

厚生科学研究研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 川尻 要

平成15(2003)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) 細胞密度による AhR 細胞内局在の制御機構に関する研究 ----- 14

川尻 要

(2) SXR の細胞質・核間輸送の分子機構 ----- 19

川尻 要

厚生科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
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 シトクロム P450 及び UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) を発現している酵母を用いてダイオキシン類の代謝研究を進展させた。ダイオキシン受容体 (AhR) の機能解析を進展させ、NLS, NES のリン酸化により核内外への輸送が抑制されていることを明らかにした。また、細胞密度により、AhR の細胞内局在が制御されていることを明らかにした。同時に、AhR とは異なる薬物受容体 SXR の機能解析も進展させた。

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）、榊 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・榊）

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 種のチトクローム P450 を発現している酵母のマイクロソーム画分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、性分化に参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・榊)

2,3,7,8-TetraCDD に水酸化を施す酵素が P450 であることを示すことを目的とし、0~3 塩基置換体に対して最も高い活性を示したラット CYP1A1 に 1 アミノ酸置換を施し、活性を上げることを試みた。基質結合あるいは基質の導入に参与すると推測される箇所部位特異的変異導入を施したところ、24 種の変異体のうち、4 種の変異体において 2,3,7,8-TetraCDD の代謝が見られた。代謝物は 2,3,7,8-TetraCDD の塩素原子 1 つが水酸基に置換されたもの、すなわち、2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体であった。この結果は天然型の CYP1A1 にもわずかながら同活性があることを示唆しており、哺乳動物において 2,3,7,8-TetraCDD の水酸化を行う酵素は P450 であることを強く示唆している。ヒト肝ミクロソーム画分および UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 発現系を用いてダイオキシン類に対する抱合活性を調べた。その結果、DD の水酸化体および 2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体に対して複数の UGT 分子種が高い活性を示した。2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体を基質とした速度論的解析から、ヒト肝における主要な UGT 分子種である UGT1A1, 1A9, 2B7 は 2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体をきわめて良い基質にすることがわかった。昨年度実施したヒト由来 P450 によるダイオキシン類の代謝研究および今年度実施したヒト由来 UGT による代謝研究から、2,3,7,8-TetraCDD の毒性が高いのは P450 による反応がきわめて起こりにくい

であり、いったん水酸基が導入されると UGT によりグルクロン酸抱合が効率よく起こり、すみやかに体外に排泄されることが示唆された。

(II) ダイオキシンの毒性発現の作用機序の解析 (川尻・諸橋)

AhR の生理的機能についてはその生理的リガンドが不明なため現状では明確にされていない。AhR の細胞内分布がどのような生理的状态で変化し、その転写機能に影響を与えるかについてダイオキシンの標的組織であるケラチノサイト細胞 (HaCaT) を用いて解析した。その結果、(i) AhR は HaCaT の細胞密度により細胞内局在が変化すること、(ii) 細胞密度により AhR の転写活性は変化し、その局在性に依拠すること、(iii) AhR のリガンド依存的核移行は NLS のリン酸化により阻害されること、(iv) AhR の核外輸送活性は NES のリン酸化により阻害されることが明らかになった。現在、細胞密度の変化による AhR の分布の変化の分子機構について解析をすすめており、これらの研究の発展により、AhR の生理的機能の解明やダイオキシンの毒性発現の分子機構が明らかになることが期待される。

D. 考察

昨年度及び今年度実施したダイオキシン代謝の研究の結果より次のことが推測される。塩素置換数が 0~3 のダイオキシン類に対しては P450 による水酸基の導入、UGT によるグルクロン酸抱合がともに効率よく起こり、体外に排泄される。一方、最も毒性の高い 2,3,7,8-TetraCDD に対しては、P450 による反応がきわめて起こりにくいために排泄されないが、いったん水酸基が導入されると UGT によりグルクロン酸抱合が効率よく起こり、すみやかに体外に排泄される。ダイオキシン

類の代謝には P450、UGT といった、発現量にきわめて大きな個人差がある酵素が代謝するため、ダイオキシンに対する感受性にも大きな個人差が存在すると考えられ、来年度の課題にしたい。天然型の P450 を改変して 2,3,7,8-TCDD を代謝できる P450 を作製したという成果はきわめて新規性が高い。これを放線菌などの微生物で発現させ、ダイオキシン汚染土壌の浄化に用いたり、乳酸菌などで発現させて食品中のダイオキシンの分解に用いる、あるいはダイオキシンで汚染された患者の遺伝子治療に用いるなどの応用へ検討することは今後の課題である。

AhR は NLS, NES のリン酸化により核移行、核外輸送が抑制されることを明らかにした。同時に、細胞密度によってもその局在性が制御されていることを明らかにし、P38 MAPK システムによる NES のリン酸化と脱リン酸化が関与していることが示唆された。AhR と環境ストレス応答システムとの細胞内でのクロストークの存在が示唆されたことは非常に興味深い。ダイオキシンが存在しても AhR の NLS がリン酸化されると AhR は活性化されず、細胞質に留まることを明らかにしたことは臨床応用につながる可能性を示唆するものである。

E. 結論

昨年度に引き続きダイオキシンの代謝研究とその受容体である AhR についての機能解析の研究を進展させた。さまざまな CYP1A1 の変異体の解析により 2,3,7,8-TetraCDD の水酸化を行う酵素は CYP1A1 であることが強く示唆された。水酸化後のダイオキシン類の代謝について UGT の分子多様性の観点より研究を進めた。AhR は NLS, NES のリン酸化により核移行、核外輸送が抑制されることを明ら

かにした。また、細胞密度によってもその局在性が制御されていることを明らかにし、P38 MAPK システムによる NES のリン酸化と脱リン酸化が関与していることが示唆された。

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.*, 401, 91-98 (2002)
- 2) Inouye, K., Shinkyō, R., Takita, T., Ohta, M. and Sakaki, T. Metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) by human cytochrome P450-dependent monooxygenase systems. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5496-5502 (2002)
- 3) Shinkyō, R., Sakaki, T., Ohta, M., and Inouye, K. Metabolic pathways of dioxins by CYP1A1: Species difference between rat and human. *Arch. Biochem. Biophys.*, 409, 180-187 (2003)
- 4) Kawana, K., Ikuta, T., Kobayashi, Y., Gotoh, O., Takeda, K., and Kawaiiri, K. Molecular mechanism of nuclear translocation of an orphan nuclear receptor, SXR. *Mol. Pharmacol.*, 63, 524-531 (2003)
- 5) Kawaiiri, K., Ikuta, T., Suzuki, T., Kusaka, M., Muramatsu, M., Fujieda, K.,

- Tachibana, and M., Morohashi, K. Role of LXXLL-motif and AF2 domain in subcellular localization of Dax-1. *Mol. Endocrinol.*, 17, (2003) in press
2. 学会発表
- 1) Shinkyō, R., Sakaki, T., Ohta, M., and Inouye, K. Metabolism of dioxins by rat CYP1A1 and its mutants. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. July 22-26 (2002) Sapporo, Japan, P171
- 2) 新京 楽、榎 利之、太田美穂、井上國世. 部位特異的変異導入によるダイオキシン代謝酵素の創製. 第75回日本生化学会大会 2002年10月17日国立京都国際会館(京都) 生化学、第74巻、第8号 p10301)
- 3) Ikuta, T. and Kawajiri, K. Regulation of subcellular localization of aryl hydrocarbon receptor. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. July, 2002, Japan (Sapporo)
- 4) 生田統悟、川尻 要 : Aryl hydrocarbon receptor の局在調節におけるリン酸化の関与 第25回日本分子生物学会年会 2002年12月、横浜
- 5) Kawana, K., Ikuta, T., Takeda, K., and Kawajiri, K. Molecular mechanism of nuclear translocation of the nuclear orphan receptor SXR. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. July, 2002, Japan (Sapporo)
- 6) 川名克芳、生田統悟、小林康人、後藤 修、武田 健、川尻 要 : 核内受容体 SXR の細胞質・核間輸送の分子機構 第25回日本分子生物学会年会 2002年12月、横浜
- 7) 諸橋憲一郎、杉山紀之、鈴木大河、水崎博文、笠原 恵、吉岡秀文、Mohamad. Z., 生田統悟、川尻 要、福井由宇子 : 生殖腺・副腎皮質の形成を支える核内受容体の機能調節機構 第25回日本分子生物学会年会 2002年12月、横浜
- 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（食品・化学物質安全総合研究事業）
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 P450 及び UGT によるダイオキシン類の代謝研究を進展させた。塩素置換数が 0~3 のダイオキシン類に対しては P450 による水酸基の導入、UGT によるグルクロン酸抱合がともに効率よく起こり、体外に排泄される。一方、最も毒性の高い 2,3,7,8-TetraCDD に対しては、P450 による反応がきわめて起こりにくいため排泄されないが、いったん水酸基が導入されると UGT によりグルクロン酸抱合が効率よく起こり、すみやかに体外に排泄される。ダイオキシン類の代謝には P450、UGT といった、発現量にきわめて大きな個人差がある酵素が代謝するため、ダイオキシンに対する感受性にも大きな個人差が存在すると考えられる。

A. 研究目的

昨年度はヒト体内でダイオキシン類がどのように代謝され、排泄されるか予測するため、ヒト肝臓の主要なシトクロム P450 (P450) 12 種類による代謝を調べた。その結果、ダイオキシン類のうち 0~3 塩基置換体に対して、複数の P450 分子種が高い代謝能を示すことを示したが、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。しかし、これまでにラットやイヌを用いた動物実験で 2,3,7,8-TetraCDD の代謝物として水酸化物、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体が同定されている。グルクロン酸抱合、硫酸抱合は、水酸化体に対して起こるため、いずれの代謝物も初発段階は水酸化反応である。哺乳動物の体内で 2,3,7,8-TetraCDD を水酸化する酵素は P450 であることを前提として本研究を進めているが、現

段階では証拠は得られていない。今年度は、哺乳動物の中で最も代謝研究が進んでいるラットにおいて 2,3,7,8-TetraCDD に水酸化を施す酵素が P450 であることを示すことを目的とし、0~3 塩基置換体に対して最も高い活性を示した CYP1A1 に 1 アミノ酸置換を施し、活性を上げることを試みた。基質結合あるいは基質の導入に関与すると推測される箇所部位特異的変異導入を施して 24 種の 1 アミノ酸置換体を作製し、活性を測定したところ、4 種の変異体において 2,3,7,8-TetraCDD の代謝が見られた。代謝物を GC-MS により分析したところ、2,3,7,8-TetraCDD の一つの塩素原子が水酸基に置換されたものであることが分かり、ラットやイヌを用いた動物実験で見られる代謝物と同様であった。この事実は天然型の CYP1A1 にもわずかながら同活性があることを示唆しており、哺乳動物において

2,3,7,8-TetraCDD の水酸化を行う酵素は P450 であることを強く示唆している。また、本研究を進展させ、ヒト CYP1A1 においても高い 2,3,7,8-TetraCDD 代謝能を有する変異体が得られれば、ダイオキシン中毒患者の治療（遺伝子に応用できる可能性がある）。

本年度のもうひとつの研究目的は、ヒト体内でダイオキシンが P450 により水酸化された後の抱合反応を調べることであり、抱合反応の中で最も重要であると考えられるグルクロン酸抱合を調べた。この反応を司る UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）においても P450 と同様、分子多様性があり、しかも、発現量は個人差が大きいことが知られている。ヒト体内でダイオキシンを代謝する主要な UGT 分子種の同定、代謝能力の個人差を予測することを目的とし、ヒト肝ミクロソーム画分および単一のグルクロン UGT 分子種を発現する昆虫細胞-バキュロウイルス発現系を用いて代謝実験を行った。

B. 研究方法

(1)材料

a) ダイオキシン類

i. 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.）

ii. 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.）

（和光純薬工業株式会社 Lot.CKL9486）

iii. 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）

iv. 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）

v. 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）

vi. 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）

vi. 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

i. 昆虫細胞-バキュロウイルス発現系

単一の UGT 分子種（以下の 9 種）を発現する昆虫細胞から調製したミクロソームを第一化学薬品から購入した。

ヒト由来 UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A8, 1A8, 1A10, 2B7, 2B15 およびコントロール

ii. ヒト肝ミクロソーム

第一化学薬品からロット番号 HK23 および HG89 を購入した。

(2)方法

a) 変異型 CYP1A1 の作製

部位特異的変異導入キット QuikChange (Amersham)を用いて、各変異体 cDNA を作

製し、酵母内発現ベクターpGYR のクローニング部位に導入し、変異体発現プラスミドを構築し、これを *S. cerevisiae* AH22 株に導入した。

b) ダイオキシン代謝活性測定

50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) に各変異型 CYP1A1 を発現する酵母菌体から調製したマイクロソーム画分および基質のダイオキシン溶液を添加し、NADPH を加えて、反応を開始させた。反応停止後、クロロホルム/メタノール=3/1 溶液により基質および代謝産物を回収し、HPLC で分析した。

HPLC (日立 L-7000) の分析条件は以下のとおりである。

カラム, YMC-ODS (4.6 mm×300 mm) ; 検出波長, 227nm; 検出温度, 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%アセトニトリル直線濃度勾配 (5-20 分)、100%アセトニトリル (20-30 分)

c) ガスクロマトグラフィー-質量分析計(GC-MS)によるダイオキシン代謝物の分析

ダイオキシンの代謝物およ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) の分析条件は以下のとおりである。

カラム, Cp-Sil 24CB-MS (Chrompack) (0.32 mm×30 m) ; カラム温度, 100°Cで1分、20°C/分の割合で 200°Cまで昇温、200°Cで2分、20°C/分の割合で 300°Cまで昇温、300°Cで3分;イオン化法, EI法

d) Ah レセプターアッセイ

ベクターpGV-P (東洋インク) の SV40 プロモーター領域を XRE 配列を 5 回繰り返した配列に置き換え、その下流にグルタチオン S-トランスフェラーゼ Ya サブユニット遺伝子の -164 から+53 までの配列を連結し、さらにルシフェラーゼ cDNA を連結した。得られたプラスミドをマウス Hepa-1c1c7 細胞に導入し、安定形質転換株を得た。ダイオキシンあるいはその代謝物を培地に添加し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

e) P450 および各種 UGT によるダイオキシンの代謝

1 mM MgCl₂ を含む 100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) に各種 UGT を含むマイクロソーム画分(タンパク質濃度 0.5mg/ml)を添加し、さらに、ラット CYP1A1 発現酵母菌体から調製したマイクロソーム画分および基質のダイオキシン溶液を添加し、UDP-グルクロン酸, 2 mM; DD, 100 μM (2,3,7-TricDD の場合は 10 μM); を添加し、最後に NADPH を加えて、反応を開始させた。ヒト肝マイクロソームの場合も同様であるが、ラット CYP1A1 発現酵母菌体から調製したマイクロソーム画分は添加しなかった。反応停止後、クロロホルム/メタノール=3/1 溶液により基質および代謝産物を回収し、HPLC で分析した。水酸化体は有機層に、グルクロン酸抱合体は水層に局在した。有機層は乾固した後、アセトニトリルに溶解し、HPLC 分析した。また、水層は等量のアセトニトリルを添加し、遠心分離後の上清を

HPLC 分析した。

HPLC (日立 L-7000) の分析条件は以下のとおりである。

カラム, YMC-ODS (4.6 mm×300 mm) ; 検出波長, 227nm; 検出温度, 40 °C;

流速, 1ml/min; 溶出条件, 10 %アセトニトリル水溶液 (0-5 分)、10~50 %アセトニトリル直線濃度勾配 (5-30 分)、50~100 %アセトニトリル直線濃度勾配 (30-40 分) ,100 %アセトニトリル (40-50 分)

f) β-グルクロニダーゼ処理による代謝物の分析

DD あるいは 2,3,7-TriCDD のグルクロン酸抱合体と推測される代謝物を HPLC により回収し、20 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)中でβ-グルクロニダーゼと 37°Cで 60 分間反応させ (酵素濃度 : 0.11 mg/ml)、HPLC で分析した。

g) 2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体を基質としたグルクロン酸抱合活性の測定

1 mM MgCl₂ を含む 100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) に UGT1A1,1A9 あるいは 2B7 を含むミクロソーム画分(タンパク質濃度 0.5mg/ml)および 2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体(終濃度 0-7 μM)を添加し、さらに UDP-グルクロン酸 (終濃度 2 mM) を添加して、反応を開始させた。反応停止後、クロロホルム/メタノール=3/1 溶液により基質および代謝産物を回収し、(4)と同様にして有機層および水層をそれぞれ HPLC 分析した。

C. 研究結果

(1) ラット CYP1A1 変異体の 2,3,7,8-TetraCDD 代謝能

天然型 CYP1A1 は 2,3,7-TriCDD に対しては高い活性を示すことから、2,3,7-TriCDD 2,3,7 よりも 1 塩素原子分大きな 2,3,7,8-TetraCDD に対する代謝能を賦与するためには基質導入部位および結合部位の空間を大きくすることが有効であると推測し、CYP1A1 の I-ヘリックス、F-ヘリックス、G-ヘリックス、F-G ループに存在する分子量の大きなアミノ酸をアラニンに置換した。作製した変異体は以下の 24 種である。

Y114A, F116A, F127A, F228A, Y236A, P237A, F240A, I241A, P242A, I243A, L244A, Y246A, F255A, F262A, I314A, F316A, F319A, F323A, I326A, L337A, F385A, F388A, I390A, Y498A

0~4 の塩素置換数のダイオキシン類に対する活性を測定したところ、多くの変異体において基質特異性および反応特異性が天然型 CYP1A1 と異なることがわかった。また、F228A F240A、F385A および F319A の 4 種について 2,3,7,8-TetraCDD 代謝能が見られた。代謝物は塩素原子 1 つが水酸基に置換したもので、代謝回転数はそれぞれ 0.008, 0.020, 0.007, 0.011 (mol/min/mol P450) であった。これらのアミノ酸残基の位置は Phe228---F-ヘリックス中、基質結合に関与していると推測される領域 (SRS-2) 内に存在。

Phe240---基質の取り込みに関与していると推測される F-G ループ内に存在。

Phe319---I-ヘリックス中、基質結合に関与していると推測される領域 (SRS-4) に存在。

Phe385---基質結合に関与していると推測される領域 (SRS-5) に存在。

これら4種の中で、最大活性を示したF240Aについて、アラニン以外のアミノ酸に置換した変異体 F240G, F240S, F240V, F240L, F240I を作製し、2,3,7,8-TetraCDD 代謝能を調べたところ、F240S において 0.011 (mol/min/mol P450) の活性が見られ、他の変異体については活性が見られなかった。これらの結果は、基質結合部位あるいは基質の取り込みに関与する領域の空間を大きくして 2,3,7,8-TetraCDD 代謝能を有する変異体を取得するという方針が妥当であったことを示唆している。F240G では 2,3,7,8-TetraCDD 代謝能が見られなかったが、グリシンへの置換は空間を大きくする一方、構造および運動性に影響を及ぼしたと推測している。

(2) 変異体 F240A による 2,3,7,8-TetraCDD 代謝物の分析

HPLC 分析において、2,3,7,8-TetraCDD 代謝物の溶出位置は 2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体と同じであった。HPLC により回収した代謝物を GC-MS により分析したところ、親イオンピークは $m/z=302$ であり、2,3,7,8-TetraCDD の親イオンピークである $m/z=320$ と比べて 18 小さく、昨年度報告した 2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体のマススペクトルとほぼ完全に一致した。反応機構としては変異体 F240A により 8,9-エポキシドが形成され、NIH シフトが起こる際に塩素原子が脱離した

と考えられる。

(3) 代謝物の Ah レセプター結合能

ルシフェラーゼ活性を指標とした Ah レセプターアッセイの結果から、F240A による 2,3,7,8-TetraCDD 代謝物、2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体には誘導能 (Ah レセプター結合能) が認められず、毒性は 2,3,7,8-TetraCDD の 0.001% 以下であることが示唆された。

(4) UGT による DD および 2,3,7-TriCDD の代謝

a) ヒト肝ミクロソームによる代謝

DD あるいは 2,3,7-TriCDD の代謝物を HPLC で分析したところ、UK23 および UG89 ともに有機層からはそれぞれの水酸化物、水層からはグルクロン酸抱合体と推測される代謝物が見られた。ヒト肝ミクロソームは複数の P450 分子種を含む。昨年度報告したように、多くの P450 分子種が DD の水酸化を触媒するため、ミクロソーム UK23 および UG89 に存在する複数の P450 分子種 DD を水酸化したと考えられる。一方、2,3,7-TriCDD の水酸化については昨年度報告したように、CYP1 ファミリーに属する P450 が 2,3,7-TriCDD を代謝するが、通常、ヒト肝における CYP1A1 および CYP1B1 の発現量はきわめて低く、UK23 および UG89 においては発現量の多い CYP1A2 が主要分子種であると考えられる。UK23 および UG89 における各 UGT 分子種の含量は不明である。

b) 昆虫細胞で発現した UGT による代謝

i. β -グルクロニダーゼによる代謝物の分析

DD あるいは 2,3,7-TriCDD のグルクロン酸抱合体と推測される代謝物を HPLC により回収し、 β -グルクロニダーゼ処理後、HPLC で代謝物を分析したところ、ほぼ 100%水酸化体に変換したことが分かった。したがって、水層に検出された代謝物はグルクロン酸抱合体であると考えられる。

ii. DD の代謝

UGT1A1, 1A9, 1A10, 2B15 においてヒト肝ミクロソームと同様の代謝が見られ、水層にグルクロン酸抱合体と推測される代謝物が検出されたが、1A3, 1A4, 1A6, 1A8 においては活性が見られなかった。UGT1A サブファミリーの共通抗原に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングにより 1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A8, 1A9 および 1A10 の発現量を見積もったところ、1.0:0.6:0.8:0.7:0.6:0.6:0.7 であった。UGT 分子当たりの活性は 1A9 が最も高く、次いで 1A1, 1A10 の順になる。

iii. 2,3,7-TriCDD の代謝

UGT1A1, 1A3, 1A8, 1A9, 1A10, 2B7, 2B15 においてヒト肝ミクロソームと同様の代謝が見られ、水層にグルクロン酸抱合体と推測される代謝物が検出されたが、1A4 および 1A6 においては活性が見られなかった。特に活性が高かった UGT1A1, 1A9 および 2B7 において基質 2,3,7-TriCDD8 位水酸化体の濃度を 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 μM と変化させて活性を測定し、 K_m および V_{max} を算出したところ、UGT1A1 については 0.83 μM 、2.97(nmol/min/mg protein)、UGT1A9 については 0.83 μM 、1.78(nmol/min/mg

protein)、UGT2B7 については 3.88 μM 、4.22(nmol/min/mg protein)であった。前述のように UGT1A1 と 1A9 の発現量の比は 1:0.6 であることから、UGT1A1 と 1A9 における分子当たりの V_{max} 値、すなわち k_{cat} 値は、ほぼ等しいと考えられる。

D. 考察

ラットやイヌを用いた動物実験においてダイオキシン類の代謝物として水酸化物、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体が同定されている。最も毒性の高い 2,3,7,8-TetraCDD においても、その代謝速度は遅いものの、同様の代謝物が得られている。したがって、ダイオキシン類はまずシトクロム P450 によって水酸化されたあと、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) によるグルクロン酸抱合、あるいはスルホトランスフェラーゼによる硫酸抱合を受け、体外へ排泄される、と推測される。しかし、昨年度報告したように 12 種類のヒト由来 P450 および 2 種類のラット P450 はいずれも 0~3 塩素置換ダイオキシン類に対しては高い活性を示すものの、2,3,7,8-TetraCDD に対する活性は検出できなかった。これまでに、P450 が 2,3,7,8-TetraCDD を代謝することを明確に示した報告は皆無である。そこで、今年度は、哺乳動物の中で最も代謝研究が進んでいるラットにおいて 2,3,7,8-TetraCDD を代謝する酵素が P450 であることを示すことを目的とし、ラット CYP1A1 に 1 アミノ酸置換を施し、活性を上げることを試みた。ラット CYP1A1 の立体構造は明らかにされていないが、これまでに立体構造が明らかになった 7 種の微生物由来水溶性 P450 お

よびウサギ由来ミクロソーム型 CYP2C5 の構造はいずれもよく似ており、これらの立体構造を元にラット CYP1A1 の立体構造を推測し、基質結合部位および基質取り込み部位を推定した。基質結合あるいは基質の導入に関与すると推測される箇所に部位特異的変異導入を施して 24 種の 1 アミノ酸置換体を作製し、活性を測定したところ、4 種の変異体 F228A、F240A、F319A および F385A において 2,3,7,8-TetraCDD 代謝能を検出することができた。これらのアミノ酸残基の位置はお互いにかかなり離れており、これらの変異体が 2,3,7,8-TetraCDD に対する代謝能を有する理由を明確に示すことはできない。しかし、F240 をアラニン以外のアミノ酸に置換した変異体の結果から、基質結合部位あるいは基質の取り込みに関与する領域の空間を大きくして 2,3,7,8-TetraCDD 代謝能を有する変異体を取得するという方針は妥当であったと推測される。得られた代謝物は 2,3,7,8-TetraCDD の 1 つの塩素原子が水酸基に置換されたものであることが分かり、ラットやイヌを用いた動物実験で見られる代謝物と同様であった。この事実は天然型の CYP1A1 にもわずかながら同活性があることを示唆しており、哺乳動物において 2,3,7,8-TetraCDD の水酸化を行う酵素は P450 であることを強く示唆している。Ah レセプターアッセイの結果、代謝物 2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体の毒性は 2,3,7,8-TetraCDD の 0.001% 以下であり、この反応が 2,3,7,8-TetraCDD の解毒にきわめて重要な反応であることがわかった。これまでに動物実験や微生物による 2,3,7,8-

TetraCDD の代謝分解が報告されているが、酵素レベルで 2,3,7,8-TetraCDD 代謝活性が明らかにされた例はなく、F228A、F240A、F319A および F385A が最初の例だと思われる。今回得られた F240A の活性は 0.02 (mol/mol/P450) と一見低いものであるが、 K_m を 1.0 μ M、 k_{cat} を 0.02 (mol/mol/P450) とし、ヒト肝臓(約 1 kg)の総 P450 の 0.1% (10 nmol 程度) が F240A であった場合を想定すると、10- μ g の 2,3,7,8-TetraCDD が肝臓に取り込まれたとして、 $-d[S]/dt = k_{cat}[E][S]/K_m$ に基づいて計算すると、半減期は 58 時間、すなわち 3 日以内に 5 μ g の 2,3,7,8-TetraCDD が代謝されることになる。WHO による 2,3,7,8-TetraCDD 許容摂取量が 1-4 μ g/kg weight/day であることを考えると、 μ g というオーダーは膨大なものである。したがって、本研究を発展させ、ヒト CYP1A1 についても 2,3,7,8-TetraCDD 代謝能を有する変異体が得られれば、ダイオキシン中毒患者の遺伝子治療等に応用できる可能性がある。

本年度のもう一つの課題である UGT によるダイオキシン類の代謝については、動物実験等により得られている知見はきわめて少なく、ヒト UGT による代謝研究としては初めての例であると思われる。前述のように 2,3,7,8-TetraCDD の塩素原子が水酸基に置換されると Ah レセプターへの結合能は激減するものの、水酸基が導入されることにより、エストロゲンレセプターへの結合能は飛躍的に高くなり、内分泌攪乱物質として作用する可能性がある。また、水酸化体の脂溶性は依然として高く、排泄は困難である。一方、グ

ルクロン酸抱合体に変換されることにより、極性は飛躍的に高くなり、排泄は容易になる。したがって、UGT による代謝はダイオキシン類の代謝、排泄において重要な役割を果たすと考えられる。今年度は主にバキュロウイルス発現系を用いて、9 種のヒト由来 UGT の代謝能を調べた。DD の水酸化体および 2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体に対して複数の UGT 分子種が高い活性を示した。特に、2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体は、2,3,7,8-TetraCDD の主代謝物と考えられるため、重要な反応である。2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体を基質とした速度論的解析から、UGT1A1,1A9, 2B7 は 2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体をきわめて良い基質にすることがわかった。これらの UGT はヒト肝における主要な UGT 分子種であり、市販のヒト肝ミクロソームにおいて見られた活性もこれらの UGT によると推測される。昨年度実施したヒト由来 P450 によるダイオキシン類の代謝研究および今年度実施したヒト由来 UGT による代謝研究から、次のことが推測される。塩素置換数が 0~3 のダイオキシン類に対しては P450 による水酸基の導入、UGT によるグルクロン酸抱合がともに効率よく起こり、体外に排泄される。一方、最も毒性の高い 2,3,7,8-TetraCDD に対しては、P450 による反応がきわめて起こりにくいため排泄されないが、いったん水酸基が導入されると UGT によりグルクロン酸抱合が効率よく起こり、すみやかに体外に排泄される。ダイオキシン類の代謝には P450、UGT といった、発現量にきわめて大きな個人差がある酵素が代謝するため、ダイオキシンに対する

感受性にも大きな個人差が存在すると考えられ、来年度の課題にしたい。

E. 結論

2,3,7,8-TetraCDD に水酸化を施す酵素が P450 であることを示すことを目的とし、0~3 塩基置換体に対して最も高い活性を示したラット CYP1A1 に 1 アミノ酸置換を施し、活性を上げることを試みた。基質結合あるいは基質の導入に関与すると推測される箇所部位特異的変異導入を施したところ、24 種の変異体のうち、4 種の変異体において 2,3,7,8-TetraCDD の代謝が見られた。代謝物は 2,3,7,8-TetraCDD の塩素原子 1 つが水酸基に置換されたもの、すなわち、2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体であった。この結果は天然型の CYP1A1 にもわずかながら同活性があることを示唆しており、哺乳動物において 2,3,7,8-TetraCDD の水酸化を行う酵素は P450 であることを強く示唆している。ヒト肝ミクロソーム画分および UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 発現系を用いてダイオキシン類に対する抱合活性を調べた。その結果、DD の水酸化体および 2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体に対して複数の UGT 分子種が高い活性を示した。2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体を基質とした速度論的解析から、ヒト肝における主要な UGT 分子種である UGT1A1,1A9, 2B7 は 2,3,7-TriCDD 8 位水酸化体をきわめて良い基質にすることがわかった。昨年度実施したヒト由来 P450 によるダイオキシン類の代謝研究および今年度実施したヒト由来 UGT による代謝研究から、2,3,7,8-TetraCDD の毒性が高いのは P450 による反応がきわめて起こりにくいためであり、いったん水酸基が導入されると UGT によりグルクロン酸抱合が効率よく起こり、すみやかに体外に排泄されることが示唆され

た。

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.*, 401, 91-98 (2002)

- 2) Metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) by human cytochrome P450-dependent monooxygenase systems. Inouye, K., Shinkyō, R., Takita, T., Ohta, M. and Sakaki, T. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5496-5502 (2002)

- 3) Metabolic pathways of dioxins by CYP1A1: Species difference between rat and human. Shinkyō, R., Sakaki, T., Ohta, M., and Inouye, K. *Arch. Biochem. Biophys.*, 409, 180-187 (2003)

2. 学会発表

- 1) Shinkyō, R., Sakaki, T., Ohta, M., and Inouye, K. Metabolism of dioxins by rat CYP1A1 and its mutants. 14th

International Symposium on
Microsomes and Drug Oxidations.

July 22-26 (2002) Sapporo, Japan, P171

- 2) 新京 楽、榑 利之、太田美穂、井上國世、
部位特異的変異導入によるダイオキシン代
謝酵素の創製. 第 75 回日本生化学会大会
2002 年 10 月 17 日国立京都国際会館 (京
都) 生化学、第 74 巻、第 8 号 p1030

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（食品・化学物質安全総合研究事業）
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) 細胞密度による AhR 細胞内局在の制御機構に関する研究

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 AhR はリガンド依存的な転写因子であり、ダイオキシンや芳香族炭化水素の薬物受容体として細胞内でシグナル伝達経路を構成している。AhR は NLS 及び NES を持つシャトル蛋白であるが、NLS, 及び NES のリン酸化によりその輸送がそれぞれ抑制されることを明らかにした。AhR の細胞内局在は細胞密度により調節されており、その分布により転写活性も制御される。細胞密度による AhR の細胞内局在は NES のリン酸化及びその脱リン酸化により調節されていることが示唆された。

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 の細胞内分布の調節機構を細胞機能と関連づけて明らかにすることを研究の目的とする。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。またその際 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。

B. 研究方法

ヒトケラチノサイト由来の HaCaT 細胞を用いて細胞密度と AhR の細胞内局在との関連性を免疫染色により検討した。様々な薬物 (LMB, MC, SB203580, Okadaic acid など) による密度と分布との関係への影響を調べ、その分子機構を類推した。同時に細胞分画と Western blot の組み合わせでの AhR の分布様式も検討した。分布の変化と AhR の転写活性との関係についても XRE (Xenobiotic Responsive Element) と Luciferase または Green fluorescent protein の融合遺伝子を組み込ませた HaCaT 細胞を単離してその関連性を明らかにした。

一方、核・細胞質間をシャトルする蛋白質の細胞内分布は NLS 及び NES 近傍のリン酸化・脱リン酸化により制御されていることが知られている。AhR の NLS, NES 近傍のリン酸化部位に注目し、変異導入をすることにより細胞内の局在変化への影響を調べた。His-tag AhR の発現、microinjection, in vitro

nuclear transport, などでリン酸化と細胞内分布との関係を明らかにした。密度による AhR の局在変化の分子機構についてのモデルを提起した。

C. 研究結果

(1) AhR は HaCaT の細胞密度により細胞内局在が変化する

HaCaT 細胞で AhR/ARNT が発現していることは知られている。細胞密度と AhR の局在との関連性を免疫組織化学的に検討したところ、密度が sparse では核、subconfluent では核と細胞質に、confluent な状態では主に細胞質に AhR の分布が確認され、細胞分画と western blotting によっても同様な結果が得られた。密度依存的な AhR の分布は、Ca²⁺濃度を減少させて細胞間接着を低下させると変化することからも裏付けられ、また、この現象は cell cycle には依存しないことを明らかにした。さらに核外輸送の選択的阻害剤である leptomycin B(LMB) を存在させることにより AhR の分布は細胞密度に関係なく核に蓄積することが見い出されたので、密度による AhR 分布の変化は高密度により AhR の核外輸送が促進された結果であると考えられる。

(2) 細胞密度により AhR の転写活性は変化する

細胞密度による AhR 局在の変化と転写活性との関連について検討するために、AhR のシスエレメントである xenobiotic responsive element (XRE) と luciferase を融合させた reporter plasmid を組み込ませた transfectant を HaCaT から単離した。培養時間を変えることにより、細胞密度と luciferase 活性との関係を調べたところ、細胞

密度が比較的低いところで転写活性が高く、密度が高いところでは luciferase 活性は非常に低いことが示された。この密度による活性の変化は AhR の分布様式の変化に見合うものであることが示唆された。また、密度による AhR/ARNT の発現レベルは変化しないことにより転写活性の変化は AhR の密度による局在の変化に起因すると考えられる。さらに密度による転写活性の変化を視覚化することにより観察するために、XRE と GFP (green fluorescent protein) を融合させた reporter plasmid を含む transfectant を HaCaT 細胞から単離した。この細胞は密度が低い時のみ GFP を発現させる。細胞を superconfluent な monolayer の状態に保ち(GFP 発現なし)、その一部を剥がした *in vitro* wound healing model を利用して、GFP の reactivation を経時的に観察した。その結果、傷口にそって細胞間接着がゆるい領域でのみ GFP の発現が観察された。以上の結果は細胞密度が低い状態で XRE に依存する転写活性が活発であることを示しており、AhR の密度による局在の relocalization に見合うものであった。

(3) AhR の核移行へのリン酸化の影響

細胞質・核間をシャトルする蛋白の細胞内分布はリン酸化などの分子内修飾により調節されることが知られている。AhR の核移行シグナル (NLS) は AhR(13-39)で構成されているが、この領域には S12, T22, S36 の 3 箇所 PKC のリン酸化部位が存在する。*In vitro* phosphorylation assay の結果、S36 が主にリン酸化されることが明らかになった。また、His-Tag を融合させた野生型 AhR 及び変異型 AhR を COS 細胞に発現させ、リガンド依存的核移行を検討したところ、S12, S36 を

negative charge をもつアスパラギン酸 (D) に置換し、リン酸化状態に類似させた変異体はリガンドである MC が存在しても核移行は見られなかった。一方、アラニン (A) 置換体はリガンド依存的な移行が観察された。GFP との融合蛋白の精製標品を細胞質に直接 microinjection して核移行活性をしらべたところ S12D, S36D では核移行活性が消失していた。核移行活性の消失は NLS 受容体との結合低下による核膜孔への targeting が失われることに依拠するものであることを *in vitro* nuclear transport assay で確認した。従って、ダイオキシンや MC などのリガンドが存在しても AhR の NLS 領域がリン酸化されていると核への輸送が阻害されることが明らかになった。

(4) AhR の核外輸送へのリン酸化の影響

AhR(55-75)には核外輸送活性があり、特異的な疎水性アミノ酸で構成される核外移行シグナル (NES) が存在する。S68, S73 はリン酸化が可能であるので野生型、及び変異型の GFP 融合蛋白精製品を細胞の核に microinjection して核外輸送活性を検討した。その結果、S73D は活性が保持されているが S68D は消失していることが明らかになった。S68 は、p38MAPK システムでリン酸化されることが知られている ER α や p53 の NES 内のリン酸化部位と見合うことが確認された。細胞は細胞内外の環境ストレスに反応して増殖、分化、アポトーシスなどの表現型を示すが、それは主にストレス応答シグナル系と呼ばれる p38MAPK を介してなされている。現在、MC で p38 が活性化 (リン酸化) され、AhR の S68 をリン酸化するかどうかを検討中である。また、細胞密度の変化による AhR の分布の変化が

p38MAPK によるリン酸化、およびその脱リン酸化により調節されているかに研究の焦点をあてている。これらの研究の発展により、AhR の生理的機能の解明やダイオキシンの毒性発現の分子機構が明らかになることが期待される。

D. 考察

細胞質・核間をシャトルする蛋白質は NLS, NES のリン酸化、脱リン酸化により細胞内の局在が規定されている。AhR の NLS はアミノ酸 13-39 領域に存在するが、双節型 NLS を構成する塩基性アミノ酸クラスターの直前の S12, S36 は共に PKC によるリン酸化認識部位であることが確認された。細胞内でのリン酸化を模倣するためにこれらのアミノ酸をアスパラギン酸に置換するとリガンド依存的な AhR の核移行は消失した。この結果はマイクロインジェクションや *in vitro* nuclear transport assay によっても確認され、NLS と importin α との相互作用が negative charge が増加することにより低下し、nuclear pore に targeting できなくなることに起因すると考えられた。

一方、AhR はそのシスエレメントである XRE との結合において PKC によるリン酸化がその後の CYP1A1 などの転写誘導に必要であることが以前より報告されている。NLS は DNA 結合領域と重複するので S36 がリガンド依存的に核に移行した後にリン酸化を受ける可能性について検討した。S36 の特異的リン酸化抗体を作製しリガンドである MC を投与したマウスの凍結肝切片を免疫染色したところ未処理マウス肝と比較したところ明白な核内での染色が確認された。従って、AhR は NLS が脱リン酸化された状態でダイオキシンなどのリガンドと結合して核に移行し、核内で PKC

によるリン酸化を受けることにより AhR/ARNT/XRE との複合体形成が安定化されて転写が促進されることが示唆された。

核内局在の促進は NES 活性の抑制によってもなされることがいくつかの転写因子で報告されている。環境応答遺伝子産物である ER や p53 はホルモンや UV などの刺激に応じてストレス応答 p38 MAPK システムの作用により NES がリン酸化され、核外輸送の停止による核への蓄積がもたらされ転写調節へ影響を与えることが最近報告されている。化学物質への細胞の暴露も一種のストレスであるので AhR の NES を ER や p53 と比較すると S68 が構造的には一致することが確認された。そこでアスパラギン酸置換をした NES 変異体を核内にマイクロインジェクションすると核外輸送活性が阻害されることが示された。

AhR はその NLS, NES のリン酸化により核内輸送、核外輸送が共に negative に調節されていることが明らかになった。このような調節がどのような状況で反映され生理的に意味を持つかを明らかにすることはダイオキシンの毒性発現機構を知る上でも重要と考えられた。ダイオキシンの標的組織の一つであるケラチノサイト由来の HaCaT 細胞を用いて検討したところ、その細胞密度により内在性の AhR の分布状態が変化することが見いだされた。すなわち、細胞密度が低いときには主に核内に、一方、密度が高いときには AhR は細胞質に局在していることが細胞染色や Western blot により観察された。LMB 暴露により密度に無関係に AhR は核内に蓄積することが観察されたことにより密度による AhR の局在変化は核外輸送の調節の変化に由来されることが考えられた。

既に記載したように AhR の NES のリン酸

化は核外輸送を阻害する。密度による局在変化が NES のリン酸化やその脱リン酸化と関連するかどうかについて詳細に検討することが重要であろう。現在までのところ、p38 MAPK のインヒビターである SB203580 の添加により AhR はより細胞質に、また phosphatase インヒビターであるオカダ酸により AhR は核にその局在がシフトする現象が観察されている。従って、細胞密度による AhR の局在の制御には p38 MAPK システムによる NES のリン酸化、脱リン酸化が関与している可能性が強いと考えられる。

E. 結論

AhR は NLS, NES のリン酸化により核移行、核外輸送が抑制されることを明らかにした。また、細胞密度によってもその局在性が制御されていることを明らかにし、P38 MAPK システムによる NES のリン酸化と脱リン酸化が関与していることが示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ikuta, T., Kobayashi, T., and Kawaiiri, K.
Cell density and p38 MAPK-mediated phosphorylation regulate subcellular localization of aryl hydrocarbon receptor. (Submitted)

2. 学会発表

1) Ikuta, T. and Kawaiiri, K.
Regulation of subcellular localization of aryl hydrocarbon receptor.

14th International Symposium on
Microsomes and Drug Oxidations.

July, 2002, Japan (Sapporo)

2) 生田統悟、川尻 要

Aryl hydrocarbon receptor の局在調節に
おけるリン酸化の関与 第25回日本分子
生物学会年会 2002年12月、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし