

「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 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

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、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

CYP1A1と1A2はダイオキシンによってその発現が活性化されるが、その誘導的発現のメカニズムに大きな違いが認められる。これまでCYP1A1の誘導的発現の研究から、誘導的エンハンサー配列XREが決定され、多くのダイオキシンによって発現が誘導される遺伝子上流にはXREが存在することが証明されている。しかしCYP1A2もダイオキシンによってその発現が活性化されるのにもかかわらずXREの存在について確証はなかった。その発現メカニズムを検討した結果、XREではないエンハンサー配列の存在が明らかになった。この配列XREIIにはAhR/Arntヘテロ2量体は直接に結合せず、このXREIIに直接結合する因子Xを介して結合することが明らかになった。X因子は精製によって均一なタンパク質を得て、その部分アミノ酸配列よりcDNAクローンを単離し、X因子の全アミノ酸配列を決定した。その結果、AhR/ArntはCYP1A2の発現についてはコアクチベーター的に働くことが明らかになった。また、AhR/ArntはER $\alpha$ にも相互作用をしてER $\alpha$ の働きにコアクチベーターとして働くことが示された。AhRの作用に対して抑制的に働く因子AhRRについては、その欠失マウスの作製が完了して、異物代謝酵素の誘導現象を利用して異物に対する感受性を検討している。AhRとNrf2の2重欠失マウスが作製され、その80%は生後数日で脂肪肝で死亡するが、20%は生存する。この生存マウスはメチルコラントレン投与によってCYP1A1、1A2の誘導的発現は見られないが、フェノバルビタール投与によってCYP2B10の誘導が認められることが分かった。その他にAhRRとAhRの2重欠失マウス等を作製し、外来異物に対する感受性を検討する予定である。また、AhR欠失マウスにヒトのAhRを組み込んだマウスが

得られているので、このマウスを用いて、ダイオキシンに対する動物の感受性の変化を検討している。ダイオキシンによる胸腺細胞の縮退はAhRに依存しているが所謂アポトーシスによる細胞死ではない。この細胞死における遺伝子発現をDNAマイクロアレイによる解析を行い、GranzymeB、IAPファミリー遺伝子が増加することが見出された。今後この遺伝子の変化がどのように細胞死に繋がっていくのか検討するつもりである。またダイオキシン処理をした胸腺細胞を電子顕微鏡で観察するとミトコンドリアの膨化が観察された。これはミトコンドリアの膜電子の脱分極の現象と関係していると考えられる。また胸腺に未熟な細胞を供給している骨髄においてダイオキシンの影響を検討したところ、ダイオキシン投与により造血幹細胞が増加していることが分かった。この増加が正常な幹細胞が増加しているのか、それとも異常な細胞が増加しているのかを検討している。

### 3 . 主な研究成果の発表 ( 論文発表 )

Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Kume, Y.H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. & Ishikawa, T. Benz[ a ]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ., 97, 779-782, 2000.

Takahata, S., Ozaki, T., Mimura, J., Kikuchi, Y., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Transactivation mechanisms of mouse clock transcription factors, mClock and mArnt3. *Genes to Cells*, 5, 739-747, 2000.

Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Arai, Y., Suzawa, M., Kobayashi, Y., Ogawa, S., Yano, T., Yoshikawa, H., Masuhiro, Y., Kato, S. A subfamily of RNA binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor coactivator through the N-terminal activation domain( AF-1 )with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J.*, 20, 2001.

Kodera, Y., Takeyama, K., Murayama, A., Suzawa, M., Masuhiro, Y., Kato, S. Ligand-type specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J. Biol. Chem.*, 275, 33201-33204, 2000.

Kato, S., Kitanaka, S., Murayama, A., Takeyama, K. Missense mutations in 25 (OH) vitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene causes vitamin D dependent type I rickets. *Clin. Pediatr. Endocrinol.*, 9 ( suppl. 14 ) 1-5, 2000.

Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., Kato, S. p300 Mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J. Biol. Chem.*, 275, 15645-15651, 2000.

Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Mori, M., Yanagisawa, J., Kato, S. p300/CBP Acts as a

coactivator of the cone-rod homeobox transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 269, 410-414, 2000.

Ikemi, N., Otani, Y., Ikegami, T. and Yasuda, M. Palatal ruga anomaly induced by all-trans-retinoic acid in the Crj : SD rat : possible warning sign of teratogenicity. *Reproductive Toxicology*, 15( 1 ), 87-93, 2001.

Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S. and Yamamoto, M. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J. Biol. Chem.* 275, 16023-16029, 2000.

Motohashi, H., Katsuoka, F., Shavit, J., Engel, J.D. and Yamamoto, M. Positive or negative MARE-dependent transcriptional regulation is determined by the abundance of small Maf proteins. *Cell* 103, 865-875, 2000.

Enomoto, A., Itoh, K., Nagayoshi, E., Haruta, J., Kimura, T., O'Connor, T., Harada, T. and Yamamoto, M. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzyme and antioxidant genes. *Toxicol. Sci.* 59, 169-177, 2001.

Ramos-Gomez, M., Kwak, M-K., Dolan, P. M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P. and Kensler, T. W. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3410-3415, 2001.