

## ダイオキシン類によるバイカルアザラシの肝チトクローム P450 への影響

岩田久人・岡島由佳・渡部真文・金 恩英<sup>1)</sup>・阪本智博・田辺信介・天野雅男<sup>2)</sup>・宮崎信之<sup>2)</sup>  
 (愛媛大・沿岸環境科学研究センター、<sup>1)</sup>愛媛県衛生環境研究所、<sup>2)</sup>東大・海洋研大植臨海研究センター)

[目的] バイカル湖では、1987年に8000頭のバイカルアザラシ(*Phoca sibirica*)が大量死した。この大量死は morbillivirus の感染が直接的な原因と報告されているが、ダイオキシン類等の環境汚染物質によるアザラシの免疫機能の低下がウィルス感染の引き金になったのではないかと考えられている。ダイオキシン類は生体内で aryl hydrocarbon receptor (AhR)を介し、チトクローム P450(CYP)1A/1B の誘導を含む多様な標的遺伝子の発現を制御する。CYP1A/1B の誘導に伴うこのような遺伝子発現制御の変調は、肝毒性・催奇形性・内分泌攪乱・免疫異常などの毒性発現と関連することが示唆されてきた。したがって、CYP1A/1B の発現量はダイオキシン類の体内暴露量や毒性影響の指標になると考えられている。そこで本研究では、ロシア・バイカル湖で捕獲したバイカルアザラシを対象に、ダイオキシン類の残留濃度と CYP の関係を解析することにより、毒性影響評価を試みた。

[試料と方法] バイカルアザラシは、1992年5月に捕獲した。肝臓のダイオキシン類は既報に従って抽出・精製し、高分解能ガスクロマトグラフ/質量分析計で定性・定量した。肝ミクロソームを調整後、CYP 依存性のエトキシレゾルフィン O-脱エチル化(EROD)活性を測定した。CYP 各分子種はウェスタンブロット法・ドットブロット法により検出した。RT-PCR および RACE 法により AhR の検出・塩基配列決定をおこなった。

[結果と考察] 肝臓中のダイオキシン類濃度と EROD 活性の関係を調べたところ、総 TEQ 値が低い場合、EROD 活性は TEQ 値の増加にともなって上昇したが、TEQ 値がさらに増加すると低減の傾向を示した。この結果より、低濃度暴露の場合は CYP 発現が誘導され、高濃度暴露では CYP 発現もしくはその機能が阻害されていると考えられた。一方、抗ラット CYP 抗体を用いた阻害実験から、EROD 活性には CYP1A および 1B の関与が示唆された。さらに、抗ラット CYP 抗体によって肝臓に発現している CYP の検出を試みたところ、CYP1A および 1B 様タンパクの発現を確認した。そこで、肝臓中のダイオキシン類濃度(TEQ 値)と CYP1A および 1B 様タンパク発現量の関係をスピアマン順位相関係数で検定したところ、両 CYP 分子種とも有意な( $p < 0.05$ )正の相関関係を示した。従って、バイカルアザラシの高濃度暴露群では、CYP タンパク発現レベルが低下しているのではなく、CYP1A もしくは 1B 様タンパクの機能が阻害されていると推察された。また、バイカルアザラシの AhR cDNA クローンを取ることに成功した。本種の AhR アミノ酸配列は、2,3,7,8-TCDD と結合親和性の強いゼニガタアザラシ AhR のアミノ酸配列と 98%の相同性を示した。以上の結果から、バイカルアザラシでは AhR—CYP1A/1B 系などの基本的な情報伝達機構が実験動物同様に保存されており、生体内のダイオキシン類による CYP1A/1B の誘導が示唆された。したがって、バイカルアザラシでは高濃度のダイオキシン類が AhR もしくは CYP1A/1B 介在性の情報伝達系を攪乱し、伺らかの毒性影響を及ぼしている可能性が高いと結論された。

### Effects of dioxins on hepatic cytochrome P450s in Baikal seals

Hisato Iwata<sup>1</sup>, Yuka Okajima<sup>1</sup>, Mafumi Watanabe<sup>1</sup>, Eun-Young Kim<sup>2</sup>, Tomohiro Sakamoto<sup>1</sup>, Shinsuke Tanabe<sup>1</sup>, Masao Amano<sup>3</sup> and Nobuyuki Miyazaki<sup>3</sup>

1) Center for Marine Environmental Studies, Ehime University, 2) Ehime Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, 3) Otsuchi Marine Research Center, Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Here we attempted to relate the hepatic levels of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyls in the Baikal seal (*Phoca sibirica*) population to certain biological responses such as the expression of cytochrome P450 (CYP). Baikal seals revealed an induction of hepatic microsomal EROD at lower TEQ levels (less than 200 pgTEQ/g wet

wt), and a decline at higher levels. Cross-reactive proteins with polyclonal antibody against rat CYP1A1 or CYP1B1 were notably detected in the seal liver microsomes. Significant correlations (Spearman rank correlation  $p < 0.05$ ) were detected between EROD activity and CYP1A or CYP1B protein levels. Both of anti-rat CYP1A1 and CYP1B1 antisera inhibited EROD activity, but anti-rat CYP2B1 antiserum showed no inhibition. These results indicate the functional inhibition of CYP1A and/or CYP1B isozyme(s), but not the suppression of CYP expression, by greater TEQ exposure. Furthermore, the cDNA encoding the aryl hydrocarbon receptor (AhR) from Baikal seal was identified. Our study reveals that the basic mechanism of AhR-mediated responses is conserved both in Baikal seal and experimental animals. Due to the interfering with AhR- and CYP1A/IB-mediated signaling pathways by dioxins, Baikal seal population may experience a serious threat from dioxins.