

平成12年度厚生科学研究費補助金
(生活安全総合研究事業)

ダイオキシン類による健康影響の機構に関する研究
(課題番号 H10—生活—012)

平成12年度研究報告書

平成13年3月

主任研究者 小栗 一太

平成 12 年度報告書

ダイオキシン類による健康影響の機構に関する研究
(課題番号 H10—生活—012)

研究班構成員氏名

主任研究者	九州大学薬学研究院教授	小栗 一太
分担研究者	九州大学薬学研究院教授	内海 英雄

総括研究報告書

ダイオキシン類による健康影響の機構に関する研究

主任研究者 小栗 一太 九州大学薬学研究院 分子衛生薬学 教授
分担研究者 内海 英雄 九州大学薬学研究院 機能分子解析学 教授

研究要旨 Polychlorinated biphenyl (PCB) は、ビフェニルに塩素が置換した化合物の総称であり、ダイオキシンに代表される高毒性の多塩素化芳香族炭化水素の1つである。実験動物を用いた研究から、PCBならびにその類縁化合物は、体重増加抑制、胸腺や脾臓の萎縮、脂質代謝異常等、様々な作用をもつことが知られている。しかし、その毒性発現機構については、未だ明らかにされていない。

これまで、PCBの中でも、最も急性毒性の強い 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) により、ラット肝サイトソルにおいて、セレン結合性タンパク質 (SeBP) の発現量が顕著に増加することが明らかにされている。しかし、SeBP の発現量の増加とダイオキシン類の毒性との関連性について明らかにはされていない。本研究では、SeBP の生理的機能および PCB による毒性発現との関連性を解明する研究の一環として、SeBP の open reading frame (ORF) を含む cDNA の塩基配列を決定した。さらに、PCB126 処理により、SeBP の mRNA の発現量が有意に増加することを明らかにした。

一方、化学物質の中には、酸化ストレスを経由して毒性を発現するものが知られている。塩化フェノールの製造過程で生成する微量のダイオキシン類による汚染事故がこれまで多く報告されており、塩化フェノール類の毒性発現機序に酸化ストレスの関与が示唆されているが、原因となる活性酸素種およびその発生機序については不明である。そこで、ダイオキシン類類縁化合物である塩化フェノール類を用い、その生体酸化ストレス惹起性を調べた。また、肝障害性との関連性を調べ、塩化フェノール類の毒性発現への酸化ストレスの関与について検討した結果、薬物代謝酵素 cytochrome P450 による代謝活性化の関与が示唆された。

研究目的

Polychlorinated biphenyl (PCB) は、ビフェニルに塩素が置換した化合物の総称であり、ダイオキシンに代表される高毒性の多塩素化芳香族炭化水素の1つである。実験動物を用いた研究から、PCB ならびにその類縁化合物は、体重増加抑制、胸腺や脾臓の萎縮、脂質代謝異常、肝障害、免疫抑制、皮膚障害および発癌プロモーター作用等、様々な作用をもつことが知られている。しかし、その毒性発現機構については、未だ明らかにされていない。

これまで、PCBの中でも、最も急性毒性の強い 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) により、ラット肝サイトソルにおいて、セレン結合性タンパク質 (SeBP) の発現量が顕著に増加することが明らかにされている。SeBP は、セレンの生理的機能を担うと考えられているタンパク質であり、その機能に関して、1) セレンの制癌作用への関与、2) 細胞内における酸化還元作用への関与、3) ゴルジ装置における層板間のタンパク質輸送複合体の構成因子の1つである可能性等の報告がなされている。しかし、SeBP の発現量の増加とダイオキシン類の毒性との関連性については未解明な点が多く残されている。本年度は、コプラナー PCB による SeBP の誘導機構の解明を試みた。

一方、化学物質の中には、酸化的ストレスを經由して毒性を発現するものが知られて

いる。その機序として、1) 化学物質あるいはその代謝物から直接活性酸素種が生成される場合、2) ミトコンドリア電子伝達系やミクロソーム薬物代謝等から間接的に亢進する場合、3) 抗酸化酵素生成あるいは活性を阻害することにより抗酸化防御系が低下する場合等、様々な可能性が示唆されている。塩化フェノールの製造過程で生成する微量のダイオキシン類による汚染事故がこれまで多く報告されており、塩化フェノール類の毒性発現機序に酸化的ストレスの関与が示唆されているが、原因となる活性酸素種およびその発生機序については不明である。そこで、ダイオキシン類類縁化合物である塩化フェノール類を用い、その生体酸化ストレス惹起性を調べると共に、肝障害性との関連性を調べ、塩化フェノール類の毒性発現への酸化ストレスの関与について検討した。

結果および考察

本研究では、SeBP の cDNA の塩基配列を決定すると共に、定量的 RT-PCR 法を用いて PCB126 処理による SeBP の mRNA の発現量の変化について検討した。決定された cDNA の塩基配列は、全長約 1.7 kbp であり、SeBP の ORF を含んでいた。また、推測されるアミノ酸配列の中には、酸化還元に関わるモチーフ、bis (cysteiny) sequence motif の存在が示唆された。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可能性が考

えられた。次に、PCB126 処理ラット肝臓における SeBP mRNA の発現量の変化を検討した。その結果、PCB126 処理により、mRNA の発現量は有意に増加することが明らかとなった。これより、SeBP をコードする遺伝子の転写調節領域における、xenobiotic responsive element の存在が示唆された。

さらに、ダイオキシン類類縁化合物である塩化フェノール類による生体酸化ストレス惹起性および肝障害性について検討した。初めに、塩化フェノール (4-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,5-Dichlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol および pentachlorophenol) をマウスに経口投与し、in vivo ESR を用いてスピンプローブのスペクトルを計測し、減衰速度を計測した。その結果、4-chlorophenol 以外の塩化フェノール投与により、減衰速度の亢進が見られた。また、これら試験物質が肝部位でヒドロキシラジカルを活性種とする酸化ストレスを惹起し、肝障害を形成することも示唆された。次に、活性酸素種の生成源を明らかにするため、cytochrome P450 阻害剤である SKF-525A を前処理した。その結果、シグナル減衰の亢進の抑制、血清 GOT 量の増加抑制が認められた。以上の結果は、塩化フェノール類の酸化的肝障害性に、cytochrome P450 による代謝活性化の関与を示唆するものであると思われる。

結論

ダイオキシン類が、健康に与える影響の機構に関して検討を続行した。本年度の研究から、以下のような成績を得た：

1) コプラナー PCB 誘導性 SeBP の ORF を含む cDNA の塩基配列を明らかにした。ORF より推測されるアミノ酸配列中には、酸化還元反応に関与すると考えられている bis (cysteiny) sequence motif の存在が明らかとなった。また、定量的 RT-PCR 法を用いた検討から、PCB126 により、SeBP の mRNA の発現量は、有意に増加することが明らかとなった。

2) 塩化フェノール類による肝障害には、活性酸素種の 1 つであるヒドロキシラジカルが関与していることが明らかとなった。また、その発生機構には、cytochrome P450 による代謝活性化が深く関わっていることが強く示唆された。

これら基礎的結果を基に、今後、ダイオキシン類の毒性発現機構が解明されることが望まれる。

研究報告書

ダイオキシン類による健康影響の機構に関する研究

主任研究者 小栗 一太 九州大学薬学研究院 分子衛生薬学 教授
分担研究者 内海 英雄 九州大学薬学研究院 機能分子解析学 教授

研究要旨 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) に代表される高毒性の多塩素化芳香族炭化水素の一つである Polychlorinated biphenyl (PCB) は、その難分解性および高蓄積性から、環境汚染物質としてヒトを高レベルに汚染しており、それに伴う健康障害が危惧されている。実験動物を用いた研究から、PCB ならびにその類縁化合物は、体重増加抑制、胸腺や脾臓の萎縮、脂質代謝異常など、様々な作用をもつことが明らかとなっているが、その毒性発現機構については、未だに解明されていない点が多い。本研究では、PCB の中でも最も急性毒性の強い 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) により、その発現が著しく増加するラット肝サイトソルセレン結合性タンパク質 (SeBP) に注目し、その解析を試みた。本研究において決定されたラット SeBP の cDNA の塩基配列は全長1685 bpであり、open reading frame および 3'-, 5'-noncoding region を含んでいた。明らかにされた塩基配列およびそれより予想されるアミノ酸配列は、マウスおよびヒトのそれと高いホモロジーを示した。また、マウスおよびヒトの SeBP と同様 bis (cysteiny) sequence motif の存在する可能性が示唆された。次に、決定された cDNA の塩基配列を基に primer を設計し、定量的 RT-PCR 法を行い、PCB126 処理による SeBP mRNA 量の変化を検討した。その結果、PCB126 処理による SeBP mRNA 量は、コントロールに対して顕著に増加しており、この誘導が転写レベルにおいてなされていることが示唆された。この結果は、SeBP をコードする遺伝子の上流における、xenobiotic responsive element (XRE) の存在を示唆するものであり、SeBP が、Ah-receptor - XRE pathway を介して発現調節を受けている可能性が示唆された。現時点では、十分な結果が得られたとはいえないが、本研究の成績は、SeBP とダイオキシン類の毒性との関連性を解明するにあたり、重要な情報を与えるものであると考えられる。

1. 目的

Polychlorinated biphenyl (PCB) は、ビフェニルに塩素が置換した化合物の総称であり、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin、いわゆるダイオキシンに代表される高毒性の多塩素化芳香族炭化水素の一つである (Fig. 1)。PCB は、優れた物性を有するため、電気機器のトランスやコンデンサー、熱媒体、印刷用インク、潤滑油など、産業界で広く利用されてきた。しかし、その難分解性および高蓄積性から、環境汚染物質としてヒトを高レベルに汚染しており、それに伴う健康障害が危惧されている。現在、PCB は、第一種特定化学物質として、その製造、使用、廃棄ならびに輸入が規制されている。また、1960年代後半に、西日本を中心に発生したカネミ油症事件の原因物質の一つとしてもよく知られており (1)、さらに最近では、内分泌攪乱物質、いわゆる環境ホルモンの1つとして、社会的な注目を集めている。

実験動物を用いた研究から、PCB ならびにその類縁化合物は、体重増加抑制、胸腺や脾臓の萎縮、脂質代謝異常、肝障害、免疫抑制、皮

膚障害および発癌プロモーター作用など、様々な作用をもつことが明らかとなっている (2-6)。しかし、その毒性発現機構については、未だに解明されていない点が多く、そのため、中毒患者に対する根本的な治療法は、未だに確立されていない。

PCB には理論上 209 種類の異性体が存在するが、PCB の毒性は置換する塩素の位置や数によって大きく異なることが知られている (7)。これら PCB の中で、オルト位に塩素置換のない異性体は比較的平面上の立体配座を取りやすく、コプラナー PCB と呼ばれる。コプラナー PCB は、オルト位に置換基があるノンプラナー PCB に比べ毒性が強いと考えられている。中でも 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) は、PCB 異性体中で最強の急性毒性を示す。PCB126 がヒトに与える毒性を、TCDD toxic equivalency factors (TCDD 毒性等価係数) で表すと、TCDD の 10 分の 1 とされている。しかし、それにもかかわらず、環境中における広範囲な分布から、生体に与える影響は TCDD よりも大きいとさえいわれている (8)。

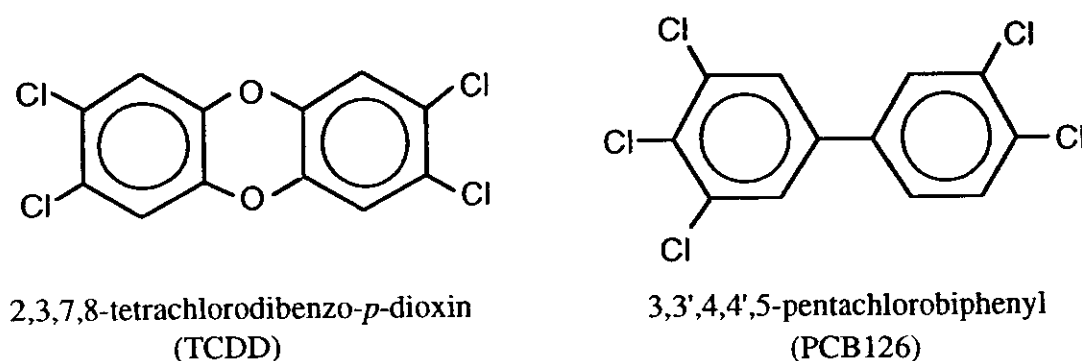


Fig. 1. Structures of TCDD and PCB126

ダイオキシンやコプラナー PCB の引き起こす急性毒性には、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 が関与していると考えられている (9, 10)。Ah-receptor に対する親和性の高い PCB 異性体は、強い急性毒性を示す (9, 10) ことが知られている。また、マウスやラットでは、それらの急性毒性の強さと CYP1A subfamily P450 の誘導の程度に良好な相関があり (9 - 11)、CYP1A1 の発現は、転写因子である Ah-receptor に up-regulate される (12)。これらの点から、ダイオキシン類の毒性は Ah-receptor を介する作用が大きいと考えられている。

Ah-receptor については、1992年に、マウスの cDNA がクローン化され (13, 14)、現在では、Ah-responsive の C57BL/6 系マウスと Ah-non responsive の DBA/2J 系マウスの Ah-receptor の一次構造の違いによる親和性の差が、発現に反映すると考えられている (12)。DBA 系マウスの Ah-receptor の TCDD に対する解離定数は、C57BL 系のそれに比べて、約 6 倍大きく (15, 16)、ヒトの場合には、DBA マウスのそれとほぼ同じであることも知られている (16)。Ah-receptor を介した誘導的発現調節機構は、特に *Cyp1a1* について詳細な研究がなされている (12, 17) (Fig. 2)。

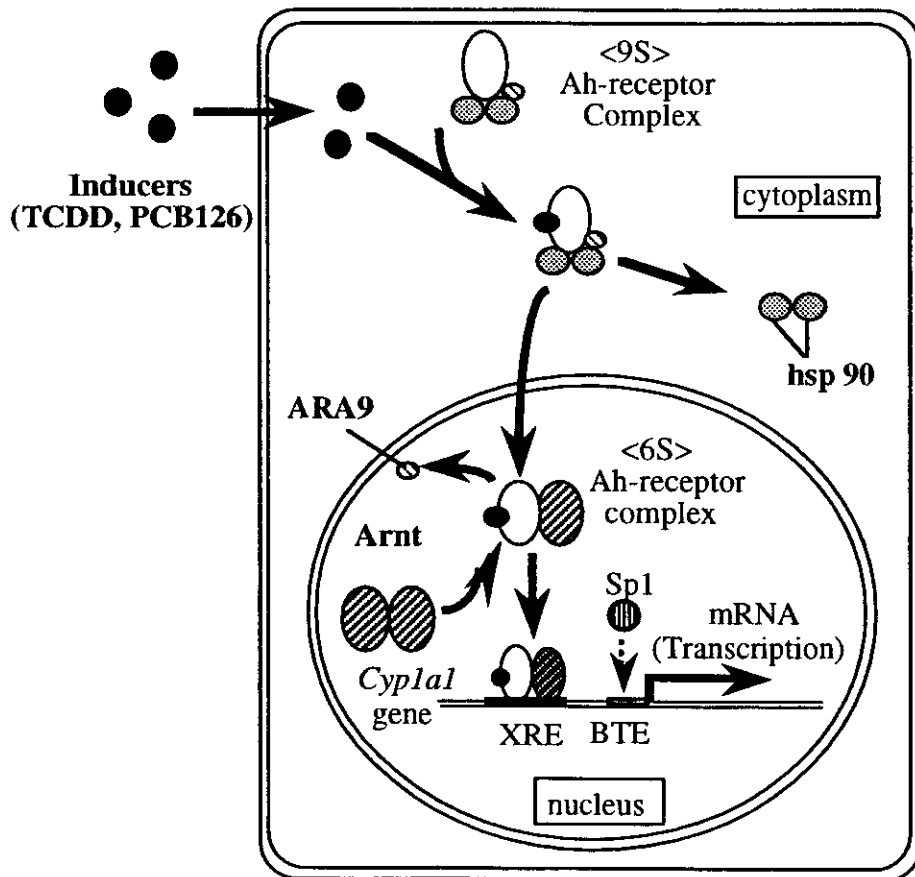


Fig. 2. Postulated mechanism of transcriptional activation of CYP1A1 by Ah-receptor system. BTE, basic transcriptional element.

Ah-receptor は通常、2 分子の heat shock protein (HSP) 90 および 1 分子の Ah-receptor activated 9 (ARA9) と結合していると考えられている (18 - 21) が、このヘテロオリゴマーに TCDD やコプラナー PCB などの ligand が結合すると、HSP90 が解離する。ついで、Ah-receptor は、リガンド結合領域および核内移行シグナルが露出され、リガンドとの結合および核内への移行が行われる。核内へ移行した後、Ah-receptor は、ARA9 と解離し、通常はホモダイマーを形成している Ah-receptor nuclear translocator (Arnt) との間にヘテロダイマーを形成すると考えられている。この HSP90 および ARA9 との解離、リガンドや Arnt との結合および核内への移行の順序については、まだよく知られていない。しかし、ligand - Ah-receptor - Arnt の複合体が、タンパク質をコードする遺伝子の 5'-上流領域に存在する xenobiotic responsive element (XRE) と特異的に結合し、転写を活性化することは、数種のタンパク質の誘導現象から明らかにされている。

一方、TCDD の急性毒性には著しい種差が認められることが知られている (22 - 36)。このことから、TCDD やコプラナー PCB による毒性発現機構は、Ah-receptor を含めた、複数の機構が関与すると考えられている。

以上のような背景から、本研究では、コプラナー PCB によって毒性が発現した状態においては、重要なタンパク質のレベルが著しく変化するという作業仮説をたて、コプラナー

PCB の 1 つである PCB126 によるラット肝サイトソルタンパク質のプロフィール変化を電気泳動で解析した。その結果、分子量 54 KDa のタンパク質が著しく誘導されること、また、そのタンパク質が、マウスの 56 KDa セレン結合性タンパク質 (SeBP) (31) または、58 kDa アセトアミノフェン結合性タンパク質 (APBP) (32) の counterpart であることを、すでに明らかにしている (33, 34)。

SeBP は、セレンの生理的役割を担うと考えられているタンパク質であるが (35, 36)、その機能に関して、次のような報告がなされている。ラット肝初代培養肝細胞において、過酸化水素生成系の存在下に、58 kDa タンパク質への ⁷⁵Se の取り込みが増加することが明らかにされている (37)。また、亜セレン酸ナトリウムによる制ガン作用を示す臓器と SeBP の臓器分布との間に高い類似性が見られることから、セレンによる制ガン作用への関与があるものと推測されている (36)。Jamba らは、このタンパク質が cadmium の毒性を減弱させることを明らかにし、細胞内での酸化還元作用について考察している (38)。さらに、最近、このタンパク質がゴルジ装置における層板間のタンパク質輸送複合体の構成因子の 1 つであることが示された (39)。一方、SeBP の発現調節に関しては、ヒト前立腺ガン細胞において、性ホルモンの 1 つであるテストステロンにより、その発現量が減少することも明らかとなった (40)。しかし、その転写調節領域は解析されておらず、発現調節

機構については明らかにされていない。

一方、APBP は、1987 年に、Bartolone ら (32) によって明らかにされたものである。解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェンの大量摂取による肝細胞壊死は、臨床上問題となっている。この現象は、ミクロソームに存在する薬物代謝酵素である P-450 の中でも CYP1A1 (41)、CYP2B1 (41, 42) および CYP2E1 (43) によってアセトアミノフェンが代謝活性化されて生じる N-acetyl-*p*-quinoneimine (NAPQI) が原因であると考えられている (44 - 46)。APBP の機能についても未解明な点が多いが、アセトアミノフェン代謝物と APBP の結合が、細胞傷害の程度と相関する (47, 48) ことから、NAPQI と APBP との結合が細胞壊死の一過程を担っているという報告がある。しかし、NAPQI による酸化ストレスが細胞毒性の原因であるという報告 (49) もあることから、APBP が、酸化ストレスの発生を抑制している可能性も考えられている。

以上のような報告があるにも関わらず、SeBP および APBP の生理的機能については、未解明な点が多い。しかし、SeBP や APBP がダイオキシン類の 1 つであるコプラナー PCB により誘導されることは、その毒性機構を考える上で、興味深い現象である。また、コプラナー PCB に感受性の高いモルモットでは、比較的感受性の低いラットと異なり、肝サイトソルの 54 kDa タンパク質の誘導は認められない (データ未掲載)。このことは、コプラナー

PCB に対する感受性の種差が、毒性から生体を防御するタンパク質を誘導する能力に依存していることと符合する。

先にも述べたように、コプラナー PCB による毒性発現機構については、未だに解明されていない点が多く残されている。しかし、コプラナー PCB によりある種のタンパク質が誘導されるという現象は、その毒性発現機構を考える上で重要な現象である。言い換えるならば、コプラナー PCB により顕著にその発現量が変動するタンパク質を調べることは、コプラナー PCB の毒性発現機構を解明するに当たり重要な情報を与えるものであると考えられる。

このような背景の基に、我々は、SeBP に関して解析を試みた。この研究を行うにあたり、我々は、遺伝子レベルでの転写調節を解明するため、ラット SeBP の open reading frame (ORF) を含む塩基配列を明らかにし、メッセージレベルでの変化について検討した。

2. 方法・結果

PCB126 誘導性 SeBP の cDNA の解析および 遺伝子発現解析

Reverse transcriptional-polymerase chain reaction (RT-PCR) によるラット肝 SeBP の cDNA クローニングおよび open reading frame (ORF) 全長を含む塩基配列の決定

ラット SeBP の ORF の塩基配列を明らかにす

るため、MC処理ラット肝臓よりcDNAを調製し、特異的 primer を用いてクローニングを行った。3週令 Wistar 系雄性ラットを Charles River Japan より購入し、最低1週間、薬学部動物舎にてステンレススチールケージで飼育した後、実験に供した。SeBPを誘導させるため、MCをcorn oilに溶解し、5 mg/kg body weightの用量で腹腔内に3日間連続投与した。最終投与1日後に屠殺し、肝臓を摘出して、約50-100 mgを量り取り、直ちに液体窒素中で凍結させ、-80℃で保存し、RNA抽出用のサンプルとした。mRNAの調製は、凍結保存しておいた組織より、Bio-Mag mRNA精製キット (perspective Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、付属のマニュアルに従って調製した。さらに、逆転写反応は、RT-PCR high kit (TOYOBO Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、調製した mRNA について、付属のマニュアルに従って調製した。以上の方法で調製した cDNA ライブラリーを用いて、ラット SeBP に対する PCR を行った。解析の概略を Fig. 3 (A) に、また、使用した primer を Table 1 に示す。

まず初めに、マウスおよびヒト SeBP の共通配列である、-6から+14番目に位置すると考えられる p54F1 primer と、Oligo (dT)₂₀-P7 プライマーを認識する Primer P7 を用いて PCR を行い、さらに PCR product の量を増やすために first PCR product をテンプレートとし、同じ primer を用いて PCR を行った。その PCR 産物をアガロース電気泳動で確認した結果、約 1.6

kbp のバンドが確認された。このバンドをゲル抽出し、pGEM®-T Easy Vector にライゲーションした後、大腸菌に形質導入し、その塩基配列を決定した。その結果、ORFの+15番目の塩基から3'側の noncoding region を含む事が明らかとなった。次に、翻訳開始点を明らかにするため、相同性が高いと考えられるマウス APBP の cDNA より設計した p54F2 (-82 から -63 の位置に相当する) および我々が解析した 1.6 kbp の fragment から設計した p54R1 (+919 から +938 の位置に相当する) を用いて PCR を行い、その増幅産物を 1.6 kbp fragment と同様の方法で解析した。その結果、翻訳開始点を含む、全長約 1.0 kbp の塩基配列が明らかとなった。

1.0 kbp の配列は、翻訳開始点を含んでおり、1.6 kbp fragment と共通する配列が一致していることから、両 fragment は、同一種の cDNA より増幅した産物であると考えられた。そこで、これらをライゲーションによりつなぎ合わせた結果、SeBP の ORF を含む全塩基配列が明らかとなった。その結果をマウス SeBP、APBP およびヒト SeBP とともに Fig. 4 に示す。解析された塩基配列は、5'側の noncoding region に 62 bp、3'側の noncoding region に 204 bp を含む、全長 1687 bp の配列であり、また、+1604から+1611番目の位置にポリ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確認された。Table 2 にはマウス SeBP、APBP およびヒト SeBP との ORF における cDNA のホモロジーを%で示している。ラット SeBP

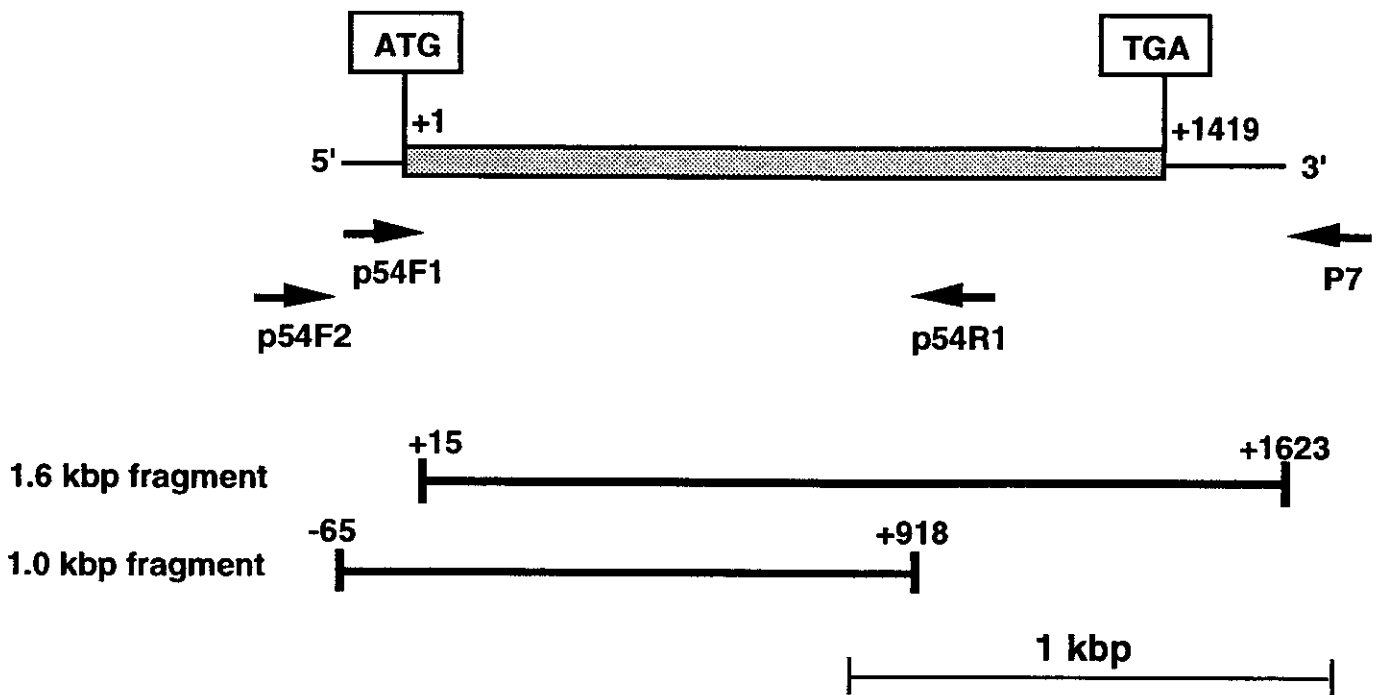


Fig. 3. Schematic representation of rat selenium-binding protein (SeBP) cDNA clones. The initiation and stop codons are depicted at their positions according to the cDNA sequences in Fig. 17 (A). The 1.6 kbp and 1.0 kbp fragments were isolated by the RT-PCR method from a liver cDNA library of rat treated with 3-methylcholanthrene. The sense primers p54F1 and p54F2 were designed from mouse and human SeBP and mouse acetaminophen-binding protein, and antisense primer p54R1 was designed from analyzed rat SeBP cDNA.

Table 1 Sequences of primers

Primer name	Sequence	Nucleotide position
Selenium-binding protein		
p54F1	5'- AGCAGCATGCTACAAAATG -3'	-6 - +14
p54F2	5'- CGACTTAATACCAGCACTGG -3'	-82 - -63
p54R1	5'- ATGTCGGTGATCAAACCAGG -3'	+919 - +938
p54R2	5'- TCCCTTTCACCTCGAAGGTC -3'	+507 - +526
P7	5'- CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC -3'	
β-actin		
ACTF1	5'- CACCATGTACCCAGGCATCGC -3'	+915 - +935
ACTR1	5'- AGGGGCCCGACTCATCGTACT -3'	+1088 - +1108

の cDNA と各 cDNA とのホモロジーはそれぞれ 93%、94%、87% と高い値を示すことが明らかとなった。

Fig. 5 にはラット SeBP の cDNA から推定されるアミノ酸配列と、マウスの SeBP、APBP およびヒトの SeBP のアミノ酸配列との比較を示している。これらアミノ酸配列のホモロジーも、いずれも高い値を示した (Fig. 5, Table 2)。さらに、ラット SeBP のアミノ酸配列中には、thioredoxin, thiol:protein disulfide isomerase, formate dehydrogenase などのタンパク質と同様に cys-X-X-cys で示される bis (cysteiny) sequence motif が 5 - 8 番目および 80 - 83 番目に含まれ

ていることも明らかとなった。このモチーフは、ヒトの SeBP には配列が異なるものの、5 - 8 番目に存在しており、さらに、マウス、ラットとは別の位置の 131 - 135 番目に CFLAC として存在していることも報告されている (50)。この sequence motif は thioredoxin や thiol:protein disulfide isomerase などにおいて、酸化還元反応に関わるモチーフであると考えられていることから、SeBP および APBP の生理的機能の 1 つに、酸化還元に関わるものがある可能性が示されたと考えられる。また、この結果から、SeBP は、動物種を越えてそのアミノ酸配列が高度に保存されている可能性が考えられた。

Table 2
Homologies among rat selenium-binding protein (SeBP), mouse SeBP, acetaminophen-binding protein (APBP) and human SeBP.

	cDNA (%) ^{a)}	Amino acid (%)
Rat SeBP - Mouse SeBP	93	92
Rat SeBP - Mouse APBP	94	93
Rat SeBP - Human SeBP	87	87

a) cDNA homologies were analyzed using each sequence of the open reading frame.

rSP	TCTCTGCTGAA-CCTTTGTCCATT-CCTAGCAAATCCTGCAGGAC	-20
mSP	...TT.CGA.A...GGT.G.T.TTAAG...C...	-23
mAP	GCACTTAATACCAGCACTGG...-G...C...CT...-T.G...	-24
hSP		
rSP	CAGAGTGTTCAGC----CAGCAGC ATGGCTACAAAATGCACAAAGTGTGGTCCAGGTTATGCGACC	42
mSP	TC.....C-GA.....CT.C...	42
mAP	.C.....CAGC.....CC.C...	42
hSPG...TGGG.T...A.C.C.CT.C...	42
rSP	CCTCTGGAGGCCATGAAAGGACCCCGAGAGGAGATTGTCTACTTGCCTGCATTTACCGAAACAC	107
mSPG...	107
mAPG...	107
hSPA.G.A...C...C...	107
rSP	AGGCATTTGAAGCCCCGGATTATTTGGCCACAGTGGATGTTGACCCCAAGTCTCCCCATTATAGCC	172
mSP	...C.....T...A...T...G.....	172
mAP	...CC.....T...A...T...G.....	172
hSP	...C...G...A...C...T...G...T...	172
rSP	AGGTCATCCATAGGCTGCCCATGCCACACCTGAAGGACGAGCTGCACCACTCAGGGTGGAAACACC	237
mSPC.T.....CT.....A.....	237
mAPC.T.....CT.....A.....	237
hSPCC.....CA.....T.....A.....	237
rSP	TGCAGTAGCTGCTTTGGGGACAGCACCAAGTCACGCGACAAGCTGATACTGCCCAGCATCATCTC	302
mSP	...C.....G.....A.....TG.TC.....	302
mAP	...C.....G.....A.....TG.TC...G..	302
hSP	.A...C.....C.T.T.....G.A.....G.CT.....TC.....	302
rSP	CTCCCGCATCTATGTGGTGGATGTGGGCTCTGAGCCTCGTGCCCC-GAAGTTGCACAAGGTCATT	366
mSPC.....	366
mAPC.....	366
hSP	...T.....C.....G...AA...C.....	366
rSP	GAGCCCAATGAAATCCATGCCAAGTGCAACCTGGGCAATCTGCACACCAGCCACTGCCTGGCCAG	431
mSP	..AG...G.....A.....G.A...G.T.....	431
mAP	..AG...G.....A.....G.A...AC.....	431
hSPG.C.....G.A...C.TG...C.....	431
rSP	CGGAGAGGTGATGATCAGCTCCTTGGGGATCCCCAGGGGAATGGCAAAGGGGGTTTTGTGCTGC	496
mSP	T....A.C...G...A.....T...T.....A.....	496
mAP	T....A.C...G...A.A.....T...T.....A.....	496
hSP	...G.A.....C.....CGT.A...C.....	496

Fig. 4. Comparison of rat selenium-binding protein (rSP), mouse selenium-binding protein (mSP), mouse acetaminophen-binding protein (mAP) and human selenium-binding protein (hSP). Sequences of mSP, mAP and hSP are referred to published reports (see ref. 52, 53 and 138). Nucleotide identities and gap spaces among four sequences are denoted by dots and dashes, respectively. The expected translation initiation/termination codons and polyadenylation signal sequence are represented by bold letters and boxed line, respectively.

rSP	TGGATGGGGAGACCTTCGAGGTGAAAGGGACGTGGGAGAAGCCTGGGGGTGAAGCTCCAATGGGC	561
mSPA.....A..C.....	561
mAPA.....C.T.....	561
hSPG.....G.....A.....GA.....CT..A..GT.....	561
rSP	TATGACTTCTGGTACCAGCCTCGACACAACATCATGGTCAGCACTGAATGGGCAGCTCCCAATGT	626
mSP	..C.....TG.....G.....	626
mAP	..C.....TG.....	626
hSPTG.....A.....G.....	626
rSP	CTTCAAAGATGGCTTCAACCCCTGCTCATGTGGAGGCTGGGCTGTATGGGAGCCACATACATGTGT	691
mSPG.....C.....G...TT.....	691
mAPG.....G...TT.....	691
hSP	...ACG.....T...C...G.....A....C.....T..T...A..	691
rSP	GGGACTGGCAGCGACATGAGATTATCCAGACCCCTGCAAATGAAAGATGGGCTGATCCCCCTGGAG	756
mSPC.....C.....A.....	756
mAPC.....C.....A.....	756
hSPC.....G.G.....TCTC.A.....A..T.....	756
rSP	ATCCGCTTCCGACAGACCCAGATGCCACCCAGGGCTTTGTAGGCTGCGCCCTCAGCTCC-AACA	820
mSPAG.....T.....T-.....A....	820
mAP	...T.....AG.....T.....T.....A-...	820
hSPA....AG.....T.....T...-.....A....	820
rSP	TCCAGCGCTTCTACAAGAATGA-GGGAGGCACCTGGTCAGTGGAGAAGGTGATCCAGGTGCCCTC	884
mSPC..A.....T.....A.....	884
mAPA.....T.....A.....	884
hSPC.G.A..T..A.....C.....	884
rSP	CAAGAAAGTGAAGGGCTGGATGTTGCCAGAAAATGCCTGGTTTATCACCACATCTTGCCTGCC	949
mSPGGG.....C.....	949
mAPC.....	949
hSPC.C.....GGG...A..CC.....C...C.....	949
rSP	TGGATGACCGCTTCCCTCTACTTCAGCAACTGGCTGCACGGGGACATTCGGCAGTATGACATCTCT	1014
mSPT.....T.....	1014
mAPT.....T.....	1014
hSP	...C.....T.....C.GA.....	1014
rSP	AACCCGAAGAAGCCTCGCCTCACTGGGCAGATCTTCCCTGGGGGCAGCATTGTAAAGGAGGCTC	1079
mSP	...AC.....C.....G.....G.....	1079
mAP	...AC.....C.....G.....	1079
hSP	G...AC...GA..C.....A..A...C.....C..A.....G.....C.....	1079
rSP	TGTACAAGTGCCTGGAGGACCAAGAGCTAACGTGTCAGCCGGAGCCCTAGTGGTCAAGGGAAAAC	1144
mSP	...G.....T...C.....	1144
mAP	...G.....T...C.....	1144
hSP	...G.....G.G..A...A..CC....A.....	1144

Fig. 4. Continued.

rSP	GAGTTCCTGGAGGTCCCTCAGATGATCCAGCTCAGCTTAGATGGGAAGCGTCTTTACGTCACTACA	1209
mSP	..A.....C.....C.....C.....C.....	1209
mAP	..A.....C.....C.....C.....C.....	1209
hSP	.G..GG.....C.....C.G.....C.....C.T.....	1201
rSP	TCA-----CTGTACAGCGCCTGGGACAAGCAGTTTTACCCCTAATCTCATTAGGGAAGGCTCT	1266
mSPA.....G.C.....C.....	1266
mAPA.....G.C.....C.....	1266
hSP	..CCACGTCG.....T.....A.....G.....C.....	1266
rSP	GTGATGCTGCAAAATTGATGTAGATACAGCAAAATGGAGGGCTGAAGTTGAACCCCAACTTTCTGGT	1331
mSP	A.....T.....C.....T.....	1331
mAP	G.....T...G.....C.....T.....	1331
hSP	..A.....GG.....C.....T...A.....GC.....	1331
rSP	GGACTTTGGGAAAGAGCCTCTTGGGCCAGCACTGGCTCATGAGCTTCGTTACCCAGGGGGTGATT	1396
mSPG.....C.....CG.....C.....C.....	1396
mAPG.....C.....C.....C.....C.....	1396
hSPC.....G.....C.....C.....C.....C.....C.....T.....C.....	1396
rSP	GCAGTTCTGACATCTGGATC TGA AGGCTAGCCCTAAAGGCCTTCCTCCACAGTCGGGGTCCCTCCT	1461
mSPC..A...GG....CC.....T..T.A-----	1457
mAPT.....CA.A...GG....CC.....T..T.A-----	1457
hSP	.T..C.....T.....C.....	1425
rSP	TCTGAGGAGCCTAGCTTCGCTCTGCTCTGGGTCCCAACTCTCCAAGGCCATGATGAGACCATCGA	1526
mSP	-----G.....A.....CA.C.....CTC.....	1514
mAP	-----G.....A.....CA.C.....CTC.....	1514
hSP		1425
rSP	GAACTGCAGAGCAGTATCTCACTACTACCTTGCTTGTTGTTTGTGCCATTCTTAAGTGAGCTCCT	1591
mSP	..T..T.....C.....TG....G.....TTCC..	1563
mAP	..T..T.....C.....TG....G.....A.TT.....	1577
hSP		1425
rSP	GGAAGCACCAAGAAATAAAATGCTGAACCTTT	1623
mSP		1563
mAPTG.....A...CAAA AAAAAAAAAAAAA	1624
hSP		1425

Fig. 4. Continued.

rSeBP	MATKCTKCGPGYATPLEAMK	GPREEIVYLPCIYRNTGIEA	PDYLATVDVDPKSPHYSQVI	60
mSeBPS.....T.....Q.....	60
mAPBPP.....T.....Q.....	60
hSeBPGN.....T.....Q.C.....	60
rSeBP	HRLPMPHLKDELHHSWNTC	SSCFGDSTKSRDKLILPSII	SSRIYVVDVGSEPRAPKLHK	120
mSeBPY.....N.....GL.	120
mAPBPY.....N.....GLM	120
hSeBPN.....Y.....N.V.L.GPQ.....	120
rSeBP	VIEPNEIHAKCNLGNLHTSH	CLASGEVMISSLGDPQNGK	GGFVLLDGETFEVKGTWEKP	180
mSeBP	..AS..Q...VSS.....V.T...L.....	..S.....	180
mAPBP	..AS..Q...VS.T.....VNT...L.....	..S.....	180
hSeBP	..KD... <u>.E.AC</u>VK.....R.....	180
rSeBP	GGEAPMGYDFWYQPRHNIMV	STEWAAPNVFKDGFNPAHVE	AGLYGSHIHVWDWQRHEIIQ	240
mSeBP	..DA.....V.....R.F.....	240
mAPBP	..AS.....V.....R.F.....	240
hSeBP	..A..L.....V.I.....LR.....D.....LY.....V.....	240
rSeBP	TLQMKDGLIPLAIRFLHDPD	ATQGFVGCALSSNIQRFYKN	EGGTWSVEKVIQVPSKKVKG	300
mSeBP	...T.....S.....SAP.....	AE.....	300
mAPBP	...T.....S.....E.....	300
hSeBP	..SL.....N.S.....SAP.....T	RE.....P.....	300
rSeBP	WMLPEMPGLITDILLSLDDR	FLYFSNWLHGDIRQYDISNP	KKPRLTGQIFLGGSIWKGS	360
mSeBP	...GV.....	Q...A.....R...	360
mAPBP	Q.....R...	360
hSeBP	..L..GV.....L.....D.....	QR.....L.....P.....	360
rSeBP	VQVLEDQELTCQPEPLVVKG	KRVPGGPQMIQLSLDGKRLY	VTTSLYSAWDKQFYPNLIRE	420
mSeBPI.....A.....D.....	420
mAPBPI.....A.....D.....D.....	420
hSeBPE..KS.....A.....I.....E.....D.....	420
rSeBP	GSVMLQIDVDTANGGLKLNPNFLVDFGKEPLGPALAHCLR	YPGGDCSSDIWI		472
mSeBP	..M.....V.....A.....	472
mAPBPV...V.....	472
hSeBPV...VK.....	..C.....	472

Fig. 5. Comparison of predicted amino acid sequences of rat selenium-binding protein (rSP), mouse selenium-binding protein (mSP), mouse acetaminophen-binding protein (mAP) and human selenium-binding protein (hSP). Amino acid identities are denoted dots. Predicted specific motif, bis (cystenyl) sequence motif (see ref. 50), is boxed. Underline represents previously analyzed internal sequences from MC-inducible SeBP.

定量的 RT-PCR 法を用いた PCB126 による SeBP の mRNA 量の変化

我々は、先に、PCB の中でも最も毒性が強く (7)、Ah-receptor の ligand の 1 つである PCB126 により SeBP の発現量が増加することを明らかにしている (33, 34)。しかし、この増加は、タンパクレベルでの結果であり、mRNA レベルで生じているものなのか否か明らかではない。SeBP の発現調節機構に関しては、これまで性ホルモンの 1 つである androgen による抑制が示唆されているが (40)、その他の報告がなされておらず、また転写調節領域も完全には明らかにされていないため、未解明な点が多く残されている。しかし、生体異物による転写レベルでの変化を明らかにすることは、SeBP の発現調節機構の解明に重要な情報を与えるものと考えられ、SeBP の生理的機能を考えるうえで非常に有用な情報になると考えられる。そこで、本節では、PCB126 処理ラット肝臓におけるダイオキシン類誘導性 SeBP の mRNA レベルでの変化を、定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。6 週令 Wistar 系雄性ラットを Charles River Japan より購入し、最低 1 週間、薬学部動物舎にてステンレススチールケージで飼育した後、実験に供した。PCB126 処理群ラットには、当研究室において合成された PCB126 を 10 mg/kg body weight/2 ml corn oil として、腹腔内に単回投与した。コントロール群には、同量

の corn oil のみを投与した。また、摂餌量の変化に伴う SeBP 発現量の変化を考慮するため、PCB126 投与に対する pair-feeding を行う pair-fed コントロール群を準備し、摂餌量を毎日記録して、体重当たりの摂餌量を揃えて飼育した。各処理群のラットは、屠殺前日の絶食は行わなかった。最終投与 5 日後に屠殺し、肝臓を摘出して、約 50 - 100 mg を量り取り、直ちに液体窒素中で凍結させ、-80 °C で保存し、total RNA 抽出用のサンプルとした。Total RNA の調製は、凍結保存しておいた組織より、RNase® Midi Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を用いて、付属のマニュアルに従って調製した。cDNA 調製のための逆転写反応は、RT-PCR high kit (TOYOBO Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、調製した total mRNA について付属のマニュアルに従って調製した。定量的 RT-PCR を行うにあたり、まず設計した primer の特異性および PCR 増幅におけるサイクル数と増幅率の関係について検討した。

SeBP における primer の特異性

RT-PCR 法の解析に用いた SeBP に対する primer は、目的の遺伝子のみが特異的にアニーリングして増幅されるように設計した (Table 1)。また、設計した primer、p54F1 および p54R2 を用いて SeBP の cDNA の PCR での増幅を試みた結果、ほぼ理論値に近いサイズである約 540 bp の単一の増幅産物が確認された(サイク

ルの温度条件、94 °C, 2 min → (94 °C, 1 min → 62 °C, 1 min → 74 °C, 2 min) x 30 cycles → 72 °C, 3 min)。また、その塩基配列を解析した結果、目的とするものであることも確認された。このことから、設計した primer および設定した PCR 条件は SeBP の遺伝子発現解析を行う上で問題ないものと判断した。

PCR増幅におけるサイクル数と増幅率の関係

PCB 126 処理したラットの肝臓より total RNA を抽出し、total RNA 量 約 1 μg のサンプルについて cDNA の合成を行った。次に、定量的解析が可能な至適サイクルの検討するため、任意のサイクル数にて PCR を行った (サイクルの温度条件、94 °C, 2 min → (94 °C, 1 min → 62 °C, 1 min → 74 °C, 2 min) x n cycles → 72 °C, 3 min)。目的遺伝子である SeBP の PCR 反応を 16 から 30 サイクルまで 2 サイクル毎に止め、それぞれの反応物から 8 μl をサンプリングしてアガロースゲル電気泳動で分離、ethidium bromide で染色した後、その発光強度を定量した。一方、β-actin 遺伝子の増幅は、18 から 30 サイクルまで、2 サイクル毎に止め、上記と同様の方法にて解析を行った (サイクルの温度条件、94 °C, 2 min → (94 °C, 1 min →

65 °C, 1 min → 74 °C, 2 min) x n cycles → 72 °C, 3 min) (Fig. 6)。この結果より、両 PCR 反応とも、24 サイクルから 30 サイクルまで直線性を示していたことから、直線性を示しなおかつ確実にバンド強度が定量できるサイクル数として、両タンパク質とも 27 サイクルで PCR を行った。

PCB126処理ラット肝臓におけるSeBP mRNAレベルの変化

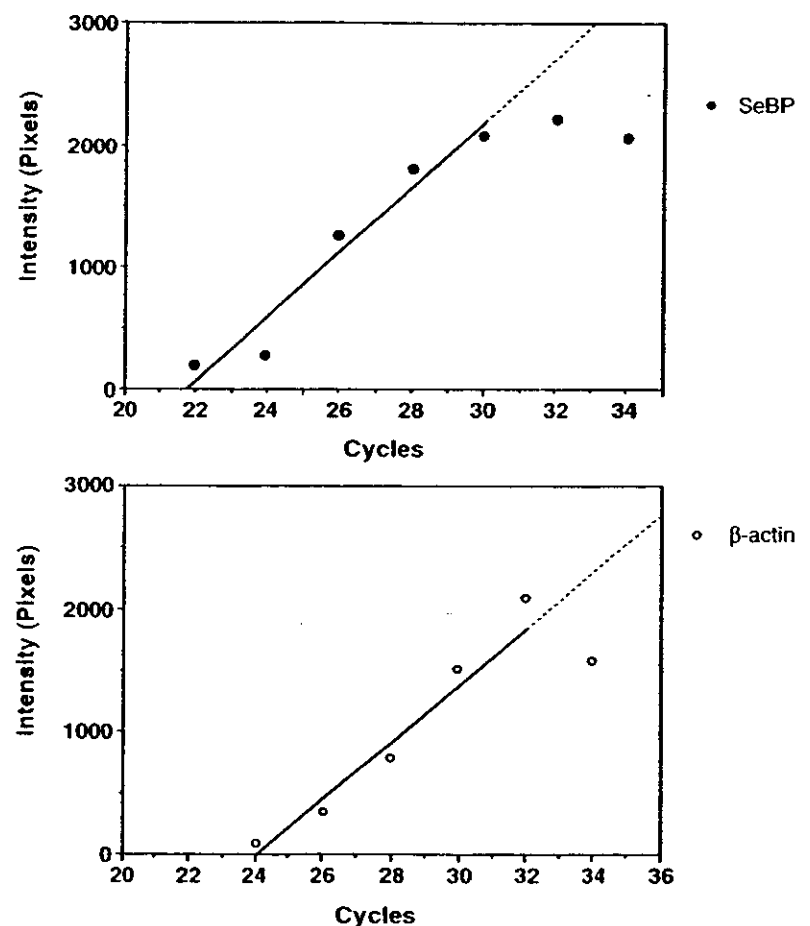


Fig. 6. Kinetics of quantitative RT-PCR of selenium-binding protein (SeBP) transcripts and β-actin. Open circle and closed circle were represented the band intensity of β-actin and SeBP, respectively. Amplification of SeBP and β-actin was linear between cycles 24 and 28.