

鳥類グルクロン酸抱合酵素 (UGT) と哺乳類 UGT の収斂進化の検証

川合佑典¹⁾、生城真一²⁾、久保田彰¹⁾、山本周平³⁾

¹⁾ 帯広畜産大学・獣医学研究部門、²⁾ 富山県立大学・工学部生物工学科、³⁾ 帯広畜産大学・共同獣医学課程 (指導教員: 久保田彰)

【研究目的】

生物は外来異物を代謝・排泄するため、異物代謝システムを有している。脊椎動物のグルクロン酸抱合酵素 (UDP-glucuronosyltransferase: UGT) は異物代謝に関わり、外来化学物質にグルクロン酸を抱合し、その水溶性を高めることで体外に排泄しやすくする機能をもつ。哺乳類では UGT1A subfamily と UGT2B subfamily に属する遺伝子が主に異物代謝にかかわり、肉食性の動物で UGT 遺伝子数が減少し、その抱合活性が低下していると考えられている (Kakehi et al. *Toxicol. Sci.*, 2015; Kondo et al. *Toxicol. Sci.*, 2017)。一方、鳥類では哺乳類の UGT1A 遺伝子群とは独立して進化した UGT1E subfamily 遺伝子が異物代謝に関わり、UGT2 family 遺伝子は異物代謝には関わっていないことがその遺伝子数等から示唆されている (Kawai et al. *PLoS One*, 2018; Kawai et al. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 2019)。

哺乳類 UGT2B subfamily が多様化している一方で、鳥類 UGT2 family が鳥類内で一様であることから (1) 鳥類は哺乳類 UGT2Bs が抱合する化学物質を抱合できず UGT2Bs が抱合する化学物質に対し感受性が高い可能性、または (2) 鳥類 UGT1Es が、UGT2Bs が抱合する化学物質の抱合も担っているという 2 つの可能性が考えられる。鳥類と哺乳類で独立して進化した UGT1 family と UGT2 family 遺伝子について、本研究では鳥類 UGT1E 遺伝子群が哺乳類 UGT1A および UGT2B 遺伝子群と機能が類似しているという (2) の収斂進化の可能性を検証するため、ニワトリ UGT1Es が哺乳類 UGT1As・UGT2Bs と同じ性質を有するか否かについて検証を試みた。

【研究内容】

哺乳類 UGTs との比較を行うため、ニワトリを鳥類のモデル動物とし、UGT の立体構造予測、化学物質によるニワトリ UGT 遺伝子誘導およびニワトリ UGT の酵母発現を行った。まずニワトリ UGTs の立体構造について AlphaFold2 を用いて予測するとともに、AlphaFold2 データベースに公開されているヒト UGTs の立体構造と比較を行った。

次に UGT 発現制御について比較を行うため、哺乳類で Aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介した遺伝子誘導を行う物質であるスダン III をコーン油に溶解し、2 段階の濃度 (10 mg/kg、40 mg/kg) で調製した。8 週齢のニワトリのオス

に対し、溶媒対照またはスダン III を経口投与し、各 UGT 遺伝子の発現量を定量的リアルタイム法により測定した。また各ニワトリ肝臓ミクロソームを調製し、4-メチルウンベリフェロン (4-MU) に対するグルクロン酸抱合活性を励起波長 360 nm、蛍光波長 460 nm の蛍光強度によって測定した。さらに誘導がみられた一部のニワトリ UGT について酵母発現を行った。

【研究成果】

哺乳類 UGTs とニワトリ UGTs の立体構造について AlphaFold2 を用いた解析を行ったところ、ヒト UGT2Bs の基質認識に関わる N 末端領域においてヒト UGT1As、UGT2As およびニワトリ UGT1Es、UGT2s に見られないヒンジ領域を持つことが示された (図 1)。この立体構造予測の結果からニワトリ UGT1Es、UGT2s は哺乳類 UGT2Bs が抱合できる基質を抱合できないことが考えられた。

スダン III の投与により、オスのニワトリ肝臓において *UGT1E7*、*UGT1E8*、*UGT2-1* の発現誘導が見られた (図 2)。また肝臓ミクロソームを用いた 4-MU の抱合活性試験ではスダン III 高濃度投与群において活性値の上昇がみられた (図 3)。これらの結果からニワトリ *UGT1E7*、*UGT1E8*、*UGT2-1* は AhR を介した遺伝子発現調節を受ける可能性が高いこと、特に大きく誘導を受けた *UGT1E8* については 4-MU の代謝に関わる可能性が高いことが考えられた。哺乳類では AhR を介して *UGT1A1*、*UGT1A6*、*UGT1A7*、*UGT1A8*、*UGT1A9*、*UGT1A10*、*UGT2B35* といった UGT 分子種が誘導を受けることが報告されている (Meech et al. *Physiol. Rev.*, 2019; Buckley and Klaassen *Drug. Metab. Dispos.*, 2009)。今回、スダン III によって大きく誘導された *UGT1E8* は哺乳類で AhR を介した誘導を受ける UGT 分子種と機能が類似している可能性が高いと考えられた。

ニワトリ *UGT1E8* が哺乳類で AhR を介した誘導を受ける UGTs と同じ基質を抱合できるか検討するため、*UGT1E8* タンパク質の酵母による異種発現を試みた。酵母異種発現による *UGT1E8* および *UGT1E7*、*UGT1E9*、*UGT1E11* の発現に成功し、すべての酵母発現 UGTs について 4-MU に対する抱合活性を確認した。現在、これらの酵母発現 UGT を使用し、*UGT1A6* の基質であるアセトアミノフェンや、*UGT2Bs* の基質であるロラゼパムなどの化学物質に対する抱合活性測定を進めている。

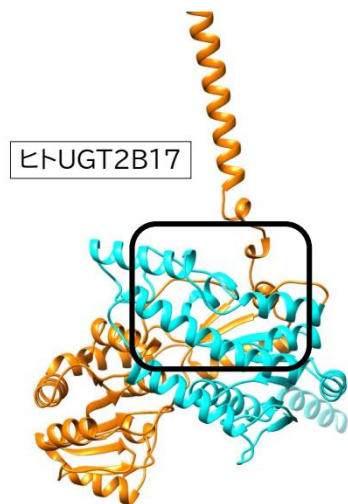


図1. ヒト UGT2B17 の予測立体構造。AlphaFold2 で予測された UGT2B17 の立体構造、青色は第 1 エキソンでコードされた基質認識に関わると考えられる N 末端側を、橙色は第 2-6 エキソンでコードされた補酵素の結合に関わると考えられる C 末端側を示す。黒枠で囲われた箇所は他のヒト UGT1As、UGT2As およびニワトリ UGT1Es、UGT2s には見られないヒンジ構造を示す。

<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/O75795>

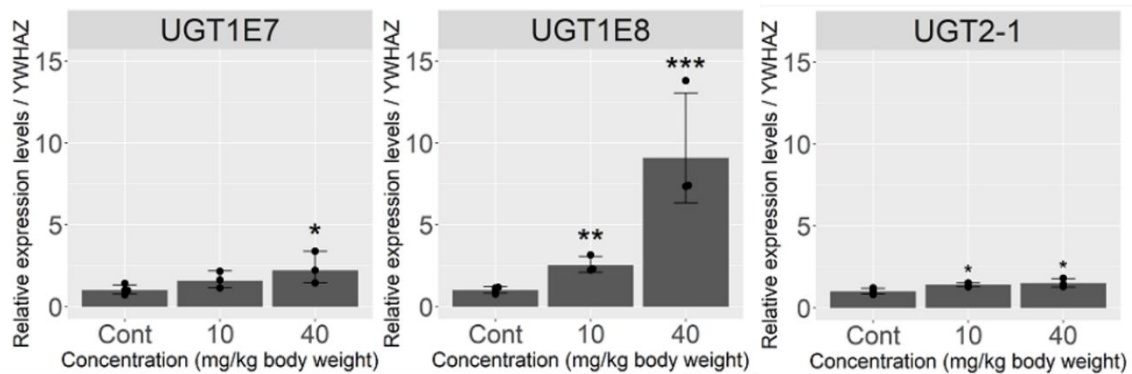


図2. スダン III 経口投与により有意に増加がみられた UGT 分子種。横軸に経口投与量、縦軸に溶媒コントロール（コーン油）を 1 とした各 UGT 遺伝子の相対発現量を示した。リファレンス遺伝子として *14-3-3 protein zeta/delta* (YWHAZ) を使用した。Ct 値に対し Dunnett 検定を実施した。*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 、***: $p < 0.001$

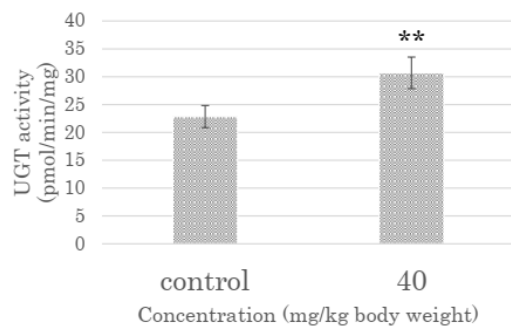


図3. 4-MU に対するグルクロン酸抱合活性。横軸に経口投与量、縦軸にグルクロン酸抱合活性値を示した。活性値の差について t 検定を実施した。**: $p < 0.01$

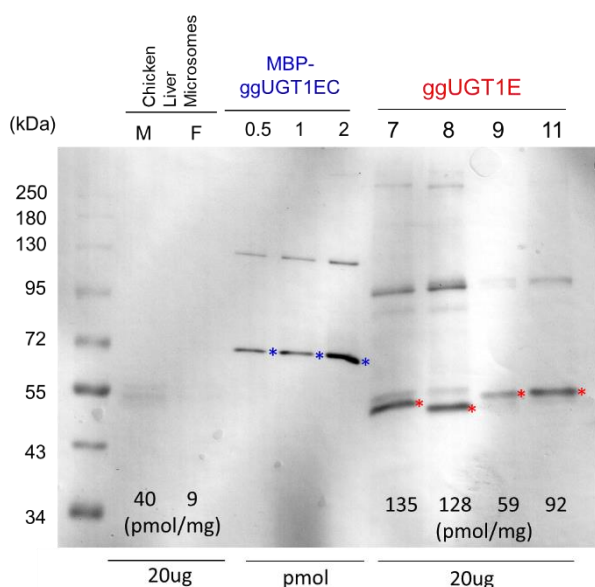


図 4. 酵母異種発現系を用いたニワトリ UGT1Es の発現。酵母異種発現させた UGT1Es について UGT1E 共通 C 末端領域に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングによる定量を行った。左からニワトリオスおよびメスの肝ミクロソーム、MBP (maltose binding protein) 融合ニワトリ UGT1E-C 末端領域、ニワトリ UGT1E UGT1E7、UGT1E8、UGT1E9、UGT1E11 を示す。

【成果発表】

学会発表

川合佑典, 池中良徳, 中山翔太, 久保田彰, 石塚真由美. 「ゲノムデータベースを利用した脊椎動物がもつグルクロン酸抱合遺伝子の進化解析」 第 23 回日本内分泌攪乱化学物質学会 2021 年 9 月, オンライン開催 (若手の会企画講演)

【今後の問題点】

ニワトリ UGT1Es とくに UGT1E8 が哺乳類 UGT1As、および UGT2Bs と類似した機能をもつか否か検証するため、今後は酵母発現タンパク質を使用し、哺乳類 UGT1As および UGT2Bs が代謝できる基質に対して抱合活性を持つか検証を行っていく必要がある。また鳥類と哺乳類のグルクロン酸抱合機能の進化を明らかにし、鳥類の化学物質への感受性を予測するためには、AhR を介した誘導だけでなく、他の核内受容体を介した誘導がニワトリ UGT に対して起こるか、そのニワトリ UGT が、同じ核内受容体によって発現制御される哺乳類 UGT と同様の機能を示すか検討を進めることも必要である。