

「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発現の分子メカニズムと モニター系の開発」

### 1. 研究実施の概要

AhR欠失マウスの解析の結果、ダイオキシンやベンツピレンなどの環境汚染物質の生体毒発現にはAhR(Aryl hydrocarbon receptorあるいはdioxin receptorとも呼ばれる)が殆どの場合関与していることが明らかになっている。従って、本研究ではAhRの作用機構とその標的遺伝子の作用の解明を中心に行う。またAhR作用の抑制因子については遺伝子欠失マウスの作製及びその作用メカニズムの解析を行って、遺伝子欠失マウスにおける内分泌かく乱物質の感受性の変化について検討する。

### 2. 研究実施内容

AhRはArntとヘテロ2量体を形成して、標的遺伝子、例えば、CYP1A1の遺伝子のプロモーター領域に存在するXRE配列に結合して、遺伝子の発現を活性するが、XREのない遺伝子でAhRとArntによって活性化される遺伝子が存在する。この遺伝子の解析から新しいエンハンサー配列を決定することができ、この配列をXRE IIと命名した。この配列には直接未知のDNA結合因子Xが結合し、AhRとArntのヘテロ2量体はこのXに結合することが示唆された。今後はこの因子Xの精製とcDNAクローニングを行い、その本体の構造を明らかにしたい。また、XRE II配列をもった遺伝子を探すことによって新たな標的遺伝子が発見される可能性が出て来た。ダイオキシンの一回投与によって、胸腺の萎縮が起こるが、これによってリンパ細胞の細胞数が10%以下に減少し、その効果は1ヶ月以上も持続する。AhR欠失マウスを用いた実験で胸腺の萎縮の80%はAhRが関与していることが示され、リンパ球の分化の過程でCD4、CD8のダブルネガティブからダブルポジティブへの移行が阻害されていることが分かった。ダイオキシンの作用点は細胞増殖調節機構ではなく、細胞死調節機構であることが判明した。この細胞死はCaspase非依存性、且つBcl2非依存性で、アポトーシスとは異なる細胞死であることが示唆された。現在、この点の究明を続けている。

AhR欠失マウスは一見正常に生まれ、発育し、生殖能力もあるが、生後半年を過ぎる頃から脊柱後弯を示す個体が現れ、骨格系の異常が認められた。また体毛の粗

雑化、顔面・頸部の皮フびらんなどが観察された。このような症状と遺伝子発現との関連は今後の問題である。またダイオキシンによって誘導されるCYP1A1, 1A2, 1B1などのP450を大腸菌で発現させる系ができたので、この系を用いて内分泌かく乱物質の代謝を研究することが可能となった。またモルモットにおいてSp1とNF1のDNAへの結合活性がダイオキシン類の投与によって増大することを見出した。

AhRとGSTなどの第2相の薬物代謝酵素遺伝子の発現をコントロールするNrf2の2重欠失マウスを作製したところ、60%が生後2週間以内に死亡することが分かった。死亡したマウスの全例に肝臓に顕著な脂肪の蓄積が見られ、成分解析の結果、不飽和脂肪酸の蓄積であることが明らかとなった。2重欠失マウスでは脂質代謝の異常が示唆された。またAhR抑制因子欠失マウスの作製にも成功しており、AhR抑制因子欠失マウスは見かけ上正常に生まれて来て、生育することが分かった。今後、薬物投与実験等の解析を行う予定である。

### 3. 主な研究成果の発表（論文発表）

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)

Takeyama, K., Masuhiro, Y., Fuse, H., Endoh, H., Murayama, A., Kitanaka, S., Suzawa, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 1049-1055 (1999)

Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Toriyabe, T., Kashiwagi, K., Watanabe, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Kato, S.: Convergence of TGF $\beta$  and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-activators. *Science*, 283: 1317-1321 (1999)

Masami Miyamoto, Yuri Umetsu, Hirotohi Dosaka-Akita, Yuichi Sawamura, Jun Yokota, Hideo Kunitoh, Nobuo Nemoto, Kunio Sato, Noritaka Ariyoshi and Tetsuya Kamataki, CYP2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261: 658-660 (1999)

Yasumasa Sasaki, Yoshiki Takahashi, Kazuo Nakayama and Tetsuya Kamataki, Cooperative regulation of CYP2C12 gene expression by signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) and liver-specific factor in female rats., *J. Biol. Chem.*, 274(52): 37117-37124 (1999)

Toshio N. Takagi, Kohji A. Matsui, Keisuke Yamashita, Hiromitsu Ohmori and Mineo Yasuda, Pathogenesis of cleft palate in mouse embryos exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD), *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 20:73-86 (2000)