

表2. 油症患者 (5名) と健常人 (8名) の血中ダイオキシン類濃度の比較 (1998年)

Congener	油症患者				健常人			
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
2,3,7,8-TCDD	-	-	-	-	1	0.5	0.5	2
1,2,3,7,8-PeCDD	17	6	10	24	5	2	2	7
1,2,3,4,7,8-HxCDD	-	-	-	-	2	0.6	2	3
1,2,3,6,7,8-HxCDD	106	72	47	208	20	4	14	27
1,2,3,7,8,9-HxCDD	-	-	-	-	3.5	0.7	2.4	4.3
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	25	15	8	49	18	7	11	26
OCDD	185	124	54	381	279	131	113	552
2,3,7,8-TCDF	-	-	-	-	1	0.3	0.5	1
1,2,3,7,8-PeCDF	-	-	-	-	1	0.3	-	1
2,3,4,7,8-PeCDF	410	238	156	727	9	3	5	13
1,2,3,4,7,8-HxCDF	180	130	52	380	4	1	3	6
1,2,3,6,7,8-HxCDF	59	40	18	125	5	1	3	6
1,2,3,7,8,9-HxCDF	-	-	-	-	0	0	0	0
2,3,4,6,7,8-HxCDF	-	-	-	-	2	1	1	3
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	12	1.4	11	14	2	1	2	4
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	-	-	-	-	0.4	0.2	-	0.9
OCDF	-	-	-	-	-	-	-	-
3,3',4,4'-TeCB	-	-	-	-	2	11	-	22
3,3',4,4',5-PeCB	195	101	97	306	48	21	18	79
3,3',4,4',5,5'-HxCB	364	292	133	860	40	18	19	67
Total PCDD-TEQ	17	11	8	33	7	2	4	8
Total PCDF-TEQ	229	135	86	414	6	2	3	8
Total PCDD/PCDF-TEQ	246	144	100	447	12	3	8	16
Total Coplanar PCB-TEQ	23	13	11	39	5	2	2	8
Total TEQ	270	153	112	487	18	5	10	24
Lipid (%)	0.41	0.04	0.36	0.46	0.42	0.05	0.37	0.49

単位: pg/g Lipid - : 定量限界以下

D. 考 察

結果の項で述べたように、油症患者の血中ダイオキシン濃度は総 TEQ 濃度で見ると経年的に減少傾向が認められ、これは TEQ 値の大部分にあたる 2,3,4,7,8-PeCDF、1,2,3,4,7,8-HxCDF および 1,2,3,6,7,8-HxCDF の減少がその大きな要因である。PCDDs の 1,2,3,7,8-PeCDD および 1,2,3,6,7,8-HxCDD の増減傾向は明確ではない。一方、OCDD はかなり急速に減少しているように見られる。coplanar PCBs の 3,3',4,4',5,5'-HxCB は減少しているが、3,3',4,4',5-PeCB の増減傾向は明確ではない。油症患者の血中ダイオキシン類濃度を健常人と比較するとき（1998 年）1,2,3,7,8-PeCDD および 1,2,3,6,7,8-HxCDD

は患者の方が高濃度であり、ライスオイル中に混入していた PCDDs の影響が示唆された。また、OCDD がかなり急速に減少しており、健常人の濃度と比べて低くなっていることは油症患者に特異な現象かもしれない。また健常人の総 TEQ で表した血中ダイオキシン類濃度が、典型的な油症患者のレベルの 1/14 とかなり接近していることは注目に値する。今後 1998 年と 1999 年の残りの患者血液（各 44 および 47 例）について分析を行い、今回 5 名の患者で見られた傾向について検証する。

E. 参考文献

- 1) 飯田隆雄、平川博仙、松枝隆彦、福岡医誌, **88**, 169-176 (1997).

油症患者30年のダイオキシン類と症状の変遷

分担研究者 増田 義人 第一薬科大学薬学部 教授

研究要旨 福岡油症患者5名および台湾油症患者3名の血液を、それぞれ1982～1998年および1980～1995年の間に数回採取し、ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)およびポリ塩化ビフェニル(PCB)の異性体を分析した。福岡油症患者において、ダイオキシン毒性の70%をしめる2,3,4,7,8-penta-CDFの体脂質当り濃度は、1969年に60 ppbであったものが、1997年では800 pptに減少したものと推定される。その間、初めの15年間は半減期2.9年で、後半の15年間は半減期7.7年で減衰した。典型的な油症症状である、クロルアクネ、色素沈着、眼脂過多などは数年経過するごとにゆっくりと快方に向かっているが、酵素誘導、ホルモン異常によると考えられる中性脂肪の上昇、血清サイロキシン濃度の異常、免疫異常などは30年経過した現在でも継続して残っている。

A. 研究目的

福岡、長崎を中心とする西日本において、ポリ塩化ビフェニル(PCB)、ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)およびポリ塩化クオータフェニルが混入されたライスオイルを摂取した油症中毒事件が1968年に発生した。患者は、クロルアクネを主訴とする特異な慢性症状を示し、30年経過した現在においても症状が残っている。非常によく似たPCB、PCDFによる中毒が、台湾において11年後の1979年に発生した。これら2つの中毒事件の患者体内に残留するPCB、PCDFを追跡することにより、ダイオキシン類が人体内ではどのような状態で蓄積および排出がなされているかを調査する。また、それに伴う油症患者の症状の変化を観察する。

B. 方法

血液試料

検診のために診療所を訪れた、福岡の

油症患者5名および台湾油症患者3名から血液約10 mlを採取し、冷凍庫(-20℃)の中に分析されるまで保存した。

PCB分析

血液試料約5 gに、 ^{13}C 標識した2,2',3,4,5,5',6-hepta-CB 5 ngを内標準物質として加え、1N NaOH/エタノール溶液中で3時間60℃に加温して加水分解した。この混液に水5 mlを添加した後、5 ml n-ヘキサンで2回抽出した。n-ヘキサン溶液を水洗後、乾燥して、シリカゲル1 gのカラムクロマトにかけた。n-ヘキサン20 mlの抽出液を濃縮し、電子捕獲検出器付ガスクロマトグラフまたは、ガスクロマトグラフ/四重極質量分析計でPCB異性体の分析をした。

PCDF分析

血液試料に ^{13}C -PCDD 6種、 ^{37}Cl -PCDF 7種および ^{13}C -コプラPCB 3種を内標準物質として加え、さらにエタノール、n-ヘキサン、硫酸アンモニウムを加え、混和した。

上層のn-ヘキサン層を集め、水洗した後蒸発濃縮させて、残留した脂質を秤量した。脂質をn-ヘキサンに溶かし、これを濃硫酸で処理した後、多層カラム（水酸化セシウム/硫酸・シリカゲル/シリカゲル）を通した後、フロリジルカラムでPCDD/PCDFを多量のPCBから分離させた。毒性を持っているダイオキシン類はCarbopack C活性炭・シリカゲルのカラムクロマトにより分離させた。溶出液を濃縮し、回収率チェック用の内標準物質を添加して、高分離能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計（VG Analytical MSまたはFinnigan MAT90）でダイオキシン類の分析をした。

C. 結果

台湾油症患者3名の1980～1995年に採取した血液、および福岡油症患者5名の1982～1998年に採取した血液について、それぞれ3種のPCDF異性体および6種のPCB異性体の濃度を測定した。それぞれの異性体について、油症発生からの経過時間とともにどのように変化したかをグラフにした。そのうち、2,3,4,7,8-penta-CDFの濃度変化を図1に示す。これらの異性体の患者体内における減衰状態を、1コンパートメントモデルとして計算したので、その半減期を表1に示す。3種のPCDF異性体の台

湾油症患者における半減期は、油症発生から5700日（15.6年）まででは約3.0年であった。また、福岡油症患者では5,000日以後の半減期は3.5～7.7年であり、長期化している。2,3',4,4',5-penta-CBを除く5種のPCB異性体の半減期は、同じ台湾油症患者におけるPCDF異性体の半減期よりも長く4.2～6.0年であった。このPCBの半減期は、福岡油症患者の油症発生後5,000日以降においても、PCDFの半減期よりも明らかに長く9～18年であった。2,3',4,4',5-penta-CBは特異なPCB異性体であり、その半減期は他のPCBおよびPCDF異性体よりも短く、比較的速く消失しており、油症発生後4,000日においては一般人のレベルよりも低くなっていた。

D. 考察

油症発生後5,100日（14年）の時点における福岡油症患者の2,3,4,7,8-penta-CDFの濃度は台湾油症患者の同じ異性体の濃度の3.8倍であった。したがって、福岡油症患者における発生直後の濃度は60 ppbと推定される。2,3,4,7,8-penta-CDFのダイオキシン毒性相当係数は0.5であり、油症患者ではダイオキシン毒性の70%をこの異性体で占められているので、福岡油症患者では発生直後のダイオキシン毒性濃度

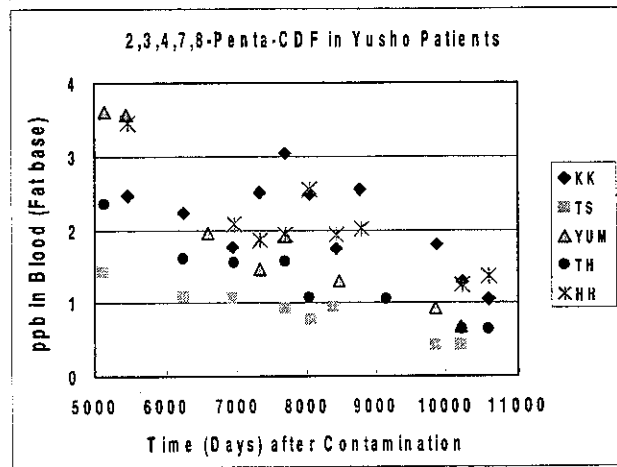
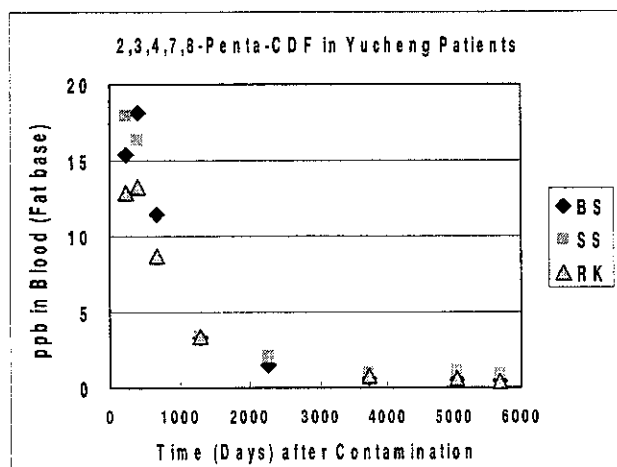


図1 台湾及び福岡油症患者における2,3,4,7,8-penta-CDFの血液中濃度の変遷

表 1 台湾及び福岡油症患者における PCDF 及び PCB 異性体の半減期

	Half-life (Years)									
	Yucheng patient				Yusho patient					
	0.6~15.6 years after onset				14.0~29.1 years after onset					
	BS	SS	RK	Median	KK	TS	YUM	TH	HH	Median
2,3,4,7,8-Penta-CDF	2.7	3.6	2.9	2.9	14.3	7.7	6.1	5.2	11.4	7.7
1,2,3,4,7,8-Hexa-CDF	2.7	3.6	3.5	3.5	6.5	4.5	3.9	5.1	6.9	5.1
1,2,3,4,6,7,8-Hepta-CDF	2.6	2.5	2.2	2.5	6.6	2.6	3.5	3.5	3.4	3.5
Average	2.7	3.2	2.9	3.0	9.1	4.9	4.5	4.6	7.2	5.4
2,3',4,4',5-Penta-CB	1.6	1.9	1.5	1.6	19.5	6.9	33.7	17.6	10.4	17.6
2,2',4,4',5,5'-Hexa-CB	3.4	4.2	4.2	4.2	9.1	7.4	16.0	12.9	7.4	9.1
2,2',3,4,4',5'-Hexa-CB	4.4	4.5	5.5	4.5	12.8	8.9	13.7	31.0	9.5	12.8
2,3,3',4,4',5'-Hexa-CB	3.8	5.6	5.3	5.3	9.4	8.5	21.5	13.2	14.4	13.2
2,2',3,3',4,4',5'-Hepta-CB	4.7	6.0	5.9	5.9	18.4	12.3	237.5	13.3	443.7	18.4
2,2',3,4,4',5,5'-Hepta-CB	4.3	6.0	6.0	6.0	16.7	12.2	20.4	10.3	224.6	16.7
Average	3.7	4.7	4.7	4.6	14.3	9.4	21.1	16.4	118.3	14.6

except -237.5

は 40 ppb であったと考えられている。これが約 30 年経過した 1997 年には 600 ppt になり、その間の半減期は 4.5 年と計算された。

油症患者で当初見られた典型的な症状であるクロルアクネ、色素沈着、眼脂過多などは非常にゆっくりと快方に向かっており、現在では一見ただけで患者であるとの識別はできない状況である。しかし、酵素誘導やホルモン異常が原因と考えられる中性脂肪の上昇、血清サイロキシン濃度の異常、免疫異常などは 30 年経過した現在でも継続して残っている。

これらは次世代にも影響を及ぼす可能性がある。

E. 参考文献

- 1) 増田義人, ダイオキシン汚染と健康影響, 食品衛生学雑誌, **39**, J255-J262 (1998).
- 2) 増田義人, ダイオキシン類によるリスクの評価, エネルギー・資源, **20**, 37-43 (1999).
- 3) Y. Masuda, Fate of Exposed PCDFs and PCBs in Patients with Yusho PCB Poisoning, *Organohalogen Compounds*, **44**, 27-38 (1999).

コプラナーPCBによる精巣Leydig細胞における
HSP70の誘導のisoform特異性
— mRNAレベルでの検討 —

分担研究者 小栗 一太 九州大学大学院薬学研究科 分子衛生薬学分野 教授

研究要旨 本研究では、油症原因油にも含まれるコプラナーPCBの毒性発現機構を解明する目的で、3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (ICPAC PCB126, PenCB) の精巣Leydig細胞における Heat shock protein 70 (HSP70) への影響を isoform レベルで明らかにすることを目的とした。PenCBは、高レベルに環境を汚染しており、かつその影響がTEQ値では、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinを上回るとされ、PCB異性体中で最強毒性を示すコプラナーPCBでもある。これまでに、ラット肝サイトソルの分子シャペロンHSP70およびHSP90が、PenCBにより著しく誘導されることを明らかにした。更に、精巣におけるテストステロン産生を通じて、精子形成に重要な役割を果たしているLeydig細胞において、これら2種の分子シャペロンが、環境汚染レベルのPenCBによっても誘導されること見出ししている。HSP70には、HSP70.1、HSP70.2およびHSP70.3、少なくとも3種のストレス応答性のisoformが存在すると言われている。本研究では、これらのmRNA発現レベルへのPenCB処理の影響をLeydig細胞において検討し、100 nM PenCB 一時間処理によって、HSP70.1が約10倍に、HSP70.2が約3倍に誘導されることがRT-PCRの結果より示唆された。HSP70.3については、検出されるものの、定量には至らなかった。このことから、HSP70 isoformの構成的発現には違いがあること、また、コプラナーPCBによるHSP70の誘導には、isoform選択性があることが明らかになった。ダイオキシン類がヒトの生殖機能に与える影響は広範囲な状況把握が必要なため明白でない点も多く、対策は困難を極めており、その生化学的メカニズムは十分には理解されていない。PenCBによる分子シャペロンHSP70の誘導は環境汚染レベルのPenCBによっても見い出されていることから、油症患者においては、より内分泌系への障害発現が危惧され、その毒性発現機構を解明する上で一つの重要な手がかりになると考えられる。

A. 研究目的

平面構造を持つ polychlorinated biphenyl (PCB) は、コプラナーPCB とよばれ、Polychlorinated dibenzo-p-dioxin (PCDD)、polychlorinated dibenzofuran (PCDF) と相

互に類似の化学構造を持ち (Fig. 1)、強い毒性を示す。これらを総称してダイオキシン類と呼んでいる。コプラナーPCBは、油症原因油にも含まれており、世界規模で汚染を引き起こしている環境汚染物質

でもある。なかでも本研究に用いた 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (IUPAC PCB126, PenCB) は、PCB 異性体中で最強の急性毒性を示す。また、内分泌攪乱化学物質の一つとして生殖機能に与える影響が危惧されているが、その毒性の生化学的メカニズムは十分には理解されていない。

コプラナー PCBs の毒性発現メカニズムの解明が遅れている要因に、その多面的な毒性がある。これらの化合物は一般に、体重増加抑制、胸腺や脾臓の萎縮、肝肥大、免疫機能低下、生殖障害などの毒性を示すことが知られているが、この生物学的効果の少なくとも一部は細胞質に存在する aryl hydrocarbon receptor (Ah-receptor, AhR) 依存性メカニズムを介すると考えられている。

Ah-receptor は 90 kDa heat shock protein (HSP90) と複合体を形成して細胞質内に存在しており、リガンドが結合すると HSP90 は解離し核内に移行する。次いで Ah-receptor nuclear translocator (Arnt) とヘテロダイマーを形成し、特異的に xenobiotic responsive element (XRE) と呼ばれる consensus 配列に結合して転写を活性化する (Fig. 2.)。事実、ダイオキシン類により誘導される cytochrome P4501A1 (CYP1A1)、NAD (P) H:quinone oxidoreductase、glutathione-S-transferase Ya subunit、UDP-glucuronosyltransferase 1A6 遺

伝子にはいずれも XRE の制御配列がプロモーター領域にあることが明らかであり、これは AhR/Arnt のヘテロ二量体が転写制御機構に関与していることを強く示唆するものである。しかし、動物の系統差や種差で示されるダイオキシン類に対する感受性の大きな違いが、Ah-receptor の発現量、あるいは親和性で全て説明されるか否かは今のところ明らかではなく、いままお、その毒性発現機構が十分に解明されたとは言い難い状況にある。

ダイオキシン類の暴露によりラットにおいて血糖値の低下が起こる。また、グルコース輸送体の発現抑制やインスリンの分泌抑制などの作用による糖利用率の低下も示唆されている。さらに、当研究室において、これまで糖代謝に関与する多くの酵素活性が PenCB 処理ラット肝において有意に低下することを明かにしている。このような PenCB により糖代謝の抑制された状態においては、グルコース調節タンパク質 (glucose regulated protein, GRP) の発現量も著しく変化している。当教室では、PenCB 処理により、ラット肝ミクロソーム中の GRP (GRP78 および GRP94) が著しく抑制されることを見出している。

GRP はストレスタンパク質の一種である。ストレスタンパク質は種々のストレスに細胞がさらされた場合にタンパク質の変性、凝集を抑えることにより細胞を防御していると考えられていたが、その後の研究

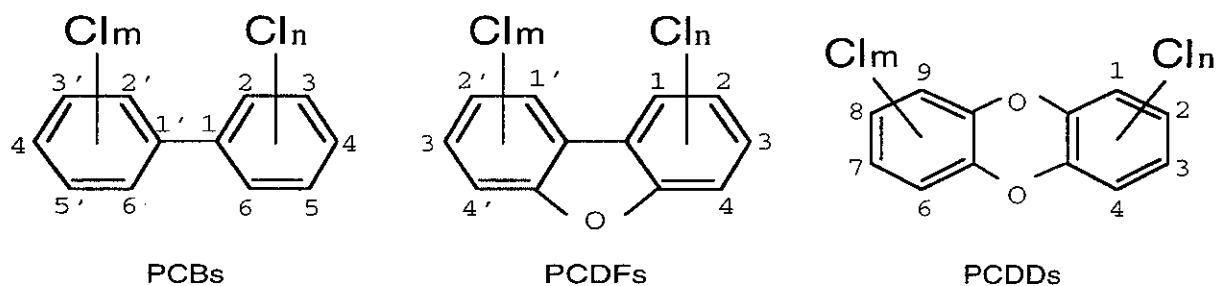


Fig. 1. Structures of PCBs, PCDFs, PCDDs.

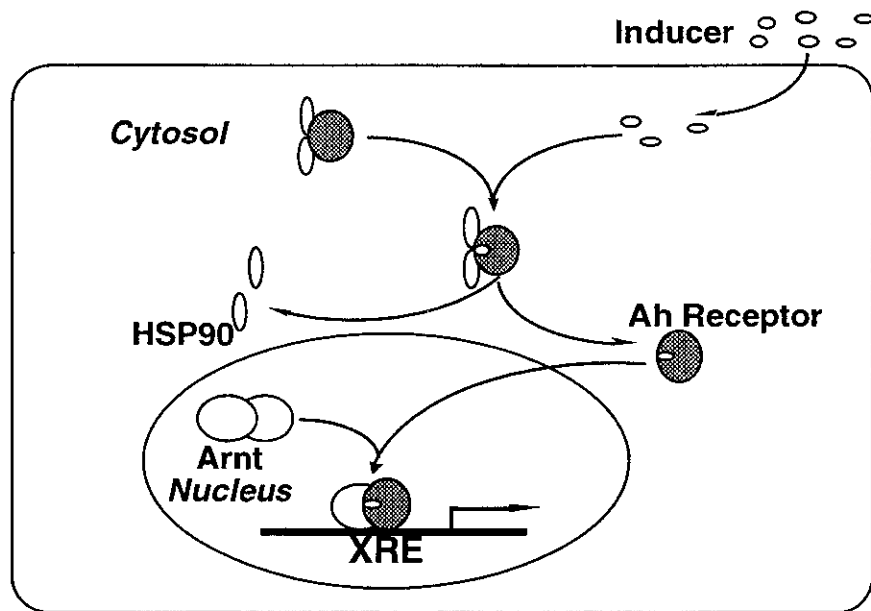


Fig. 2. Postulated mechanism of transcriptional activation of Ah-responsive gene by Ah-receptor system.

Ah, Aryl hydrocarbon

で多くのストレスタンパク質は平常時にも細胞内でタンパク質との相互作用を通じて、細胞の正常な代謝や生存にとって必須の役割を担っていることが明らかになった。合成されたポリペプチドの折畳み (folding) や会合 (assembly) の調節、つくられたタンパク質の細胞内輸送や品質管理 (quality control)、転写因子の調節やシグナル伝達およびシグナル受容体の活性調節、さらには分解に至るまで、極めて広範な細胞機能に関わっている。このようなストレスタンパク質の機能的側面から、分子シャペロンと呼ぶことが提案され、定着している。分子シャペロンとは、未熟なタンパク質に一過性に結合してその folding や assembly を助け、完成した最終的な産物からは解離してゆく介助タンパク質ということになるが、全てのストレスタンパク質がシャペロン機能を持つか否かについては明確ではない。

多くの生物種で分子シャペロンはその分子量の違いから幾つかのファミリーに分類される。なかでも、分子量 70 kDa 前後の HSP70 ファミリーと分子量 90 kDa 前後の

HSP90 ファミリーは全ての生物に認められ、かつ進化の過程でよく保存されており、これら一群のタンパク質が生物に共通の重要な機能を持つことが示唆されている。事実 HSP70 および HSP90 は様々なタンパク質分子と相互作用する分子シャペロンであり、特に HSP90 はシグナル伝達において HSP70 と協同し重要な役割を果たしている。

Estrogen receptor (ER)、androgen receptor (AR) などのステロイドホルモンレセプターは、リガンド非存在下ではレセプター複合体として存在しており、この複合体は HSP90、HSP70 を含むタンパク質群からなる。HSP90 は細胞中でリガンド非存在下においてレセプターの活性を抑制し、HSP70 はレセプター複合体形成の介助を行っていると考えられている。一方、雄性の生殖組織においては、ER が発現していることが知られており、精巣においてもエストロゲンの濃度は非常に高い。これまで雄性生殖器におけるエストロゲンの役割は未解明の問題であったが、近年、ER ノックアウトマウスを用いた動物実験

などから、エストロゲンが精子の濃度を維持することが明らかとなり、精子数の減少傾向にエストロゲンが直接的な影響を及ぼしている可能性が示唆されるようになった。

当教室では、PenCB 処理によってラット肝臓の HSP70 および HSP90 が誘導されることを明らかにしている。また精巣 Leydig 細胞では、10 pM という低濃度の PenCB によって HSP70 および HSP90 が誘導されることを明らかにしている。しかしながら、HSP70 にはストレス応答性の isoform が、HSP70.1、HSP70.2 および HSP70.3 の少なくとも3種類存在すると考えられており、HSP70 が PenCB で誘導されるとしても、どの form が PenCB にレスポンスするのかは、分かっていない。

以上のような背景から、本研究では、ストレス応答性の HSP70 isoform とされる、HSP70.1、HSP70.2 および HSP70.3 の発現量を選択的に評価することを指向して、RT-PCR を用いた定量法を検討した。HSP70 isoform は、エクソン一つにコードされており、open reading frame (ORF) における相同性が極めて高い。これに対し、非翻訳領域は比較的相同性が低い。この部分に着目して、PenCB 処理精巣 Leydig 細胞における分子シャペロン HSP70 の誘

導を isoform の mRNA レベルで検討した。

B. 方法

HSP70.1 および HSP70.2 の非翻訳領域の増幅 Fig. 3. に、HSP70.1 と HSP70.2 の RT-PCR による検出の模式図を示す。100 nM PenCB で1時間処理した Leydig LC540 細胞より、Bio-Mag (Perseptive Ltd) によって mRNA を調製し、oligo (dT)₂₀-P7 primer と MMLV 逆転写酵素により 1st strand cDNA を合成し、Takara Ex-Taq DNA polymerase を用いて、Fig. 3. の様に、isoform 特異的に PCR 増幅した。HSP70.1 では、284bp、HSP70.2 では253bp の産物が得られた。これらの PCR 産物が目的の配列を有するか否かを調べるために、TA クローニングにより pGEMT-vector (Promega) にライゲーションして、*E. Coli* JM109 を形質転換した。Direct PCR により、クローンをスクリーニングし、ポジティブクローンを得た。これらクローンは、ABI Big-Dye terminator 法により塩基配列を決定し、目的のインサートを含むクローンであることを確認した。なお、HSP70.3 についても試み、産物は得られたものの、定量化には至っていない。

RT-PCR による定量 種々の検討の結果、mRNA でなく total-RNA を用いる方が、

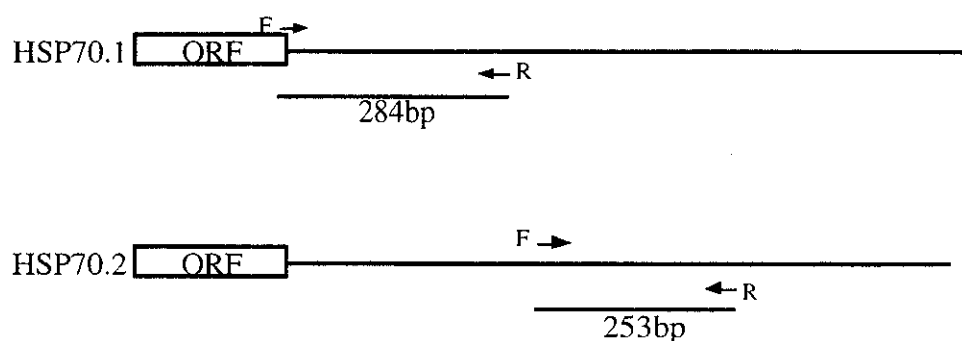


Fig. 3 Selective PCR amplification of HSP70.1 and HSP70.2.

F: primer forward

R: primer reverse

ORF: open reading frame

extra band もなく、定量に適していると思われた。そこで、Leydig LC540 細胞を 100 nM PenCB 処理し、一時間後にハーベストして total-RNA を単離した。コントロールには、DMSO 処理を行ない、同様に total-RNA を単離した。逆転写反応および PCR は、基本的に前述の通りにおこなった。まず、 β -actin によるノーマライズを行なった。 β -actin プライマーは、新たに設計し、鋳型濃度とサイクル数から、直線性のある範囲は 26 サイクルまでであることが分かった。このプライマーを用いることで、mRNA からは 280 bp の産物が出来るのに対し、RNA にコンタミネーションしたゲノム DNA からは 320 bp の産物が生成する。使用したサンプルにおいては、320 bp のバンドは認められていないことから、一つの exon しかない HSP70 の RT-PCR 解析にも供することの出来るサンプルであることがわかった。次に、HSP70.1 および HSP70.2 についても同様な検討を行ない、鋳型濃度とサイクル数を割り出した。こ

れにしたがって、ほぼ同量の β -actin の RT-PCR 産物を与える鋳型量で、HSP70.1 および HSP70.2 について、PenCB 処理とコントロールを比較した。なお、逆転写を行っていない total-RNA を鋳型の代りに加えても、増幅産物は得られていないことから、得られた産物は、mRNA に由来していると考えられた。

100 nM PenCB で一時間処理した Leydig 細胞では、HSP70.1 は、コントロールの約 10 倍、HSP70.2 では、約 3 倍に誘導されることが、RT-PCR の結果から明らかになった。(Fig. 4. and 5) また、 β -actin との duplex-PCR の結果からも、HSP70.1 の PenCB 誘導性が明らかであった。

C. 考 察

HSP70.1、HSP70.2 および HSP70.3 の遺伝子は、Fig. 6. の様に近接して並んでいる。何れの 5'-上流域にも、XRE とアサインされるコンセンサス配列が見出だされる。特に、HSP70.2 と HSP70.3 の ORF は 5'-上流域をお互いに共有した構造になって

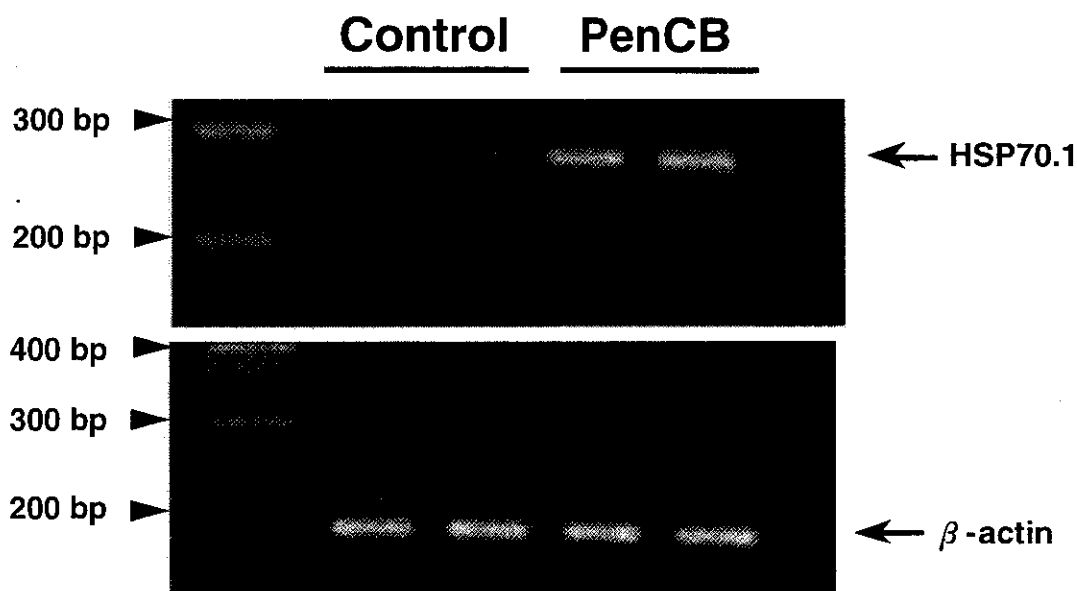


Fig. 4 Induction of HSP70.1 following PenCB exposure in rat Leydig LC540 cells. Cells were exposed to 100 nM PenCB or vehicle (DMSO) for 1 hr. Both total-RNA samples were subjected to RT-PCR amplification. PCR of HSP70.1 (upper panel) and β -actin (lower panel) were stopped after 30 cycles, and the products were separated on a 2% agarose gel containing ethidium bromide.

いる。Ah-receptor-XREによる、Ah-gene batteryであるとするなら、XREの dioxin responsive enhancer という機能から考えて、HSP70.3も誘導されるものと期待していた。しかし今回は、HSP70.3の定量化には至っておらず、その誘導性については、確認出来ていない。

このように、HSP70のisoformによって、精巢Leydig細胞における構成的な

発現レベルが異なることが示唆された。

HSP70.1については、この方法で区別できない isoform が存在する可能性があり、HSP70.1の誘導率が高くなっているのは、区別しえなかった別のHSP70.1との発現の総和である可能性もある。

D. 研究発表

1) 日本薬学会第120年会 (岐阜、2000年3月)

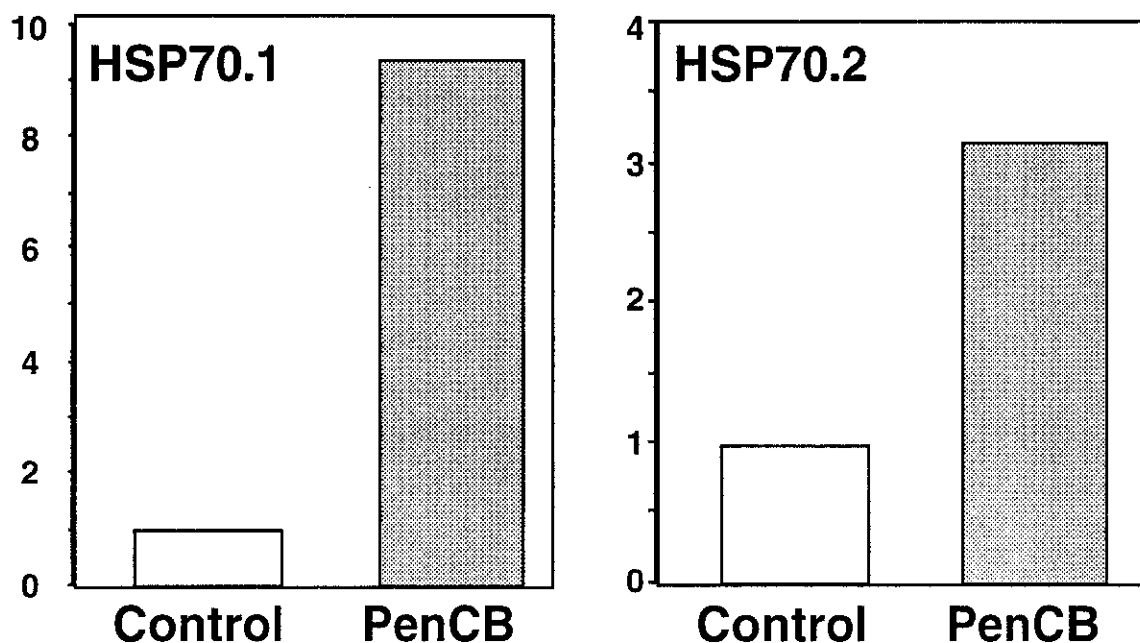


Fig. 5 Comparison of the inducibility between HSP70.1 and HSP70.2 following PenCB exposure in rat Leydig LC540 cells.

Isoform-selective RT-PCR amplification of HSP70.1 and HSP70.2 were performed. Inducibility of HSP70.1 and HSP70.2 were calculated the from laser densitmetric estimation from the RT-PCR amplification. Relative band intensity to that of control (= 1.0) is shown.



Fig. 6 Organization of HSP70.1, HSP70.2 and HSP70.3 genes.

The boxes represent coding region plus 3' untranslated region of the genes, and the gene distances are between the start codon of HSP70.1 and the poly (A) signal of HSP70.2, and between the start codons of HSP70.2 and HSP70.3 (Walter *et al.* 1994).

コプラナーPCBによる
カルボニックアンヒドラーゼIII (CAIII) 発現への影響
— 肝臓と筋肉での発現調節の違い —

分担研究者 小栗 一太 九州大学大学院薬学研究科 分子衛生薬学分野 教授

研究要旨 コプラナーPCBやダイオキシンによるCYP1A1などの誘導的発現調節機構は、よく研究されているが、発現抑制機構については、あまり分かっていないのが実状である。当研究室では、コプラナーPCBが、ラット肝カルボニックアンヒドラーゼIII (CAIII) のタンパク質レベルの低下を引き起こす原因が、そのmRNAレベルの著しく低下によることを明らかにしてきた。CAIIIは、筋肉にも高レベルに発現していることから、本研究では、コプラナーPCBの筋肉CAIIIへの影響を検討した。まず、ラットヒラメ筋のCAIII cDNAをRT-PCRクローニングして、塩基配列を決定し、肝臓型と筋肉型のCAIIIが同一であることを明らかにした。次に、これをプローブとしてノーザンブロッティングを行った。PCB最強の急性毒性を示す3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (IUPAC PCB 126, PenCB) (10 mg/kg) 処理5日後の、筋肉CAIII mRNAレベルは、対照群に比べやや高いか、ほとんど変わらないことが明らかになった。このことから、PenCBによるCAIIIタンパク質レベルの著しい低下は、筋肉には起らず、肝臓に特異的であると考えられた。

A. 研究目的

当教室では、油症原因油にも含まれるコプラナーPCBの毒性発現機構を解明する目的で、コプラナーPCBにより毒性の発現した状態においては、生理的に重要な機能をもつタンパク質の発現量が著しく変化するという作業仮説を立て検討を行ってきた。その結果、PenCB処理ラット肝サイトソルにおいて、カルボニックアンヒドラーゼIII (CAIII) の発現量が著しく減少していることが見出された。これまでコプラナーPCBやポリ塩化ジベンゾフラン類などの多塩素化芳香族炭化水素 (PAH) によるタンパク質の誘導的発現調節機構については、かなり詳細な研究が行

われてきており、体内に吸収されたPAHはサイトソルに存在するaromatic hydrocarbon receptor (Ah-receptor) と結合し、さらにAh-receptor nuclear translocator (Arnt) と結合して複合体を形成した後、遺伝子の上流域に存在するxenobiotic responsive element (XRE) と特異的に結合して転写の活性化を引き起こすという、Ah-receptor-XRE pathway が知られている。その一方で、HAHsによるタンパク質の発現抑制のメカニズムはほとんど明らかにされていない。

カルボニックアンヒドラーゼ (CA) は、動植物に広く分布しており、水と二酸化炭素の可逆的な水和/脱水和反応を触媒

している酵素であり、これまでにいくつかの isozymes の存在が確認されている。CAIII は、CAI や CAII と比較して CO₂ hydration 活性は低いが、ホスファターゼ活性をもつという特徴がある。したがって、PenCB により CAIII の発現が抑制された場合、細胞内におけるリン酸化を介したシグナルトランスダクションに影響を与える可能性がある。

当教室では、この CAIII の抑制に着目し、PenCB によるタンパク質の発現抑制機構の解明を目的として、PenCB 処理ラット肝における CAIII の発現について、そのタンパク質レベルでの検討を行ってきた。7 週令 Wistar 系雄性ラットにおける、

CAIII タンパク質レベルの低下の PenCB 用量依存性について、0 から 25 mg/kg の PenCB を腹腔内に単回投与して検討し、CAIII に特異的な抗体を用いたイムノブロットティングを行った結果、PenCB 処理 5 日後では CAIII は PenCB 10 mg/kg の用量まで用量依存的に減少していた。

PenCB により、このような CAIII タンパク質レベルの著しい低下が起こることから、CAIII の発現抑制機構を明らかにする目的で、ラット肝の CAIII cDNA をクローン化し、これをプローブとしてノーザンブロットティングを行なった。PenCB 10 mg/kg 処理によって CAIII mRNA レベルの著しい減少が認められた。

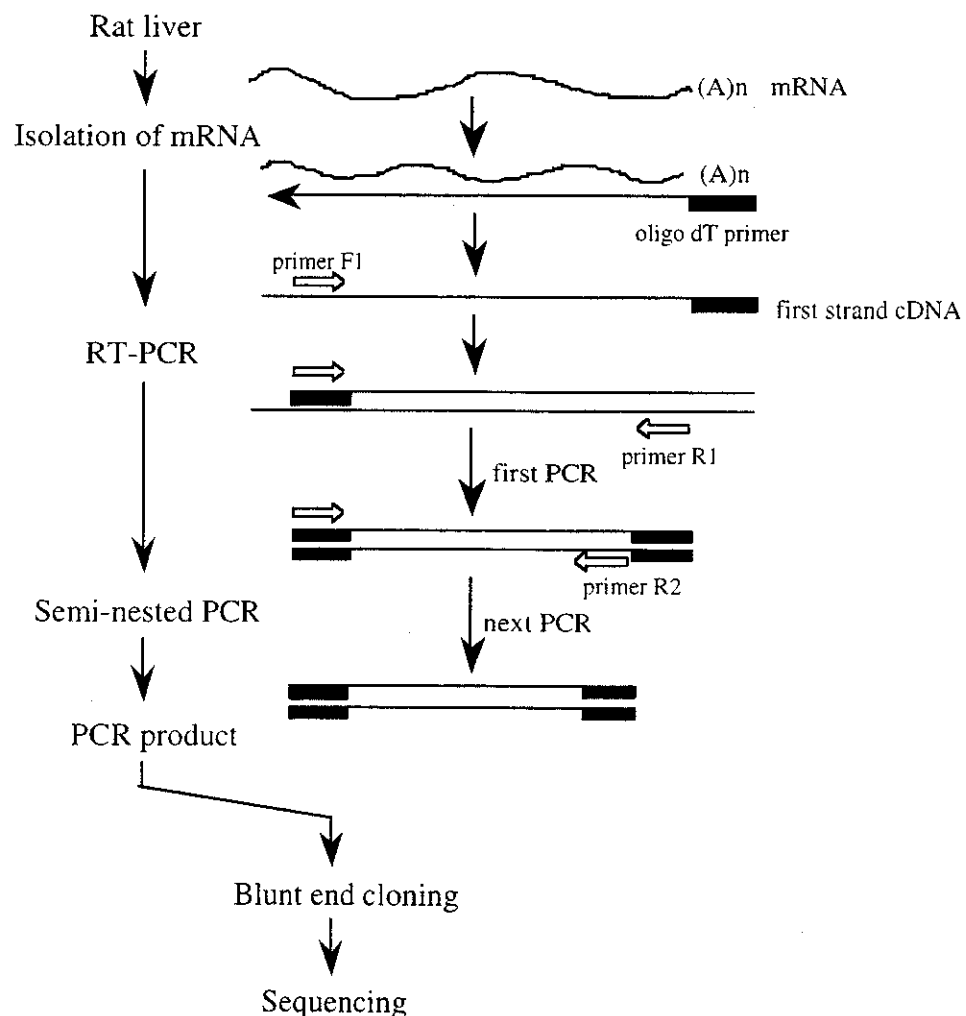


Fig. 1 Strategy of cDNA cloning of rat muscle and liver carbonic anhydrase III.

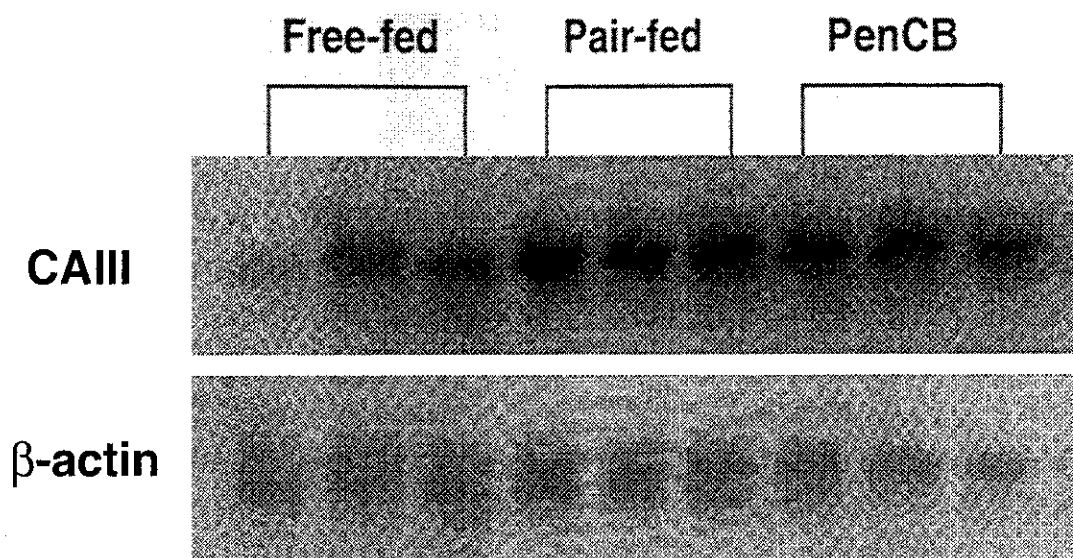


Fig. 2 Northern blot analysis of soleus muscle CAIII mRNA.

mRNA was isolated from free-fed control, pair-fed control, and PenCB-treated rat muscle and subjected to northern blot analysis. Each lane contains 0.5 μ g of mRNA. A β -actin probe was used for normalization of mRNA amount and transfer efficiency.

CAIIIは、種を超えて筋肉に多く発現している、これまでの報告にある肝臓のCAIIIと筋肉のCAIIIには、幾つかの相違点があることから、本研究では、まず、筋肉のCAIII cDNAをクローン化して、肝臓型と筋肉型のCAIIIの異同を明らかにするとともに、コプラナーPCBの筋肉CAIIIレベルへの影響を検討した。

B. 方法・結果

ラット筋肉CAIIIのcDNAクローニング未処理 Wistar ラットの肝臓およびヒラメ筋から mRNA を調製し、RT-PCR を行い、CAIII の open reading frame (ORF) を含む 846 bp の product を blunt end cloning して塩基配列の決定を行った (Fig. 1)。その結果、肝臓と筋肉のCAIII cDNAの配列は、完全に一致しており、肝臓と筋肉には同じCAIIIが発現していることが示唆された。

PenCB処理のラット筋肉CAIIIの mRNA レベルへの影響

4週令 Wistar 系雄性ラットに PenCB を 10 mg/kg 宛て、腹腔内に単回投与し、投与 5 日後にヒラメ筋を摘出、液体窒素中で直ちに凍結し、使用まで -80°C で保存した。PenCB 処理群に対するコントロール群には、free-fed コントロール群、ならびに PenCB 処理により摂餌量が減少することが知られているので、PenCB 処理群の摂餌量に対する pair-feeding を行った pair-fed コントロール群を設けた。クローン化したラット CAIII cDNA をプローブとしてノーザンブロッティングを行い、PenCB 処理ラット筋肉における CAIII mRNA レベルの検討を行った。その結果、PenCB 処理によって、筋肉の CAIII mRNA レベルは、変化しないか、むしろ増加した (Fig. 2)。

C. 考 察

肝臓と筋肉での CAIII の異同を明らかにするため、Wistar ラットのヒラメ筋の CAIII cDNA を RT-PCR でクローン化した。

筋肉から得た CAIII cDNA の配列は、肝臓のそれと完全に一致し、肝臓と筋肉の CAIII は同一であることが示唆された。PenCB 処理が筋肉の CAIII に及ぼす影響を、ノーザンブロットで解析した結果、筋肉の CAIII は、PenCB 処理によって、変らないか、むしろ増加することが分かった。CAIII は、種を超えて筋肉に発現していると思われるが、PenCB による筋肉 CAIII の発現レベルへの影響を通じた毒性への寄与はあまり大きくないと推察された。ラット肝臓での CAIII の高発現の理由は、男性ホルモンの調節によるとの報告がある。ダイオキシンによってテストステロンレベルが下がることも示唆されている。このことから、筋肉の CAIII は、男性ホルモンによる調節は受けていない可能性があり、肝臓と筋肉では CAIII の発現調節機

構が異なっているものと推定される。

肝臓では CAIII の著しい発現抑制が認められるが、ラットの CAIII 遺伝子のプロモーター領域の配列は明らかではなく、その遺伝子上に XRE の存在も確認されていないため、Ah-receptor が CAIII の転写制御に関与するか否かは現時点では不明である。PenCB による肝臓の CAIII mRNA の著しい減少が、Ah-receptor-XRE pathway のような転写制御によるのか、テストステロンレベルの低下など内分泌への影響を介したものであるのかを含め、どのような機構によって引き起こされるのかを解明することが、今後の課題である。

D. 研究発表

- 1) 第72回日本日本生化学会大会（横浜、1999年10月）。

分担研究報告書

コプラナーPCB誘導性セレン結合性タンパク質の生理的機能の解明 —塩基配列の決定と生理的機能の考察—

分担研究者 小栗 一太 九州大学大学院薬学研究科 分子衛生薬学分野 教授

研究要旨 これまで、当研究室では、コプラナーPCBによるラット肝臓でのタンパク質の発現量の変化を検討した結果、セレン結合性タンパク質の発現量が著しく増加することを明らかにした。本タンパク質の生理的機能および誘導機構については、未解明な点が多い。しかし、その解明は、コプラナーPCBの毒性発現の解明に新たな知見を加えると考えられる。本年度は、本タンパク質の生理的機能を解明する研究の一環として、cDNAの塩基配列を決定し、それより推定されるアミノ酸配列から、その生理的機能を考察した。

A. 研究目的

コプラナーPCBやダイオキシンの毒性発現機構については、これまで様々な研究がなされている。しかし、細胞のサイトソル分画に存在する芳香族炭化水素レセプター、いわゆる Ah-receptor が関与すると考えられているものの、その詳細は明らかにされていない。これまで当研究室では、コプラナーPCBによる毒性の発現は、生体もしくは細胞にとって重要なタンパク質の発現量のレベルが著しく変化するためであるという作業仮説をたて、コプラナーPCB処理ラット肝臓でのタンパク質の発現量の変化を検討した。その結果、マウスのセレン結合性タンパク質に非常に相同性の高い分子量 54 kDa のタンパク質の発現量が著しく増加することを明らかにした。本タンパク質の生理的機能および誘導機構については、未解明な点が多い。しかしその解明は、コプラナーPCBの毒性発現の解明に新たな知見を加えると考えられる。本年度は、分子生物学的観点から本タンパク質の生理的機

能を解明するため、cDNAの塩基配列の決定を行った。また、決定した塩基配列よりアミノ酸配列を推定し、その生理的機能について考察した。

B. 方法

3-Methylcholanthreneを5 mg/kg 宛、腹腔内に3日間連続投与した Wistar 系雄性ラットの肝臓から mRNA を調製し、これまでに報告されているマウスおよびヒトのセレン結合性タンパク質の塩基配列^(1,2)をもとに設計したプライマーを用いて RT-PCR を行った。得られた PCR product を、TA クローニングベクターである pGEM[®]-T Easy vector に組み込み、その後、JM109 cell に transform した。この JM109 cell を増殖させ、プラスミドを抽出し、特異的なプライマーを用いて PCR を行い、その PCR product の塩基配列を決定した。その結果、ラット肝 54kDa タンパク質の open reading frame (ORF) を含む 1685 bp の配列が明らかとなった。また、この塩基配列よりアミノ酸配列を翻訳したところ、マ

ウスのセレン結合性タンパク質に非常に相同性の高い、472個のアミノ酸配列が推定された (Fig. 1)。

C. 考 察

我々が明らかにした塩基配列は、ラット肝 54 kDa タンパク質の ORF を含んでおり、3'-下流には、ポリ A の付加位置の認識信号である AATAAA 配列と思われる配列が存在した。しかし、5'-上流 62 bp を解析することができたものの、その中に Ah-receptor が特異的に作用すると考えられている塩基配列 xenobiotic responsive element を見出すことはできなかった。今回推定されたアミノ酸配列より、PCB126 および 3-MC により誘導されるラット肝サイトソル 54 kDa タンパク質は、マウスおよびヒトに見られるセレン結合性タンパク質の counter part であることが強く示唆された。また、このアミノ酸配列の中には、酸化還元に関わるタンパク質のいくつかを持っているユニークなモチーフ、

bis (cysteiny) sequence motif が存在する可能性が示された。このことから、本タンパク質は細胞内において、酸化還元に関わる機能を有するタンパク質の 1 つである可能性が考えられる。すなわち、PCB126 による本タンパク質の発現増加現象には、PCB126 により生ずる酸化ストレスにตอบสนองした、細胞の防御機構の 1 つである可能性が考えられる。今回の結果は、未解明な点が多いセレン結合性タンパク質の生理的機能の解明にせまる情報であり、コプラナー PCB やダイオキシンなどの毒性発現機構の解明に、新たな知見を与えるものであると考えられる。

D. 参考文献

- 1) M. P. Bansal, T. Mukhopadhyay, J. Scott, R. G. Cook, R. Mukhopadhyay and D. Medina, *Carcinogenesis*, **11**, 2071 (1990).
- 2) P. W. G. Chang, S. K. W. Tsui, C. Liew, C. Lee, M. M. Y. Waye and K. Fung, *J. Cell. Biochem.*, **64**, 217 (1997).

rat 54 kDa protein	MATK CTKCGPGY ATPLEAMKGPREE IVYLPCIYRNTG TEAPDY LATVDVD PKSE HYCQVIHRLPMP FLKDELHHS	75
mouse-SeBP	MATK CTKCGPGY STPLEAMKGPREE IVYLPCIYRNTG TEAPDY LATVDVD PKSE HYCQVIHRLPMP FLKDELHHS	75
mouse-APBP	MATK CTKCGPGY STPLEAMKGPREE IVYLPCIYRNTG TEAPDY LATVDVD PKSE HYCQVIHRLPMP FLKDELHHS	75
human-SeBP	MATK CTKCGPGY STPLEAMKGPREE IVYLPCIYRNTG TEAPDY LATVDVD PKSE HYCQVIHRLPMP FLKDELHHS	75
rat 54 kDa protein	GWNT SSCF GDSTKSR DKLIL ESII SSRIYVVDVGSE FRAEKLHKVIE PN ETIAK ONLGN LHTSHCLAS GEVMIS	150
mouse-SeBP	GWNT SSCF GDSTKSR DKLIL EGLI SSRIYVVDVGSE FRAEKLHKVIE AS ETIAK ONVSS LHTSHCLAS GEVMVS	150
mouse-APBP	GWNT SSCF GDSTKSR DKLIL EGLM SSRIYVVDVGSE FRAEKLHKVIE AS ETIAK ONVSN LHTSHCLAS GEVMVN	150
human-SeBP	GWNT SSCF GDSTKSR DKLIL ESLI SSRIYVVDVGSE GPQKLHKVIE PK ETIAK ON LHTSHCLAS GEVMIS	150
rat 54 kDa protein	SLG DPG NGK GSFVLLD GETFEVKG TWE HPG GA EMGYDFWYQ PRH MMV STEWAAPNV FKDG FNPA VEAGLYG	225
mouse-SeBP	TLG LLC NGK GSFVLLD GETFEVKG TWE HPG DA EMGYDFWYQ PRH MMV STEWAAPNV FKDG FNPA VEAGLYG	225
mouse-APBP	TLG LLC NGK GSFVLLD GETFEVKG TWE HPG GA EMGYDFWYQ PRH MMV STEWAAPNV FKDG FNPA VEAGLYG	225
human-SeBP	SLG DPG NGK GSFVLLD GETFEVKG TWE HPG GA EMGYDFWYQ PRH MMI STEWAAPNV LFDG FNPA VEAGLYG	225
rat 54 kDa protein	SH HVVD WQRHE ITQTLQ MDGLIP LEIRFLH DESATQ GFVGCALSS NIQ RFYK NEEGTWS VEKVIQ VFSK KVKG	300
mouse-SeBP	SR HVVD WQRHE ITQTLQ MDGLIP LEIRFLH DESATQ GFVGCAS ARNIQ RFYK NAEGTWS VEKVIQ VFSK KVKG	300
mouse-APBP	SR HVVD WQRHE ITQTLQ MDGLIP LEIRFLH DESATQ GFVGCALSS NIQ RFYK NEEGTWS VEKVIQ VFSK KVKG	300
human-SeBP	SH LVVD WQRHE ITQTL SLR DGLIP LEIRFLH DESATQ GFVGCAS ARNIQ RFYK TRREGTWS VEKVIQ VFSK KVKG	300
rat 54 kDa protein	W LL LE MPGL ITD ILLSL DDRFLYFS NWLHGD IRQYDIS NE PKPRL IG QIF LGG SIV GG SVQVLE D ELT C QPEE	375
mouse-SeBP	W LL LE MPGL ITD ILLSL DDRFLYFS NWLHGD IRQYDIS NE PKPRL IG QIF LGG SIV GG SVQVLE D ELT C QPEE	375
mouse-APBP	W LL LE MPGL ITD ILLSL DDRFLYFS NWLHGD IRQYDIS NE PKPRL IG QIF LGG SIV GG SVQVLE D ELT C QPEE	375
human-SeBP	W LL LE MPGL ITD ILLSL DDRFLYFS NWLHGD IRQYDIS NE PKPRL IG QIF LGG SIV GG SVQVLE D ELK S QPEE	375
rat 54 kDa protein	L VV KGK RIV GG PQMI QLSLDGK RLY MT SLY SAM K QFY PL I REG S VM L Q MD VT AN GGL KL NPN L V DFG KEE	450
mouse-SeBP	L VV KGK RIV GG PQMI QLSLDGK RLY MT SLY SAM K QFY PL I REG S VM L Q MD VT AN GGL KL NPN L V DFG KEE	450
mouse-APBP	L VV KGK RIV GG PQMI QLSLDGK RLY MT SLY SAM K QFY PL I REG S VM L Q MD VT AN GGL KL NPN L V DFG KEE	450
human-SeBP	L VV KGK RIV GG PQMI QLSLDGK RLY MT SLY SAM K QFY PL I REG S VM L Q MD VT AN GGL KL NPN L V DFG KEE	450
rat 54 kDa protein	L G ALAH ELRY PG DCSS DI WI	472
mouse-SeBP	L G ALAH ELRY PG DCSS DI WI	472
mouse-APBP	L G ALAH ELRY PG DCSS DI WI	472
human-SeBP	L G ALAH ELRY PG DCSS DI WI	472

Fig. 1. Comparison of amino acid sequences of rat liver 54 kDa protein and mouse selenium-binding protein (SeBP), acetaminophen-binding protein (APBP) or human SeBP. Shaded boxes represent bis(cysteiny) sequence motif.

PCBsによる気道上皮細胞のアポトーシス誘導に関する検討

分担研究者 中西 洋一 九州大学大学院医学系研究科 附属胸部疾患研究施設 助教授

研究要旨 PCB、PCDFによる気道上皮細胞の傷害とアポトーシスとの関連について検討を加えた。ヒト気道上皮細胞株、A549を使用した。各種濃度のPCBsを添加して培養し、trypan day exclusion testにより細胞死の誘導を検討した。また、抽出した細胞質DNAにおいてDNA ladder formationとp53蛋白の誘導を検討した。各種濃度のPCBsを添加して培養し、細胞死の誘導を検討した。0.2～25 μ g/mlでは細胞死もDNA ladder formationもみられなかった。対照として用いた末梢血単核細胞では、PCBs添加により低濃度で細胞死とDNA ladder formationも観察された。また、1-NPでは薬剤接触の24時間後にp53蛋白の発現が確認されたが、PCBs、PCDF、TCDDではp53蛋白の発現はみられなかった。

以上の結果より、気道上皮はPCBs刺激に対して不応性であり、PCBsの作用を生理的条件下に観察するには細気管支Clara細胞の形質を有した細胞株の使用が必要なこと、ならびにPCBsによるapoptosisにはp53の関与は大きくないことが推測された。

A. 研究背景・目的

油症の原因物質であるPCDFならびにPCBは、全身臓器に種々の障害を引き起こした。呼吸器系においては、1)慢性気管支炎様の気道症状が多く、油症患者で認められたこと、ならびに2)疫学的に肺癌発生が増加する可能性が示唆されたことが重要は問題として挙げられる。しかしその詳細は不明であり、今後の検討が必要と思われる。

一方、慢性炎症と発癌に細胞のアポトーシスが関与していることが報告されている。しかし、PCBとアポトーシスとの関連はほとんど報告がない。唯一マウス脾細胞を用いた検討において、PCBによる免疫系の障害は、免疫担当細胞がアポトーシスに陥ることが一因であるとの知見が報告された(Yoo et al, Toxicol Lett., 1977)。ヒト気道上皮の異型には、アポ

トーシス関連遺伝子産物p53の過剰発現が認められる(Wakamatu et al, Am J Respir Cell Mol Biol., 1999)。発現は、異型度が進むにつれて増加し、肺癌の多段階発癌説を支持する一所見とされている(Bennett et al, Cancer Res., 1993)。これまでの動物実験モデルで示されたPCBと肺発癌の関連、PCBによる細気管支上皮の変性脱落を考え合わせると、PCBによる細気管支肺胞上皮細胞の形態変化には、アポトーシスが関与していることは想像に難くないが、現在のところそのような報告はない。

そこで、本研究では、PCB、PCDFによる気道上皮細胞の傷害とアポトーシスとの関連について検討を加えることとした。

B. 方法

1) 培養細胞系におけるアポトーシスの検討

ヒト気道上皮細胞株、A549を使用した。対照細胞として、ヒト末梢血単核細胞を使用した。各種濃度のPCBsを添加して培養し、trypan blue dye exclusion testにより細胞死の誘導を検討した。また、 1×10^7 個の細胞より抽出した細胞質DNAにおいてDNA ladder formationを検討した。

2) 培養細胞系におけるp53蛋白の誘導

1×10^7 個の細胞より抽出した細胞質DNAにおいて、western blot法によりp53蛋白の誘導を検討した。対照薬として、1-NPとPCDFを用いた。

C. 結果

1) 培養細胞系におけるアポトーシスの検討

各種濃度のPCBsを添加して培養し、細胞死の誘導を検討した。0.2～25 μ g/mlでは、細胞死もDNA ladder formationもみられなかった。超高濃度(50 μ g/ml)でようやく細胞死がみられた。一方、対照として用いた末梢血単核細胞ではPCBs添加後、4時間後には、1、2.5、5、10 μ g/mlのPCBsにより、%生細胞が93.4、65.2、35.6、15.8、3.8 (%)となり、DNA ladder formationも

観察された。

2) 培養細胞系におけるp53蛋白の誘導

1×10^7 個の細胞より抽出した細胞質DNAにおいて、p53蛋白の誘導を検討した。対照薬として、1-NP、PCDF、TCDDを用いた。1-NPでは、薬剤接触の24時間後にp53蛋白の発現が確認されたが、PCBs、PCDF、TCDDではp53蛋白の発現はみられなかった。

D. 考察

PCBsやPCDFによる細気管支Clara細胞の傷害が実験動物で示されている。その分子機序を解明するために本実験を行ったが、in vitroにおいて明らかなapoptosisが生じたのは、superphysiological concentrationでのみだった。また、1-NPのようなDNA damaging agentによって生じるp53蛋白の発現も明らかではなかった。

以上の結果より、気道上皮はPCBs刺激に対して不応性であり、PCBsのn作用を生理的条件下に観察するには、細気管支Clara細胞の形質を有した細胞株の使用が必要なこと、ならびにPCBsによるapoptosisにはp53の関与は大きくないことが推測された。