

れぞれ 75 ppm 及び 40 ppb である時に、油症特有のクロルアクネ、皮膚粘膜の色素沈着、眼脂過多等のひどい症状が発生した。これらの症状は 10 年経過した頃から徐々に回復しており、30 年経過した現在では油症患者であるとの判別は外見からはできない状態である。この 30 年の間に体内の PCB 濃度は 1/33 に、TEQ 濃度は 1/70 に減少している。油症患者には PCB 及び PCDF による酵素誘導作用及びホルモン異常が原因で発生した内科的症状が数多くある。血清のトリグリセライド、サイロキシン、免疫グロブリン、及びリンパ球の炭化水素水酸化酵素の異常は福岡油症患者発生当時から、30 年以上経過した現在まで継続<sup>2)</sup>していると考えられている。

1990 年代における一般人の全 PCB 及び TEQ 濃度はそれぞれ福岡油症患者の 1/2 ~ 1/9 及び 1/3 ~ 1/14 であり<sup>3)</sup>、大きな濃度差ではない。一般人であっても、体内にはかなりの PCB、TEQ 及び塩素系農薬を

蓄積しているため、それらが原因でホルモン異常にもとづく油症の症状、例えば、血清中サイロキシンレベルの異常などは発生しているかもしれない。

#### D. 参考文献

- 1) 増田義人, 油症を起こした原因化学物質, 小栗一太、赤峰昭文、古江増隆 編集, 油症研究30年の歩み, 47-74, 九州大学出版会 (2000).
- 2) K. Haraguchi, Y. Kato, R. Kimura and Y. Masuda, Hydroxylation and methylthiolation of mono-ortho-substituted polychlorinated biphenyls in rats: Identification of metabolites with tissue affinity. *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 1508-1515 (1998).
- 3) Y. Masuda, Fate of exposed PCDFs and PCBs in patients with Yusho PCB poisoning. *Organohalogen Compounds*, 44, 27-30 (1999).

## 分担研究報告書

### コプラナーPCBによる ラット肝カルボニックアンヒドラーゼIII (CAIII)の発現抑制 —ラットCAIII遺伝子の5'-flanking regionの解析—

分担研究者 小栗 一太 九州大学大学院薬学研究院 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レベルの著しい低下によることを明らかにしてきた。本研究では、コプラナーPCBによるCAIIIの発現調節機構を明らかにする目的で、ラットCAIII遺伝子の5'上流域約1.5 kbpをPCRクローニングして、塩基配列を明らかにし、発現調節モチーフの解析を行った。また、転写開始点を、CapSite huntingにより決定した。CAIIIの5'-上流域には、Ah-receptor (AhR) とAhR nuclear translocator (Arnt) の複合体が結合しうる xenobiotic responsive element (XRE) のコンセンサス配列に類似したXRE-likeの配列が2箇所存在することが明らかになり、ラット肝CAIIIの発現抑制にAhRが関与している可能性が示唆された。

#### 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 (AhR) と結合し、さらに AhR 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、PAHs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 CO<sub>2</sub> hydration 活性は低い、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、当研究室では、ダイオキシン類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のもと検討を行ってきた。PCB126 など、ダ

イオキシン類による毒性発現の大部分は、サイトソル中に存在する AhR によって説明し得ると考えられ、cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) などの酵素は AhR を介して顕著に誘導される。AhR と Arnt のヘテロダイマーは遺伝子上流域に存在する XRE と特異的に結合することが知られており、実際、ダイオキシン類により誘導される酵素の多くは、この XRE を 5'-上流域に含むことが知られている。

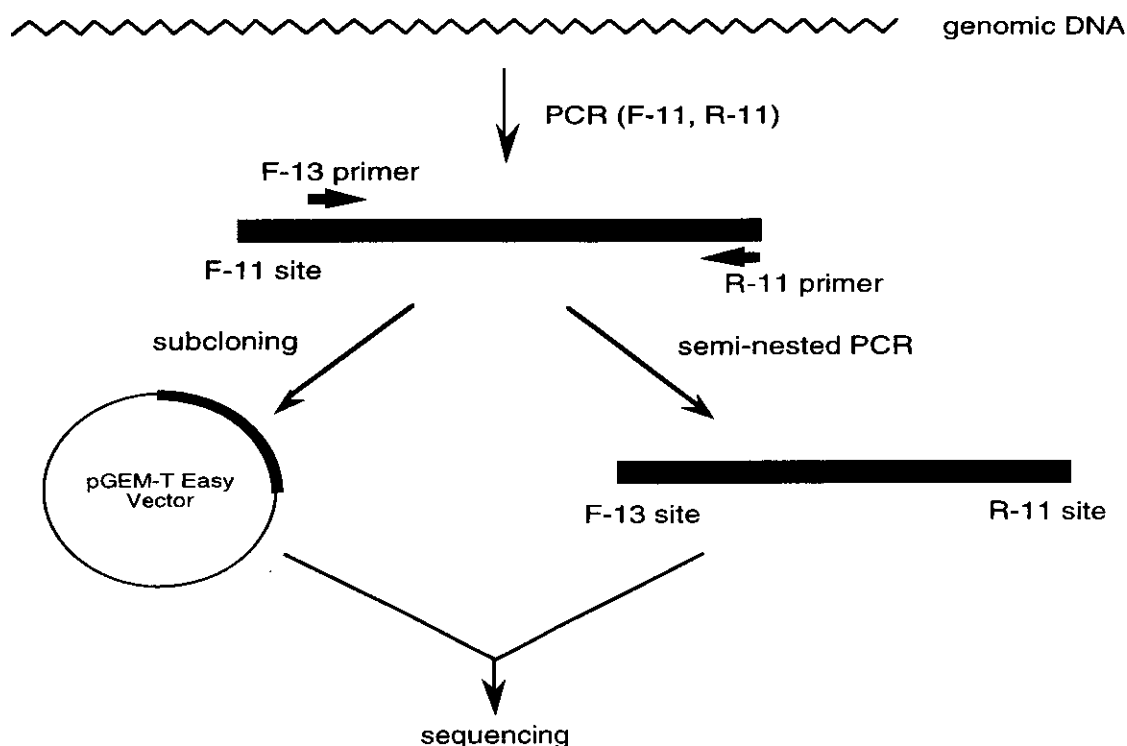
一方、肝 CAIII のようにダイオキシン類により抑制されるタンパク質については、その抑制メカニズムは明らかとはなっていない。CAIII の 5'-上流域の配列については、マウスおよびヒトの近位プロモーター領域が明らかとなっており、遺伝子発現についても調べられつつある。ラット CAIII の 5'-上流域の解析は、ラット肝 CAIII の発現抑制機構解明のための一つの手掛かりになると思われる。本研究では、ラット CAIII 5'-flanking region の塩基配列を明らかにするとともに、そこに存在する発現調節モチーフの検索を行った。

## B. 方法・結果

### ラット CAIII 遺伝子 5'-flanking region の

**Table 1** Oligonucleotides primers for sequencing of CAIII 5'-flanking region. The initiation codon was defined as +1.

primer	primer sequence	corresponding nucleotide position
CAIII-F-11	5'-ACGGTATTTGTTTCTCTGTG-3'	-1585 ~ -1566 (mouse)
CAIII-F-13	5'-TTCCACAGTGCTATTGTGTG-3'	-1503 ~ -1484
CAIII-F-14	5'-TAATTATGTCTTGGAGTGTG-3'	-966 ~ -947
CAIII-F-15	5'-TGCTTGGTAGTCTGCAAAGG-3'	-346 ~ -327
CAIII-R-11	5'-CTTTCCTGTCTCTCAGCG-3'	-21 ~ -4
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	
SP6	5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'	



**Fig. 1 Strategy of sequencing of rat CAIII 5'-flanking region.**

#### PCR 法による増幅およびクローニング

CAIII 近位プロモーター領域の配列はマウスおよびヒトで明らかになっている (91-93)。その配列の中でも、マウスおよびヒトともにホモロジーの高いセグメントが存在し、その部分においてはラットにおいても保存されている可能性が高い。そこで、その部分に sense primer を設計し、既知のラット CAIII の配列から antisense primer を設計して、genomic DNA をテンプレートに PCR を行った。Genomic DNA はラット肝臓より、DNAzol® Reagent (Gibco BRL) を用いて抽出したものを使用した。得られた約 1.5 kb の PCR product を pGEM®-T Easy Vector (Promega) にライゲーションし、大腸菌 JM109 をトランスフォーメーションしてクローンを得た。得られたクローンは、ベクターの配列に相補的なプライマー T7、SP6 (Table 1) を用いたダイレクト PCR により、インサートの確認を行っ

た。

#### 塩基配列の決定

塩基配列の決定の要項を Fig. 1 に示す。まず、得られたクローンよりプラスミド DNA を調製し、ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit を用いてシーケンス反応させ、Table 1 に示す各種 primer でシーケンシングを行った。また、genomic DNA より、primer F-11、R-11 を用いて得られた PCR product をテンプレートに、さらに内側の primer F-13 を用いて semi-nested PCR を行い、得られた product のダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。その配列を Fig. 2 に示す。

#### 発現調節モチーフ解析

Molecular Bioinformatics of Gene Regulation (<http://transfac.gbf.de/>) にアクセスし、Transfac-Programs to search for binding sites and more の MatInspector において、得られたシーケンスデータを入力して

ACGGTATTTG TTTCTCTGTG TTTGCTTGGA TCTTCCAAAC TAACTGAGGG  
F-11 NF-kB  
 CTCCTGATTC CACAGTGCTA TTGTGTGGAT CAAGTGATCC CTGGTCACAA  
F-13 SREBP  
 AAATACCCTG AACTGACTC CCCTGGCGTC CAGGTTCTGC GTGTGGTCAG  
XRE  
 CCATTCCACA TACTTAGCCG ATGAGCTGTC TTGGCAATGA AGAGAGATTT  
NF-1  
 CCTTCTCAGG TTTTGTACC CACAAGAAA AGTAAACTGA AAAAGTCACT  
 TTTTATAAAA GTAAAAGTTA TAAGAAAATG CTTGCAGAAA TCTTGTTCAA  
C/EBP  
 GACATTTCCA ACACGAGGTG TATCTTTTTG GTCTCAAGAT ATTCTTGCCC  
E-box C/EBP  
 AAACAAGTTT TTTTTTCCAT AATAGATGCA TAGAATTGCA AACATCTATT  
 AACTGGCTT CTTTCATGTG AGGCATAACC AGATATTTCT AATTATACCT  
NF-1 SREBP  
 TTGTTATGCA CAAATGGGAT ATGCCAGTTT TAGTCTCCAT TTATGTGGTT  
NF-1 NF-kB  
 TACTGTATTA CAAAACACAC TAGGACTGAG AGAAAAACA CAAGACCCAA  
 CCGATCTCAT AGACCTTTTC CTTTTTGTTC CCCTCCCTTG TCTCTAATTA  
 TGTCTTGAG TGTGAAATTT TTATGTAGCA TACTCTTTTT TGATGCTACT  
F-14  
 CTTTTAAAGC TTCAGATATT CTTGGTGTCC TGAGGTGAAC AGAGCGCAGC  
 TCCCAGTGTG GTTCTGTCCC AACTGCTGC TGAGTAAGGC TGGGGTGCAG  
 AGGCCCTCCC TGGCTGACCG GGATCTGTG CTGTGCTCCC GAGTCATACT  
 AGACAAACTA AGTTAGGCTG GATGTGAAGC CTAGGCAGTC TACCTTAGAA  
 ACTCATCCC TTAAGGATGT TGGGACCGGA AAGCATGCAG TCCCAGATTC  
 CTCCTCATCT CTATTTCCAG GATTTTACAC GTTTTCCGTA GGGGAATCAC  
 GCAC TAGTCA GAGGATCAGA AGAGCTCTTT CCACCCTAAC CGGATTCCTG  
XRE  
 CGGGAAGG AACTCAAGCG TCCAGAGACT GCAGCGGGTC CTTCATTCCG  
 AGGTAAAAGT TTTCTGAGGA AGGCTGCAAG AGCCGTGGGT GCAATTTTTA  
 GCTGCTAAGT AACACACGGG ACTGCAGCCT GAGTCGGCTG CTCCTCCAGA  
E-box  
 CCCCCAAGTG AGTGAAAATG GAGGGAACCA ACGCTACCAA AGCCGAGCTC  
 TTAGAAAGCT CAGTTGCTTG GTAGTCTGCA AAGGAAACAG AGGAAAGAGC  
F-15  
 CAGGGCTTTT GCAAGAGCCA AGAAGGGAGT CTTCTGTCCC CCTCCGTTCC  
C/EBP NF-1  
 CCCTCCGTGC CTCCTCCCTG CCCCTCCTG CCACCCTCTC ACCCCGACAG  
 CTGTCCACCG CTTGTAATTC ACTGGCTCCC CCGCCCCGCC TTCCGAGTAC  
GC-box  
 CACCCCAATC CAGTTTAGCC CCCTTCTCA CCGCTGACC TAATAAGGCC  
ERE  
 ATGCACACTG CAGGAGACCT ATATAAAAGT GGGGACTTTT TGGAGCTTTT  
TATA-box  
 GCCGGACAAC AGGAGCAGGC AAAAGCAGGA GCTGTCCAGC GCTGAGAGAC  
R-11  
 AGGAAAG

**Fig. 2 Nucleotide sequence of rat CAIII 5'-flanking region.**

Asterisk indicates the transcriptional start site, which is defined as +1.

解析したところ、Fig. 2 に示す発現調節モチーフが見出された。AhR-Arnt complex が結合しうる XRE のコンセンサス配列に類似した XRE-like 配列が 2 箇所認められた。

### 転写開始点の決定

転写開始点の決定には、Cap Site cDNA®、Rat Liver (日本ジーン) を用い、CapSite® hunting を行った (Fig. 3)。既知のラット CAIII cDNA の配列より、antisense primer を設計し、Cap Site cDNA® に添付の sense primer 1RC、2RC を用いて PCR を行った。使用した primer の配列を Table 2 に示す。特異性を上げるため、antisense primer は二種用意し、1RC、CAIII-R (202, 183) で 1st PCR を行った後、2RC、CAIII-R (138, 117) で nested PCR を行った (Fig. 3)。Nested PCR product を pGEM®-T Easy Vector (Promega) にライゲーションし、大腸菌 JM109 をトランスフォーメーションして

得られたクローンよりプラスミド DNA を抽出し、シーケンシングにより転写開始点を決定した。決定した転写開始点を Fig. 2 に \* で示す。

### C. 考 察

本研究では、Wistar 系ラット CAIII の 5'-flanking region 約 1.5 kb の塩基配列を明らかにした。コンピューター解析により、CAIII の 5'-上流域には 2 箇所の XRE-like 配列が存在することが明らかとなり、ラット肝 CAIII の発現抑制に AhR が関与している可能性が示唆された。

AhR-XRE pathway が遺伝子の誘導に関わっていることは既に知られているが、負の調節に直接関与しているという報告は現在のところなく、可能性としては、XRE 以外のエレメントとの相互作用が考えられる。例えば、カテプシン D は TCDD によって遺伝子発現が減少するが、本来、カテプシン D の転写調節領域

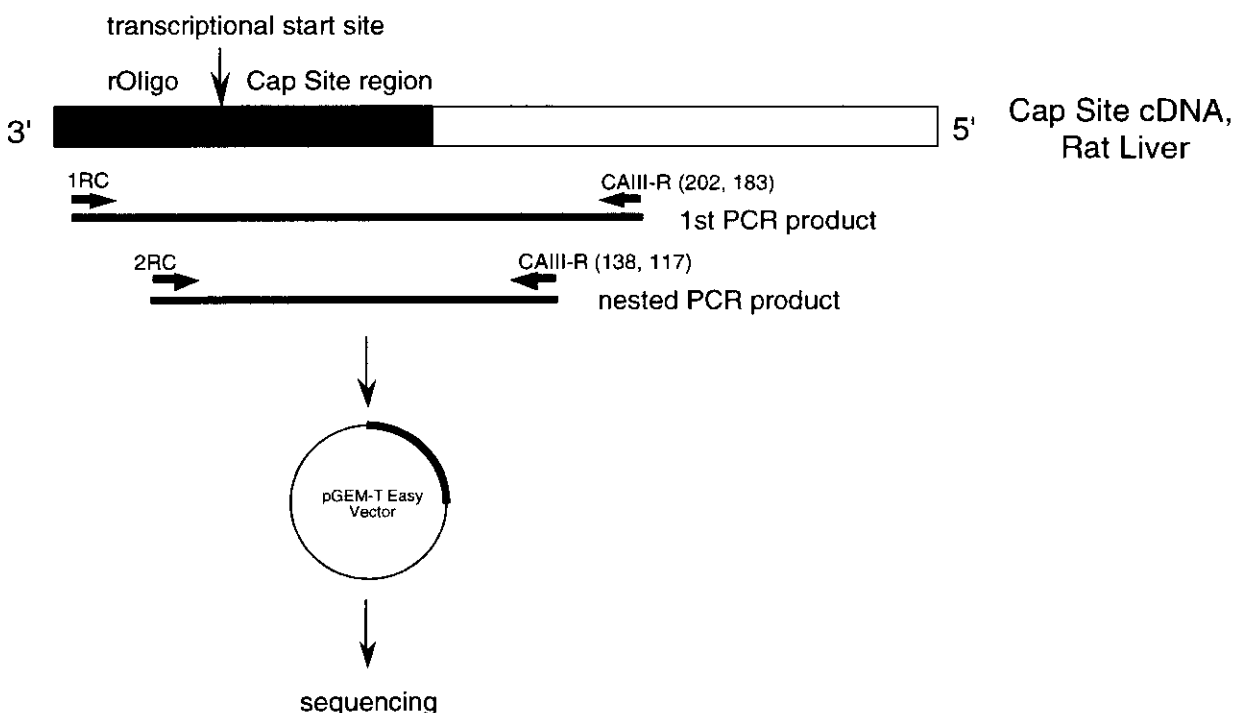


Fig. 3 Principle of CapSite hunting.

**Table 2 Oligonucleotides primers for CapSite hunting.**  
The initiation codon was defined as +1.

primer	primer sequence	corresponding nucleotide position
1RC	5'-CAAGGTACGCCACAGCGTATG-3'	
2RC	5'-GTACGCCACAGCGTATGATGC-3'	
CAIII-R (202,183)	5'-CTCTGCAGGTCTTCCCATTG-3'	183 ~ 202
CAIII-R (138,117)	5'-AGGCTGCAGAGAAGGATCATGC-3'	117 ~ 138

には estrogen responsive element (ERE) が存在し、estrogen receptor (ER) が結合することで転写活性化が起こる。この ERE には XRE がオーバーラップしており、TCDD によって活性化された AhR-Arnt complex が XRE に結合することで、 $\beta$ -エストラジオール依存的な転写活性化が抑制されるというものである。また、glutathione S-transferase Ya (GST-Ya) は TCDD や benzo[a]pyrene によって誘導されるが、最近、その 5'-上流域のエレメントの解析により、CCAAT-enhancer binding protein (C/EBP) の結合サイトは antioxidant responsive element (ARE) および XRE にオーバーラップしており、C/EBP $\alpha$ あるいはC/EBP $\beta$ が結合することで転写活性化が抑制されることが知られている。また、TCDD 処理したマウス肝では、C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$  mRNA レベルがそれぞれ減少、増加するという報告もある。C/EBP $\alpha$  mRNA レベルの抑制機構は明らかになっていないが、このことによって、二次的に CAIII mRNA レベルの減少が引き起こされる可能性もある。

C/EBP に関しては、次のような報告もある。プロスタグランジン生合成の律速酵素である prostaglandin G/H synthase-2 (PGHS-2) は、TCDD 処理したラットにおいて、肺や肝などでは誘導され、胸腺

では抑制されることが知られているが、rat hepatocytes における誘導では、AhR-XRE よりも C/EBP $\beta$  の結合の寄与が大きいことが示されており、AhR-XRE pathway 以外の誘導機構が示唆されているものである。胸腺における PGHS-2 の抑制が、同様のメカニズムで説明できるとするならば、CAIII の 5'-上流域にも C/EBP-like 配列が確認されたことから、その観点での考察も必要であろう。

その他、CAIII の 5'-上流域に見つかった発現調節モチーフにおいて、抑制に関与すると予想されるものに、NF-kB および NF-1 がある。ある種の cytokines は CYP1A1 などの誘導を抑制することが知られているが、同時に NF-kB を誘導し、NF-kB は AhR と相互作用していることも明らかとなっている。また、NF-1 も AhR と相互作用する可能性が示唆されている。CYP1A1 の誘導には NF-1 を介したネガティブフィードバック機構が存在し、そこには活性酸素種の発生も関与しているとの報告がある。

ダイオキシンによるタンパク質の抑制機構は、AhR-XRE pathway のみで説明できるほど単純ではないかも知れない。しかし、実際、MHC Q $\beta$  のようにダイオキシンによる抑制に AhR が関与している可能性があるものもあり、CAIII にも XRE-like

配列が見つかったことから、ダイオキシン存在下、これら発現調節因子が単独、あるいは AhR と相互に作用して遺伝子発現を制御していることは十分に考えられる。

#### **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）。



コプラナーPCBによる  
小胞体局在性ストレスタンパク質GRP78レベルの低下  
— 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院 分子衛生薬学分野 教授

**研究要旨** これまでに、ラット肝ミクロソーム中の GRP78 が、3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PenCB) 10 mg/kg (i. p.) 投与によって著しく減少することを immunoblotting により明かにしてきた。これ以外にも、PenCB 処理によって発現抑制されるタンパク質としては、アルドラーゼ B、アルコールデヒドロゲナーゼ (class I)、カルボニックアンヒドラーゼ III が、当研究室で明らかにされ、カルボニックアンヒドラーゼ III については、mRNA レベルが著しく低下することが Northern blot により明らかになっている。本研究では、肝 GRP78 mRNA レベルへの PenCB の影響を northern blot 解析し、mRNA レベルには変化がないことが分かった。GRP78 タンパク質レベルの減少には、転写抑制や mRNA の分解促進などの mRNA レベルの低下は反映していない可能性があり、翻訳障害やタンパク質の分解が亢進しているなどの可能性が示された。

**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 arylhydrocarbon receptor (AhR) 依存性メカニズムを介すると考えられている。

AhR 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 AhR 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 /Amt 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、AhR 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、いまなお、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。

これまでに、ラット肝ミクロソーム中の GRP78 が、PenCB 10 mg/kg (i. p.) 投与によって著しく減少することを immunoblotting により明かにしてきた。これ以外に

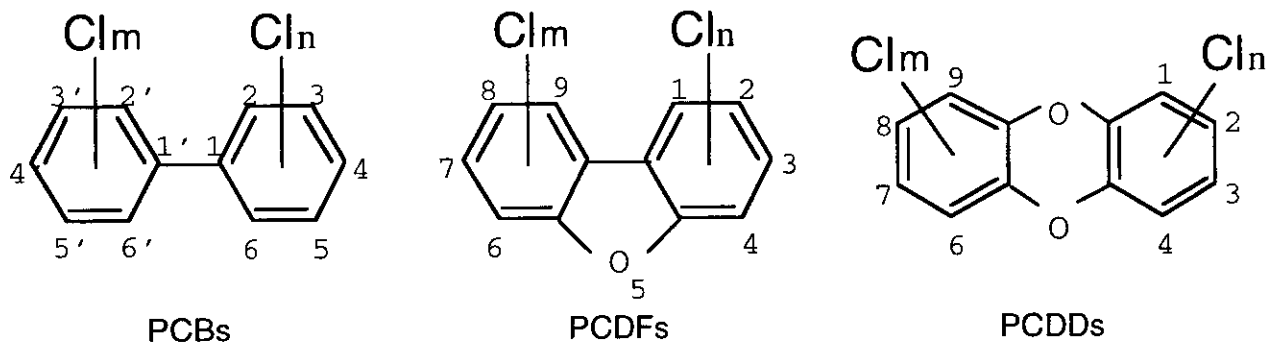


Fig. 1. Structures of PCBs, PCDFs, PCDDs.

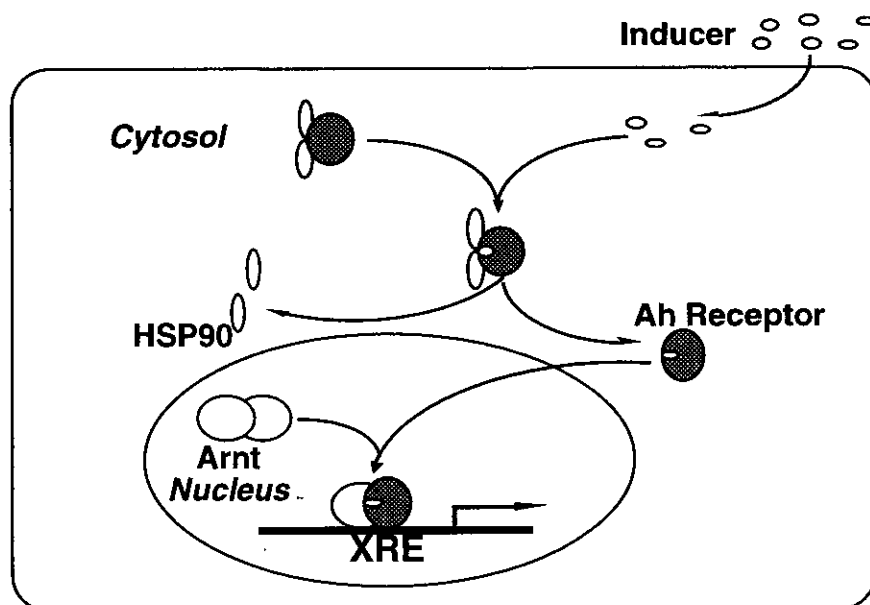


Fig. 2. Postulated mechanism of transcriptional activation of Ah-responsive gene by Ah-receptor system.

Ah, Aryl hydrocarbon

も、PenCB 処理によって発現抑制されるタンパク質としては、アルドラーゼ B、アルコールデヒドロゲナーゼ (class I)、カルボニクアンヒドラーゼ III が、当研究室で明らかにされ、カルボニクアンヒドラーゼ III については、mRNA レベルが著しく低下することが Northern blot により明らかになっている。

本研究では、GRP78 タンパク質レベルの減少が、転写抑制や mRNA の分解促進などの mRNA レベルの低下を反映しているのか、あるいは翻訳障害やタンパク質の分解が亢進しているなど、mRNA レベルには変化がないのかを明らかにすることを目的とし、PenCB によるラット肝 GRP78 の発現抑制について northern blot 解析による mRNA レベルでの検討を行った。

## B. 方法

### Northern blotting

Wistar 系雄性ラットに PenCB (10 mg/kg, i.p.) を腹腔内に単回投与した。対照群には、コーンオイルを投与し自由に摂餌さ

せる free-fed、摂餌を PenCB 処理群にあわせた、pair-fed を設けた。投与 5 日後肝臓を摘出後、液体窒素で凍結させ使用まで -80°C で保存した。Total RNA は、QIAGEN RNeasy kit で調製した。調製した total RNA をホルムアルデヒドを含む変性ゲルで電気泳動して、ナイロンメンブレンに転写した。プローブには、ラットの GRP78 cDNA 396 bp フラグメントを、<sup>32</sup>P でランダムプライム法でラベルして使用した。ハイブリダイゼーションは 18 時間以上行い、最終的には、イメージングプレートに暴露した後、Bio-Imaging Analyzer BAS-2500 (富士フイルム社) により解析して、バンドの検出を行った。また、<sup>32</sup>P ラベルした GRP78 プローブを stripping した同一のメンブレン上に <sup>32</sup>P ラベルした β-actin のプローブをハイブリダイズさせ、メンブレン上の mRNA 量のノーマライゼーションを行った。その結果を、Fig. 3 に示す。GRP78 の mRNA レベルは、PenCB 処理によってもあまり大きくは変化せず、free-fed、pair-fed 両コントロール群に比べ

て有意な変化はみられなかった。

### C. 考 察

本研究では、PenCB 処理による、ラット肝ミクロソームの GRP78 タンパク質の減少について、mRNA レベルの変化が伴うか否かについて、northern blotting による検討を行った。その結果、free-fed、pair-fed 両コントロール群と比較して、GRP78 mRNA 量は顕著な変化がなく、GRP78 のタンパク質レベルの低下は、mRNA レベルの低下を伴わないことが明らかになった。今回の結果のように mRNA レベルでの変化がないにもかかわらず、タンパク質レベルが減少している場合、翻訳段階での異常や、タンパク質の分解促進などが考えられる。これまでに、GRP78 の発現量の変化に関する報告はストレスによる誘導や、グルコース飢餓状態時の減少など多くなされているが、これらのほとんどが mRNA レベルの変化に起因するものである。PenCB による GRP78 の減少のように、mRNA レベルに変化はなく、GRP78 のタンパク質レベルのみが減少している一例として、自発性糖尿病を引き起こす Zucker rat がある。Zucker rat では、翻訳での異常はないらしく、タンパク質分

解が促進されていると考えられている。ダイオキシン類によって、ある種のプロテアーゼが誘導もしくは活性化されている可能性も考えられる。

GRP78 は小胞体局在化シグナルと言われ KDEL 配列を C 末端に持っている。この配列があるために、一度ゴルジ体に輸送されても KDEL receptor により認識されて COPI と呼ばれるコートタンパク質に包まれて、小胞体へ送り返されることが明らかにされてきた。PenCB により、この輸送過程で分解を促進するシステムが亢進したり、KDEL receptor 量が低下したり、その機能が障害を受けるなどして、一度、小胞体から出た GRP78 が逆輸送される経路を断たれ、ミクロソーム分画からは減少しているという機構も推定できる。

本研究では、PenCB による GRP78 の減少が mRNA レベルではなく、タンパク質レベルで生じていることが明かとなった。この結果は、カルボニックアンヒドラーゼ III にみられるような mRNA レベルの低下とは、異なった抑制機構が存在する可能性を示唆しており、非常に興味深い。GRP78 は小胞体局在性であるのに対し、カルボニックアンヒドラーゼ III はサイトソル酵素であるが、これら細胞下画分に

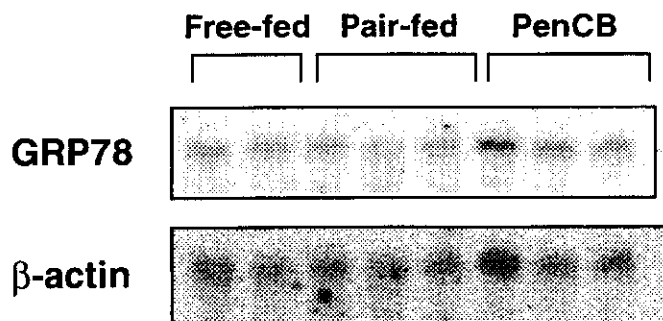


Fig. 3. Northern blot analysis of GRP78

Total RNA was isolated from free-fed controls, pair-fed controls and PenCB-treated rat liver and subjected to northern blot analysis. A  $\beta$ -actin probe was used for normalization of mRNA amount and transfer efficiency

において、すべてのタンパク質が減少するというわけではない。タンパク質の安定性の低下には、おそらく群特異的プロテアーゼの活性化など、ある程度の幅広い領域に特異的なイベントが起こっていることを想像させる。

今回は GRP78 に関してのみの検討であるが、他の小胞体局在性ストレスタンパク質についても検討を行うことにより、その減少の機構について、新たな見解が得られるかもしれない。また、PenCB の

毒性と生理的に重要なタンパク質の発現抑制という現象は、密接に関連していると思われるが、ダイオキシン類や PenCB によるタンパク質発現の負の調節機構は明らかにされていない。本研究で得られた結果は、PenCB によるタンパク質の発現の抑制機構解明のための重要な一歩になると思われる。

#### **D. 研究発表**

1) 油症報告 第18集 (印刷中)

## 分担研究報告書

### 高蓄積性PCB代謝物メチルスルフォン体の生成酵素の解明

分担研究者 古賀 信幸 中村学園大学 食物栄養学科 教授

**研究要旨** 高蓄積性PCB代謝物メチルスルフォン ( $\text{MeSO}_2$ ) 体の生成酵素について検討した。本研究では、3-及び4-メチルチオ-2,5,3',4'-TCB (CB70) に対するハムスター及びモルモット肝のS-酸化活性を調べ、ラットと比較した。また、このS-酸化酵素としてP450あるいはFMOの関与が考えられるが、これらの関与の程度をP450誘導剤及び両酵素の阻害剤を用いて調べた。

その結果、 $\text{MeSO}_2$ の生成活性の強さは、モルモット>ハムスター>>ラットの順であった。なお、モルモットとハムスターはPB誘導性P450が重要であることが明らかとなった。FMO阻害実験の結果、ハムスター肝でのS-酸化活性は、P450とFMO (P450>FMO) によって、またモルモットではほとんどP450によって触媒されていることも明らかになった。

#### A. 研究目的

最近、2,5-二塩素置換PCBの3-メチルスルフォン ( $\text{MeSO}_2$ ) 体が、肝へ特異的に蓄積し、さらに母化合物より遙かに強いフェノバルビタール (PB) 型チトクロムP450 (P450) 誘導能を有していることが明らかになった<sup>1,2)</sup>。現在、S原子の酸化を触媒する酵素としては、これまでにP450<sup>3)</sup>あるいはフラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO)<sup>4)</sup>が報告されているものの、PCBの $\text{MeSO}_2$ 体生成に関与する酵素系については、ほとんどわかっていない。昨年度、ラット肝において3-及び4-メチルチオ (MeS) -2,5,3',4'-四塩素化ビフェニル (CB70) の代謝にどちらの酵素が主に関与しているか調べた。その結果、 $\text{MeSO}_2$ 体の生成活性は、3-メチルコラントレン (MC) 前処理により数倍に増加すること、またP450阻害剤で顕著に阻害されることが明らかになった<sup>5)</sup>。そこで本年度は、ハムスター及びモルモット肝で同様に検討を加えた。

#### B. 方法

- 1) 3-および4-MeS-CB70を合成した後、NADPHおよび酸素存在下、上記動物肝ミクロゾーム (Ms) とともに、37℃で5～60分間インキュベートし、メチルスルフォキシド (MeSO) 体および $\text{MeSO}_2$ 体の生成量を測定した。 $\text{MeSO}_2$ 体の測定は、代謝物をクロロホルム-メタノール (2:1) とn-ヘキサンで抽出した後、電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフ (GC/ECD) で行った。
- 2) P450の典型的な誘導剤であるPBとMCで前処理した動物から肝Msを調製し、MeSO体および $\text{MeSO}_2$ 体の生成量を未処理Msと比較した。
- 3) P450およびFMOの阻害剤による影響は、P450阻害剤として、SKF-525A及びN-benzylimidazole (NBI) を、FMO阻害剤として、methimazoleを用いて行った。また、FMOを失活させるため、Msを50℃で1分間前処理した。

### C. 結果および考察

Table 1 に示すように、MeS → MeSO 及び MeSO → MeSO<sub>2</sub> のいずれの反応も、モルモットで最も高く、次いでハムスター、ラットの順であった。ラットの活性はモルモットの数 10 分の 1 と低いものであった。また、モルモットとハムスターでの MeSO<sub>2</sub> の生成はラットと異なり、PB 前処理により、未処理の数倍から 14 倍に増加した。

以上の結果から、活性の強さ及び酸化酵素 (P450) の被誘導性が大きく異なるなどの動物種差が明らかとなった。

P450 阻害剤である SKF525-A 及び NBI はいずれも 1mM の添加で、ハムスター及びモルモット肝 Ms による MeSO<sub>2</sub> 体の生成をほぼ完全に阻害した。一方、MeSO<sub>2</sub> 体の生成は methimazole 0.15 mM の添加により、ハムスターで約 30% 阻害されたが、モルモットでは 0.45 mM の添加でも全く影響

を受けなかった。同様に、Ms を温度処理した場合にも、MeSO<sub>2</sub> 体の生成がハムスターでは阻害されたのに対し、モルモットでは全く阻害されなかった。

以上の結果から、2,5,3',4'-TCB の MeS 体から MeSO<sub>2</sub> 体への酸化経路において、モルモットでは P450 が主に関与しており、FMO の関与はかなり少ないことが示唆された。また、ハムスターでは P450 が主ではあるが、FMO も S-酸化活性全体の数 10% は寄与していると考えられる。なお、P450 分子種であるが、P450 誘導剤の結果から、モルモットでは CYP2B18 が、ハムスターでは HPB-1 (CYP2B) が重要であると考えられる。

### D. 参考文献

- 1) Y. Kato, K. Haraguchi, M. Kazashima, S. Yamada, R. Kimura, *Chem.- Biol. Interaction*, **95**, 257 (1995).

Table 1. The S-Oxidation activity for MeS-CB70 in liver microsomes of rats, hamsters and guinea pigs

Microsomes	S-Oxidation activity (nmol/min/mg protein)			
	3-MeS → 3-MeSO	3-MeSO → 3-MeSO <sub>2</sub>	4-MeS → 4-MeSO	4-MeSO → 4-MeSO <sub>2</sub>
<b>Rat</b>				
Untreated	0.080 (100)	0.015 (100)	0.129 (100)	0.050 (100)
PB-treated	0.088 (109)	0.041 (278)	0.086 (67)	0.055 (111)
MC-treated	0.252 (312)	0.034 (229)	0.237 (185)	0.155 (311)
<b>Hamster</b>				
Untreated	0.523 (100)	0.080 (100)	0.540 (100)	0.097 (100)
PB-treated	0.353 (68)	1.078 (1349)	0.837 (155)	0.383 (394)
MC-treated	0.913 (175)	0.105 (132)	0.990 (183)	0.164 (169)
<b>Guinea pig</b>				
Untreated	2.444 (100)	0.520 (100)	2.347 (100)	0.766 (100)
PB-treated	0.532 (22)	2.288 (440)	1.115 (48)	2.871 (375)
MC-treated	1.744 (71)	0.997 (191)	2.271 (97)	0.987 (129)

Each value represents the mean of duplicate determinations.

- 2) Y. Kato, K. Haraguchi, M. Kazashima, S. Yamada, R. Kimura, *Chem.- Biol. Interaction*, **95**, 269 (1995).
- 3) E. Kashiwama, T. Yokoi, M. Odomi, Y. Funae, K. Inoue, T. Kamataki, *Drug Metab. Dispos.*, **6**, 716 (1997).
- 4) J. R. Cashman, *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 165 (1995).
- 5) N. Koga, K. Haraguchi, T. Kanamaru, N. Oishi, H. Kuroki, Y. Masuda and H. Yoshimura, *Organohalogen Compounds*, **49**, 193 (2000).



## PCBsによる細胞死誘導に関する検討

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

**研究要旨** 我々はPCBsが *in vivo* の実験系において、細気管支Clara細胞の変性脱落を誘導することを報告してきた。今回はヒト気道上皮細胞株A549 (野生型 *p53*)、NCI H1299 (*p53* 遺伝子欠失)、BEAS-2B (*p53* 蛋白不活化)、ならびに mouse fibroblast NIH-3T3 (野生型 *p53*) を使用し、*in vitro* においてPCBsが *p53* を介したアポトーシスの誘導について検討した。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。0.2 ~ 5  $\mu$ g/ml では細胞死はほとんど誘導されず、10 mg/ml 以上ではじめて細胞死が誘導された。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が観察された。*p53* 蛋白の有無もしくは不活化に関わらず、20  $\mu$ g/ml 前後の濃度で細胞死が誘導されること、そして野生型 *p53* を有する細胞株において *p53* が蛋白レベルで誘導されないことは、上皮細胞において、PCBは *p53* 非依存性の細胞死を誘導することの直接的な所見であると考えられた。

### A. 研究背景・目的

油症の原因物質であるPCBs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、が重要な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。

発癌作用をもつ物質は細胞にストレス(あるいは細胞死)を与える一方、原癌遺伝子を増幅させるといった、二面性を持つ事が多い。PCBsにおいては、マウス脾細胞を用いた検討において、PCBs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*, 1997)。また一方で、preadipocyteである細胞株 NIH 3T3 L1 で、25  $\mu$ g/ml のPCBs

により *jun*、*myc*、*ras* などの遺伝子が発現される事が明らかになった (Gribaldo et. al, *J. Toxicol. Env. Health*)。これまでの動物実験モデルで示されたPCBsと肺癌の関連、PCBsによる細気管支上皮の変性脱落を考え合わせると、PCBsも前述の二面性を持つのではないかという考え方もできる。

そこで、本研究では、PCBsによる気道上皮細胞の傷害と細胞死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細胞死の検討

ヒト気道上皮細胞株A549 (肺腺癌由来・野生型 *p53*)、ヒト気道上皮細胞株 NCI-H1299 (肺大細胞癌由来・*p53* 欠失)、マウス繊維芽細胞株NIH-3T3、形質転換気道上皮細胞株 BEAS-2B (SV-40 large Tにより

トランスフォームされた細胞株、p53不活化、CC10蛋白発現)を使用した。各種濃度のPCBsを添加して24時間培養しtrypan blue dye exclusion testにより細胞死の誘導を検討した。

## 2) p53 及び p53 関連蛋白の検出

上記のように処理された細胞の全蛋白を抽出し、SDS-PAGEで展開し、メンブレンに転写した。各種抗体を用いて蛋白の発現量を検討した。

## C. 結 果

### 1) 培養細胞系における細胞死の検討

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。24時間後には、コントロール、2.5、5、10、20、40  $\mu\text{g/ml}$ のPCBsにより、NCI-H1299では%生細胞が99、96、88、66、64 (%)となり、NIH-3T3では98、95、94、17、9 (%)であった。BEAS-2Bでは99、89、89、70、24、25 (%)であった。すなわち、各細胞はp53 statusにかかわらず20  $\mu\text{g/ml}$ というかなり高い濃度においてアポトーシスに陥った。

### 2) 培養細胞系における p53 蛋白の誘導

PCB処理された細胞の全蛋白をSDS抽出バッファーで抽出し、p53蛋白の誘導をWestern blotting (anti-p53 mAb; Ab6 oncogene)で検討した。対照薬として、1-NP、B[a]P、TCDDを用いた。野生株p53を持つ細胞株では、1-NP、B[a]Pで細胞死が

誘導される濃度以下においてp53及びp21、hMDM2が誘導されるが、PCB、TCDDでは確認できなかった。

## D. 考 察

PCBsによる細気管支Clara細胞の傷害が動物実験で示されている。その傷害性は、反復的な摂取に伴うPCBsの蓄積によるところが大きいが、今回我々が使用した濃度が細胞において生理的濃度であるかは議論の残るところである。しかし、p53蛋白の有無、もしくは不活化に関わらず、PCBsが20  $\mu\text{g/ml}$ 前後というかなりの高濃度で細胞死を誘導したという事実は、上皮細胞においてPCBがp53非依存性の細胞死を誘導することの直接的な所見であると考えられた。

BEAS-2BはCC10を発現しうる細胞株として知られているが、細胞死の誘導自体は、NIH-3T3とほぼ同様であった。この現象の解釈自体は難しいが、培養細胞株ではCC10の発現が抑えられているという報告もあり、in vivoにおける生理的蛋白発現条件を満たすことの困難性かもしれない。しかし近年、ホルモン、サイトカインによるCC10蛋白質の制御が明らかになってきており、in vitroにおいてはサイトカインなどで修飾した細胞を使用してみる事も一手法であるかもしれない。

## カネミ油症検診者におけるCK上昇の意義

分担研究者 吉村 俊朗 長崎大学医療技術短期大学部 教授  
沖田 実 長崎大学医療技術短期大学部 助手

**研究要旨** カネミ油症検診者で認められたCK上昇の要因の一つは血液中PCB濃度である可能性を報告してきた。カネミ油症検診者の血液中PCB濃度はCK上昇群で有意に高値であった。

しかし、PCQ濃度は有意差を認めなかった。ラットを用いた動物実験では筋線維直径が減少していた。PCB投与群では、筋細胞膜のフリーズフラクチャーでorthogonal arrayが増加し、particle密度とCaveolae密度では差を認めなかった。PCBは筋細胞膜構成成分を変化させる可能性がある。

### A. 研究目的

血清クレアチン・ホスフォカイネース(以下、血清CK)の上昇がカネミ油症検診者の約20%に認められる。一般に血清CKの上昇は、筋疾患や末梢神経の異常で認められる。そして、血中PCB濃度高値が血清CK上昇の要因の一つである可能性を報告してきた。今年度もカネミ油症検診者の血液中PCB濃度、PCQ濃度と血清CK上昇の関係を調査し、併せて、ラットにPCBを投与し、筋細胞膜の変化の有無をFreeze fracture法を用いて検討し、筋細胞膜のparticle密度の変化に関して検討した。

### B. 方法

#### B1 検診データ

##### 1) 対象

平成7年～11年までのカネミ油症検診者のうち、血清CKを測定できた延べ502名(内訳:平成7年84名、平成8年101名、平成9年97名、平成10年107名、平成11年107名)を対象として用いた。

##### 2) 方法

血清CK値を基に正常群(CK < 198 IU/

l)と上昇群(CK ≥ 198 IU/l)の2群に分け、血液中のPCB濃度、PCQ濃度を比較した。統計処理は対応のないt検定を用い有意水準5%未満とした。

#### B2 動物実験

##### 1) 方法

実験動物には4週齢のSprague-Dawley系雄ラット9匹を用い、PCB投与群(n=4)と対照群(n=5)に分けた。PCB投与群に対しては、濃度42%のPCB42(東京化成工業)をサラダ油に100mg/mlの分量で溶解し、ラット用ゾンデ針を用いて一回あたり0.15mlの量を1週間に5回の頻度で経口投与した。また、投与量は2週毎に0.15mlずつ増やし、延べ8週間投与した。その結果、ラット1匹あたりのPCBの総投与量は450mgとなった。一方、対照群には同量のサラダ油を8週間経口投与した。一側の長趾伸筋とヒラメ筋を生検し、凍結切片作製後、H&E染色し、筋線維直径を計測した。また、他側の長趾伸筋とヒラメ筋は3%グルタルアルデヒドに固定した後、徐々に30%グリセリンに浸漬した。液体窒素で急速凍結後JFD7000(JEOL)で凍

結切断し、電子顕微鏡にて検鏡・写真撮影した。筋細胞膜のCaveolaとOrthogonal arrayの密度及びParticleの密度を計測した。

## C. 結果

### C1 検診データ

血清CKの上昇を認めたものは、平成7年度17名(20.2%)、平成8年度21名(20.8%)、平成9年度10名(10.3%)、平成10年度14名(13.1%)、平成11年度8名(7.5%)で、5年間の延べ数では70名(14.1%)だった。

CK上昇群では血中PCB濃度は有意に上昇していたが(図1)、PCQ濃度には有意差を認めなかった(図2)。

### C2 動物実験

実験期間中のラットの体重は2群とも有

意に増加したが、その変化には2群間で有意差が認められた。そして、実験終了時の体重はPCB投与群 $378.5 \pm 61.7$ g、対照群 $445.0 \pm 30.6$ gで有意差を認めた。

長趾伸筋の平均筋線維直径はPCB投与群 $47.2 \pm 13.0$   $\mu$ m、対照群 $54.9 \pm 14.3$   $\mu$ mで2群間に有意差を認めた。また、ヒラメ筋においても平均筋線維直径はPCB投与群 $54.1 \pm 11.1$   $\mu$ m、対照群 $64.0 \pm 13.4$   $\mu$ mで2群間で有意差を認め、両筋ともPCB投与群の筋線維直径は減少していた。

長趾伸筋、ヒラメ筋のH&E所見では変性、壊死も認めない。

Caveola密度は、PCB投与群で減少も増加もみとめなかった。Orthogonal array密度は密度の高い線維が増加していた。しかし、Particle密度には長趾伸筋およびひら

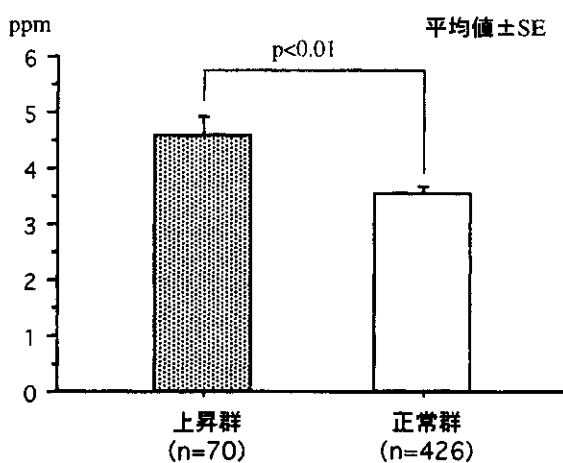


図1 血中PCB濃度の比較

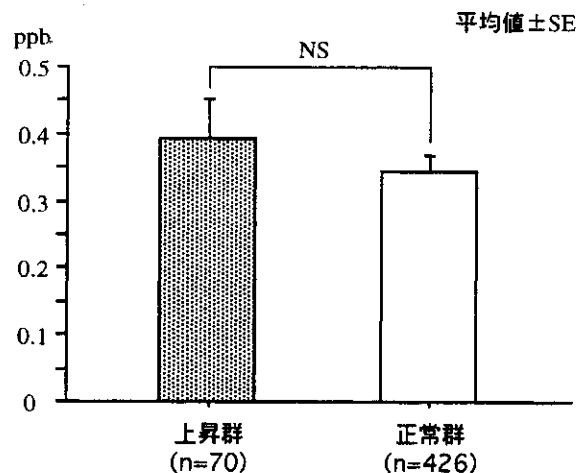


図2 血液中のPCQ濃度の比較

表1 Particle density

	E 面		P 面	
	PCB投与群	対照群	PCB投与群	対照群
長趾伸筋 ( $\mu$ m <sup>2</sup> )	907 $\pm$ 348 (n=53)	920 $\pm$ 344 (n=41)	2358 $\pm$ 640 (n=59)	2421 $\pm$ 323 (n=27)
ヒラメ筋 ( $\mu$ m <sup>2</sup> )	886 $\pm$ 289 (n=34)	871 $\pm$ 255 (n=29)	2780 $\pm$ 401 (n=18)	2423 $\pm$ 748 (n=30)