

200100888A

厚生科学研究研究費補助金

生活安全総合研究事業

ダイオキシンの代謝と毒性発現の作用機序の解析に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 川尻 要

平成14(2002)年4月

目 次

I. 総括研究報告

ダイオキシンの代謝と毒性発現の作用機序の解析に関する研究 ----- 1

川尻 要

II. 分担研究報告

1. ヒトにおけるダイオキシンの代謝と毒性評価に関する研究 ----- 5

井上 國世、榊 利之

2. ダイオキシンの毒性発現の作用機序に関する研究

(1) AhR の活性制御機構の解析：LXXLLモチーフの役割 ----- 15

川尻 要

(2) Dax-1 の Ad4BP(SF-1)依存的な核移行について ----- 18

川尻 要、諸橋憲一郎

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
総括研究報告書

ダイオキシンの代謝と毒性発現の作用機序の解析に関する研究

主任研究者 川尻 要 埼玉県立がんセンター・研究室 主幹

研究要旨 ヒト体内におけるダイオキシン類の代謝にシトクロム P450 が大きな役割を果たしていることが強く示唆された。ダイオキシン類に対して高い活性を示す P450 分子種は CYP1 ファミリーに属する分子種であった。ダイオキシン受容体の機能解析を進展させ、タンパク質間相互作用に関連する NR box の細胞内局在に関する役割を明らかにした。性分化関連因子 Dax-1 の SF-1 依存的な細胞質・核間輸送のメカニズムを明らかにし、ダイオキシンの生物への影響を検討する基礎的な基盤を築いた。

分担研究者

諸橋憲一郎（岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所・教授）、井上 國世（京都大学大学院農学研究科・教授）、榎 利之（京都大学大学院農学研究科・教授）

A. 研究目的

ダイオキシンによる環境汚染が深刻な社会問題となっている。ダイオキシンは奇形の誘導、発癌プロモーション、免疫能の低下、薬物代謝酵素の誘導を引き起こし、生殖機能へ影響を及ぼす可能性があるとも考えられている。脂溶性が高く、しかも生物活性の高いダイオキシンは、環境中での濃度は低くても食物連鎖により濃縮され、人体に深刻な影響を与えることが憂慮されている。ダイオキシンの代謝とその毒性発現の作用機序を明らかにすることを研究目的とする。

B. 方法

(I) ヒトにおけるダイオキシンの代謝と毒性評価（井上・榎）

本研究の目的は多種類のヒト由来酵素を用い

て種々のダイオキシン類の代謝を調べ、ヒト体内における代謝を予測し、それぞれの毒性を正確に評価することである。ヒト肝臓由来の 12 種のシトクロム P450 を発現している酵母のミクロソーム画あるいは菌体を用いて代謝を調べる。代謝産物は HPLC および GC-MS 等により分析、同定し、毒性は変異原性試験および AhR との親和性を調べることにより評価する。

(II) ダイオキシンの毒性発現の作用機序の解析（川尻・諸橋）

細胞内に取り込まれたダイオキシンが代謝された後に、どのようなメカニズムで標的遺伝子に作用し、生殖機能に影響を与えるかという作用機序の解明の研究である。毒性は AhR/ARNT システムにより仲介されるが、AhR は細胞質・核間を移行するシャトルタンパク質であることを我々はすでに見い出している。分子内修飾、分子間相互作用による AhR の核移行、核外移行によるシグナル伝達メカニズムについて調べる。AhR の生理機能と内因性リガンドについても検討する。また、ヒト生殖腺由来の細胞や AhR ノックアウトマウ

スを用いて、性分化に関与する転写因子群と AhR とのクロストークを解析する。

C. 研究結果

(I) ヒトにおけるダイオキシンの代謝と毒性評価 (井上・榎)

1. ヒト由来 P450 によるダイオキシンの代謝
12 種類のヒト由来 P450 (1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4) のそれぞれを発現させた酵母のミクロソーム画分に種々のダイオキシン誘導体を添加し、代謝産物を HPLC および GC-MS により分析した。その結果、ジベンゾパラダイオキシン (DD) の 0~3 塩基置換体のいずれに対しても複数の P450 分子種が代謝能を示し、基質特異性、反応特異性は P450 分子種により大きく異なることを明らかにした。すなわち、2C9, 2C9, 2E1, 3A4 はほとんど代謝活性を示さなかった。1B1 は 2 位に塩素原子が存在するダイオキシンに対しては活性を示し、1A1, 1A2 は 0~3 塩素置換体全般に代謝能を示した。しかしながら、最も毒性の強い TCDD に対してはいずれの P450 も代謝活性を示さなかった。

2. CYP1A サブファミリーによるダイオキシン代謝における動物種差
ヒトとラットではダイオキシン (2,3,7,8-TetraCDD) に対する感受性が大きく異なることが知られており、P450 の代謝能に基づく可能性が考えられる。ダイオキシン代謝に関して中心的役割を果たすと考えられる CYP1A1 および CYP1A2 について種差を調べた。その結果、CYP1A1 の反応特異性において大きな差が認められた。前述のようにヒト CYP1A1 は塩素置換数 0~3 の DD に対して塩素置換数が高くなるほど高い活性を示したが、ラット CYP1A1 は塩素置換数 0~3 の DD に対し、塩素置換数にかかわらず一様に高い活性を示

した。また、ラット CYP1A1 発現酵母の生菌体を用いて 2-モノクロロジベンゾパラダイオキシン (2-MCDD) の代謝経路を詳細に調べたところ、エポキシドを介すると考えられる環の水酸化反応、脱塩素反応を伴う水酸化反応、NIH シフト、多段階水酸化反応、さらにはダイオキシンの毒性低下に最も重要な反応であると考えられる環の開裂反応を司ることが分かった。しかしながら、最も毒性の高い 2,3,7,8-TetraCDD に対しては高い結合能を有するものの、代謝活性は検出されず、ヒト CYP1A1 と同様の結果が得られた。

(II) ダイオキシンの毒性発現の作用機序の解析 (川尻・諸橋)

1. AhR の細胞質・核間輸送の解析

AhR の核移行、核外移行によるシグナル伝達メカニズムについての研究の一環として、蛋白質間相互作用にも関与している 2 カ所の NR box (LXXLL モチーフ) の機能について明らかにした (*J. Biochem.*, **131**, 79-85, 2002)。AhR の NR box 1 (50-54) は NLS と NES の間に位置しており、このモチーフに変異を導入するとリガンドが存在しなくても AhR は細胞質から核へと移行することが観察された。従って、AhR は単に Hsp90 などの因子と結合することにより細胞質に繫留されているのではなく、核からの NES による積極的な排出や NR box を介しての蛋白質の分子間・分子内相互作用などの複合的メカニズムによる動的なバランスの上で細胞質に存在していることが示唆された。

2. 性分化関連因子の細胞内局在

ダイオキシンの複合的な生物機能への影響を解析するために、性分化関連因子でありステロイドホルモン合成を調節する SF-1 とその抑制作用を示す Dax-1 の細胞内での相互作用について検討した。その結果、Dax-1 は SF-1

と結合して SF-1 の NLS を利用して核に移行すること、SF-1 との結合には Dax-1 の 3 カ所に存在している NR box のうちで最も N 端に近い NR box 1 が関与すること、これらの複合体の核への移行には Dax-1 の C 端に存在している AF2 ドメインも重要であること、AF2 ドメインに変異のある先天性副腎低形成 (AHC) 患者の DAX-1 は SF-1 依存的な核移行活性が非常に低下していることが示された。従って、正常な DAX-1 の細胞内局在性に変異により乱されることにより遺伝性疾患 AHC の原因の一部になることが示唆された。

D. 考察

ヒト由来の P450 を発現させた酵母を用いてダイオキシンの代謝についての基礎的な知見が得られた。AhR の分子内にある LXXLL モチーフがその細胞内局在に重要な働きをもつことが明らかになった。ステロイドホルモン合成を調節している SF-1 と Dax-1 の細胞内での相互作用、特に Dax-1 の核移行についての基礎的な知見が得られた。今後、活性測定法の改良による TCDD 代謝活性の検出限界をあげることや phaseII 酵素群の酵素の同時発現系、及びヒト肝マイクロゾームを用いた代謝研究が必要である。また、細胞増殖や分化の過程を調節するような刺激に応じた AhR の局在および転写調節活性の変化を検討することも必要であり、AhR のリン酸化など分子内修飾の関わりについても検討することが重要である。ステロイドホルモン産生細胞にダイオキシンを暴露し、遺伝子発現がどのように影響を受けるかについて検討することにより生物への影響特に性分化への影響について検討することも必要である。

E. 結論

ヒトの肝臓由来の 12 種類の P450 の中で、通常ヒトの肝臓にほとんど存在していない CYP1A1 や存在量の少ない CYP2C19、2D6、1A2 がダイオキシシンに対して高い活性を示し、CYP3A4、2C8、2C9 などの主要な P450 はほとんど活性を示さない事がわかった。また、ヒト CYP1A1 や 1A2、1B1 など CYP1 ファミリーに属する P450 分子種は、塩素数が 3 までのダイオキシシン類に対して高い活性を示すことがわかった。AhR 内の LXXLL モチーフ (NR box 1: 50-54) は AhR の細胞質局在に関与することが示された。また、Dax-1 の核移行には SF-1 が関与することを明らかにし、その移行メカニズムを提起した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakaki, T., Shinkyō, R., Takita, T., Ohta, M., and Inouye, K. Biodegradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) by recombinant yeast expressing rat CYP1A subfamily. *Arch. Biochem. Biophys.* (2002) (in press)
- 2) Ikuta, T., Watanabe, J., and Kawajiri, K. Characterization of the LxxLL motif in the aryl hydrocarbon receptor: Effects on subcellular localization and transcriptional activity. *J. Biochem.*, 131, 29-85 (2002)

2. 学会発表

- 1) Sakaki, T., Shinkyō, R., Takita, T., Ohta, M., and Inouye, K. Metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by human cytochromes P450. 12th

International Conference on
Cytochrome P450. Sept. 11-15 (2001)
La Grande Motte, France, P226

- 2) 新京 楽、榎 利之、太田美穂、井上國世。
ヒトおよびラット由来 CYP1 ファミによる
ダイオキシン代謝機構の解析。第 74 回日
本生化学会大会 2001 年（京都）
- 3) 榎 利之、新京 楽。ヒト由来シトクロ
ム P450 によるダイオキシンの代謝。第
74 回日本生化学会大会 2001 年（京都）
- 4) 生田統悟、川尻 要。表皮角化細胞にお
ける XRE を介した遺伝子発現調節の解
析。第 74 回日本生化学会大会 2001 年
（京都）

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

ヒトにおけるダイオキシンの代謝と毒性評価に関する研究

分担研究者 井上 國世、榊 利之

京都大学大学院農学研究科 食品生物科学専攻 食品生命科学講座 酵素化学分野

研究要旨 ヒト由来 12 種類およびラット由来 2 種類のシトクロム P450 によるダイオキシン代謝を調べたところ、塩素原子数が 3 までのダイオキシンに対しては複数の P450 分子種が代謝能を示したが、最も毒性の高い 2,3,7,8-TetraCDD に対しては、いずれの P450 分子種も活性を示さなかった。基質特異性および反応特異性は P450 分子種により大きく異なり、同じ P450 分子種でもヒトとラットでは活性に差が認められた。

A. 研究目的

ダイオキシンは多くの化合物の総称であるが、その中で 2,3,7,8-TetraCDD は人工の化合物の中で、最強の発癌性・催奇形性物質として知られており、発癌プロモーターとして、または発癌イニシエーターとして、発癌の促進、免疫毒性作用、ビタミン A およびコレステロール、ポルフィリンなどの物質代謝障害、催奇形性などの生殖毒性、種々の遺伝子発現誘導などが知られている。これらの毒性の作用機構として、芳香族炭化水素受容体(以下、Ah レセプターと略す)を介した機構が知られており、Ah レセプターへの結合力の強弱は毒性の強弱に深く関与している。ダイオキシン類の毒性や代謝機構について、ラットやイヌなどの実験動物を用いた研究は盛んに行われており、ダイオキシンの主な代謝反応機構が提唱されている。反応産物の構造から、これらの反応を司る酵素は P450 であることが示唆され、実際に P450 がダイオキシン類の代謝に関与していることを示す報告がなされている。しかし、各 P450 分子種がダイオキシン類に対してどのような反応を司るのかといった詳細

な解析はほとんどなされていない。ヒトに対するダイオキシンの毒性を正しく評価する上でヒトの酵素によるダイオキシンの代謝研究はきわめて重要である。本研究では酵母発現系を用いて 12 種類のヒトの肝臓由来 P450 (ヒト CYP1A1、1A2、1B1、2A6、2B6、2C8、2C9、2C18、2C19、2D6、2E1、3A4) のダイオキシン類に対する代謝活性を調べた。P450 の酵母発現系はそれぞれ単一の P450 分子種を発現しており、各 P450 分子種の機能解析に有用である。今回用いた 12 種のヒトの P450 はヒトの肝臓において発現している P450 をほとんど網羅しており、これら 12 種の P450 によるダイオキシンの代謝を調べることは、ヒトの生体内におけるダイオキシンの代謝を予測する上で非常に有用であると考えられる。また、動物種により、ダイオキシンの毒性は大きく異なるが、原因はよくわかっておらず、一つの要因として P450 を中心とする薬物代謝酵素の差に依る可能性がある。今回の研究で CYP1A1 および CYP1A2 がダイオキシンの代謝に最も重要な分子種であることが明らかになったため、これらの P450 分子種についてヒ

トとラットの比較を行った。

B. 研究方法

(1) 材料

a. ダイオキシン類

イ. 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾパラダイオキシン (以下、2,3,7,8-TetraCDD と略す)

(Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Lot. ED-901-C)

ロ. 2,3,7-トリクロロジベンゾパラダイオキシン (以下、2,3,7-TriCDD と略す)

(Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Lot. ED-1779-C)

ハ. 2,7-ジクロロジベンゾパラダイオキシン (以下、2,7-DCDD と略す)

(ジーエルサイエンス株式会社 Lot. 001-203-A)

ニ. 2,3-ジクロロジベンゾパラダイオキシン (以下、2,3-DCDD と略す)

(AccuStandard Inc. Lot. 930924)

ホ. 2-クロロジベンゾパラダイオキシン (以下、2-MCDD と略す)

(AccuStandard Inc. Lot. 980817LB-AC)

ヘ. 1-クロロジベンゾパラダイオキシン (以下、1-MCDD と略す)

(AccuStandard Inc. Lot. 971105LB-AC)

ト. ジベンゾパラダイオキシン (以下、DD と略す)

(和光純薬工業株式会社 Lot. CKL9486)

b. ミクロソーム画分

ヒト CYP1B1 を除く 11 種のミクロソーム画分は住友化学分析センターから購入した。

ヒト CYP1B1 のミクロソーム画分は第一化学

薬品株式会社から購入した。ヒト CYP1B1 を除く 11 種のミクロソーム画分は 100mM リン酸緩衝液(0.5 mM EDTA を含む)に懸濁したものであり、ヒト P450 1B1 のミクロソーム画分は 100 mM リン酸緩衝液)に懸濁したものである。

1. ヒト CYP1A1 Lot. 11 P450 濃度…
16.2pmol/ mg protein

タンパク質濃度…30.0mg/ ml

2. ヒト CYP1A2 Lot. 12 P450 濃度…
40.0pmol/ mg protein

タンパク質濃度…30.0mg/ ml

3. ヒト CYP1B1 Lot. 5 P450 濃度…
190pmol/ mg protein

タンパク質濃度…5.0mg/ ml

4. ヒト CYP2A6 Lot. 10 P450 濃度…
23.1pmol/ mg protein

タンパク質濃度…30.0mg/ ml

5. ヒト CYP2B6 Lot. 19 P450 濃度…
11.7pmol/ mg protein

タンパク質濃度…30.0mg/ ml

6. ヒト CYP2C8 Lot. 8 P450 濃度…
145pmol/ mg protein

タンパク質濃度…10.0mg/ ml

7. ヒト CYP2C9 Lot. 11 P450 濃度…
68.7pmol/ mg protein

タンパク質濃度…10.0mg/ ml

8. ヒト CYP2C18 Lot. 8 P450 濃度…
71.3pmol/ mg protein

タンパク質濃度…10.0mg/ ml

9. ヒト CYP2C19 Lot. 13 P450 濃度…
29.8pmol/ mg protein

タンパク質濃度…30.0mg/ ml

10. ヒト CYP2D6 Lot. 14 P450 濃度…
12.8pmol/ mg protein

タンパク質濃度…30.0mg/ ml

11. ヒト CYP2E1 Lot. 8 P450 濃度…

67.1pmol/ mg protein

タンパク質濃度…10.0mg/ ml

12. ヒト CYP3A4 Lot. 21 P450 濃度…

46.1pmol/ mg protein

タンパク質濃度…30.0mg/ ml

(2) 方法

1. 酵母の培養

ラット由来 CYP1A1 cDNA 発現ユニットおよび酵母由来 NADPH-P450 還元酵素遺伝子を組み込んだ発現プラスミド pAMR2 を酵母 *S. cerevisiae* AH22 株に導入した組換え酵母 AH22/ pAMR2、あるいはラット由来 CYP1A2 cDNA 発現ユニットおよび酵母由来還元酵素遺伝子を組み込んだ発現プラスミド pGR1A2 を酵母 *S. cerevisiae* AH22 株に導入した組換え酵母 AH22/ pGR1A2 を SD 培地 (8% グルコース、5.4% 窒素源(アミノ酸不含)、ヒスチジン 160 mg/l) を用いて 30°C で培養した。

2. 組換え酵母ミクロソーム画分の調製

培養液を遠心分離(8,000 x g, 10 分)して集めた酵母 AH22/ pAMR2 株の菌体を Zymolyase buffer (10 mM Tris-HCl、2 M ソルビトール、0.1 mM DTT、0.1 mM EDTA、pH 7.5) に懸濁し、Zymolyase 処理を行った。遠心分離 (8,000 x g、10 分)し、得られたスフェロプラストを Sonication buffer (10 mM Tris-HCl、0.65 M Sorbitol、0.1 mM DTT、0.1 mM EDTA、pH7.5) に懸濁し、超音波処理を行った。遠心分離(10,000 x g、20 分)により得られた上清をさらに超遠心分離 (100,000 x g、60 分)して、沈殿を得た。これを 20mM リン酸緩衝液 (20% グリセロール、50 μM PMSF を含む)に懸濁して、ミクロソーム画分とし、-80°Cにて保存した。

3. 還元型 CO 結合差スペクトルの測定およびタンパク質量の測定

島津製作所製分光光度計 UV-2200 を用いてミクロソーム画分を含む溶液の還元型 CO 結合差スペクトルを測定し、 $\Delta \epsilon_{447-490} = 91 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [18]により P450 濃度を算出した。また、タンパク質濃度は BSA を標準タンパク質とし、Lowry-Folin 法により算出した。

4. ヒト由来およびラット由来 P450 分子種のミクロソーム画分によるダイオキシン類代謝活性測定

50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) にミクロソーム画分を加え、エタノールあるいはアセトンに溶解したダイオキシン溶液を終濃度が 10 μM になるように添加し(エタノールあるいはアセトンの終濃度 1%)、37 °Cにて 2 分間インキュベートした。ただし、ヒト由来 CYP2E1 はエタノールおよびアセトンにより、活性が著しく阻害されるため、メタノールあるいはジメチルスルフォキシドを用いた。その後、NADPH (終濃度 500 μM) を加えて、反応を開始させた。反応の停止および、基質、代謝産物の抽出は、反応溶液の一部をクロロホルム：メタノール=3：1 の溶液に攪拌することによって行った。このクロロホルム層を一定量取った後、遠心エバポレーターおよび風乾にて乾固させ、その後アセトニトリルに再び溶解し、HPLC で分析した。

反応液の P450 濃度は、ラット CYP1A1 (2,3,7-TriCDD、2-MCDD、DD に対して) は 7.5 nM、ラット CYP1A1(2,7-DCDD、2,3-DCDD、1-MCDD に対して)は 18.7 nM、ラット CYP1A2 およびヒトの P450 は 33 nM とした。

(1) HPLC(日立 L-7000)の分析条件：

カラム, YMC-ODS 4.6×300 mm; 検出波長, 227nm; カラム温度, 40 °C; 流速, 1ml/ min; 溶出条件, 50 %アセトニトリル水溶液 (0-5 分)、50~100%アセトニトリル

リル直線濃度勾配 (5-20 分)、100%アセトニトリル (20-30 分)

(2) ガスクロマトグラフィー-質量分析計 (GC-MS)による分析

ダイオキシンの代謝産物及びそのメチル化物を分取し、GC-MS で分析した。

GC-MS (Finnegan Mat Thermo Quest GC) の分析条件 :

カラム, Cp-Sil 24CB-MS (Chrompack)

(0.32 mm × 30 m) ; 温度, 250-275°C;

イオン化法, EI 法

5. Ah レセプターアッセイ

ラット由来グルタチオン S-トランスフェラーゼ Ya 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ cDNA の 5' 上流に結合した発現ユニットを有するプラスミドをマウス由来 Hepa-Ic1c7 細胞に導入し、安定発現株を得た。これに終濃度 25, 50, 100, 200 nM になるように 2,3,7-TriCDD あるいは、2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体、2,7-DCDD 3 位水酸化体を添加した。また、ポジティブコントロールとして 2,3,7,8-TetraCDD を終濃度 0.02、0.2 および 2 nM で添加した。

C. 研究結果

(1) ラット由来 CYP1A1 あるいは CYP1A2 発現酵母ミクロソーム画分の P450 濃度およびタンパク質濃度

還元型 CO 結合差スペクトル測定、およびタンパク質量の結果、各ミクロソーム画分におけるラット CYP1A1 および CYP1A2 の比含量は、それぞれ 130 および 231 pmol/mg タンパク質であった。

(2) 各種ミクロソーム画分におけるダイオキシン類代謝活性

2,3,7,8-TetraCDD を除く 6 種類のダイオ

キシンに対しては複数の P450 分子種が活性を示し、P450 分子種によって、その基質特異性と反応特異性は異なった。それらの反応特異性は、DD に対するものを除くと、大きく 2 つに分けられ、1 つはヒト 1A1 型でラット CYP1A1、ヒト CYP1A1、1B1、2C8 の 4 種であり、もう 1 つはヒト 1A2 型でヒト CYP1A2、2B6、2C9、2C18、2C19、2D6、2E1 の 8 種であった。ラット CYP1A2 は、1-MCDD、2,3-DCDD に関してはヒト 1A1 型、2,7-DCDD および 2,3,7-TriCDD についてはヒト 1A2 型と興味深い性質を示した。それぞれについて詳しく述べると以下のようであった。

- a. DD の主要代謝産物 : HPLC における溶出時間 12.3 分 (図 1)
- b. 1-MCDD の主要代謝産物 : 1A1 型…溶出時間 14.4 分、1A2 型…14.9 分
- c. 2-MCDD の代謝産物 : 1A1 型…15.9 分、16.1 分、16.3 分、1A2 型…16.1 分、16.3 分)
- d. 2,3-DCDD の主要代謝産物 : 1A1 型…17.6 分、1A2 型…17.4 分
- e. 2,7-DCDD の主要代謝産物 : 1A1 型…18.9 分 1A2 型…16.3 分、18.9 分 (図 2)
- f. 2,3,7-TCDD の主要代謝産物 : 1A1 型…20.9 分、1A2 型…18.8 分、20.9 分 (図 3)

ヒト由来およびラット由来の CYP1A1 および CYP1A2 は塩素置換数 0-3 のダイオキシンに対して代謝活性を示したが、最も毒性の高い 2,3,7,8-TetraCDD に対しては活性を示さなかった。ヒト P450 1B1 は、2-位に塩素がついているダイオキシンに対して活性を示した。ヒト CYP2C19、2D6 および 2E1 は、両方の環に塩素のついているダイオキシン(2,7-DCDD, 2,3,7-TriCDD, 2,3,7,8-TetraCDD) 以外に対して活性を示した。

反応速度を比べると、ラット由来 CYP1A1 が 2,3,7,8-TetraCDD を除く 6 種のダイオキシン全てに対して最も高い値を示した(表 1)。

(3) ダイオキシン代謝産物の GC-MS による分析

a. DD 代謝物の分析

DD に対する代謝物は、 $m/z=200$ に親イオンピークを示し、DD の親ピークである $m/z=184$ と比べて酸素原子 1 個分増加していた。このことから、この代謝物には水酸基が一個付加されていることがわかった(図 4)。

b. 1-MCDD 代謝物の分析

1-MCDD に対する 1A1 型の代謝物は、 $m/z=234$ に親イオンピークを示し、1-MCDD の親イオンピークである $m/z=218$ と比べて 1 酸素原子分増加していた。(M-Cl)⁺ および(M-COCl)⁺ が主要フラグメントであることから、2,3,7,8-位のいずれかに水酸基が付加されたと考えられる(図 5-A)。一方、1A2 型の代謝産物の場合、親イオンピークは同様であったが、フラグメントパターンが異なっていた。(M-COH)⁺ および(M-2CO)⁺ が主要フラグメントであったことから、4,6,9-位のいずれかに水酸基が付加されたと推測される(図 5-B)。

c. 2-MCDD 代謝物の分析

CYP1A1 による 2-MCDD に対する代謝産物は 2 つあり、両代謝物の親イオンピークは $m/z=234$ で 1-MCDD と同様、1 酸素原子分増加していた。フラグメントパターンから、代謝物 4 (図 6-B) は 3,7,8-位のいずれかに水酸基が付加され、代謝物 5 (図 6-C) は 1,4,6,9-位のいずれかに水酸基が付加されたと推測される。

d. 2,3-DCDD 代謝物の分析

CYP1A1 による 2,3-DCDD の代謝物は 3 つあり、代謝物の親イオンピークはすべて

$m/z=268$ であり、2,3-DCDD の親イオンピークである $m/z=252$ と比べて 1 酸素原子分増加していた。しかし、各代謝産物のフラグメントパターンは異なっていた。代謝物 6 (図 7-B) と 7 (図 7-C) は(M-Cl)⁺ および、(M-COCl)⁺ が主要フラグメントであり、2,3,7,8-位のいずれかに水酸基が付加された化合物と推定される。一方、代謝産物 8(図 7-D)は(M-COH)⁺ および(M-2CO)⁺ が主要フラグメントであり、4,9-位のいずれかに水酸基が付加されると推測される。

e. 2,7-DCDD 代謝物の分析

CYP1A1 による 2,7-DCDD に対する CYP1A1 の代謝物は M9 (図 8-B) で 3 位水酸化体と考えられたが、転位反応(NIH シフト)の結果生じた 2,8-DCDD の 3-位水酸化物である可能性もある。一方、CYP1A2 の代謝物は 2 つあり(図 9)、代謝産物 9 については CYP1A1 の場合と同様であったが、代謝物 10 の親イオンピークは $m/z=234$ であり(図 10)、2-MCDD の代謝物 5 (図 6-C) と同様のフラグメントパターンを示した。このことから、代謝物 10 は 2,7-DCDD の 1 塩素原子が脱離し、さらに 6-位に水酸基が付加されたものであると推測される。

f. 2,3,7-TriCDD 代謝物の分析

2,3,7-TriCDD に対する CYP1A1 の代謝物 12 (図 3) の親イオンピークは $m/z=302$ であり、2,3,7-TriCDD の親イオンピークである $m/z=286$ と比べて酸素原子 1 原子分増加していた(図 10-C)。この代謝物のメチル化物の親イオンピークは $m/z=316$ であり、その分子イオンピークとして(M-CH₃)⁺ の $m/z=301$ が観察された(図 10-D)。Tulp らの報告 [19] から、(M-CH₃)⁺ のイオンピークが観察される場合、-OCH₃ 基は 2,3,7,8-位のいずれかに存在することが示唆されており、この代謝物の

水酸基の位置は2,3,7,8-位のいずれかであることがわかった。このことから、(M-Cl)⁺および(M-COCl)⁺が主要なフラグメントである場合は、2,3,7,8-位のいずれかに水酸基が付加していると考えられる。つまり、代謝物において、(M-Cl)⁺および(M-COCl)⁺が主要なフラグメントである場合は、2,3,7,8-位のいずれかに水酸基が付加していると考えられ、また(M-COH)⁺および(M-2CO)⁺が主要なフラグメントである場合、あるいは、これらが(M-Cl)⁺および(M-COCl)⁺と同程度のフラグメントである場合は、1,4,6,9-位のいずれかに水酸基が付加していると考えられる。したがって、代謝物12は8位に水酸基が付加されたものであると考えられる。2,7-DCDDの場合と同様に、CYP1A2の代謝物は2つあり(図3)、一つは代謝物12であった。もう一つの代謝物(M11)の親イオンピークはm/z=268で、2,3,7-TriCDDの1塩素原子が脱離し、さらに1位に水酸基が付加されたものであると推測される(図10-B)。

(4) ヒトおよびラット由来 CYP 1A1 および CYP 1A2 による 2,7-DCDD 3 位水酸化活性および 2,3,7-TriCDD 8 位水酸化活性の速度論的解析

2,3,7-TCDD および 2,7-DCDD に対する 8-位水酸化活性を測定し、代謝産物の分子吸光係数 ϵ_{227} が基質と同じであると仮定して Hanes-Woolf プロットにより最大酵素活性 V_{max} およびミカエリス定数 K_m を求めた(表2)。ラット CYP1A1 とヒト CYP1A1 を比較するとラット CYP1A1 の方が両基質に対して K_m 値は小さく、 V_{max} 値は大きかったことから、ヒト CYP1A1 よりも代謝能が優れていると考えられる。一方、CYP1A2 の場合は逆にヒト CYP1A2 の方が、ラット CYP1A2 よりも優れ

ていると考えられた。但し、ラット CYP1A2 の場合、発現量が他の P450 分子種に比べて多く、P450 に対する NADPH-P450 還元酵素の割合が少ないため(1/2程度)、 V_{max} が低くなっている可能性が高く、直接比較することはできない。

(5) ラット CYP1A1 による 2-MCDD 代謝経路の解明

a. 代謝物の経時変化

0~3 の塩素置換数のダイオキシンに対し最も高い活性を示したラット CYP1A1 において 2-MCDD に対する代謝を詳細に調べた。反応 0、2、8 分後の代謝物を HPLC で分析した結果を図 11 に示す。反応 2 分で添加した基質の 70% が代謝物 P1-P 7 に変換され、8 分後には基質は検出されなかった。反応時間 2 分における主代謝物は P1 および P2 であり、8 分における主要代謝物は P6 および P7 であった。後述するように、P6 および P7 はダイオキシンの環が開裂し、227nm における吸光度はそれぞれ 11.4% および 7.4% と著しく減少

しているため、今回用いた HPLC 条件では検出感度が低い。図 12 に反応液中の各代謝物濃度の経時変化を示す。2-MCDD のほとんどはまず、P1 あるいは P2 に変換され、最終的には P6 あるいは P7 に変換されることが考えられる。

b. GC-MS による代謝物の同定

HPLC 分析では分離が不十分であった代謝物 P1 と P2 は GC で完全に分離した。ピークの高さから P1 と P2 の量比は 1 : 2 と推定される(図 13-B)。質量分析における親イオンピークは m/z=234 で、199 (M-Cl)⁺ および 171 (M-COCl)⁺ が主要なフラグメントであり、3,7,8-位のいずれかに水酸基が付加していると考えられる。一方、P2 は 205 (M-COH)⁺ および 178 (M-2CO)⁺ が主要なフラグメントであ

り、1,4,6,9-位のいずれかに水酸基が付加していると考えられる(図13-C)。また、P3は親イオンピークは $m/z=234$ で、 $199(M-Cl)^+$ および $171(M-COCl)^+$ が主要なフラグメントであり、2,3,7,8-位のいずれかに水酸基が付加していると考えられるが(図13-D)、前述の1-MCDDの代謝物とHPLC溶出位置と一致することからNIHシフトにより塩素原子が一位に転位した1-MCDD 8位水酸化体であると推定される。P4は親イオンピークは $m/z=200$ で $171(M-COH)^+$ および $144(M-2CO)^+$ が主要なフラグメントであることから2位の塩素原子が脱離し、水酸基が導入されたものであることがわかった(図14-A)。P5の親イオンピークは $m/z=250$ で、 $221(M-COH)^+$ 、 $215(M-Cl)^+$ 、 $194(M-2CO)^+$ および $187(M-COCl)^+$ が主要なフラグメントであり、3,7,8-位のいずれかに水酸基が一つ、1,4,6,9-位のいずれかにも水酸基が一つ付加したものであると考えられる(図14-B)。P6の親イオンピークは $m/z=144(^{35}Cl)$ および $146(^{37}Cl)$ で、4-クロロカテコールのマススペクトルと同様であった。HPLCでの溶出位置も一致したことから、P6は2-MCDDの環が開裂して生じた4-クロロカテコールであると考えられる(図14-C)。一方、P7の親イオンピークは $m/z=110$ で、また、HPLCでの溶出位置も一致したことから、カテコールであると考えられる。

以上の結果をまとめると図15のような代謝経路が考えられる。最終的には環が開裂した代謝物のみが観察される。P1およびP2を基質として添加した場合もP6およびP7が代謝物として観察されるが、この場合、水酸基が3つある代謝物が生じるはずであるが、現在のところ検出されていない。抽出効率が悪い、あるいは今回のHPLC条件下で不純物ピークと重なっている可能性が考えられる。代謝経

路中括弧で囲んだ代謝物は検出されていないが、エポキシドの生成に続くヘミアセタールの形成、自発的な環の開裂と続くと考えられる。いずれにしてもP450による徹底的な代謝が行われることがわかった。CYP1A1による2,3,7-TriCDDの代謝においても4,5-ジクロロカテコールと推測される代謝物が検出されており、0-3の塩素置換数のダイオキシンに対して、CYP1A1は環の開裂を伴う代謝を行うと考えられる。

(6) 2,3,7,8-TetraCDD 結合差スペクトル
ヒトCYP1A1およびラットCYP1A1の2,3,7-TriCDDあるいは2,3,7,8-TetraCDD添加による差スペクトルを測定したところ、いずれも420nmあたりに極小、390nm付近に極大を持つ典型的なType Iスペクトルが観察された。基質が結合していない状態ではCYP1A1のヘム鉄の第6配位子に水の酸素原子が配位した低スピン型で、2,3,7-TriCDDあるいは2,3,7,8-TCDDの結合により高スピン型に変化したことを示唆する。したがって、これらP450は2,3,7,8-TetraCDDを代謝しないものの2,3,7,8-TetraCDDを基質ポケットに結合すると考えられた。一方、ヒトCYP1A2およびラットCYP1A2の場合、差スペクトルは観察されなかったが、これらP450は基質非存在下においても高スピン型であるため差スペクトルが観察されなかったと考えられる。

(7) ヒト由来CYP1A1およびCYP1A2依存性2,3,7-TriCDD 8位水酸化活性に対する2,3,7,8-TetraCDDの阻害効果

2,3,7,8-TetraCDD存在下(0.78 μ M)および非存在下でCYP1A1あるいはCYP1A2による2,3,7-TriCDD 8位水酸化活性を測定し、

Hanes-Woolf プロットした結果を図 16 に示す。いずれにおいても 2,3,7,8-TetraCDD が拮抗阻害を示すことがわかった。阻害定数 K_i はそれぞれ、0.61 および 0.74 μM と算出され、かなり高い親和性で 2,3,7,8-TetraCDD がヒト CYP1A1 および CYP1A2 に結合することが明らかになった。

(8) Ah レセプターアッセイ

蛍光強度の測定から 2,3,7-TriCDD には 2,3,7,8-TetraCDD の 0.01-0.05% 程度の誘導能 (Ah レセプター結合能) があることがわかった。しかし、代謝物である 2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体には誘導能が認められず、2,3,7,8-TetraCDD の 0.001% 以下であることが示唆された。また、2,7-DCDD 3 位水酸化体においても誘導能は全く認められなかった。

D. 考察

これまで、ダイオキシンの代謝に関する研究は、ラットなど動物個体への投与実験や動物の肝臓から調製してきたマイクロソーム画分を用いたものが多く、異種細胞発現系を用いた代謝研究はほとんど行われていない。今回用いた酵母発現系は単一の P450 分子種の働きを調べるのに有用である。ヒトの肝臓由来の 12 種類の P450 の中で、通常ヒトの肝臓にほとんど存在していない CYP1A1 や存在量の少ない CYP2C19、2D6、1A2 がダイオキシンに対して高い活性を示し、CYP3A4、2C8、2C9 などの主要な P450 はほとんど活性を示さない事がわかった。また、ヒト CYP1A1 や 1A2、1B1 など CYP1 ファミリーに属する P450 分子種は、塩素数が 3 までのダイオキシン類に対して高い活性を示すことがわかった。エポキシドを介すると考えられる環の水酸化および転位反応、脱塩素を伴う水酸化反応が

主な反応であり、毒性の低減化に最も重要な環の開裂反応も観察された。2,3,7-TriCDD の主代謝物である 8 位水酸化体および 2,7-DCDD の主代謝物である 3 位水酸化体の毒性を Ah レセプターアッセイにより調べたところ、遺伝子発現誘導能は全く検出されず、Ah レセプターへの結合能はきわめて低いと考えられる。反応の多くがエポキシドの生成を介すると推測されるものの、P450 の反応により毒性の高いダイオキシン代謝物が生じる可能性は低いと考えられる。

ラット CYP1A1 による 2-MCDD の代謝において代謝物を詳細に分析した結果、これまでに動物実験で観察された代謝パターンのうち、抱合体を除くすべての代謝が見られ、ダイオキシンの代謝において P450 が中心的な役割を果たしていることが強く示唆された。特に CYP1A サブファミリーに属する P450 分子種が重要である。CYP1A1 の活性が特に強いが、健常人の肝臓における CYP1A1 の発現量はきわめて低いことがわかっている。遺伝子発現が誘導されるレベルのダイオキシンが体内に取り込まれた場合は別であるが、通常は肝臓での発現量が比較的多い CYP1A2 が中心的役割を果たしていると考えられる。結合差スペクトルおよび活性阻害実験からヒト CYP1A1 および CYP1A2 は最も毒性の高い 2,3,7,8-TetraCDD を高い親和性で結合することが明らかになったが、代謝活性は検出できなかった。

ヒト由来 12 種類の P450 の中でダイオキシンに対して高い活性を示した CYP1A1 および CYP1A2 についてヒトとラットの比較を行った。その結果、CYP1A1 の基質特異性において大きな差が認められた。ヒト CYP1A1 は塩素置換数が 0 から 3 まで増加するにつれて活性が増大するのに対し、ラット CYP1A1 は塩

素置換数 0 から 3 までのすべてのダイオキシンに対して高い活性を示した。ヒト CYP1A1 は塩素原子が付加されていない DD に対してラット CYP1A1 の 2~3% の活性しか示さず、1 塩素置換体についても活性は著しく低かった。CYP1A2 に関しても基質特異性において明らかな種差が認められた。アミノ酸配列における同一性は CYP1A1 で 79%、CYP1A2 で 73% で、ヒト、ラット間で厳密に保存されているわけではない。基質結合部位と推定される領域にもアミノ酸の違いが認められるため、基質特異性や反応特異性に違いが認められるのは当然ともいえる。しかし、ラット CYP1A1 および CYP1A2 の場合もヒト CYP1A1、CYP1A2 の場合と同様、2,3,7,8-TetraCDD に対する活性は認められなかった。したがって、現段階ではヒトとラットに対する 2,3,7,8-TetraCDD の毒性の違いをこれら P450 の代謝活性から説明することはできないが、きわめて低いレベルでの活性の違いが効いている可能性あるため、検出方法の改良により、検出感度の上昇を試みる予定である。

E. 結論

今年度得られた結果から、ヒト体内におけるダイオキシン類の代謝にシトクロム P450 が大きな役割を果たしていることが強く示唆された。ダイオキシン類に対して高い活性を示す P450 分子種は CYP1 ファミリーに属する分子種であった。これらの分子種は、Ah レセプターに 2,3,7,8-TetraCDD が結合することが引き金になり、誘導発現される分子種である。したがって、これらの P450 分子種に 2,3,7,8-TetraCDD 代謝能があればダイオキシンの問題は起こらなかつたと推測されるが、実際には代謝能は全く認められず、ヒトに対する毒性がきわめて高い要因になっていると

考えられた。一方、ラットはヒトよりもダイオキシンに対する感受性がかなり低いため、ラット由来 P450、特に CYP1A1 は 2,3,7,8-TetraCDD に対してある程度の活性を示すのではないかと推測したが、活性は検出できなかった。今年度の研究成果は P450 によるダイオキシン類の代謝経路を解明したこと、および Ah レセプターアッセイにより代謝物の毒性が低いことを示したことである。しかしながら、ヒトとラットにおけるダイオキシンの毒性の違いを説明するには至らず、検討が不十分であったと考えている。来年度は今年度の成果をふまえ、ダイオキシン類、特に 2,3,7,8-TetraCDD の代謝と毒性に関する詳細な検討を行いたい。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Biodegradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) by recombinant yeast expressing rat CYP1A subfamily. Sakaki, T., Shinkyō, R., Takita, T., Ohta, M., and Inouye, K. *Arch. Biochem. Biophys.* (2002) (in press)

2. 学会発表

1) Sakaki, T., Shinkyō, R., Takita, T., Ohta, M., and Inouye, K. Metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by human cytochromes P450. 12th International Conference on Cytochrome P450. Sept. 11-15 (2001) La Grande Motte, France, P226

2) 新京 楽、榎 利之、太田美穂、井上國世。

ヒトおよびラット由来 CYP1 ファミによる
ダイオキシン代謝機構の解析. 第 74 回日本
生化学会大会 2001 年 10 月 27 日 国立京都
国際会館 (京都) 生化学、第 73 巻、第 8 号、
p873

- 3) 榎 利之、新京 楽、滝田 禎亮、太田 美穂、
井上 國世。ヒト由来シトクロム P450 によ
るダイオキシンの代謝. 第 74 回日本生
化学会大会 2001 年 10 月 27 日 国立京都
国際会館 (京都) 生化学、第 73 巻、第 8 号、
p873

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

ダイオキシンの毒性発現の作用機序に関する研究
(1) AhR の活性制御機構の解析：LXXLL モチーフの役割

主任研究者 川尻 要 埼玉県立がんセンター（研究室）主幹

研究要旨 AhR の bHLH および PAS 領域には LxxLL モチーフ (NR1 と NR2) が存在する。このモチーフの AhR における役割を検討するため、モチーフ内の Leu を Ala に置換した変異型 AhR を COS 細胞で発現させ、野生型と比較した。NR1 変異体はリガンド非存在下で核局在が促進され、CYP1A1 の転写は減少した。NR2 変異体は野生型と差がなかった。このモチーフは AhR の機能発現に重要である事が示された。

A. 研究目的

ダイオキシンは奇形の誘導、発癌プロモーション、免疫能の低下、薬物代謝酵素の誘導を引き起こし、生殖機能へ影響を及ぼす可能性があるとも考えられている。Ah レセプター (AhR) はダイオキシンと高い親和性をもって結合することにより、その毒性発現を仲介する蛋白質である。蛋白質の機能発現は時間的かつ空間的に制御される必要がある。我々は既に AhR の核移行シグナル (NLS) および核外移行シグナル (NES) を同定し、この転写因子が細胞質・核間を行き来するシャトルタンパク質である事を明らかにしている。本年度においては、AhR がもつ蛋白-蛋白相互作用に重要な LxxLL モチーフに着目し、その AhR の活性制御機構への役割についてを解析した。

B. 研究方法

ヒト AhR のアミノ酸配列には 2ヶ所の LxxLL モチーフ (NR1; 50-54 アミノ酸、NR2; 224-228 アミノ酸) が存在する。AhR の全長 cDNA を発現ベクターに組み込み、site-directed mutagenesis により、モチーフ内の

Leu 残基を Ala に置換した種々の変異型 AhR を作製した。これを COS 細胞に遺伝子導入し、免疫染色により細胞内局在を検出した。また同時に AhR/ARNT の標的遺伝子である CYP1A1 の転写調節領域を luciferase cDNA の上流に連結したレポーター遺伝子を用いて、AhR の転写調節活性を野生型と変異型とで比較した。

AhR の HSP90 および ARA9 との結合にこのモチーフが関与するか否かを調べるため、His-AhR を高発現させた COS 細胞の溶解液を抗 His 抗体で免疫沈降し、沈降物中に含まれる HSP90 および ARA9 を western blotting で解析した。一方、モチーフの DNA 結合におよぼす影響を解析するため、in vitro で合成した AhR、ARNT を種々の条件下で組み合わせ、放射ラベルした XRE 配列への AhR/ARNT 複合体の結合活性を検討した。

C. 研究結果

1. 局在におよぼす影響

a) 免疫染色による解析

NR1 の変異型 AhR はリガンド非存在下

で核に局在する割合が増加した（野生型 3%、変異型 10-40%）。一方、NR2 の変異は野生型と比較して、差がみられなかった。野生型、変異型共にリガンド依存的な核移行が認められ、核分布の割合は 70-80%であった。

b) AhR と HSP90 および ARA9 との結合

NR1 の変異が、AhR の cytoplasmic anchor としての HSP90 または ARA9 との結合活性を低下させたことが上記の局在様式の変化に関わっている可能性を検証するため、免疫沈降法を用いて蛋白質相互作用を検出した。その結果、LxxLL モチーフの変異は AhR と HSP90 および ARA9 との結合に影響を与えない事が示された。

c) 核外移行に与える作用

a)で示された局在変化を引き起こした別の要因として、NR1 変異により AhR の核外移行が抑制された可能性が考えられた。この事を検証するため、AhR の NR1-NES を含む領域を GST-GFP 融合蛋白質に連結し、MDBK 細胞の核にマイクロインジェクションした。その結果、変異は核外移行活性に影響しないことが示された。

2. 転写調節能におよぼす影響

a) レポーター活性による解析

NR1 変異型 AhR の転写活性は野生型と比較して、有意に低かった。一方、NR2 変異型のそれは、野生型と差がみられなかった。

b) DNA 結合に与える作用

NR1 変異による転写活性の低下は、DNA 結合活性の低下に起因するものか否かを調べるため、*in vitro* で合成した AhR お

よび ARNT 蛋白質を用いてゲルシフトアッセイをおこなった。NR1 変異型 AhR の XRE 結合活性は、野生型より低下していた。

c) AhR/ ARNT 複合体形成に与える作用

XRE 結合の低下には、AhR/ ARNT 複合体形成の低下が伴うのか否かを調べるため、免疫沈降法を用いた解析をおこなった。NR1 変異型 AhR は野生型と比較して、ARNT との結合が低下している事が示された。

D. 考察

NR1 変異型 AhR はリガンド非存在下での核局在を増加させ、さらに標的遺伝子の転写活性を抑えることが示された。一方で NR2 の変異による野生型との差は認められなかった。このことから、AhR(50-54)に位置する LxxLL モチーフは、AhR の細胞内局在と転写調節能の双方の制御に関わっている事が示唆された。

1) LxxLL モチーフの細胞内局在調節における役割

核への局在が促進されたことの原因として 2つのことが考えられた。1つは核移行の促進、もう1つは核外移行の抑制である。前者を検証するために、AhR を細胞質に繫留することが知られている HSP90 と ARA9 について調べた。すなわち NR1 領域が HSP90 または ARA9 との結合に必要であるとの仮説をたてて解析した。しかしながら、この可能性は否定された。後者の可能性もまた、マイクロインジェクションの実験により否定された。これらより、NR1 は AhR が細胞質から核へ輸送されるいずれかの段階で機能することが考えられた。詳細なメカニズムは明らかでないが、既に調べられている glucocorticoid receptor の LxxLL モチーフ解析の結果との比較から、

AhR の NR1 は蛋白質の分子内相互作用に重要であり、その結果立体構造の維持に関わっている可能性が考えられた。NR1 変異は、AhR がリガンドと結合した時におこる構造変化と類似した変化を促し、これによりリガンド非存在下の核局在が増加したのかもしれない。

2) LxxLL モチーフの転写活性調節における役割

NR1 の変異は ARNT との複合体形成を低下させ、DNA 結合も低下させた。レポーター活性の低下はこのためと考えられる。しかしながら、この結果は LxxLL モチーフに特異的な性質の反映であると結論付ける事はできなかった。なぜなら、NR1 は AhR の bHLH 領域の一部であり、アミノ酸置換が bHLH の機能を妨げている可能性が否定出来ないからである。本研究では LxxLL モチーフと bHLH の両機能ドメインを分離して解析する事ができなかった。このことは今後の重要な課題である。観察された転写調節活性の低下は、アミノ酸置換により AhR の立体構造が不活型に変化した結果であろうと考えている。

E. 結論

AhR の LxxLL モチーフの機能を解析した。

(50-54) アミノ酸に位置するこのモチーフは AhR を細胞質に留めるために必要であり、さらに AhR/ARNT/XRE 複合体形成において重要な働きをしていることが示された。これらの結果は、AhR 蛋白質の立体構造の調節において LxxLL モチーフが大きく寄与している事を示唆した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ikuta, T., Watanabe, J., and Kawajiri, K. Characterization of the LxxLL motif in the aryl hydrocarbon receptor: Effects on subcellular localization and transcriptional activity. *J. Biochem.*, 131, 29-85 (2002)

2. 学会発表

1) 生田統悟、川尻 要. 表皮角化細胞における XRE を介した遺伝子発現調節の解析. 第 74 回日本生化学会大会 2001 年 (京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

厚生科学研究費補助金（生活安全総合事業）
分担研究報告書

ダイオキシンの毒性発現の作用機序に関する研究
(2) Dax-1 の Ad4BP(SF-1)依存的な核移行について

主任研究者 川尻 要 埼玉県立がんセンター（研究室）主幹

分担研究者 諸橋憲一郎 岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所 教授

研究要旨 ダイオキシンの複合的な生物機能への影響を解析するために、性分化関連因子でありステロイドホルモン合成を調節する SF-1 とその抑制作用を示す Dax-1 の細胞内での相互作用について検討した。その結果、Dax-1 は SF-1 と結合して SF-1 の NLS を利用して核に移行すること、SF-1 との結合には Dax-1 の 3 カ所に存在している NR box のうちで最も N 端に近い NR box 1 が関与すること、これらの複合体の核への移行には Dax-1 の C 端に存在している AF2 ドメインも重要であること、AF2 ドメインに変異のある先天性副腎低形成 (AHC) 患者の DAX-1 は SF-1 依存的な核移行活性が非常に低下していることが示された。従って、正常な DAX-1 の細胞内局在性が変異により乱されることにより遺伝性疾患 AHC の原因の一部になることが示唆された。

A. 研究目的

ダイオキシンの毒性は主に AhR とそのヘテロダイマーパートナーである AhR Nuclear Translocator (ARNT) の仲介により引き起こされるが、その中でも生殖機能への影響は最も憂慮されるべき問題である。生殖活動は視床下部-脳下垂体-性腺からなる内分泌系により支えられている。この内分泌系において中心的な役割を果たしている転写因子の機能と発現様式がダイオキシンにより影響されるかどうかについて時間的、空間的な側面より明らかにすることによりダイオキシンの毒性発現メカニズムを解明することを研究目的とする。本年度は特に、AhR と細胞内でクロスト

ークする可能性があり、性分化に関与する Ad4BP(SF-1)と Dax-1 との細胞内での相互作用を Dax-1 の核移行の視点より解析した。

DAX-1(Dax-1) は Xp21 の量依存的性分化異常 (XY female sex reversal) を引き起こす DSS 領域に存在し、その変異が先天性副腎低形成 (AHC) や下垂体性性腺低形成 (HHG) を引き起こす原因遺伝子として単離された。N 端側には Zinc フィンガードメインの代わりに 65-68 アミノ酸で構成される三回のくり返し構造を持ち、C 端側にはリガンド結合部位を持つ分子量約 53kDa の核内受容体である。また、Dax-1 はステロイドホルモン合成に関与するさまざまな P450s の転写因子であり、性