

「内分泌かく乱物質」

平成10年度採択研究代表者

藤井 義明

(東北大学大学院理学研究科 教授)

「内分泌かく乱物質の生体毒性発現メカニズムと モニター系の開発」

1. 研究実施の概要

ダイオキシンを中心とする内分泌かく乱物質の生体毒発現のメカニズムを分子レベルで明らかにし、内分泌かく乱作用を示す物質を高感度でモニターする生物を発生工学的手法を用いて作製する可能性を検討する。この目的のためにダイオキシン類によって誘導される P450 による内分泌かく乱物質やホルモンの代謝を検討する。AhR とステロイドホルモン受容体 (SHR) の相互作用を、共役因子も含めて明らかにする。ダイオキシンの免疫毒性と生殖毒性を AhR 欠失マウスと野生型マウスを用いて、AhR 依存性と非依存性の毒性発現経路を明らかにし、AhR が毒性発現にどの程度関与しているのかを検討すると共に非依存性発現の分子メカニズムについての手がかりを探る。動物種によるダイオキシン感受性の違いと AhR のダイオキシン結合性にどの程度平行性が依存するのか、感受性の極度に高いモルモットと極度に低いハムスターの AhR について検討し、これまでに得られているマウス、ラット、ヒトなどと比較する。この比較はヒトの感受性を推定するのに科学的根拠を与えることが期待できる。AhRR (AhR repressor) 欠失マウスを作製することにより、ダイオキシンに対する感受性の高いマウスを作製する可能性を試す。また、AhR と Nrf2 の2重欠失マウスを作製し、第一相、第二相薬物代謝酵素の発現のなくなったマウスでの内分泌かく乱物質の作用を検討する。

2. 研究実施内容

ダイオキシン類によって誘導されるヒト P450 分子種 (CYP1A1 と CYP1A2) を大量に発現する大腸菌株を樹立した。最適な発現条件を検討したところ、CYP1A1 と CYP1A2 の発現量は、培養液 1 L 当たり、各々 121 及び 172nmol であった。発現させたヒト P450 分子種は、代表的な基質に対し肝ミクロソームによる場合と同じ基質特異性を示したことから、ヒト P450 の大腸菌発現系は、内分泌かく乱物質やホルモン代謝の研究に十分応用できると結論された。

ダイオキシンなどの内分泌かく乱物質が作用する可能性が考えられるステロイドホルモンレセプター (SHR)、AhR に作用する転写共役因子群の検索を行っている。

ダイオキシンに対する感受性の極度に高いモルモットと極度に低いハムスターについて、そのレセプター (AhR) 及びその抑制因子 AhRR の cDNA クローニングを行い、モルモットの AhR の全長の cDNA クローニングを得ることができ、そのアミノ酸配列を決めることができた。その他の cDNA クローニングについては部分的な cDNA クローンが得られているので、さらに全長のクローンを得る努力を続けている。AhRR の作用メカニズムについては、転写抑制ドメインの約 150 アミノ酸配列を決めることができ、さらに、この阻害がトリコスタチン A (TSA) によって解除されることから、ヒストンデアセチラーゼの関与が示唆された。

AhRR の欠失マウスの作製はキメラマウスの作製まで進んでおり、生殖細胞に欠失遺伝子が導入されたものも得られているので、現在、ホモ欠失マウスが得られるように研究を続けている。また、AhR と Nfr2 の 2 重欠失マウスの作製は、既に、得られているので、その表現形の解析を行っている。

ダイオキシンの胸腺細胞に及ぼす影響は、大変顕著で、ダイオキシン一回投与で胸腺細胞は 1/10 に減少することが明らかになった。AhR 欠失マウスと野生型マウスの比較から、この中、約 80% 程度が AhR 依存的に起こり、約 20% は AhR 非依存的である。また、細胞の減少は細胞増殖能の阻害ではなく、細胞死によることが示唆された。初期実験より、このダイオキシンによる細胞死は caspase 非依存性で、なお且つ、Bcl-2 非依存性の可能性が考えられるので、現在、そのメカニズムを詳細に検討中である。

AhR 欠失マウスは、一見、正常に発育するが、生後半年を過ぎることから脊柱後弯を示す個体が現れることが分かった。アリザリン赤 S 染色透明骨格標本を作製して、骨格系を調べた結果、脊椎椎体の変形は比較的軽度であった。下位胸椎で、椎体前部の上下縁での骨棘形成・癒合、椎間円板前方部や前縦靭帯内の異常骨格が見られた。その他の所見としては、体毛の粗雑化、顔面・頸部のヒフびらん・潰瘍、脱肛を認める例があった。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

○K. Sogawa, K. Numayama-Tsuruta, M. Ema, M. Abe, H. Abe & Y. Fujii-Kuriyama.

Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7369-7373 (1998)

○F. Wang, J-x. Gao, J. Mimura, A. Kobayashi, K. Sogawa & Y. Fujii-Kuriyama.

- Structure and Expression of the Mouse AhR Nuclear Translocator (mArnt) Gene. *J. Biol. Chem.* 273: 24867-24873 (1998)
- J. Mimura, M. Ema, k. Sogawa & Y. Fujii-Kuriyama. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* 13: 20-25 (1999)
- M. Ema, K. Hirota, J. Mimura, H. Abe, J. Yodoi, K. Sogawa, L. Poellinger and Y. Fujii-Kuriyama. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1a in response to hypoxia : their stabilization and redox signal induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* 18: 1905-1914 (1999)
- M. Ema, S. Ikegami, T. Hosoya, J. Mimura, H. Ohtani, K. Nagao, K. Inokushi, M. Katsuki and Y. Fujii-Kuriyama. Mild impairment of learning and memory in mice overexpressing mSim2 gene located in chromosome 16, an animal model of a Down syndrome. *Hum. Molec. Genet.* 8 1409-1415 (1999)