

ダイオキシン消耗性症候群に見られる細胞内 グリコーゲン減少における CYP1A1 の役割並びに CYP1A1-IRES ルシフェラーゼ試験法の開発

阪田 佳紀

キーワード： 化学物質、環境汚染、リスク評価、ダイオキシン、消耗性症候群、
CYP1A1、IRES、レポーターアッセイ

1. 研究背景、目的

ダイオキシンの毒性影響は非常に多岐に亘り、その毒性メカニズムを解明することは同様の症状を示す他の化学物質の毒性評価に適用できる可能性がある。また、レポーター試験は特定の遺伝子の発現に対して容易に毒性学の基盤である用量応答曲線を描くことができ、改良を加えることで動物種間の感受性差を評価できる可能性がある。本論文ではダイオキシン毒性の一つ消耗性症候群に見られるグリコーゲン減少メカニズムの解明と、新規試験系 IRES-Luciferase システムの開発を目的とした。

2. TCDD 消耗性症候群に見られるグリコーゲン減少メカニズムの解明

消耗性症候群はダイオキシンの究極の毒性である死に見られる体重減少のことであり、その際グリコーゲンの減少が見られる。ダイオキシンに関する毒性の文献調査から、シトクロム P450s タンパクの発現によりヘムが枯渇し、それによってヘム合成経路、クエン酸回路の過剰促進が行われることでグリコーゲンが減少していると仮説を立てた。まずダイオキシンと同じ AhR リガンドである β -naphthoflavine を細胞に曝露したところ、経時的にグリコーゲンの減少が見られた。また、ヒト、マウス、ラットの肝細胞での比較を行ったところ、CYP1A1 の活性とグリコーゲンの減少率に相関が見られた。そしてヘム合成経路、クエン酸回路を繋ぐアミノレブリン酸合成酵素を RNA 干渉によって阻害したところ、 β -naphthoflavone によるグリコーゲンの減少が見られなくなった。

3. 新規試験系 IRES-Luciferase システムの開発

従来のレポーター試験系を改良し、IRES 配列を用いることでより生体に近いと考えられる、遺伝子内部配列による転写活性への影響を測定する IRES-Luciferase システムを考案した。ダイオキシン毒性の生物学的指標として考えられる CYP1A1 遺伝子を様々な部位で切断し作成したプラスミドを細胞に導入したところ、転写後調節機構であるイントロン切除が正確に行われていることが確認された。また、IRES-Luciferase システムでは AhR リガンドである 3-methylcholanthrene を曝露したとき、含む遺伝子の長さに依存してルシフェラーゼ活性が低下することが確認された。しかし、同程度の長さであり CYP1A1 第一イントロンを含むものと含まないものを比較したところ、前者の方がルシフェラーゼ活性が低かった。

4. 結論

細胞による実験系で仮説の経路阻害を行い、ダイオキシン受容体 (AhR) リガンドによるグリコーゲン減少はヘム合成経路からクエン酸回路を通して行われることが確認された。また、CYP1A1 タンパクの活性とグリコーゲン減少率に相関が見られた。

ダイオキシン毒性の生物学的指標として考えられる CYP1A1 遺伝子を用いたところ、実際の生体と同じ転写後調節機構が確認され、また CYP1A1 内部配列転写活性を抑制する働きがあることを検出した。