

「内分泌かく乱物質」

平成10年度採択研究代表者

藤井 義明

(筑波大学先端学際領域研究センター 客員教授)

「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

アリルハイドロカーボン受容体 (AhR, またはダイオキシン受容体とも言う) の作用メカニズムを詳細に検討し, 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し, 内分泌かく乱物質の作用との関係を検討する。AhR及びAhRR遺伝子の欠失マウスを作製し, その表現型の変化を解析して, それら遺伝子の機能を推定すると同時に, 内分泌かく乱物質の毒性発現の感受性の変化を検討する。またAhRによって遺伝子発現が活性化される異物代謝酵素CYPによるダイオキシンを含む内分泌かく乱物質の代謝活性を検討する。

2. 研究実施内容

CYP1B1はCYP1A1と同様にダイオキシンや3メチルコラントレン (3MC) によってその合成がAhRを介して誘導されるが, AhR(-/-)マウスではCYP1A1と同様に発現しなくなることが分かった。CYP1B1はCYP1A1と殆ど同様の基質特異性を示し, ベンゾピレンなどの多くの多環性芳香族発癌物質の代謝活性化に関与していることが明らかになった。マウスのCYP1A2はCYP1A1と同じように, ダイオキシンなどによってAhRを介した強い誘導的発現がみられるが, AhR(-/-)マウスでは, CYP1A1の発現は全く見られなくなるのに対し, CYP1A2は弱い構成的発現が見られる。このことがCYP1A1とCYP1A2の間で遺伝子発現と異なる点である。CYP1A2の遺伝子の上流約9kbまでにCYP1A1の誘導的発現に関与するXRE配列は認められないが, 2kb上流にダイオキシンに依存して, 遺伝子発現を活性化するXRE配列とは異なったエンハンサー配列が存在することを明らかにした。このエンハンサー配列にはXREと異なりAhR/Arntヘテロ2量体は直接結合しないが, この配列に直接結合する因子LBP-1a又はcを介して結合し, 転写を活性化することが明らかになった。この時にはAhR/ArntのDNA結合領域は必要ではない。このようなAhR/Arntヘテロ2量体のコアクチベーター的な作用メカニズムは, 3MCやダイオキシンのエストロジェン様作用を示す時にも働くことが示された。この時には, エストロジェンの結合していないER α あるいは β がEREに結合しているときに, 3MCやダイオキシンの結合によって活性化されたAhR/Arntヘテロ2量体が, ERのAF-1

に結合する。AhR/ArntがAF-1と相互作用する場所は、HLH-PAS領域であり、この時にもAhR/ArntのN末端にあるDNA結合領域は必要ではない。この作用メカニズムによって、ERの標的遺伝子であるVEGFやcFos遺伝子が、3MCなどによって活性化される。また、卵巣摘出雌マウスに3MCを投与したところ、エストロジェンと同じように子宮重量が増加したが、AhR(-/-)雌マウスではその増加が認められないことから、3MCの示すエストロジェン作用に、AhR/Arntの関与していることが確認された。AhR(-/-)雌マウスは129SVとの雑種の時は、第一回目の受精は成功するが、それ以降は妊娠しなくなる。さらに、遺伝子背景をC57BLに純化すると、初めから不妊になることが分かった。その原因を追求すると4-5日の周期でおこるEstrus cycleが不順で、PMSGとhcGによる強制排卵の操作で排卵が起こらず、黄体形成不全であることが明らかになった。この雌マウスは、エストロジェンの合成の低下が認められ、アロマターゼの発現が顕著に低下していることが分かった。AhRはマウスでは多型があり、ダイオキシンに高感受性と低感受性のマウスが各々C57BL/6とDBA/2として知られている。これらのマウスでは、AhRの塩基配列に5個のアミノ酸の置換を伴う塩基置換があり、その中の2つの塩基の置換が、ダイオキシンの結合親和性に関与していることが明らかにされている。ヒトの場合には、このアミノ酸の置換が低感受性のマウスAhRに一致し、実験的にもヒトAhRは、高感受性C57BL/6マウスのAhRに比較してダイオキシンに対する親和性が低下している。ヒトのAhR cDNA遺伝子を高感受性マウスのAhRの遺伝子座に置き換えてhumanized AhRマウスを作製した。このマウスは、ダイオキシンによる薬物代謝酵素CYP1A1の誘導に対し低感受性で、催奇形性に対しても抵抗性であることが分かった。また、AhRRはAhRによって遺伝子発現が活性化されAhRの転写活性を抑制する因子として、そのcDNAが単離された。この遺伝子を相同組み換え法の技術によって、欠失マウスを作製した。このマウスを使って、ダイオキシンによる薬物代謝酵素CYP1A1の誘導や、催奇形性などの検討を行っている。このAhRR欠失雌マウスも生殖に欠陥がある可能性が出て来たので、詳細な検討を行っている。Estrus cycleは、脳下垂体から分泌されるFSHとLH及び卵巣から分泌されるエストロジェン、アクチビン、インヒビンの協調作用によってコントロールされていると考えられている。現在FSHRとLHR欠失マウスを得ているので、これらの欠失マウスも使って、Estrus cycleにおけるAhRの役割をさらに詳細に検討する予定である。

3. 研究実施体制

AhRの機能調節グループ

- ① 研究分担グループ長：藤井義明（筑波大学先端学際領域研究センター，客員教授）
- ② 研究項目：AhRとAhRRの機能，異物の毒性感受性及びAhRR遺伝子欠失マウスの作製P450と代謝グループ

- ① 研究分担グループ長：鎌滝哲也（北海道大学大学院薬学研究科，教授）

- ② 研究項目：内分泌攪乱物質の代謝に関わるP450の検討

ダイオキシンと胸腺グループ

- ① 研究分担グループ長：菅野雅元（広島大学大学院医歯薬学総合研究科，教授）
- ② 研究項目：内分泌攪乱物質，特にダイオキシンによる胸腺縮退のメカニズム
ダイオキシンと発生・生殖グループ
- ① 研究分担グループ長：山下敬介（広島大学大学院医歯薬学総合研究科，助教授）
- ② 研究項目：ダイオキシンによる子宮内膜症と精巣毒性のメカニズム
AhRR, AhR/Nrf2欠失動物の作製と機能解析グループ
- ① 研究分担グループ長：山本雅之（筑波大学基礎医学系，教授）
- ② 研究項目：AhRとNrf2ダブル欠損マウスの作製とAhRR欠損マウスの作製による内分泌攪乱物質のモニターマウスの作製
AhRの作用メカニズムグループ
- ① 研究分担グループ長：十川和博（東北大学大学院生命科学研究科，教授）
- ② 研究項目：AhRの作用メカニズムの研究

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Mimura, J. & Y. Fujii-Kuriyama. Regulatory roles of AhR. *Env. Sci.*, **9**: 71-81 (2002)
- 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)
- Gradin K., Takasaki C., Fujii-Kuriyama Y., Sogawa K. The Transcriptional Activation Function of the HIF-like Factor Requires Phosphorylation at a Conserved Threonine. *J Biol Chem.*, **277**: 23508-23514 (2002)
- F. Wang, H. Sekine, Y. Kikuchi, C. Takasaki, C. Miura, H. Okuda, T. Shuin, Y. Fujii-Kuriyama, and K. Sogawa. HIF-1 α -proryl Hydroxylase: Molecular Target of Nitric Oxide in the Hypoxic Signal Transduction Pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **295**: 657-662 (2002)
- Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Nagasawa, H., MacMahon, S. B., Cole, M. D., Tora, L., Takahashi, N., Kato, S.: Nuclear receptor function requires a TFIIA-type histone acetyl transferase complex. *Mol. Cell.*, **9**: 553-562 (2002)
- Takeyama, K., Ito, S., Yamamoto, A., Tanimoto, H., Furutani, T., Kanuka, H., Miura, M., Tabata, T., Kato, S.: Androgen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in drosophila. *Neuron*, **35**: 55-864 (2002)
- Kato, S., Yoshizawa, T., Kitanaka, S., Murayama, A., Takeyama, K.: Molecular

- genetics of vitamin D-dependent hereditary rickets. *Hormone Research*, **57**: 73-78 (2002)
- Matsui, D., Sakari, M., Sato, T., Murayama, A., Takada, I., Kim, M., Takeyama, K., Kato, S.: Transcriptional regulation of the mouse steroid 5 α -reductase type II gene by progesterone in brain. *Nucleic Acids Res.*, **30**: 1387-1393 (2002)
 - Michihiro Chida, Noritaka Ariyoshi, Tsuyoshi Yokoi, Nobuo Nemoto, Makoto Inaba, Moritoshi Kinoshita and Tetsuya Kamataki: New allelic arrangement *CYP2D6*36x2* found in a Japanese poor metabolizer of debrisoquine, *Pharmacogenetics*, **12**: 659-662 (2002)
 - Satoshi Daigo, Yoshiki Takahashi, Masaki Fujieda, Noritaka Ariyoshi, Hiroshi Yamazaki, Wasaburo Koizumi, Satoshi Tanabe, Katsunori Saigenji, Seiko Nagayama, Kazumasa Ikeda, Yasuhiko Nishioka and Tetsuya Kamataki: A novel mutant allele of the *CYP2A6* gene (*CYP2A*11*) found in a cancer patient who showed poor metabolic phenotype toward tegafur, *Pharmacogenetics*, **12**(4): 299-306 (2002)
 - Takeshi Ozeki, Yoshiki Takahashi, Kazuo Nakayama, Masato Funayama, Kazuo Nagashima, Takako Kodama and Tetsuya Kamataki: Hepatocyte nuclear factor(HNF)-4 α/γ and HNF-1 α as casual factors of interindividual difference in the expression of human dihydrodiol dehydrogenase(DD)4mRNA in human livers, *Pharmacogenetics*, **13**: 49-53 (2002)
 - Kazuma Kiyotani, Masaki Fujieda, Hiroshi Yamazaki, Tsutomu Shimada, F. Peter Guengerich, Andrew Parkinson, Kazuko Nakagawa, Takashi Ishizaki and Tetsuya Kamataki: Twenty one novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *CYP2A6* gene in Japanese and Caucasians, *Drug Metabol. Pharmacokin.*, **17**(5): 482-487 (2002)
 - Takeshi Ozeki, Yoshiki Takahashi, Kazuo Nakayama, and Tetsuya Kamataki: Hepatocyte nuclear factor(HNF)-4 α/γ , HNF-1 α and vHNF-1 regulate the cell-specific expression of the human dihydrodiol dehydrogenase(DD)4/AKR1C4 gene, *Arch. Biochem. Biophys.*, **405**: 185-190 (2002)
 - Kazuma Kiyotani, Hiroshi Yamazaki, Masaki Fujieda, Satoshi Daigo, Soisungwan Satarug, Pailin Ujjan, and Tetsuya Kamataki: Novel mutations of the *CYP2A6* gene in a Thai population with lowered capacity of coumarin 7-hydroxylation, *Drug Metabol. Pharmacokin.*, **17**(2):SNP1(161)-SNP3(163) (2002)
 - Zeki Topcu, Itsuo Chiba, Masaki Fujieda, Toshiyuki Shibata, Noritaka Ariyoshi, Hiroshi Yamazaki, Figen Sevgican, Malsantha Muthumala, Hiroshi Kobayashi, and Tetsuya Kamataki: *CYP2A6* gene deletion reduces oral cancer risk in betel quid

- chewers in Sri Lanka, *Carcinogenesis*, **23**(4): 595-598 (2002)
- Miyazaki, K., Inoue, H., Onai, N., Ishihara, H., and Kanno, M. Chemokine-mediated thymopoiesis is regulated by a mammalian Polycomb group gene, mel-18. *Immunol. Lett.*, **80**: 139-43 (2002)
 - Keisuke Yamashita, Fine structural aspects of the urothelium in the mouse ureter with special reference to cell kinetics. *Hiroshima J. of Med. Sci.*, **51** (2): 41-48 (2002)
 - Yuichi Tsumamoto, Hidetoshi Yamashita, Masaya Takumida, Koji Okada, Satoshi, Mukai Makoto Shinnya, Keisuke Yamashita, Mineo Yasuda, and Hiromu K. Mishima. In situ localization of nitric oxide syntase and direct evidence of NO production in rat retinal ganglion cells. *Brain Res.*, **933**(2): 118-129 (2002)
 - Kusunoki, H., Motohashi, H., Katsuoka, F., Morohashi, A., Yamamoto, M. and Tanaka, T. Solution structure of the DNA-binding domain of MafG. *Nature Str. Biol.*, **9**: 252-256 (2002)
 - Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. and Talalay, P Direct evidence that sulfhydryl group of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 11908-11913 (2002)
 - Kobayashi, M., Itoh, K., Suzuki, T., Osanai, H., Nishikawa, K., Katoh, Y., Takagi, Y. and Yamamoto, M. Identification of the interactive interface and phylogenic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells*, **7**: 807-820 (2002)
 - Katsuoka, F., Motohashi, H., Tamagawa, Y., Kure, S., Igarashi, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M. Small Maf compound mutants display CNS neuronal degeneration, aberrant transcription and Bach protein mislocalization coincident with myoclonus and abnormal startle response. *Mol. Cell. Biol.*, **23**: 1163-1174 (2002)
 - Itoh, K., Wakabayashi, W., Katoh, Y., Ishii, T., O' Connor, T. and Yamamoto, M. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells*, **8**: 379-391 (2003)
 - Junsei Mimura, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD, *Bioch. Biophys. Acta*, **1619**, 263-268 (2003)
 - Shuhei Noda, Nobuhiko Harada, Azumi Hida, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Hozumi Motohashi and Masayuki Yamamoto. Gene expression of detoxifying enzymes in AhR and Nrf2 compound null mutant mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**:

105-111 (2003)

- Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K., Kato, S.: Inhibition of adipogenesis by cytokines with suppression PPAR γ function through the TAK1/TAB1-NIK mediated cascade. *Nature Cell Biol.*, **5**: 224-230 (2003)
- Kenji Toide, Hiroshi Yamazaki, Rikako Nagashima, Keisuke Itoh, Shunsuke Iwano, Yoshiaki Takahashi, Shaw Watanabe and Tetsuya Kamataki: Aryl hydrocarbon hydroxylase represents CYP1B1, and not CYP1A1, in human freshly isolated white cells: Trimodal distribution of Japanese population according to induction of CYP1B1 mRNA by environmental dioxins, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **12**: 219-222 (2003)
- Fujisaki S, Ninomiya Y, Ishihara H, Miyazaki M, Kanno R, Asahara T, and Kanno M. Dimerization of the Polycomb-group protein Mel-18 is regulated by PKC phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**: 135-140 (2003)
- Sakai R, Kajiume T, Inoue H, Kanno R, Miyazaki M, Ninomiya Y, and Kanno M. TCDD treatment eliminates the long-term reconstitution activity of hematopoietic stem cells. *Toxicol. Sci.*, **72**, 84-91 (2003)
- Noda, S., Harada, N., Hida, A., Fujii-Kuriyama, Y., Motohashi, H. and Yamamoto, M. Gene expression of detoxifying enzymes in AhR and Nrf2 compound null mutant mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **303**: 105-111 (2003)
- Masanobu Morita, Akira Kobayashi, Toshiharu Yamashita, Tomomasa Shimanuki, Osamu Nakajima, Satoru Takahashi, Shiro Ikegami, Kaoru Inokuchi, Keisuke Yamashita, Masayuki Yamamoto and Yoshiaki Fujii-Kuriyama. Functional analysis of basic transcription element binding protein (BTEB) by gene targeting technology. *Mol. Cell. Biol.*, **23**: 2489-2500 (2003)
- Masanobu Morita, Osamu Ohneda, Toshiharu Yamashita, Satoru Takahashi, Norio Suzuki, Osamu Nakajima, Shimako Kawauchi, Masatsugu Ema, Shigeki Shibahara, Tetsuo Udono, Koji Tomita, Makoto Tamai, Kazuhiro Sogawa, Masayuki Yamamoto and Yoshiaki Fujii-Kuriyama. HLF/HIF2^Δ is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *EMBO J.*, **22**: 1134-1146 (2003)
- Daisuke Mori, Naoko Okuro, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Kazuhiro Sogawa, Gene structure and promoter analysis of the rat BTEB2 gene. *Gene*, **304**: 163-170 (2003)

(2) 特許出願

なし