

様式 3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」
共同研究報告書

平成 29 年 2 月 28 日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者）

所属機関 愛媛大学大学院農学研究科

職 准教授

氏名 石橋 弘志

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

残留性有機汚染物質による PPAR α 活性化能の比較生物学的解析

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者 石橋 弘志	愛媛大学大学院農学研究科	准教授	cDNA クローニング
分担者 平野 将司	熊本高等専門学校	講師	アミノ酸配列解析
拠点対応教員 岩田 久人	愛媛大学沿岸環境科学研究センター	教授	

3 研究内容 （別紙）

3-1 研究課題名

残留性有機汚染物質による PPAR α 活性化能の比較生物学的解析

3-2 共同研究者名（所属を含む）

平野 将司（熊本高等専門学校）

3-3 研究目的

ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) などの臭素系難燃剤 (BFRs) やペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) などの有機フッ素化合物 (PFCs) は、ストックホルム条約により新たな残留性有機汚染物質 (new POPs) として指定され、高い学術的・社会的関心を集めている。これまで new POPs による地球規模での汚染現状を明らかにするため、化学分析による濃度分布や環境動態、さらには生物蓄積などに関する研究が行われてきた。しかし、new POPs の毒性影響に関する知見は限定的であり、ストックホルム条約の目的である「人の健康の保護」に加え「環境の保護」を推進するためには、生物多様性の保全を考慮し、多種多様な生物種を対象とした new POPs の毒性影響評価やその毒性発現機序の解明、さらにはリスク評価を行うことが極めて重要である。

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) は核内受容体スーパーファミリーに属し、糖・脂質代謝に関与する種々の標的遺伝子を調節する転写因子である。哺乳動物では3種類のサブタイプ (PPAR α , β/δ 及び γ) が存在する。ペルオキシソーム増殖因子は、脂肪酸結合タンパク質、アシル CoA オキシダーゼなど脂肪酸輸送関連タンパク質やペルオキシソーム性 β 酸化酵素の発現レベルを変化させ、齧歯類では肝細胞の増殖、アポトーシスの抑制、肝腫瘍の形成などの毒性を示すことが知られている (Peraza *et al.*, Toxicol. Sci., 2006)。これらの毒性作用の発現には PPAR α の介在が必要であり、PPAR α 欠損マウスではペルオキシソーム増殖因子による肝腫瘍の発現はみられない。これまで new POPs を対象とした研究では、PFCs によるマウスやヒトの PPAR α の活性化が明らかにされており (Peraza *et al.*, Toxicol. Sci., 2006)、ヒト培養細胞系を用いた研究では、POPs に指定され

ているポリ塩化ビフェニル (PCBs) で誘導された炎症やアテローム性動脈硬化に対する PPAR α の関与が示唆されている (Arzuaga *et al.*, Cardiovasc. Toxicol., 2007)。このことは、PFCs や PCBs が PPAR α を起点とした情報伝達機構を攪乱し、生理機能の生体恒常性に影響することを意味している。しかしながら、PCBs と化学構造の類似した BFRs などの new POPs について、PPAR α シグナル伝達系に与える影響を調査した研究はほとんどない。

申請者は、これまでにロシア・バイカル湖に生息する水棲哺乳類バイカルアザラシを対象として、PFCs の汚染実態や蓄積特性を明らかにした (Ishibashi *et al.*, Environ. Sci. Technol., 2008a)。一方、PFCs の潜在的な毒性影響を解明するため、アザラシ PPAR α の完全長 cDNA クローニングを試み、水棲哺乳類で世界初となる単離に成功した (Ishibashi *et al.*, Environ. Sci. Technol., 2008b)。また、野生集団のアザラシ肝臓中の PPAR α 遺伝子と薬物代謝酵素チトクローム P450 4A (CYP4A) タンパク質は、蓄積した PFCs によって発現が誘導されていることを明らかにし、*in vitro* レポーター遺伝子アッセイ系を用いて PFCs による PPAR α 依存的標的遺伝子の活性化も証明した (Ishibashi *et al.*, Environ. Sci. Technol., 2011)。

そこで水棲哺乳類だけでなく、系統学的・生態学的に重要な多種多様な生物種を対象として、PPAR α を介した情報伝達機構に対する new POPs の影響を評価するため、本研究ではイヌに着目した。伴侶動物であるイヌは、ヒトと生活環境を共有しているため、ヒトの生活環境から検出される化学物質に曝露されやすいと考えられる (Storelli *et al.*, Sci. Total Environ., 2009)。これまでイヌ血清中の平均 PFCs 濃度は PFOS の 25 ng/mL (濃度範囲: 12-57 ng/mL) が最も高く、次いで PFHxS の 10 ng/mL (濃度範囲: 0.89-32 ng/mL)、PFNA の 3.5 ng/mL (濃度範囲: 0.16-8.5 ng/mL)、PFOA の 2.5 ng/mL (濃度範囲: 0.12-9.4 ng/mL) の順で検出され、生体影響が懸念されている (Guruge *et al.*, Chemosphere, 2008)。今回は PPAR α cDNA をクローニングし、その推定アミノ酸配列の解析を行った。

3-4 研究内容

LaMer から分与された肝臓試料を用い、試料は RNA 抽出時まで -80℃ で保存した。遺伝子クローニングは、既報 (Ishibashi *et al.*, Environ. Sci. Technol., 2008a) に従い、肝臓から total RNA を抽出し、mRNA を精製後、RT-PCR 法にて部分配列を得て、5'-および 3'-RACE 法により、全長の塩基配列を決定した。なお、推定アミノ酸配列の解析は、MacVector ver. 15.1.5 を用いて実施した。

3-5 研究成果

肝臓試料から PPAR cDNA の全長クローニングを行った。得られた塩基配列は 1407 bp の Open Reading Frame を有し、468 個のアミノ酸残基をコードしていた。本研究で単離した PPAR と他の脊椎動物 PPAR α 分子種のアミノ酸配列を用いて系統学的解析を行ったところ、PPAR のアミノ酸配列は PPAR α clade に属することが確認できた。

そこで、これまで報告されている他哺乳類の PPAR α 分子種のアミノ酸配列との相同性を比較したところ、domestic cat、Amur tiger、Pacific walrus および Baikal seal と最も相同性が高く (98%)、ついで human (95%)、rat (91%) および mouse (90%) の順であった (図 1)。また、各 domain の相同性比較では、すべての哺乳類 DNA-binding domain (C domain) では 97% 以上の高い相同性

を示し、ligand binding/dimerization domain (E/F domain) では domestic cat、Amur tiger、Pacific walrus および Baikal seal と 99% の高い相同性を、他の哺乳類とは

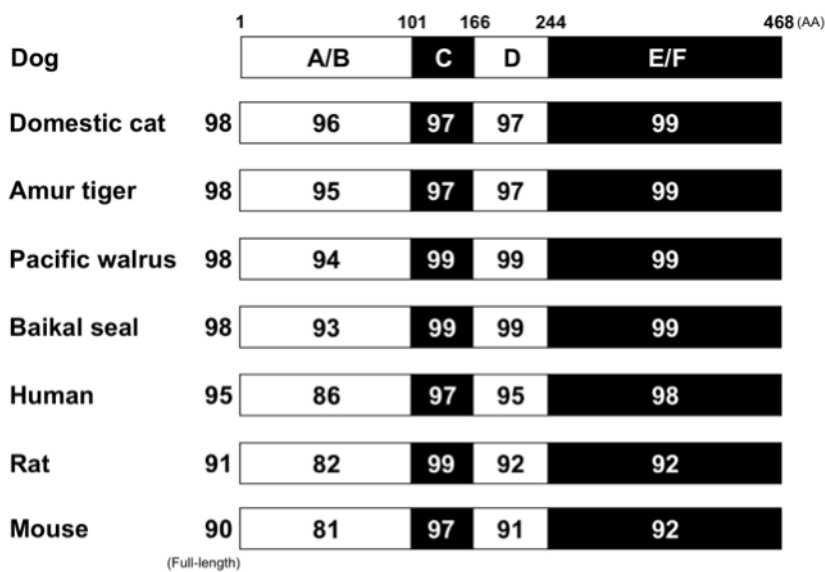


図 1 各生物における PPAR α アミノ酸配列の相同性比較 (%)

92-98%の相同性を示した。これらアミノ酸配列の種間比較の結果から、PPAR α 分子種は哺乳類間で高く保存されていることが明らかとなった。

しかしながら、E/F domain におけるアミノ酸配列の相違は、リガンドプロファイルの差として反映されることが報告されている (Nagasawa *et al.*, Biochem. Pharmacol., 2004)。PPAR α リガンドとの反応に関与すると推測される 272/279 番目のアミノ酸は、dog では domestic cat や human と同様に Ile/Thr であり、rat や mouse (Phe/Met) と異なっていた。これらのことから、dog は rat や mouse などの実験動物とは異なる PPAR α リガンドプロファイルを示すと考えられた。

	266		276		286
Dog	K E A E V R	I	F H C C Q C	T	S V E T V T E
Domestic cat	K E A E V R	I	F H C C Q C	T	S V E T V T E
Amur tiger	K E A E V R	I	F H C C Q C	T	S V E T V T E
Pacific walrus	K E A E V R	I	F H C C Q C	T	S V E T V T E
Baikal seal	K E A E V R	I	F H C C Q C	T	S V E T V T E
Human	K E A E V R	I	F H C C Q C	T	S V E T V T E
Rat	K E A E V R	F	F H C C Q C	M	S V E T V T E
Mouse	K E A E V R	F	F H C C Q C	M	S V E T V T E

図2 各生物の PPAR α リガンド感受性に関与すると考えられるアミノ酸の比較

3-6 今後の課題

PPAR α cDNA クローンを用いたレポーター遺伝子アッセイ系を構築し、new POPs による転写活性化能を測定する。また、PPAR α アミノ酸配列の 272/279 番目を変異したドメインの作製を試み、PPAR α のリガンドに対する感受性や種間差を明らかにする必要がある。

3-7 成果発表リスト（論文・学会発表など）

該当なし