

「内分泌かく乱物質」

平成 10 年度採択研究代表者

藤井 義明

(東北大学大学院生命科学研究所 教授)

「内分泌かく乱物質の生体毒発現のメカニズムとモニター系の開発」

1. 研究実施の概要

アрилハイドロカーボン受容体(またはダイオキシン受容体、AhR)の作用機構を詳細に検討し、さらにステロイドホルモン受容体などの他の因子との相互干渉作用を検討する。またその結果として生ずる遺伝子発現の活性化あるいは、抑制のおこる遺伝子を検索する。AhR 及び関連する遺伝子の欠失マウスを作製し、その表現形の変化を解析して、機能を推定すると同時に、毒性発現の感受性の変化を検討する。AhR によって活性化される異物代謝酵素 CYP による内分泌かく乱物質及びダイオキシン類の代謝活性を検討する。

2. 研究実施内容

CYP1A2 のダイオキシンや 3-メチルコラントレンによる誘導は XRE とは異なる配列 XREII によって行われるが AhR に依存的である。この誘導メカニズムは XREII に結合する LBP-1 に AhR/Arnt がリガンド依存的に結合することが分かった。一方、卵巣摘出マウスに 3MC を投与し子宮重量増減及び標的遺伝子の発現を検討したところ、E2 非存在下で 3MC がエストロゲン作用をすることが見出された。そこで ER の転写促進能を検討したところ、3MC に結合した AhR/Arnt が ER α あるいは ER β を介して、E2 の非存在下でも転写を促進することが見出された。また AhR 欠失マウスは遺伝子背景を C57BL に統一すると雌は不妊となる。この原因は Estrous cycle の不順、排卵数の減少、黄体形成不全であることが明らかになった。現在、AhR が生殖に影響を与える原因遺伝子の同定を行なっている。TCDD をマウスに与えると著しい胸腺の縮退が見られる。この原因を探る目的でマウス約 500 匹の胸腺から問題となる未熟なリンパ球分画を単離し、その RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行なった。コントロール群は未処理のマウスの未熟なリンパ球の RNA である。その結果、Granzyme B、IAP ファミリーの遺伝子発現の増加が検出された。この現象がミトコンドリアの膨化を伴うが、核の凝集、DNA 分断を伴わない細胞死の亢進とどのように関係しているか、今後の問題である。AhR と Nrf2 二重欠失マウスを作製し、種々の薬物を投与して酵素の誘導実験を行った。3MC 投与では CYP1A1、1A2 が誘導されなかったが、BHA 投与では CYP1A2 が誘導され、CYP1A2 の誘導には AhR および Nrf2 を介さない第 3 の誘導系が存在することが示された。また Nrf2 欠失マウスにディーゼルエンジン排気ガスの曝露実験を行うと野性型に対して DNA アダクトが顕著に増加することが認められた。またブロッコリーの成分であるオルティプラッツ(oltipraz)をベ

ンツピレンと同時に投与すると胃ガンの発症率が低下することが知られているが、Nrf2 欠失マウスではオルティプラットの発癌抑制効果が認められなくなることが明らかになった。これはオルティプラットの発癌抑制には Nrf2 が関与していることを示している。

3. 研究実施体制

(1) AhR 機能調節グループ

- ① 藤井 義明 (東北大学大学院生命科学研究科分子生命科学専攻遺伝子システム学講座遺伝子調節分野(兼務 大学院理学研究科化学専攻相関化学講座生物化学研究室)教授)
- ②
 - ・ ハムスターとモルモットのAhRとAhRRの解析
 - ・ AhRR遺伝子発現機構解析、標的遺伝子の探索
 - ・ AhRRのノックアウトマウスの作製と機能解析
 - ・ AhRと核内ステロイドホルモン受容体の相互作用
 - ・ 核内エストロゲン受容体に対する内分泌攪乱物質の作用
 - ・ CYP1A2の外来異物による誘導機構
 - ・ AhRR、Arnt2ノックアウトマウスの機能解析
 - ・ 薬物投与による遺伝子発現の調節機構

(2) P450 と代謝グループ

- ① 鎌滝 哲也 (北海道大学大学院薬学研究科 教授)
- ②
 - ・ 内分泌攪乱物質による薬物代謝酵素系の変動
 - ・ AhR標的遺伝子の探索
 - ・ ダイオキシン類のCYPへの親和性評価

(3) ダイオキシンと胸腺グループ

- ① 菅野 雅元 (広島大学医学部免疫学寄生虫学講座 教授)
- ②
 - ・ ダイオキシンによる胸腺萎縮の分子生物学的解析
 - ・ 胸腺細胞のフローサイトメトリー解析、分子生物学的解析、マイクロアレイ解析
 - ・ 骨髄の造血幹細胞解析、骨髄移植実験系の確立
 - ・ 樹状細胞系を用いた解析

(4) ダイオキシンと発生・生殖グループ

- ① 山下 敬介 (広島大学医学部解剖学第一講座 助教授)
- ②
 - ・ 精巣毒性発現機構解析
 - ・ 子宮内膜症発症機構

(5) AhR、AhR/Nrf2 欠失動物の作製と機能解析グループ

- ① 山本 雅之 (筑波大学基礎医学系先端学際領域研究センター 教授)
- ②
 - ・ Nrf2 と AhR ホモノックアウトマウスの解析
 - ・ ゼブラフィッシュの Nrf2 と AhR の活性化機構の解析

- Nrf2 の活性化機構の解析
- Keap1 ノックアウトマウスの作製

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Watanabe, M., Yagagisawa, J., Kitagawa, H., Arao, Y., Suzawa, S., Kobayashi, Y., Tano, T., Yoshikawa, H., Masuhiro, Y., Kato, S. A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor a coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA EMBO J 20, 1341-1352, 2001
- Baba, T., Mimura, J., Gradin, K., Kuroiwa, A., Watanabe, T., Matsuda, Y., Inazawa, J., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. Structure and expression of the Ah receptor repressor gene J. Biol. Chem. 276, 33101-33110, 2001
- Hosoya, T., Oda, Y., Takahashi, S., Morita, M., Ema, M., Yamamoto, M. & Fujii-Kuriyama, Y. Defective development of secretory neurons in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. Genes to Cells 6, 361-374, 2001
- Watanabe T, Imoto I, Kosugi Y, Fukuda Y, Mimura J, Fujii Y, Isaka K, Takayama M, Sato A, Inazawa J. Human arylhydrocarbon receptor repressor (AHRR) gene: genomic structure and analysis of polymorphism in endometriosis. J Hum Genet 46(6), 342-6, 2001
- Oikawa K, Ohbayashi T, Mimura J, Iwata R, Kameta A, Evine K, Iwaya K, Fujii-Kuriyama Y, Kuroda M, Mukai K. Dioxin suppresses the checkpoint protein, MAD2, by an aryl hydrocarbon receptor-independent pathway. Cancer Research, 61(15), 5707-5709, 2001
- Nukaya, M., Takahashi, Y., Gonzalez, F.J. & Kamataki, T. Aryl hydrocarbon receptor-mediated suppression of expression of the low molecular weight prekininogen gene in mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 287(1), 301-4, 2001
- Tanaka T, Morita E, Mihara S, Kanno M, Yamamoto S. Identification of leukemia inhibitory factor as a potent mast cell growth-enhancing factor produced by mouse keratinocyte cell line, KCMH-1. Arch Dermatol Res 293(1-2), 18-25, 2001
- Akasaka T, van Lohuizen M, van der Lugt N, Mizutani-Koseki Y, Kanno M, Taniguchi M, Vidal M, Alkema M, Berns A, Koseki H. Mice doubly deficient for the Polycomb Group genes Mel18 and Bmi1 reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression. Development 128(9), 1587-97, 2001
- Yamasaki M, Sasho T, Moriya H, Kanno M, Harada M, Kamada N, Shimizu E, Nakayama T, Taniguchi M. Extrathymic development of V alpha 11 T cells in placenta during pregnancy and their possible physiological role. J Immunol, 166(12), 7244-9, 2001
- Sugihara, K., Kitamura, S., Yamada, T., Ohta, S., Yamashita, K., Masuda, M., Fujii-Kuriyama, Y. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated induction of xanthine

oxidase/xanthine dehydrogenase activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 1093-1099, 2001

- Yamasaki, S., Ohmori, H., Yamashita, K., Yasuda, M. A morphometric study on postnatal development sciences *Hiroshima Journal of Medical Sciences* 50, 53-60, 2001
- Horie, S., Yasuda, M. Alterations in palatal ruga patterns in Jcl:ICR mouse fetuses from dams treated with all-trans retinoic acid. *Hiroshima Journal of Medical Sciences* 51, 17-25, 2001
- Ikemi, N., Otani, Y., Ikegami, T. & Yasuda, M. Palatal ruga anomaly induced by all-trans retinoic acid in the Crj:SD rat: possible warning sign of teratogenicity. *Reproductive Toxicology* 15, 87-93, 2001
- Ishii, T., Toh, K., Itoh, K., Akasaka, J., Yanagawa, T., Takahashi, S., Yoshida, H., Bannai, S. & Yamamoto, M. Induction of murine intestinal and hepatic peroxiredoxin MSP23 by dietary butylated hydroxyanisole. *Carcinogenesis* 21, 1013-1016, 2001
- Enomoto, A., Itoh, K., Nagaoshi, E., Haruta, J., Kimura, T., O'Connor, T. & Yamamoto, M. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes *Toxicol. Sci.* 59, 169-177, 2001
- Ramos-Gomez, M., Kwak, M., Dolan, P. M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., Kensler, T. W. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducer is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3410-3415, 2001
- Kobayashi, M., Nishikawa, K. & Yamamoto, M. Hematopoietic regulatory domain of gata1 gene is positively regulated by GATA1 protein in zebrafish embryos. *Development* 128(12), 2341-2350
- Kwak, M.K., Itoh, K., Yamamoto, M., Sutter, T.R. & Kensler, T.W. Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dimethylthio-3-thione. *Mol. Med.* 7(2), 135-45
- Shimizu, R., Takahashi, S., Ohneda, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M. In vivo requirements for functional GATA-1 domains during primitive and definitive erythropoiesis. *EMBO J.* 20, 5250-5260 (2001)
- Ogi, T., Mimura, J., Hikida, M., Fujimoto, H., Fujii-Kuriyama, Y. & Ohmori, H. Expression of human and mouse genes encoding polk: testis-specific developmental regulation and AhR-dependent inducible transcription *Genes to Cells* 6, 943-753, 2001
- Oikawa, K., Ohbayashi, T., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., Teshima, S., Rokutan, K., Mukai, K. & Kuroda, M. Dioxin stimulates synthesis and secretion of IgE-Dependent histamine-releasing factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 984-987, 2002

(2) 特許出願

なし