

内分泌攪乱化学物質感受性遺伝子：野生生物におけるアрил炭化水素受容体の分子生物学的分析とダイオキシン感受性

マーク E. ハーン¹、ブレンダ A. イェンセン¹、エウンヤン キム^{1,2}、
ショーン W. ケネディー³、ダイアナ G. フランクス¹、サイベル I. カーシュナー¹

米国¹ウッズホール海洋研究所

²愛媛大学

カナダ³カナダ環境省

はじめに

野生生物の一部の動物種や個体群は、残留性有機汚染物質を含む化学汚染物質を高濃度で蓄積することが知られています。これらの化学物質の多くはラットやマウスなどの実験動物で内分泌攪乱を含む毒性を生じさせることが確認されています。

これらの化学物質が実験用動物に影響を及ぼすことが分かっているにもかかわらず、野生生物、特に直接的な毒性試験が不可能な保護された動物種では、これらの化学物質の影響を調査することは困難でした。

従って、野生生物への化学物質曝露のリスクの調査は、我々が他の動物、特に実験用げっ歯類で分かっていることを外挿することが必要です。しかし、外挿というプロセスは本来不確定性を伴っています。一般に、我々は内分泌攪乱に関わる機序が総じて類似していると予測することができます。そしてこのことが、外挿の根拠となっています。しかし、重要な機械論的な細部には、ある動物種からの所見を他の動物種に正確に外挿することに影響を及ぼすような差が存在する可能性があります。例えば、化学物質への感受性には時として大きな種差があり、このような差は生体内変化の許容能力の差や化学物質が標的とする細胞（例えばタンパク質）の特性の差に起因している可能性があります。

感受性における種差を考察する方法の 1 つは、化学物質に対する「感受性バイオマーカー」を開発することです。この方法は、タンパク質の多型性が研究されているヒトの健康アセスメントにおいて、個々の患者の疾患に対する感受性のマーカーとしても用いられています。同様に、毒性機序に関与するタンパク質の特性に見られる種特異的な差を野生生物の感受性を予測するために利用できるかもしれません。我々は、毒性に関与する遺伝子の種特異的なクローニングと特性評価を行うことが、げっ歯類における機械論的な研究を野生生物における疫学的所見に関連づけることとなり、リスクアセスメントに貢献できると考えます。

世界的に懸念され続けている内分泌攪乱化学物質のグループの 1 つは、ポリ塩化ジベンゾダイオキシン類、ジベンゾフラン類、およびプレーナー（non-ortho 型）ポリ塩化ビフェニル類（PCB 類）を含むダイオキシン様化学物質です。これらの化学物質は、生殖と発生に影響を及ぼし、エストロゲンやアンドロゲンに関わる経路を含む内分泌経路の機能を妨害することから、内分泌攪乱化学物質であると考えられています。

これらの化学物質は、リガンドで活性化する転写因子であるアрил炭化水素受容体（Ah 受容体または AHR）を巻込んだ周知の機序により作用しています。ダイオキシン類とコプレーナー-PCB 類は AHR を介して作用し、チトクローム P450 類の誘導といった適応免疫反応を含む遺伝子発現に変化を生じさせたり、細胞の成長や機能の毒性変調を引き起こす可能性のある他の遺伝子の発現に変化を生じさせたりします。

我々は、げっ歯類では AHR がダイオキシン感受性遺伝子としての役割を果たしていることが示されていることから、野生生物においても感受性遺伝子である可能性が高い AHR について研究しています。いくつかの研究所見がこの仮説を裏付けています。第一に、AHR ノックアウトマウスはダイオキシンの作用に感受性を示さないことで分かる通り、マウスでダイオキシン毒性が現れるには AHR が必須であることです。第二に、マウス系統を用いた複数の研究で、AHR の特性がダイオキシンに対するマウス系統の感受性を決定していることが示されています。第三に、AHR との親和性が、ダイオキシン様化学物質が毒性を発揮するかどうかの構造活性相関を決定する主要な要因であることです。この理解に基づいて、我々は、AHR を野生生物における感受性（または感受性遺伝子）バイオマーカーとして調査できると考えました。

我々の研究室における調査の目標は、野生生物における Ah 受容体の信号経路および野生生物のダイオキシン様化学物質に対する感受性を決定する AHR の役割を明らかにすることです。本研究では、AHR cDNA のクローニングと塩基配列決定、発現プラスミドへの cDNA のサブクローニング、*in vitro* 転写と翻訳によるタンパク質の発現、および発現したタンパク質の機能的特性の評価を行っています。現在のところ、我々は AHR に焦点を置いています。この方法はステロイドや他のホルモンの受容体を含む他のタンパク質にも適用できます。我々の研究室における研究では、海棲哺乳動物、鳥類、魚類、および無脊椎動物を含む様々な動物種を扱っています。本日は、2 つの研究の概要についてお話します。1 つは海棲哺乳動物を扱った研究で、もう 1 つは鳥類を扱った研究です。

シロイルカの AHR

一連の研究で我々はシロイルカの AHR 経路について調査しています。この動物種はカナダ東部のセント・ローレンス川河口に棲息している絶滅の危機に瀕した個体群として関心を集めています。この個体群は、ダイオキシン様化学物質を含む様々な化学物質に高度に曝露しています。この個体群に関する研究では、化学物質への曝露に起因すると疑われる病理学的異常および生殖異常が確認されています。さらに、生化学的影響が他のシロイルカ個体群でも観察されており、化学物質への曝露に関連付けられています。これらの実験では、我々はシロイルカが高い親和性の AHR タンパク質を発現するかどうかを調査しました。

私の研究室のブレンダ・イェンセンはシロイルカ AHR cDNA のクローニングの作成と塩基配列の解明を行いました。この cDNA は、95 kDa (キロダルトン) タンパクをコード化しており、ヒト AHR とほぼ同じサイズです。シロイルカ AHR は、ヒトおよびマウスの AHR とのアミノ酸相同性が高く、特に機能上重要であることが知られているタンパク質領域で顕著です。これらの領域は、塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 領域を含んでおり、bHLH はリガンド結合のために重要な DNA 結合と PAS ドメインに重要な役割を果たしています。

我々は、このクローニングした AHR cDNA を使用して、*in vitro* での転写と翻訳によりシロイルカ AHR タンパク質を発現させ、それを同じ方法で発現させたマウスとヒトの AHR と比較しました。³⁵S-メチオニンの存在下でこれを行ったときに、標識を付したタンパク質を変性ゲル上で可視化させ、タンパク質合成を確認することができました。さらに、*in vitro* 合成したシロイルカ AHR がマウス AHR に対する抗体によって認識されることを確認し、AHR としてのアイデンティティが確定されました。

次に、この *in vitro* 合成したシロイルカ AHR の機能を調査しました。我々は毒性が現れる最初のステップであるダイオキシン結合に焦点を置きました。この AHR へのダイオキシンの結合を測定するための最も良い方法はショ糖密度勾配遠心分離法です。この方法では、放射線標識を付した 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-パラ-ダイオキシン (³H TCDD) と共に *in vitro* 合成したシロイルカ AHR のインキュベーションを行います。1 つ目のインキュベーションには ³H TCDD だけを入れ、「総結合量」を測定します。2 つ目のインキュベーションには、³H TCDD と過剰量の未標識テトラクロロジベンゾフラン (TCDF) を入れ、「非特異的結合」を測定します。これらの 2 本の試験管の違いは「特異的結合」があるかないかです。結合がショ糖勾配上でインキュベーション混合物を分画した後にシンチレーションカウンターで測定します。

これらの実験では、³H TCDD は *in vitro* 合成したシロイルカ AHR に最大結合量で結合し、結合した ³H TCDD は非標識リガンドで置換できたため、特異的な結合を示すものと判断されます。同様の結果が *in vitro* で発現させたマウス AHR でも得られました。*in vitro* で発現させたタンパク質で得られたピーク値を肝細胞質ゾルで得られたピーク値と比較すると興味深い結果が得られます。最も新鮮なシロイルカ肝の場合でも、特異的結合のピークはごく僅かでありません。このことは、クローニングと *in vitro* 合成が研究用に大量のシロイルカ AHR を作成する優れた方法であり、フィールドサンプルの採取の必要性が低くなることを示しています。

我々が海棲哺乳動物の AHR について持っていた大きな疑問の 1 つは、どのようにして TCDD との親和性を実験用げっ歯類の AHR に見られる親和性と比較したらよいのかということです。TCDD との結合親和性を測定するために、我々は *in vitro* 合成したシロイルカ、ネズミ、およびヒト AHR の飽和結合分析を行いました。飽和結合分析は、ある範囲の ³H TCDD 濃度における総結合量と非特異的結合の差から特異的結合を明らかにします。特異的結合曲線から、結合親和性の値である平衡解離定数 (Kd) を計算しました (低い Kd 値は高い親和性を意味します)。これらの実験により、シロイルカ AHR の Kd がヒト AHR の Kd よりも著しく低い (すなわち、親和性

が高い) ことが示されました。従って、シロイルカ AHR は、ダイオキシン感受性が高い系統のマウスの AHR に類似した高い親和性があります。

シロイルカ AHR の親和性を、どのようにしてシロイルカの組織中のダイオキシン類の濃度と対比させることができるのでしょうか? *in vitro* と *in vivo* システムには数多くの違いがあるため、両者の比較は複雑であることを念頭に置いた上で、文献にあるデータを用いてある程度対比させることができます。カナダで Derek Muir が行ったシロイルカにおける PCB 類とダイオキシン類の研究から、我々はセント・ローレンス河口の雄の成体の肝臓に含まれるダイオキシン等量 (TCDD-Eqs) が 0.13 nM (ナノモル) であることを計算しました。0.43 nM の K_d 値の場合、このダイオキシン等量の濃度では受容体の 23%がリガンドで占められる結果になるでしょう。この占有率は、げっ歯類や他の試験系での実験に基づけば、影響が起こることが予測される高さです。それらの影響の強さは、受容体と他の因子の濃度によって異なるものと思われます。しかし、この計算は、高い親和性の AHR の存在を考慮すれば、一部のシロイルカが曝露している化学物質は影響を起こすに十分な濃度であることを示唆しています。

シロイルカに関する我々のリサーチのもう 1つの目的は、海棲哺乳動物とげっ歯類との間で PCB 同族体の相対的効力に差があるかどうかの調査を始めることです。相対的効力 (毒性同価因子 (TEF) とも呼ばれる) は、環境中で採取したサンプルのダイオキシン総等価量に対するダイオキシン様 PCB 同族体の相対的寄与率を計算するために利用されます。しかし、これらの相対的効力 (TEF) には相当な種差がある可能性があり、このことがリスクアセスメントの計算に影響を及ぼすことがあることが知られています。海棲哺乳動物の TEF はこれまで確認されていません。

我々は、シロイルカにおける PCB 類の相対的効力を推定するために、*in vitro* で発現させたシロイルカ AHR を使用して、AHR への相対的結合親和性の測定値として、PCB 同族体が TCDD の結合を阻害する能力を測定しました。すなわち、non-ortho 型および mono-ortho 型 PCB 類を含む一連の PCB 同族体で得られた相対的結合曲線を使用して、これらの化合物とマウス AHR およびシロイルカ AHR との阻害定数 (K_i 値) を測定し、その阻害定数から相対的結合親和性を計算することができました。限られた数ながらこれら PCB 類に関するシロイルカの K_i 値は、ほぼ完全にマウスの K_i 値と一致しており、げっ歯類で測定した相対的効力がシロイルカでも十分に利用できる可能性があることを示唆しています。しかし、結合親和性が等しいからと言って、相対的効力が等しいとすることができるかどうかを確認することが依然として重要です。

アザラシ AHR

ただ今解説したシロイルカの研究と同じ種類の研究がアザラシでも行われています。これは愛媛大学のエウナン キムが客員研究員として私の研究室にいたときの研究です。彼女はアザラシ AHR cDNA のクローンの作成と塩基配列の解明を行い、アザラシ AHR が他の哺乳動物の AHR と高いアミノ酸相同性があることを示しました。

シロイルカ AHR と同様、アザラシ AHR も *in vitro* で発現させ、TCDD との結合親和性を測定するために結合アッセイを使用することができます。ショ糖密度勾配分析では、³H]TCDD が *in vitro* で発現させたアザラシ AHR に結合したことが確認されました。飽和結合分析では、アザラシ AHR の TCDD 結合親和性が親和性の高いマウス AHR の TCDD 結合親和性に類似していることが示されました。従って、シロイルカと同様、アザラシも親和性の高い AHR を持っています。

鳥類における AHR

別の一連の研究で、我々は鳥種に見られるダイオキシン類に対する感受性の差について分子的根拠を調査しました。これはサイベル・カーシュナーとダイアナ・フランクスが行った研究です。シロイルカやアザラシとは異なり、*in vivo* および *in vitro* による鳥類の研究のデータが存在し、それらのデータを用いてダイオキシン様化学物質に対する鳥類の感受性を直接比較することができます。これらの研究では、アジサシはダイオキシン類の影響に対してニワトリより 80 分の 1 の感受性しかないことが示されています。我々は、その差が部分的にはこれらの 2つの種の Ah 受容体の特性の差に起因するものかどうかを検討しました。

この疑問への答えを得るため、我々は、アジサシとニワトリから AHR のクローンを作成し、*in vitro* でタンパクを発現させ、さきほどお話したショ糖密度勾配分析により [³H]TCDD の結合を測定しました。我々は、アジサシ AHR がニワトリ AHR やマウス AHR よりも TCDD へ結合しにくいことを確認しました。ニワトリ AHR とアジサシ AHR の結合親和性を測定するため、さきほどお話した飽和結合分析を行いました。実験では、アジサシ AHR の TCDD との結合親和性は、ニワトリ AHR の約 7 分の 1 の低さであることが示されました。この結果は、アジサシとニワトリとの間の AHR の特性の差が、（すべてではないが）少なくとも部分的には、ダイオキシン類に対する感受性の差であることを示しています。

意味

この情報はどのように利用されるでしょうか？冒頭で指摘しましたように、汚染物質の影響を理解することの困難な点の 1 つは、げっ歯類の研究結果から野生生物で観察される影響を推定することです。一部の研究者は「証拠を重視した」方法を提案しています。この場合、野生生物における疫学的研究やげっ歯類の研究から得られた機械論的なデータを含む様々なデータを考慮します。

我々は、ここで紹介した種類の相対的な生化学的情報と分子生物学的情報が、げっ歯類における機械論的研究と野生生物における疫学的研究または観察研究との間の「ギャップを埋める」のに役立つと考えます。野生生物における感受性遺伝子の研究は、外挿というプロセスに固有の不確定性を減らすことにより、外挿を容易にすることができました。このような相対的な分子的方法は、野生生物への内分泌攪乱化学物質の影響を調査するために使用されている他の方法を補うことができると思われます。このような方法（感受性遺伝子の研究）は、すでにヒトの健康リスクアセスメントで使用されています。

結論として、我々は以下を確認しました。

- クジラおよびアザラシは、陸棲哺乳動物の AHR と比べ、非常に持続性のある高い親和性を示す AHR を発現する。
 - シロイルカとマウスの AHR は PCB の構造と結合の関係が類似している。
 - 高親和性の AHR の存在は、鯨類と鰭脚類がダイオキシン様化学物質の影響に感受性が高い哺乳動物種であることを示唆している。
 - ニワトリ AHR とアジサシ AHR には、TCDD との親和性に 7 倍の差がある。この差は、すべてではないが少なくとも部分的には、ダイオキシンの影響に対する感受性の差に関係している。
- これらの結果は、全体として以下のことを示唆しています。
- 「証拠を重視した」方法の一部として、毒性機序に関するタンパク質の比較研究を外挿に役立てることができる。
 - AHR と他の受容体は、「ダイオキシン類」や他の内分泌攪乱化学物質に対する様々な種の感受性のバイオマーカーとして有用である可能性が高い。

最後に、本研究の資金を提供した米国国立衛生研究所と全国海洋研究助成金プログラムに感謝の意を表したいと思います。

質疑応答

井口：どうもありがとうございます

ダイオキシンレセプターは、市によってかなりダイオキシンの受け取り方が違うようですが、何かご質問がありましたら、マイクのところをお願いします。

ダストン：プロクターアンドギャンブル社のジョージ・ダストンです。非常に素晴らしい研究を行われていますね。実験動物研究から野生生物への外挿をどのように数量化するかについて、あなたは大変正しい道を進んでおられると思います。1つ質問ですが、恐らく核心的な疑問は、ばらつきの範囲はどのようになっているかということです。この場合は、AH受容体リガンドの親和性においては、適切な不確定性因子を外挿法に組み込むことができるような範囲ですか？

ハーン：それら特定種の個体間の範囲についておっしゃっているのですか？

ダストン：それは質問の1つですが、私が考えていたのは、リスクアセスメントをする際の日や科や綱といった動物種の間における範囲のことです。

ハーン：それには複数の答えがあります。哺乳動物においては、これまでに観察した哺乳動物の中では、親和性の範囲は一桁程度の範囲に過ぎないと思います。脊椎動物の中でも一般に同程度の範囲だと思えます。しかし、まだ観察していないグループが数多くあり、両生類などでは感受性はそれほど高くないと思います。

しかし、脊椎動物を超えて範囲を広げれば、かなり大きな差が観察されるようになります。我々は軟体動物からAH受容体のクローンを作成しましたが、我々が分かった範囲では、軟体動物のAH受容体クローンはダイオキシンのような化合物と結合する能力はありません。これは、リスクアセスメントの面やメカニズムおよび進化の面の両方で非常に興味深いと思います。従って、系統発生的な関連性によって範囲は大幅に異なるというのがご質問に対する答えだと思います。

井口：ほかにどなたかご質問は。どうぞ、関沢先生。

関沢：国立医薬品食品衛生研究所の関沢です。海棲哺乳動物は、ダイオキシン類よりもPCB類に曝露していると思うのです。従って、PCB類やダイオキシンへの曝露の完全な寄与率やその親和性の違いを比較すれば、これらの動物の感受性を説明できると思います。

ハーン：ご質問が良く理解できないのですが。

関沢：海棲哺乳動物は、特に極地域では、ダイオキシン類よりもPCB類に曝露していると思うのです。従って、親和性またはPCB類やダイオキシンの解離定数を比較すれば、PCB類とダイオキシン類の相対的寄与率が分かると思います。

ハーン：そうですね。我々が望んでいたのは、他の哺乳動物種におけるPCB類の結合親和性と比較すれば、相対的結合親和性における何らかの差が見られるのではないかということでした。そうなれば、海棲哺乳動物におけるダイオキシン等価量の計算がもっと正確に行うことができると考えました。そしてそれは、あなたが示唆された通り、PCB類が大部分を占めると思われます。

井口：ほかにございませぬか。ハーン先生は少し早く終えていただいたので、まだ質問の時間がたっぷりあります。ございませぬでしょうか。

私も質問があります。あなたはコプラーナーPCB類の結合親和性を調査しましたか？

ハーン：何についてですか？

井口：コプラーナーPCB類の結合親和性です。

ハーン：コプラーナーPCB類ですね。PCB 77、126、169についてしか行っていません。しかし、何れも我々がマウスで観察したことと非常に類似しています。

井口：ほかにございませぬでしょうか。では、どうもありがとうございました。