

20031307

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 川尻 要

平成16(2004)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 ----- 7

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 ----- 14

川尻 要

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 19

厚生科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
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 昨年度に引き続きシトクロム 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証明した。また、細胞密度により、AhR の細胞内局在が制御される分子機構を明らかにし、そのモデルを提示した。AhR の生理的機能、及び毒性発現の解明につなが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）、榊 利之（京都大学大学院農学研究科・助教授）

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・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 種のシトクロム P450 を発現している酵母のミ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。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 の生理機能や核内受容体との相互作用についても検討する。

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)

(1) 新たなヒト由来 P450 分子種によるダイオキシンの代謝

昨年度までに 12 種のヒト由来 P450 のダイオキシン代謝能を調べた。今年度は CYP1B1、CYP2S1 (2,3,7,8-TCDD により遺伝子発現が誘導される)、CYP2F1 (肺特異的に発現)、CYP2J2 (長鎖脂肪酸の代謝に関わる)、CYP2R1 (ビタミン D₃ 25 位水酸化活性を示す) の酵母内発現に成功し、それぞれの P450 分子種によるダイオキシン代謝能を調べた。CYP1B1 については昆虫細胞-バキュロウイルス発現系での結果と同様、塩素置換数 0-3 のダイオキシン類に対して高い活性を示したが、最も毒性の高い 2,3,7,8-TCDD に対しては代謝能を示さなかった。CYP2S1 はすべてのダイオキシン類に対して活性は検出されなかった。CYP2F1、CYP2J2、CYP2R1 についても同様に、ダイオキシン類に対する活性は検出されなかった。

(2) ヒト肝ミクロソームを用いたダイオキシン類の代謝

i. P450 によるダイオキシンの代謝

BD サイエンス社から購入したヒト肝ミクロソーム 10 種 (それぞれ一人の肝臓から調製) を用いて塩素置換数 3 の 2,3,7-TricDD の代謝を調べた。その結果、いずれのサンプルにおいても代謝物として 8 位水酸化体、8-OH-2,3,7-TricDD が検出された。しかし、その活性にはかなりの差が認められ、最も活性が高いサンプルと最も活性の低いサンプルには 15 倍程度の差が認められた。

ii. UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) によるダイオキシンの代謝

昨年度、昆虫細胞あるいは酵母で発現させた

各 UGT 分子種の酵素学的性質を調べたところ、UGT1A1, 1A9, 2B7 において高い活性が見られ、1A3, 1A6, 1A8, 1A10, 2B15 においても活性が認められ、8-OH-2,3,7-TricDD はこれら UGT の良い基質になることがわかった。昨年度のラット CYP1A1 変異体の解析結果から、P450 による 2,3,7,8-TCDD 代謝物は 8-OH-2,3,7-TricDD であることが示唆された。したがって、2,3,7,8-TCDD がヒト体内で代謝され、8-OH-2,3,7-TricDD が生じた場合、複数の UGT によって効率良くグルクロン酸抱合が起こると考えられる。

(II) ダイオキシンの毒性発現の作用機序の解析 (川尻・諸橋)

(1) AhR のシグナル伝達の調節についてのモデルの完成

i. AhR のリガンド依存的核移行のリン酸化による調節

AhR のリガンド依存的核移行は双節型 NLS (核移行シグナル) に隣接する 2 箇所 (Ser12, Ser36) の PKC によるリン酸化で抑制されることを発現実験や microinjection, in vitro nuclear transport, 及びレポーター assay を用いて明らかにした。核移行活性の消失はリン酸化による NLS 受容体との結合低下による核膜孔への輸送が失われることに依拠するものである。また、PKC によるリン酸化が AhR の XRE への結合やその後の転写活性にとり必要であるとの報告があり、NLS 領域は XRE 結合領域とも重なるので核内でのリン酸化の可能性を見るために Phosphoserine36 を含む AhR(12-42) のペプチド抗体を作成し検討した。その結果、AhR は核内でリン酸化されることが明らかになった。

ii. AhR の細胞密度による局在変化の分子機構

の解析

(a) ケラチノサイト由来の HaCaT では AhR はその細胞密度により細胞内局在が変化し、低密度では主に核に、高密度では細胞質に局在する。Leptomycin B の添加実験より、密度依存的な分布の変化は高密度における AhR の核外輸送の促進による。(b) 高密度における AhR の核外輸送の促進は細胞間接着シグナルが必要である。(c) 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。(d) in vitro wound healing model による実験より、転写活性化が細胞間接着の希薄な wound edges にそって見られる。(e) AhR の核外輸送活性は NES の Ser68 を negative charge をもつ Asp に置換すると阻害される。Ser68 がリン酸化されると AhR は核内に蓄積することを示唆する。上述した(a)から(e)までは昨年度までに明らかにした。今年度は研究を進展させ、その分子機構を明らかにすることができた。則ち、(f) Phosphoserine68 を含むペプチド抗体[Anti-AhR(61-74)-pS68]を作製し、活性化 AhR が核内でリン酸化されることを明らかにした。(g) p38 MAPK の阻害剤 SB203580 で AhR の局在はより細胞質に移るが、ERK-MAPK 系である MEK の阻害剤 U0126 では変化が見られなかった。また、phosphatase 阻害剤であるオカダ酸では逆に核への蓄積が促進された。(h) E-cadherin の転写抑制因子 Slug が表皮角化細胞では AhR の標的遺伝子である可能性を示した。

(2) AhR と性分化関連因子群の相互作用についての研究の推進

精巣由来の生殖腺細胞 TM3 において AhR と性分化関連因子などとの相互作用を検討するために、His-AhR を恒常的に発現している細胞を単離し、その性質をあきらかにすることを

試みた。その結果、His-AhR を発現している細胞の増殖速度は遅く、リガンドである MC 添加によりさらにその増殖速度が低下した。TM3 細胞の増殖も EGF に依存的であり、His-AhR を発現している細胞での EGFR の発現を検討したところ、mRNA の発現量の変化は見られなかったが、EGFR タンパクのリガンド依存的な分解が観察された。この分解においては Proteasome 阻害剤である MG-132 の添加効果は見られなかった。

D. 考察

ヒトゲノムには 56 種の P450 が存在する。本研究課題で調べた P450 分子種は 16 種であり、56 種のうちの一部に過ぎないが、ダイオキシンの代謝に関与すると推測される分子種はほとんど含まれている。今年度のダイオキシン代謝の研究より以下のことが推論される。ヒト体内におけるダイオキシン類の代謝に重要な役割を果たしている P450 分子種は CYP1A1、CYP1A2 および CYP1B1 であり、肝臓での代謝において最も重要な役割を果たしているのは CYP1A2 である。ヒト肝臓における P450 によるダイオキシン代謝能には顕著な個人差があるが、それは CYP1A2 含量の差に起因する。ヒトの肝臓におけるダイオキシン代謝において中心的な役割を果たしている UGT 分子種は UGT2B7、UGT1A1 および UGT1A9 であり、大きな個人差は認められない。

本研究において、最も毒性の高い 2,3,7,8-TetraCDD をヒト P450 が代謝できるという明確な証拠は得られず、ダイオキシン類の毒性を評価するには至らなかった。しかし、種々の発現系やヒト肝ミクロソームを用いた実験、さらには CYP1A1 変異体の解析等から、ダイオキシン代謝に重要な役割を果たす P450 分子種お

よび UGT 分子種を特定化し、ダイオキシン類の代謝機構を詳細に解析することができた。これらの成果は、これまでに報告例のない新規な知見であり、今後、ヒトに対するダイオキシンの毒性を正当に評価する上で重要な役割を果たすと考えられる。また、ダイオキシン代謝能に顕著な個人差があることが示唆された。薬物代謝には顕著な人種差、個人差があることが知られ、それが P450 の遺伝的多型、発現様式に基づくことは周知の事実である。したがって、ダイオキシンを代謝する主要酵素が P450 であることが分かった時点で、その代謝に個人差があることは容易に推測できる。しかし、そのことを実証した本研究はダイオキシンの摂取許容量を論ずる上で重要な知見を与えたと考えられる。

表皮角化細胞株を用いて AhR の細胞内局在及び転写調節活性が細胞密度で制御されることを明らかにした。この過程で、AhR の核外輸送シグナル内に位置する Ser68 が p38 MAPK システムによりリン酸化されることが重要であることを示した。則ち、AhR は低密度では p38MAPK によるリン酸化により核内に繫留されて転写調節を促進させ、逆に高密度では細胞間接着シグナルで調節される脱リン酸化活性により核外輸送が促進され転写調節活性が低下するという細胞の生理的条件によるシグナル伝達モデルが提示された。

細胞密度の変化とは *in vivo* の生体ではどのような状態を意味し、培養細胞で観察された局在性の変化という現象が具体的にどう反映されるかについての研究は、AhR の本質的な機能を演繹するためには非常に重要で興味のある視点であると考えられる。上皮性細胞は器官形成や癌細胞の転移・浸潤に伴う間充織細胞への変化 (Epithelial-Mesenchymal Transitions) において、細胞間接着を低下させ、運動性を獲得する。表皮角化細胞を低 Ca^{2+} 培地で培養し、

細胞間接着を弱めると、AhR の核移行や XRE を介した転写活性化が E-cadherin の局在及び発現の減少という変化と共に観察された。この時に、E-cadherin の転写抑制因子 Slug は AhR の標的である CYP1A1 と同様な時間経過で誘導された。Slug 遺伝子転写調節領域に存在する XRE 配列に着目し、Slug-luciferase を用いた研究より、Slug は AhR の XRE 結合能依存的に誘導されることが示された。従って、AhR は化学発がん物質の受容体として CYP1A1 などの発現を誘導して発がん物質の代謝活性化を促進して発がんに関与するのみならず、がんの浸潤・転移の過程においても機能している可能性が考えられる。

細胞密度依存的にその細胞内局在が変化するものとしてがん抑制遺伝子産物 APC と VHL が知られており、 β -catenin, Hypoxia-inducible factor の核外輸送に伴う分解を伴って、がん抑制作用を示す可能性が指摘されている。その意味で AhR が同様な現象を示したことは興味深い。AhR を過剰に恒常的に発現する TM3 細胞においては MC 依存的な細胞増殖の低下がみられ、細胞増殖に関与する主な経路として知られている EGF Receptors (EGFR) の分解が促進されていることが観察された。EGFR は Plasma membrane に存在し、様々な EGR と結合することにより細胞内へシグナルを伝達して細胞増殖に関与している。どのようなメカニズムで AhR がリガンド依存的に EGFR を分解するのかは今後の研究の結果を待ちたい。

E. 結論

ダイオキシン代謝において最も重要な臓器と考えられる肝臓において、毒性の高いダイオキシン類は主に CYP 1A2 によって水酸化された後、UGT2B7, 1A1 および 1A9 を中

心とする複数の UGT 分子種によるグルクロン酸抱合を受け、完全に無毒化されるが、その代謝能には顕著な個人差があり、それは肝臓中の CYP1A2 含量の差に起因すると推測される。

ダイオキシンの毒性発現に関与する AhR の細胞質・核間輸送の調節機構を詳細に検討し、リガンド依存的核移行は NLS のリン酸化により抑制され、また NES のリン酸化は AhR の核外輸送を抑制する事を明らかにした。AhR の細胞内局在はケラチノサイトにおいて細胞密度によりその分布様式が変化し、転写活性もそれに連動することを示したが、その分子機構として p38 MAPK による NES のリン酸と細胞間接着シグナルで調節されるその脱リン酸化が関与していると考えられた。AhR の標的遺伝子の一つとして E-cadherin の発現を抑制する因子である Slug が考えられ、AhR は Epithelial-Mesenchymal Transitions の過程で機能している可能性が示唆された。このような知見をもとに AhR の生理的機能の解明やダイオキシンによる毒性発現の分子機構が解明されることが期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shinkyō, R., Sakaki, T., Takita, T., Ohta, M., and Inouye, K. Generation of 2,3,7,8-TCDD-metabolizing enzyme by modifying rat CYP1A1 through site-directed mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 309, 885-892 (2003).

- 2) Kawajiri, 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, 994-1004 (2003).

- 3) Ikuta, T., Kobayashi, Y., and Kawajiri, K. Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317, 545-550 (2004)

- 4) Ikuta, T., Kobayashi, Y., and Kawajiri, K. Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.*, 279, 2004 (in press)

- 5) Kawajiri, K. and Ikuta, T. Regulation of nucleo-cytoplasmic transport of aryl hydrocarbon receptor. *J. Health Science*, 50, 2004 (in press)

2. 学会発表

- 1) ダイオキシン代謝酵素の創製
新京 楽, 榊 利之, 太田美穂, 井上國世
2003 年度日本農芸化学会大会 (演題番号 3B02a03)
- 2) ヒト UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) によるダイオキシン代謝機構の解析
榊 利之, 笠井規行, 新京 楽, 生城真一, 井柳 堯, 太田美穂, 井上國世

- 2003 年度日本農芸化学会大会 (演題番号 3D04p12)
- 領域シンポジウム
2003年10月、東京
- 3) Metabolism of dioxins by human cytochromes P450.
Shinkyō, R., Sakaki, T., Ohta, M., and Inouye, K.
第 75 回日本生化学会大会 (演題番号 3P-462)
- 7) 川尻 要、生田統悟
核内受容体の細胞質・核間輸送と内分泌攪乱物質
内分泌かく乱物質 (CREST) 第 4 回領域シンポジウム
2003年10月、東京
- 4) Metabolism of dioxins by human UDP-glucuronosyltransferases.
Kasai, N., Sakaki, T., Shinkyō, R., Ikushiro, S., Iyanagi, T., Ohta, M., and Inouye, K. 第 75 回日本生化学会大会 (演題番号 3P-464)
- 8) 川尻 要、生田統悟
AhR の細胞内局在の調節機構
フォーラム 2003 : 衛生薬学・環境トキシコロジー
2003年10月、仙台
- 5) Kawaiiri, K. and Ikuta T.
Signal transduction of chemicals mediated by aryl hydrocarbon receptor.
Toxicogenomics International Forum 2003.
October, 2003, Japan (Tokyo)
- 9) 井関 穰、生田統悟、小林哲也、川尻 要
Aryl hydrocarbon receptor (AhR) を発現するマウスライディッヒ細胞株 TM3 の分離
第 26 回日本分子生物学会年会
2003年12月、神戸
- 6) 生田統悟、川尻 要
ダイオキシン受容体の機能解析
内分泌かく乱物質 (CREST) 第 4 回
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
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

ダイオキシン代謝において最も重要な臓器と考えられる肝臓において、毒性の高いダイオキシン類は主に CYP 1A2 によって水酸化された後、UGT2B7,1A1 および 1A9 を中心とする複数の UGT 分子種によるグルクロン酸抱合を受け、完全に無毒化されるが、その代謝能には顕著な個人差があり、それは肝臓中の CYP1A2 含量の差に起因する。

A. 研究目的

昨年度実施した部位特異的変異導入による変異体の解析は、哺乳動物において最も毒性の高いダイオキシンである 2,3,7,8-TetraCDD の水酸化を行う酵素はシトクロム P450 であることを強く示唆した。また、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ところ、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、特に 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。また、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。

今年度は、近年、新たに存在が明らかになった P450 分子種、CYP2F1 (肺特異的に発現)、CYP2J2 (長鎖脂肪酸の代謝に関わる)、

CYP2R1 (ビタミン D₃ 25 位水酸化活性を示す) および CYP2S1 (2,3,7,8-TCDD により遺伝子発現が誘導される) の cDNA クローニングおよび酵母内発現を試み、ダイオキシン代謝能を調べた。特に、CYP2S1 は CYP1 ファミリーに属する P450 と同様、2,3,7,8-TCDD により遺伝子発現が誘導されることが報告されており、高いダイオキシン代謝能を有するのではないかと推測された。今年度のもうひとつの研究目的は、ダイオキシン代謝能の個人差についての情報を得ることである。そのために市販のヒト肝ミクロソームを 10 種揃え、2,3,7-TriCDD に対する代謝能を調べた。P450 および UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) は、ともに分子多様性があり、各分子種の発現量には個人差が大きいことが知られているため、2,3,7-TriCDD に対する代謝能においても、かなり大きな個人差が見られると推測された。これまでにダイオキシン代謝能の個人差に関する情報は皆無であり、今後、ダイオキシンの摂取許容量を考える上で重要な情報になると考えられる。

B. 研究方法

(1)材料

a) cDNA ライブラリー

Human lung cDNA Library No.104 (タカラバイオ)

b) ダイオキシシン

2,3,7-トリクロロジベンゾパラダイオキシシン (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)

c) ヒト肝ミクロソーム

第一化学薬品から 10 種のヒト肝ミクロソーム、ロット番号 HH13, HG112, HH47, HG95, HH18, HG43, HG74, HK25, HG89 および H93 を購入した。これらはすべて個人の肝臓から調製されたものである。

(2) 方法

a) ヒト CYP1B1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1

および CYP2S1 cDNA のクローニング

CYP1B1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1 の cDNA はすべて human Lung cDNA library No. 104 をテンプレートとして PCR 法 (Pyrobest[®] DNA polymerase 使用) によって得られた。CYP1B1 については 3 つの断片に分けてクローニングを行い、CYP2F1, CYP2J2, CYP2S1, CYP2S1 については 2 つの断片に分けてクローニングを行った。それぞれ用いたプライマーは以下に示すとおりである。

CYP1B1 N1 5'-

ATGGGCACCAGCCTCAGCCCCGAACGA-3'

CYP1B1 C1 5'-GTCCGCGCTGCCGCGCACCA-3'

CYP1B1 N2 5'-

GCCCACAGCATGATGCGCAACTTCTTCAC-3'

CYP1B1 C2 5'-

CTGGTCACCCATACAAGGCAGACGGTC-3'

CYP1B1 N3 5'-

TGACATCTTCGGCGCCAGCCAGGACA-3'

CYP1B1 C3 5'-

TTATTGGCAAGTTTCCTTGGCTTGTAAT-3'

CYP2F1 N1 5'-

ATGGACAGCATAAGCACAGCCATCTTACTC-3'

CYP2F1 C1 5'-

ATCTTGGTGAGGAAGCACTGGATGAAGT-3'

CYP2F1 N2 5'-

CAAGTGCCTGAGAGACCTCATCGCC-3'

CYP2F1 C2 5'-

TTAGCGCGGGCGCAGGCACAGCT-3'

CYP2J2 N1 5'-ATGCTCGCGCGATGGGCTCTCT-3'

CYP2J2 C1 5'-

GAGAGTTTGGTGGGGTCCAGGCAGGAATTT-3'

CYP2J2 N2 5'-

TTGGAGGCTTCAAAGACATGCCAGCTCTAC-3'

CYP2J2 C2 5'-

TTCACCTGAGGAACAGCGCAGAGGCG-3'

CYP2R1 N1 5'-

CTCGGAAAAAATGTGGAAGCTTTGGAGAGCTG AAGAG-3'

CYP2R1 C1 5'-AGC ATC AAC AAAATG CTG AGG TAG CTG AGG-3'

CYP2R1 N2 5'-TAA TGC CTT TCC ATG GAT TGG CAT CC-3'

CYP2R1 C2 5'-CTC GAG TCA GCG TCT TTC AGC ACA GAT GAG-3'

CYP2S1 N1 5'-

CCCACGCCGCTACCACTGCTGGGAAAC-3'

CYP2S1 C1 5'-

CAGGGTGTACCCTCGGAAGCGGGTGGT-3'
CYP2S1 N2 5'-
ACACCGACGCGGTTCTGCATGAGGCGC-3'
CYP2S1 C2 5'-
TCATCTGGTCTGCGTGGTGGAGTGAAGGTC-3

b) 酵母内発現プラスミドの構築

CYP2R1 以外の 4 種類については、それぞれ両端に *Hind* III 部位を導入するためにプライマーを設計し、上記の PCR によって得られた PCR 断片を鋳型として PCR を行い、それぞれの断片を得た。次に、酵母内発現ベクター pGYR の *Hind* III 部位全コーディング領域を含む *Hind* III 断片を挿入し、発現プラスミドを得た。また、CYP2R1 については pGYR の *Hind* III 部位をフィルインした後、*Xho* I 部位を導入し、全コーディング領域を含む *Xho* I 断片を挿入して発現プラスミドを得た。

c) 酵母の形質転換およびマイクロソーム画分の調製

LiCl 法を用いて各発現プラスミドを *S. cerevisiae* AH22 株に導入した。得られた組換え体からマイクロソーム画分を調製し、還元型 CO 結合差スペクトルにより、各 P450 の発現量を算出した。

d) 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 P450 を含む酵母マイクロソーム画分あるいはヒト肝マイクロソーム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)

e) 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

f) ヒト肝マイクロソームによる 2,3,7-TriCDD の代謝 (P450 反応+UGT 反応)

1 mM MgCl₂を含む100mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) に各種ヒト肝マイクロソーム(タンパク質濃度0.5mg/ml)および2,3,7-TriCDD を添加し (終濃度 10 mM)、2mM UDP-グルクロン酸、1mM NADPH を加えて、反応を開始させた。37°Cで0,2,4,8,10,15,29,30 あるいは60分間反応させ、クロロホルム/メタノール=3/1 溶液の添加により反応を停止するとともに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)

g) 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。

h) 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 を含むマイクロソーム画分(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 mM)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、(e)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) 各種 P450 の酵母内発現

マイクロソーム画分における各 P450 分子種の含量は CYP1B1 (5 pmol/mg タンパク質)、CYP2J2 (2 pmol/mg タンパク質)、CYP2R1 (21 pmol/mg タンパク質) であった。CYP2F1 および CYP2S1 は発現量がきわめて

低く、還元型 CO 結合差スペクトルから P450 濃度を見積もることができなかった。

(2) 各種 P450 のダイオキシン代謝能

各種 P450 発現酵母のマイクロソーム画分を用いて 6 種のダイオキシン類について活性測定を行った。CYP1B1 のマイクロソーム画分の場合、DD, 2-MCDD, 2,3-DCDD, 2,7-DCDD, 2,3,7-TricDD の 5 種について代謝産物を検出することができた。CYP1B1 分子あたりの活性は、それぞれ、2.4, 6.3, 9.8, 16.6, 7.9 (mol/min/mol P450) であった。一昨年度報告した昆虫細胞-バキュロウイルス発現系と今回の酵母発現系を比較すると全般的に酵母発現系の方が活性が高く、酵母マイクロソーム画分の方が還元酵素含量が高いことに起因すると推測された。また、昆虫細胞-バキュロウイルス発現系の場合、2,3,7-TricDD に対して最も高い活性を示したのに対し、酵母発現系の場合、2,7-DCDD に対する活性の方が高かった。CYP2R1、CYP2J2、および P450 濃度を見積もることができなかった CYP2F1 および CYP2S1 についてはいずれの基質についても活性を検出することはできなかった。

(3) ヒト肝マイクロソームによる 2,3,7-TricDD の代謝 (P450 反応+UGT 反応)

a) P450 反応

2,3,7-TricDD 8 位水酸化活性を比較したところ、ロット番号 HG93 の活性が最も高く、HG89, HK25, HG74, HG43, HH18, HG95, HH47, HG112, HH13 の順で活性が低下した。HG93 の活性は HH13 の 15 倍であった。2,3,7-TricDD 8 位水酸化活性を示す P450 分子種は CYP1A1, CYP1B1, CYP1A2 の 3 種であるが、CYP1A1 および CYP1B1 は肝臓にはほとんど存在せず、活性の差は主に CYP1A2

の含量の違いに起因すると考えられる。

b) UGT 反応

P450 反応により生じた 2,3,7-TricDD 8 位水酸化体を基質としてそれぞれのヒト肝ミクロソームに添加し、グルクロン酸抱合活性を調べたところ、最も活性が高かったのは HG43 で、最も活性が低かったのは HH13 であった。しかし、P450 反応に比べてその差は小さく、1.9 倍の違いであった。昨年度報告したように 2,3,7-TricDD 8 位水酸化体に対して高い活性を示す UGT 分子種は UGT1A1、1A9、2B7 といずれもヒト肝における主要な UGT 分子種であること、また、UGT1A8、1A9、2B15、1A3、2B17 といった UGT 分子種にも活性が認められることから、個人差が少ないと推測される。

c) P450 反応+UGT 反応

ヒト肝ミクロソーム HG89 に 2,3,7-TricDD を添加し、NADPH および UDP-グルクロン酸存在下で反応させたところ、8 分までは 2,3,7-TricDD 8 位水酸化体が直線的に増加し、その後、増加速度が低下し、20 分から 60 分まではほぼ一定となった。一方、グルクロン酸抱合体は 10 分までは指数関数的に増加し、それ以降は直線的に増加した。このことから 20-60 分の間は 2,3,7-TricDD から 2,3,7-TricDD 8 位水酸化体が生じる速度と 2,3,7-TricDD 8 位水酸化体がグルクロン酸抱合体に変換される速度が等しいと考えられる。10 種のヒト肝ミクロソームにおける 60 分後のグルクロン酸抱合体の生成量を比較したところ、HG93 が最も多く、以下、HG89、HK25、HG74、HH18、HG95、HH47、HG43、HH13、HG112 の順であった。HG43 以外は(i)ときわめて良い一致を示し、最高値 (HG93) と最低値 (HG112) の開き

は約 20 倍であった。(i)、(ii)の結果と併せて以下のことが推測できる。2,3,7-TricDD から 8 位水酸化体が生じる速度には顕著な個人差があり、それは CYP1A2 含量の違いに基づく。しかし、8 位水酸化体がグルクロン酸抱合体に変換される速度は個人差が少なく、60 分後には生じた 8 位水酸化体のほとんどがグルクロン酸抱合体にされた。

D. 考察

昨年度までに 12 種のヒト由来 P450 のダイオキシン代謝能を調べた。11 種は酵母発現系を用いたが、CYP1B1 については市販の昆虫細胞-バキュロウイルス発現系を用いたため、活性を他の分子種と直接比較することができなかった。今年度は CYP1B1 を酵母内で発現させ、ダイオキシン代謝能を調べた。その結果、昆虫細胞-バキュロウイルス発現系での結果と同様、塩素置換数 0-3 のダイオキシン類に対して高い活性を示したが、2,7-DCDD および 2,3,7-TricDD に対する活性において違いが見られた。原因は今のところ不明であるが、酵母発現系の方が還元酵素含量はるかに高いことに起因している可能性が高い。P450 反応サイクルにおいて電子伝達が律速段階になっている場合は還元酵素含量の増加に応じて活性が上昇するが、それ以外のステップが律速段階になっている場合には還元酵素含量が増加しても活性は上昇しない。2,3,7-TricDD の活性上昇率が他の基質に比べて低いのは、酵母発現系において、CYP1B1 の 2,3,7-TricDD 8 位水酸化反応の律速段階が電子伝達ではないことに依ると思われる。今年度はさらに CYP2F1 (肺特異的に発現)、CYP2J2 (長鎖脂肪酸の代謝に関わる)、CYP2R1 (ビタミン D₃ 25 位水酸化活性を示す)、CYP2S1 (2,3,7,8-TCDD によ

り遺伝子発現が誘導される)の酵母内発現に成功し、それぞれの P450 分子種によるダイオキシン代謝能を調べた。CYP2S1 は 2,3,7,8-TCDD により遺伝子発現が誘導されることから、ダイオキシンに対する活性が期待されたが、すべてのダイオキシン類に対して活性は検出されなかった。CYP2F1、CYP2J2、CYP2R1 についても同様に、ダイオキシン類に対する活性は検出されなかったが、CYP2F1、CYP2J2 については発現量がきわめて低く、現段階でダイオキシン代謝能がないとは言い切れない。ヒトゲノムには 56 種の P450 が存在する。本研究課題で調べた P450 分子種は 16 種であり、56 種のうちの一部に過ぎない。また、現在、基質特異性が全く分かっていない P450 分子種が 10 種以上存在し、その中にヒト体内でのダイオキシン代謝の中心的役割を果たしている P450 分子種が存在する可能性を否定することはできない。しかし、今回調べた 16 種以外の分子種がダイオキシン類の代謝に対して中心的役割を果たしている可能性はきわめて低いと考えられる。毒性の高いダイオキシン類に対しては CYP1A1 が最も活性が高く、CYP1B1、CYP1A2 の順であるが、ヒト生体内(特に肝臓)における含量は CYP1A2 が CYP1A1、CYP1B1 に比べてはるかに高いことから、毒性の高いダイオキシン類の代謝において最も重要な分子種は CYP1A2 であると考えられる。

ヒト肝ミクロソーム 10 種(それぞれ一人の肝臓から調製)を用いて 2,3,7-TricDD の代謝を調べたところ、いずれのサンプルにおいても代謝物として 8-OH-2,3,7-TricDD が検出された。しかし、その活性にはかなりの差が認められ、最も活性が高いサンプルと最も活性の低いサンプルには

15 倍程度の差が認められた。ヒト肝臓における CYP1A2 の含量は CYP1A1 および CYP1B1 の含量に比べはるかに高いことから、2,3,7-TricDD の代謝において見られた差(個人差)は CYP1A2 の含量の違いに起因すると推測される。昨年度、昆虫細胞あるいは酵母で発現させた各 UGT 分子種の酵素学的性質を調べたところ、UGT1A1、1A9、2B7 において高い活性が見られ、1A3、1A6、1A8、1A10、2B15 においても活性が認められ、8-OH-2,3,7-TricDD はこれら UGT の良い基質になることがわかった。昨年度のラット CYP1A1 変異体の解析結果から、P450 による 2,3,7,8-TCDD 代謝物は 8-OH-2,3,7-TricDD であることが示唆された。したがって、2,3,7,8-TCDD がヒト体内で代謝され、8-OH-2,3,7-TricDD が生じた場合、複数の UGT によって効率良くグルクロン酸抱合が起こると考えられる。(i)で用いたヒト肝ミクロソーム 10 種に 8-OH-2,3,7-TricDD を添加し、グルクロン酸抱合活性を比較したところ、(i)の場合と異なり、グルクロン酸抱合活性における個人差は小さく、2 倍程度であった。また、グルクロン酸抱合反応の速度論的解析および肝臓における発現量から、ヒトの肝臓におけるダイオキシン代謝において中心的な役割を果たしている UGT 分子種は UGT 2B7、UGT 1A1 および UGT 1A9 であると推測される。P450 による代謝とそれに続く UGT による代謝を併せて見るために、ヒト肝ミクロソームに 2,3,7-TricDD を基質として添加し、経時的に代謝物を分析した。その結果、2,3,7-TricDD は 8 位水酸化体に変換された後、効率よくグルクロン酸抱合体へと変換した。8-OH-2,3,7-TricDD には 2,3,7,8-TCDD の 0.01%程度の Ah レセプター結合能が残存するが、グルクロン酸抱合体

には結合能が全く見られず、完全な無毒化であるといえる。また、グルクロン酸抱合体への変換能には(i)と同様の個人差(20倍程度)があり、2,3,7-TriCDDから8-OH-2,3,7-TriCDDへの変換ときわめて良い相関を示した。

以上、今年度の研究結果から以下のことが推論される。

(1) ヒト体内におけるダイオキシン類の代謝に重要な役割を果たしている P450 分子種は CYP1A1、CYP1A2 および CYP1B1 であり、肝臓での代謝において最も重要な役割を果たしているのは CYP1A2 である。

(2) ヒト肝臓における P450 によるダイオキシン代謝能には顕著な個人差があるが、それは CYP1A2 含量の差に起因する。

(3) ヒトの肝臓におけるダイオキシン代謝において中心的な役割を果たしている UGT 分子種は UGT2B7、UGT1A1 および UGT1A9 であり、(2)で見られたような大きな個人差は認められない。

E. 結論

ダイオキシン代謝において最も重要な臓器と考えられる肝臓において、毒性の高いダイオキシン類は主に CYP1A2 によって水酸化された後、UGT2B7、1A1 および 1A9 を中心とする複数の UGT 分子種によるグルクロン酸抱合を受け、完全に無毒化されるが、その代謝能には顕著な個人差があり、それは肝臓中の CYP1A2 含量の差に起因すると推測される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shinkyo, R., Sakaki, T., Takita, T., Ohta, M., and Inouye, K. Generation of 2,3,7,8-TCDD-metabolizing enzyme by modifying rat CYP1A1 through site-directed mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 309, 885-892, 2003.

2. 学会発表

1) ダイオキシン代謝酵素の創製

新京楽, 榊利之, 太田美穂, 井上國世

2003 年度日本農芸化学会大会 (演題番号 3B02a03)

2) ヒト UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) によるダイオキシン代謝機構の解析

榊利之, 笠井規行, 新京楽, 生城真一,

井柳堯, 太田美穂, 井上國世

2003 年度日本農芸化学会大会 (演題番号 3D04p12)

3) Metabolism of dioxins by human cytochromes P450.

Shinkyo, R., Sakaki, T., Ohta, M., and Inouye, K.

第 75 回日本生化学会大会 (演題番号 3P-462)

4) Metabolism of dioxins by human UDP-glucuronosyltransferases.

Kasai, N., Sakaki, T., Shinkyo, R.,

Ikushiro, S., Iyanagi, T., Ohta, M., and

Inouye, K. 第 75 回日本生化学会大会 (演題番号 3P-464)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
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

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 の細胞内局在はケラチノサイトにおいて細胞密度によりその分布様式が変化し、転写活性もそれに連動することを示したが、その分子機構として p38 MAPK による NES のリン酸と細胞間接着シグナルで調節されるその脱リン酸化が関与していると考えられた。このような知見をもとに AhR の生理的機能の解明やダイオキシンによる毒性発現の分子機構が解明されることが期待される。

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。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。昨年度においては、NLS, 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。また AhR の細胞内分布はケラチノサイトにおいては細胞密度により調節されており、その分子機構として NES のリン酸化(Ser68)及びその脱リン酸化により調節されていること可能性を指摘した。本年度はその分子メカニズムをより詳細に解析し、AhR の生理的機能との関連を明らかにすることを目的とする。得られた研究成果を基盤にして AhR により仲介される細胞内シグナル伝達のモデルを完

成する。

B. 研究方法

NES のリン酸化抗体を作成して AhR の NES が核の中で実際にリン酸化されていることを確認する。このリン酸化に p38 MAPK が関与するかどうかについて各種阻害剤の影響を局在、転写活性で観察することにより解析する。また、細胞間接着に重要な役割を果たしている E-cadherin の発現を negative に調節している Slug 遺伝子が AhR のケラチノサイトにおける標的遺伝子である可能性についてを検討する。

C. 研究結果

(1) 抗リン酸化ペプチド抗体による AhR Ser68 のリン酸化

リン酸化された Ser68 が細胞内に存在することを証明するために、phosphoserine 68 を含むペプチドをウサギに免疫して、抗リン酸化ペプチド抗体を作製した。この抗体の特異性を検討するため、抗原ペプチドをニトロセルロース膜に滴下して dot blot を行った。その結果、リン酸化ペプチドは非リン酸化ペプチドに比べ

て高い反応性を示し、抗体の特異性が確認された。高密度で培養された HaCaT の培地 (DMEM) を、低カルシウム培地 (SMEM) に交換すると、AhR は核へ移動することを既に我々は昨年度に観察している。この条件下で AhR Ser68 はリン酸化され、核外移行が抑制されている可能性がある。細胞内に発現する AhR のリン酸化を検討するため、SMEM 刺激後に得た cell lysate を immunoblot に用いた。その結果、抗 AhR 抗体でみられるバンドより移動度の遅いバンドが、抗リン酸化ペプチド抗体により認められた。DMEM で培養した細胞の lysate では、このバンドはみられなかった。このことから、Ser68 がリン酸化された AhR が HaCaT 細胞に存在することが示唆された。さらに、マウス肝臓の免疫染色をおこなった。AhR のリガンドであるメチルコラントレン処理された肝臓組織では、核に強い染色性が認められた。この局在性は、リン酸化された核外移行シグナルを融合した GFP が核に蓄積した microinjection の結果と一致する。これらの結果より、細胞内で Ser68 がリン酸化された AhR は核に存在することが示唆された。

(2) p38 MAPK と AhR 活性

NES のリン酸化により核外輸送活性が調節されるタンパク質として報告されている p53 やエストロゲン受容体は、p38 MAPK がリン酸化に関わることが示されている。AhR の NES 領域に位置する Ser68 のリン酸化にも、p38 MAPK が関与している可能性がある。そこで、AhR の転写調節活性におよぼす p38 MAPK の効果について検討した。高密度で培養された HaCaT の培地を SMEM に交換すると、2 時間後には AhR の分布は細胞質から核へ変化した。この時、AhR Ser68 のリン酸化

が認められることは上記の通りである。XREtk-Luc を導入した HaCaT を用いることにより、この条件下では 10 時間をピークに、ルシフェラーゼ活性は上昇した。この活性は p38 MAPK 阻害剤 SB203580 存在下で抑制され、ERK1/2 MAPK 経路の MEK 阻害剤である U0126 では抑制されなかった。SMEM で培養すると、E-cadherin による細胞間接着は低下し、細胞の形態変化が起こる。この時の MAPK 活性の変化を、活性化型 MAPK を認識する抗体を用いて検討した。P38 および ERK は培地交換後、15 分で活性化されることが immunoblot により示された。また、AhR の標的遺伝子である CYP1A1 は 2 時間後から増加した。AhR が細胞質と核にほぼ等しく分布する subconfluent な密度の状態の細胞に SB203580 を暴露させるとより細胞質に、U0126 では影響が見られなかった。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。以上の結果より、培地中のカルシウム濃度低下により生じた細胞内シグナルは MAPK 経路を活性化し、Ser68 をリン酸化することにより AhR を核に蓄積させ、XRE を介した転写調節機能を活性化させたというシグナルの伝達経路が考えられた。

(3) ケラチノサイトにおける AhR/ARNT の標的遺伝子

AhR はケラチノサイトの培養密度により、その活性が調節されることを示してきた。この過程で、細胞内ではどんな遺伝子の転写が調節されているのだろうか。上皮細胞間の接着に機能する E-cadherin は、培地中のカルシウム濃度低下に伴い機能が低下する。E-cadherin の調節には Snail/Slug family に属する蛋白

質が転写抑制因子として作用する。我々は Slug 遺伝子の転写調節領域に AhR/ARNT が結合するコンセンサス配列 XRE があることに着目し、我々はケラチノサイトにおける AhR/ARNT 標的遺伝子の候補として Slug の解析をおこなった。高密度で培養した HaCaT 細胞を低カルシウム培地に交換後、経時的に細胞を回収し、RT-PCR で Slug mRNA の発現を解析した。2時間後から発現の上昇がみられ、10時間後には低下した。これは AhR/ARNT の標的遺伝子 CYP1A1 と類似した発現パターンを示していた。次に、ヒト Slug 遺伝子の転写調節領域を PCR で増幅し、ルシフェラーゼに連結した。こうして作製したレポーター遺伝子と AhR 発現ベクターを COS 細胞に導入した。その結果、ルシフェラーゼ活性は、AhR の XRE 結合活性に依存して上昇することが示された。これらより、Slug の転写活性は AhR により調節されている可能性が示唆された。

D. 考察

表皮角化細胞株を用いて AhR の細胞内局在及び転写調節活性が細胞密度で制御されることを明らかにした。この過程で、AhR の核外輸送シグナル内に位置する Ser68 が p38 MAPK システムによりリン酸化されることが重要であることを示した。則ち、AhR は低密度では p38MAPK によるリン酸化により核内に滞留されて転写調節を促進させ、逆に高密度では細胞間接着シグナルで調節される脱リン酸化活性により核外輸送が促進され転写調節活性が低下するという細胞の生理的条件によるシグナル伝達のモデルが提示された。

細胞密度の変化とは *in vivo* の生体ではどのような状態を意味し、培養細胞で観察された局在性の変化という現象が具体的に反映されるか

についての研究は、AhR の本質的な機能を演繹するためには非常に重要で興味のある視点であると考えられる。上皮性細胞は器官形成や癌細胞の転移・浸潤に伴う間充織細胞への変化 (Epithelial-Mesenchymal Transitions) において、細胞間接着を低下させ、運動性を獲得する。表皮角化細胞を低 Ca^{2+} 培地で培養し、細胞間接着を弱めると、AhR の核移行や XRE を介した転写活性化が E-cadherin の局在及び発現の減少という変化と共に観察された。この時に、E-cadherin の転写抑制因子 Slug は AhR の標的である CYP1A1 と同様な時間経過で誘導された。Slug 遺伝子転写調節領域に存在する XRE 配列に着目し、Slug-luciferase を用いた研究より、Slug は AhR の XRE 結合能依存的に誘導されることが示された。従って、AhR は化学発がん物質の受容体として CYP1A1 などの発現を誘導して発がん物質の代謝活性化を促進して発がんに関与するのみならず、がんの浸潤・転移の過程においても機能している可能性が考えられる。

E. 結論

ダイオキシンの毒性発現に関与する AhR の細胞質・核間輸送の調節機構を詳細に検討し、リガンド依存的核移行は NLS のリン酸化により抑制され、また NES のリン酸化は AhR の核外輸送を抑制する事を明らかにした。AhR の細胞内局在はケラチノサイトにおいて細胞密度によりその分布様式が変化し、転写活性もそれに連動することを示したが、その分子機構として p38 MAPK による NES のリン酸と細胞間接着シグナルで調節されるその脱リン酸化が関与していると考えられた。AhR の標的遺伝子の一つとして E-cadherin の発現を抑制する因子である Slug が考えられ、AhR は

Epithelial-Mesenchymal Transitions の過程で機能している可能性が示唆された。このような知見をもとに AhR の生理的機能の解明やダイオキシンによる毒性発現の分子機構が解明されることが期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Kawaiiri, K., Ikuta, T., Suzuki, T., Kusaka, M., Muramatsu, M., Fujieda, K., Tachibana, M., and Morohashi, K. Role of LXXLL-motif and AF2 domain in subcellular localization of Dax-1. *Mol. Endocrinol.*, 17, 994-1004 (2003)
- 2). Ikuta, T., Kobayashi, Y., and Kawaiiri, K. Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317, 545-550 (2004)
- 3). Ikuta, T., Kobayashi, Y., and Kawaiiri, K. Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.*, 279, 2004 (in press)
- 4). Kawaiiri, K. and Ikuta, T. Regulation of nucleo-cytoplasmic transport of aryl hydrocarbon

receptor. *J. Health Science*, 50, 2004 (in press)

2. 学会発表

- 1). Kawaiiri, K. and Ikuta T. Signal transduction of chemicals mediated by aryl hydrocarbon receptor. *Toxicogenomics International Forum 2003*. October, 2003, Japan (Tokyo)
- 2). 生田 統悟、川尻 要 ダイオキシン受容体の機能解析 内分泌かく乱物質 (CREST) 第4回 領域シンポジウム 2003年10月、東京
- 3). 川尻 要、生田 統悟 核内受容体の細胞質・核間輸送と内分泌攪乱物質 内分泌かく乱物質 (CREST) 第4回 領域シンポジウム 2003年10月、東京
- 4). 川尻 要、生田 統悟 AhRの細胞内局在の調節機構 フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー 2003年10月、仙台
- 5). 井関 穰、生田 統悟、小林哲也、川尻 要 Aryl hydrocarbon receptor (AhR) を発現するマウスライディッヒ細胞株 TM3 の分離

第26回日本分子生物学会年会
2003年12月、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。) なし