

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 30年 3月 20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 帯広畜産大学

職 助教

氏名 川合 佑典

e-mail ykawai@obihiro.ac.jp

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

古代魚ポリプテルスにおける AhR の機能解析：魚類 AhR の進化と機能

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者 川合佑典	帯広畜産大学・獣医学研究部門	助教	
分担者 久保田彰	帯広畜産大学・獣医学研究部門	准教授	
石川裕介	帯広畜産大学・共同獣医学課程	共同獣医学課程 6年	
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）

研究課題名：古代魚ポリプテルスにおける AhR の機能解析：魚類 AhR の進化と機能

Functional analysis of AhR in Senegal bichir (*Polypterus senegalus*): AhR evolution and function in fish

【共同研究者名】

代表者：川合佑典 帯広畜産大学 獣医学研究部門 助教

分担者：久保田彰 帯広畜産大学 獣医学研究部門 准教授

分担者：石川裕介 帯広畜産大学 共同獣医学課程 共同獣医学課程 6年

拠点对応教員：岩田久人 愛媛大学 沿岸環境科学研究センター 教授

【研究目的】

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) は多環芳香族炭化水素を認識し、異物代謝第 I 相ではたらく cytochrome P450 1 family や第 II 相ではたらく UDP-glucuronosyltransferase (UGT) を誘導する。このような機構は哺乳類から魚類まで共有されているが、AhR にはいくつかの種類が存在し (AhR, AhR2 など)、異物代謝酵素の誘導に関わる受容体の種類には種差が存在する。本研究では、条鰭魚類の系統で起こった全ゲノム重複が AhR の機能に影響を与えたという仮説を立て、全ゲノム重複が起こる前に他の条鰭魚類と分岐したポリプテルスに注目し、AhR の転写調節機能について解析を行った。

【研究内容】

ハイスループットシーケンス (Illumina, HiSeq 2500) により肝臓・脳についてトランスクリプトーム解析を進め、AhR 及び AhR によって誘導を受けやすい可能性が高い CYP 遺伝子を同定した。またポリプテルスを 5 個体ずつ 3 群に分け、それぞれコントロール (コーン油)、beta-Naphthoflavone (BNF) 低濃度 (7 mg/kg)、高濃度 (70 mg/kg) を腹腔投与し、CYP 遺伝子、AhR 受容体の発現誘導を定量的リアルタイム PCR 法 (Roche, LightCycler® 96) により測定した。

【研究成果】

まずポリプテルス肝臓と脳に発現する AhR 遺伝子および CYP 遺伝子について、高機能シーケンサー (Illumina, HiSeq 2500) で配列解析及び、基礎的発現パターンの解析を行った。その結果、2 種類の AhR (AhR、AhR2) 及び Pregnane X Receptor (PXR)、19 種類の CYP 遺伝子 (CYP1B1, 2K-like, 2P-like, 2U1, 2V1, 2Y-like (12 配列), 2AA-like, 3C-like) を同定した。また定量的 PCR により肝臓での基礎的遺伝子発現パターンを測定した。ポリプテルス肝臓では AhR が AhR2 よりも発現量が高い傾向が示された (図 2)。また CYP 遺伝子は CYP2Y 分子種群が優位に発現していることが明らかとなった (図 3)。

さらに、一般的に脊椎動物で AhR リガンドとして知られる BNF を腹腔投与し、AhR および CYP 遺伝子の発現量の変動を測定した。その結果、わずかな

がら、AhR 遺伝子の mRNA が濃度依存的に発現量を減少させる結果となった (図 3)。しかし CYP1B1 遺伝子及びレアミノウにおいて AhR リガンドによって誘導されることが報告されている CYP2Y 分子種は BNF によって誘導を受けなかった。

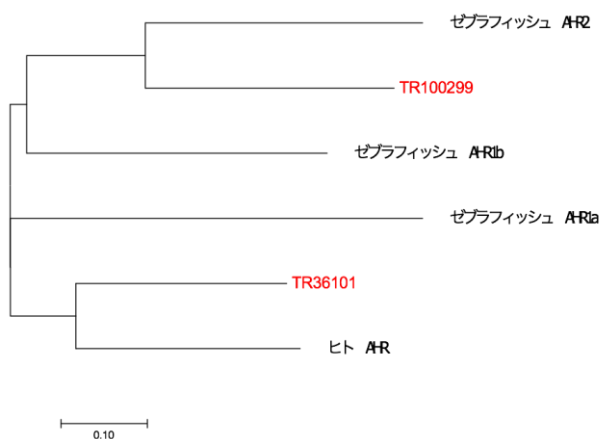


図 1. ポリプテルス AhR の同定
TR36101: ポリプテルス AhR、TR100299: ポリプテルス AhR2

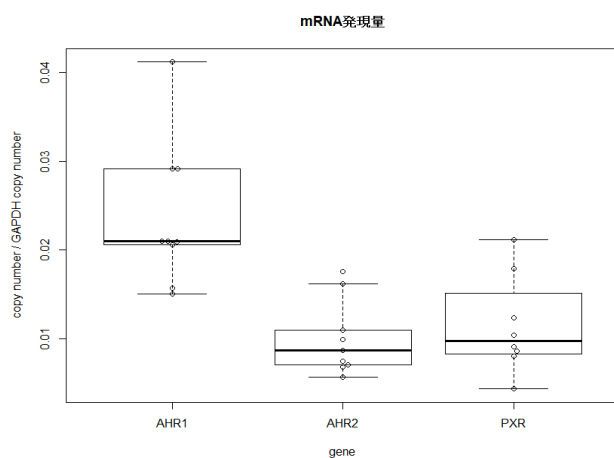


図 2. ポリプテルス肝臓における AhR、PXR mRNA の基礎的発現量

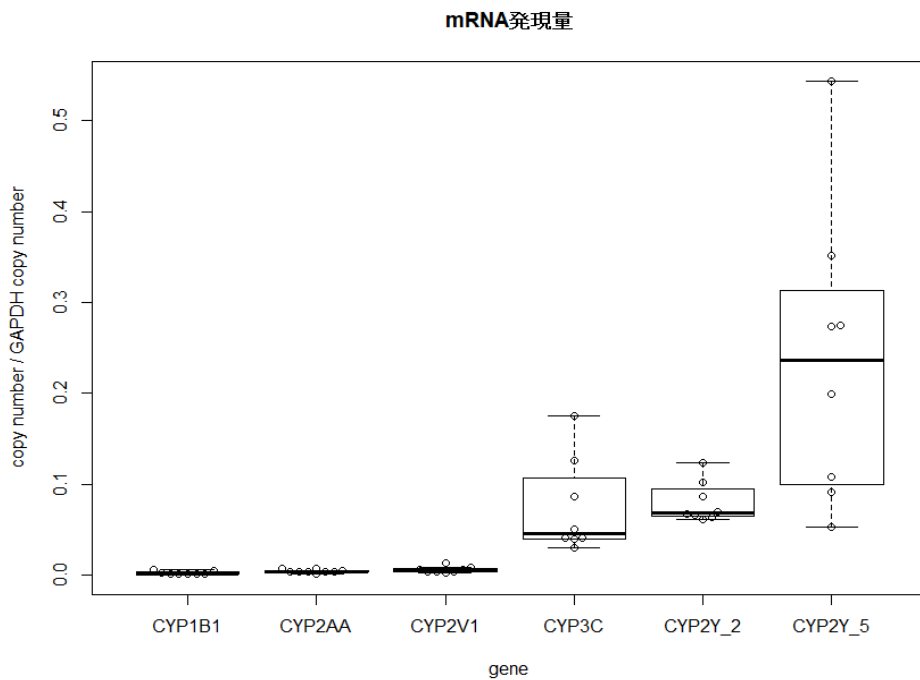


図 3. ポリプテルス肝臓における CYP 遺伝子 mRNA の基礎的発現量

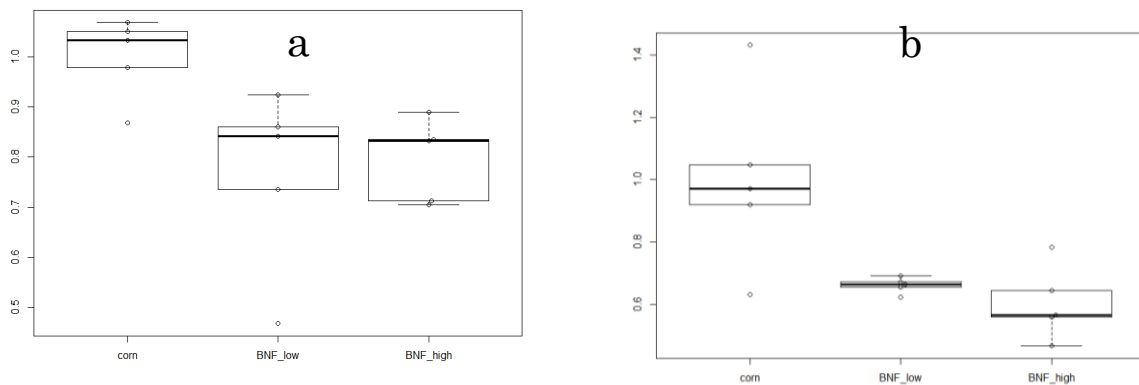


図 4. BNF 投与による AhR の発現変動

BNF_low: 7 mg/kg 腹腔投与群、BNF_high 70 mg/kg 腹腔投与群。a) AhR の発現変動 b) AhR2 の発現変動

【成果発表】

現時点でなし

【今後の問題点】

ポリプテルスの肝臓において AhR と AhR2 のどちらが異物代謝の制御に大きく関わっているかを明らかにするために CYP1A のクローニングを行う必要が

ある。今後、BNFを腹腔投与した個体及び、ベンゾピレンの水性暴露を行った個体から CYP1A の degenerate primer を用いたクローニングを行う予定である。CYP1A 遺伝子のクローニングが成功した後は、CYP1A 遺伝子上流域のゲノム配列を同定し、AhR を用いたレポーターアッセイを行う。