍光の増加が認められず、本研究で得られたスプライス部位変異体は CYP1A ノル変異体であることが確認された。

(2) *cyp1a* KO は通常飼育環境下では発生や成長、生殖に異常が見られず、生後一年での生存率や繁殖率は野生型とほぼ同等であった。受精後 6 日目の胚の AhR 活性化の程度をリアルタイム PCR で定量したところ、KO では野生型の 8 倍程度の *cyp1a* mRNA の増加が認められた。この結果は、内因性の AhR の生理的リガンドが存在し、*cyp1a* mRNA を誘導するが、*cyp1a* のスプライシング異常のために機能的な CYP1A が合成されないために、本来、代謝分解・排泄されるべき物質が体内に蓄積する結果、AhR シグナルが過度に活性化したものと解釈される。

(3) 次に、KO メダカの外因性 (環境) 化学物質に対する感受性を調べた。AhR シグナル伝達系は生物種間でよく保存されている解毒代謝経路であり、AhR は、化学物質の細胞内受容体として機能する。AhR は、リガンドである多環芳香族炭素 (PAH) やダイオキシンと結合した後、ARNT とヘテロ二量体を

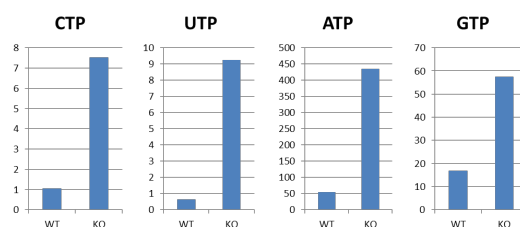
形成し、核内へ移行する。AhR/ARNT が、生体異物応答配列 (XRE) を介して DNA に結合する結果、cyp1a などの標的遺伝子が転写活性化され、PAH が代謝解毒される。一方、TCDD は難分解性であり、cyp1a の誘導にも関わらず、生体内に未代謝のまま残存する。cyp1a KO は 3-メチルコラントレン (3MC) などの PAH、また、β-ナフトフラボン (BNF) といったその他の AhR リガンドに高感受性を示し、野生型に比べ数十分の一の濃度で心嚢水腫をきたして死亡することが明らかになった。BNF に対する野生型コントロール胚の最小毒性濃度 (LOAEC) は 0.5 ppm であるのに対し、KO 胚の LOAEC は 0.025 ppm であった ( $p < 0.01$ )。また、BNF の濃度と心嚢水腫の程度の間には量反応関係が認められ、BNF 濃度が高いほど、心嚢の断面積は大きくなった。一方、AhR に結合して、cyp1a 遺伝子の発現誘導をするものの、その遺伝子産物である CYP1A タンパク質の基質にはならない難分解性の TCDD に対しては、野生型 KO ともに 0.1 ppb で心嚢水腫の発現が見られ、両者の間に統計的有意差はなかった。

(4) 外因性化学物質の暴露による心嚢水腫の発現は、魚類胚を用いた AhR リガンドの毒性評価でよく用いられる方法であるが、暴露後 7~10 日を要すること、心嚢水腫の定量 (heart area の計測) が煩雑であることより、より簡便な毒性評価法が望まれる。簡便かつ迅速な評価法の確立のために、京都大学農学研究科の木下政人博士の協力を得て、メダカ cyp1a プロモーター下に高感度緑色蛍光タンパク質 (eGFP) を接続したレポータートランスジェニックライン (cyp1a:egfp Tg) を作製した。cyp1a:egfp Tg と、cyp1a KO または野生型コントロールを交配し、cyp1a の有無によるトランスジーン発現誘導を比較した。トランスジーンを hemizygous に持つ胚に BNF もしくは 3MC を添加すると、暴露後 6 時間から蛍光の誘導が見られ始め、暴露後 18 時間では腸管、肝臓、腎臓に強い蛍光の誘導が認められた。これは、魚類胚における PAH 誘導 cyp1a 発現部位として報告された、in situ hybridization の結果と一致する (Ng and Gong, PLoS ONE, 2013)。蛍光強度には量反応関係が見られ、より高濃度の BNF に対しては、より強い eGFP の誘導が観察された。野生型コントロール (cyp1a+/+) にトランスジーンが入った胚の BNF に対する最小影響濃度 (LOEC) は 1 ppb であるのに対し、KO (cyp1a-/-) にトランスジーンが入った胚の LOEC は 0.1 ppb であった。このことは、cyp1a が破壊されたトランスジェニック系統は、従来の野生型魚種のトランスジェニックに比べて、鋭敏かつ迅速な環境化学物質評価として有用であることを示している。

(5) cyp1a プロモーター下に eGFP を接続したレポータートランスジェニックライン

は、安定的にレポーター遺伝子を保持する系統を 4 系統得ることができたが、そのすべてにおいて、視蓋 (optic tectum) の特定の細胞群に basal な蛍光を観察した。これらが内因性 AhR リガンドによって活性化されているのかを調べるために、BNF と 3MC による暴露、および、AhR 阻害剤である CH-223191 の効果を検討した。BNF、3MC、CH-223191 のすべてにおいて、視蓋の蛍光の増強または減弱が見られず、これらの細胞群では、AhR シグナル伝達経路とは無関係であると結論した。

(6) 通常飼育環境下の KO および野生型コントロール成魚の肝臓を摘出し、メタボロームおよびトランスクリプトーム解析を行った。その結果、マイクロアレイ解析では、成人型と胎児型のグロビンが、野生型にくらべて KO で 2 倍以上多く発現していることが明らかとなった。また、シトクロム c オキシダーゼ・サブユニット 4 の発現も KO において 2 倍以上に亢進していた。メタボローム解析では、KO は野生型に比べて ATP、UTP、CTP、GTP の量が増加しており、CYP1A が核酸代謝に関わっていることが示唆された。



#### < 引用文献 >

Dragin N, Uno S, Wang B, Dalton TP, Nebert DW. Generation of 'humanized' hCYP1A1\_1A2\_Cyp1a1/1a2(-/-) mouse line. *Biochem Biophys Res Commun.* 359(3):635-642, 2007.

Taniguchi Y, Takeda S, Furutani-Seiki M, Kamei Y, Todo T, Sasado T, Deguchi T, Kondoh H, Mudde J, Yamazoe M, Hidaka M, Mitani H, Toyoda A, Sakaki Y, Plasterk RH, Cuppen E. Generation of medaka gene knockout models by target-selected mutagenesis. *Genome Biol.* 7(12):R116, 2006.

Ng GH, Gong Z. GFP transgenic medaka (*Oryzias latipes*) under the inducible cyp1a promoter provide a sensitive and convenient biological indicator for the presence of TCDD and other persistent organic chemicals. *PLoS One.* 8(5):e64334, 2013.

#### 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2件)

Tonoyama Y, Shinya M, Toyoda A, Kitano T, Oga A, Nishimaki T, Katsumura T, Oota H, Wan MT, Yip BWP, Helen MOL, Chisada S, Deguchi T, Au DWT, Naruse K, Kamei Y, Taniguchi Y. Abnormal nuclear morphology is independent of longevity in a zmpste24-deficient fish model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 209:54-62, 2018.

Yip BW, Mok HO, Peterson DR, Wan MT, Taniguchi Y, Ge W, Au DW. Sex-dependent telomere shortening, telomerase activity and oxidative damage in marine medaka *Oryzias melastigma* during aging. *Mar Pollut Bull*. 124(2):701-709, 2017.

〔学会発表〕(計3件)

谷口善仁

CYP1A 欠損が生体内代謝産物に与える変動  
第39回 日本分子生物学会年会、横浜、2016

谷口善仁、大前和幸、木下政人

メダカを用いた AhR シグナルバイオモニタリング系の開発

第84回日本衛生学会学術総会、岡山、2014

谷口善仁

AhR シグナル伝達系が cyp1a 遺伝子を欠如する動物で亢進している

第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 善仁 (TANIGUCHI, Yoshihito)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号: 00324616

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )