

古代魚ポリプテルスにおける CYP1-3 subfamily のキャラクタライゼーション
Characterization of CYP1-3 subfamily genes in Senegal bichir (*Polypterus senegalus*)

【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：芳之内結加 愛媛大学 沿岸環境科学研究センター 博士課程後期3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 (CYP1) などを誘導する。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, AhR1, 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。申請者らは、既にポリプテルス肝臓に発現する CYP 遺伝子を同定し、それら遺伝子の一部の肝臓での発現量パターンを明らかにした。

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 および CYP 遺伝子の機能に及ぼした影響を明らかにするため、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、CYP 分子種の臓器別の発現分布および AhR の転写調節機能について解析を行った。

【研究内容】

まず既に同定されている CYP 分子種の臓器別の発現量を明らかにするため、成魚8個体から採材した臓器サンプル(肝臓・脳・肺・腎臓・腸)から total RNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR 法 (Roche, LightCycler® 96) により臓器別の発現量を測定した。また AhR による誘導を強く受けることが知られている CYP1A 遺伝子はポリプテルスでは未同定のため、他の魚類、及びネッタイツメガエルの CYP1A 配列から degenerate primer を作成しそのクローニングを試みた。

AhR による転写調節機能についての解析では、AhR リガンドによるポリプテルスへの影響を調べるための予備実験として、ポリプテルスをコントロール (N=2)、1週間 (N=1)、2週間 (N=2) に分け、高濃度ベンゾ-a-ピレン (B[a]P 100 µg/L) を水性暴露し、肝臓及び腸における AhR、AhR2、及び CYP1B1 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。さらに AhR、AhR2 について、THS リガンドと結合した HIF-2α PAS B ドメインをテンプレートとして、ホモロジーモデリングを行い、B[a]P とのドッキングシ

ミュレーションを行った。

【研究成果】

1) CYP 分子種の臓器発現分布

すでに、同定していた CYP1B1、CYP2AA、CYP2Y_2、CYP2Y_5、CYP3C について、リファレンス遺伝子を GAPDH、肝臓での発現量を 1 とし、 $\Delta\Delta Ct$ 法により臓器別の発現分布を明らかにした (図 1)。AhR による転写制御を受けることが考えられる CYP1B1 については、肝臓での発現も見られるが、脳、及び腸で比較的高く発現している可能性が示された。ゼブラフィッシュでは複数の CYP2AA 分子種が存在するが、ポリプテルスでは一種のみの CYP2AA 分子種が同定され、その臓器分布は腸と腎臓で高く、ゼブラフィッシュの CYP2AA1 と CYP2AA2 の臓器分布を併せたような特徴を示した。CYP2Y について、ゼブラフィッシュが CYP2Y3 の一分子種のみを持つのに対し、ポリプテルスでは 12 の分子種が同定された。今回 CYP2Y_2 と CYP2Y_5 の臓器発現量を測定したところ、それぞれ優位に発現する臓器が異なり、ポリプテルスの系統で CYP2Y が機能分化を起こしていることが示唆された。

2) CYP1A のクローニング

複数の魚類、及びネッタイツメガエルの CYP1A 配列から CYP1A の degenerate primer を設計し、ポリプテルス CYP1A 遺伝子のクローニングを試みたが、設計したプライマーからは目的遺伝子を増幅することができなかった。

3) AhR 及び AhR2 の臓器発現分布

AhR 及び AhR2 について、臓器発現分布をそれぞれの遺伝子について測定した (図 2)。発現分布のパターンとしては 2 遺伝子とも似た傾向を示し、脳で発現が比較的高く、肺での発現は低いものの、全臓器で発現が見られるというパターンを示した。

4) B[a]P の水性暴露

B[a]P (100 $\mu\text{g/L}$) をポリプテルスに 1 週間 (N=1) 及び 2 週間 (N=2) 水性暴露し、肝臓と腸での AhR、AhR2、CYP1B1 の発現誘導を測定した (図 3)。肝臓では 1 週間暴露では発現誘導は見られず、2 週間暴露では 1 個体のみ発現誘導が起きるといった結果がしめされ、明らかな誘導は見られなかった。一方、腸においては、2 週間暴露個体では、AhR の誘導は見られなかったが、AhR2 が 2~3 倍、CYP1B1 が 7~10 倍の誘導傾向を示した。なお、1 週間暴露個体の腸から RNA は抽出できなかった。これらの結果からゼブラフィッシュと同様ポリプテルスにおいても AhR2 の自己誘導が起こることが示唆さ

れた。今後、B[a]Pの濃度を50 µg/L、100 µg/Lとし、2週間の水性暴露による遺伝子の誘導反応を明らかにする計画である。

5) AhR、AhR2とB[a]Pのドッキングシミュレーション

AhR、AhR2とリガンドであるB[a]Pのドッキングシミュレーションを行った(図4)。その結果、ドッキング時のエネルギー状態はAhRとAhR2の間でほぼ同じであり、リガンドとの結合にはAhRとAhR2間で、差がないことが示唆された。

【成果発表】

現時点でなし

【今後の問題点】

ポリブ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。CYP1Aのdegenerate primerを用いたクローニングでは目的遺伝子を増幅できなかったため、B[a]P暴露によって得られた臓器サンプルを対象に高機能シーケンス解析を行い、AhRリガンドによる影響をトランスクリプトームレベルで明らかにする予定である。またAhR2の自己誘導が示唆されたため、AhR、AhR2の遺伝子上流域のゲノム配列を同定し、AhR及びAhR2を用いたレポーターアッセイを行う。

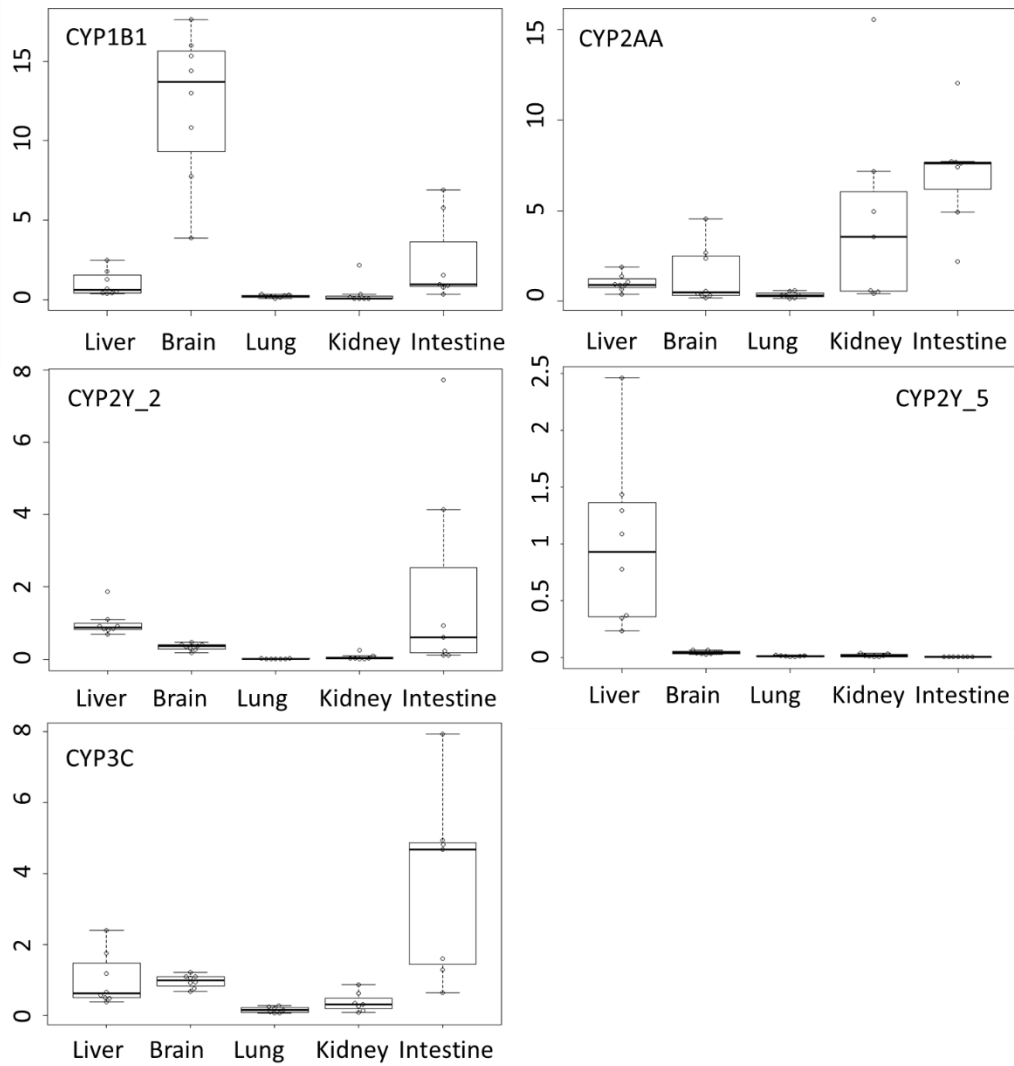


図 1. CYP 分子種の mRNA 臓器発現分布. GAPDH をリファレンス遺伝子、肝臓での発現量を 1 としたときの相対発現量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) を示す。

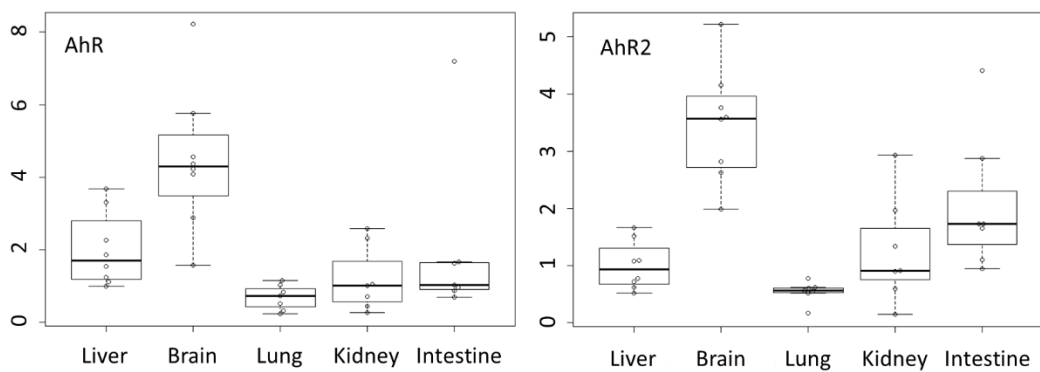


図 2. AhR、AhR2 の臓器発現分布. GAPDH をリファレンス遺伝子、肝臓での発現量を 1 としたときの相対発現量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) を示す。

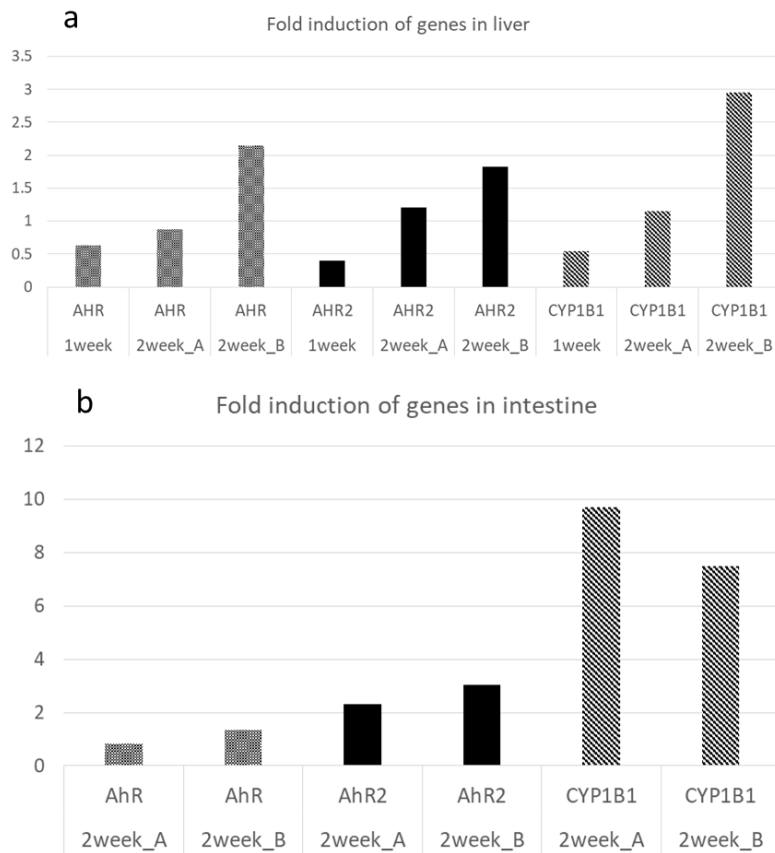


図 3. AhR リガンドによる遺伝子誘導.

B[a]P(100 μg/L)を1週間及び2週間水性暴露した後の肝臓 a)または腸 b)での遺伝子誘導を示す。GAPDHをリファレンス遺伝子、コントロールの群(N=2)の発現量を1としたときの相対発現量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)を示す。

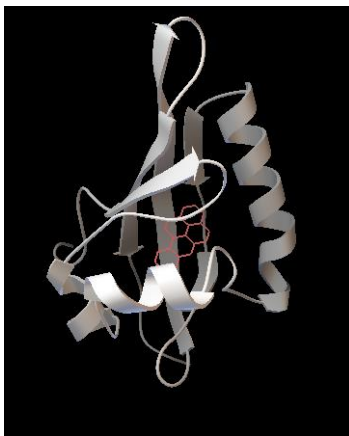


図 4. AhR2 と B[a]P のドッキングシミュレーションホモロジーモデリングによって得られた AhR2 のリガンド結合部位と B[a]P との結合状態を示す。