

研究課題

ハロゲン化多環芳香族炭化水素の核内受容体に対する *in silico* 相互作用評価

代表研究者

神田 宗欣（国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構）

共同研究者

Keerthi S. Guruge（国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構）

岩田 久人（愛媛大学沿岸環境科学研究センター）

研究目的

ハロゲン化多環芳香族炭化水素（HPAHs）は、有機物の不完全燃焼で生成し、大気・河川・魚類・マイクロプラスチックなど世界各地のあらゆる環境・生物中から検出される環境化学物質である^{1),2),3)}。親化合物である多環芳香族炭化水素（PAHs）は、リガンド依存性核内受容体であるアリール炭化水素受容体（AHR）と相互作用し、その標的遺伝子であるシトクロム P450 1A1（CYP1A1）による代謝的活性化を受け、催奇形性や発がん作用を引き起こすことが知られている⁴⁾。したがって、HPAHs も AHR を介して毒性影響を発現することが予測される。しかし、特に次世代への影響を含め、HPAHs の動物に対する毒性情報は不足しており、産業動物や野生動物へのリスクを評価することが困難である。

本研究の目的は、HPAHs の一つである 1-クロロピレン（1-ClPyr）の発生毒性を評価することである。そのために 1-ClPyr を *ex ovo* ニワトリ胚に曝露し、無卵殻孵化システムを用いて表現型への影響を調査すると共に、ニワトリ胚の肝臓トランスクリプトーム解析および *in silico* 分子ドッキングシミュレーションにより毒性作用機構の解明を試みた。

研究方法

まず、ニワトリ胚を用いた 1-ClPyr 曝露試験を農研機構 動物衛生研究部門にて実施した。孵卵 0 日目のニワトリ有精卵に 0.001, 0.01, 0.1, および 1 nmol/g 卵の 1-ClPyr、または DMSO（対照群）を投与した。孵卵 56 時間後にニワトリ胚を無卵殻孵化装置に移動し、孵卵 3-9 日目に無卵殻ニワトリ胚を観察した。観察時の画像・動画記録から ImageJ を用いて画像解析を行い、生存率・体長・頭+嘴長・前肢長・後肢長・眼直径・心拍数・胚体外血管長を測定した。また、孵卵 9 日目の解剖時に体重・心重量・肝重量を計量した。

そして、孵卵 9 日目のニワトリ胚の肝臓から RNA を抽出し、RNA-seq および

肝臓トランスクリプトーム解析を行った。1-ClPyr 曝露による発現変動遺伝子 (DEGs) を同定し、KEGG パスウェイ解析を実施した。

次いで、愛媛大学沿岸環境科学研究センター 岩田久人教授の研究室にて、統合計算科学システム Molecular Operating Environment (MOE, CCG 社) を使用し、*in silico* 分子ドッキングシミュレーションを実施した。ニワトリの AHR1、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α (PPAR α)、およびレチノイド X 受容体 α (RXR α) におけるリガンド結合ドメインのホモロジーモデルを構築した。各ホモロジーモデルと 1-ClPyr・アゴニスト・アンタゴニスト間でのドッキングシミュレーションを実施し、結合ポテンシャルエネルギー (U_Dock; kcal/mol) を算出した。

研究成果

ニワトリ胚の生存率は、1-ClPyr 曝露による有意な影響を受けなかった (図 1A)。体長や心拍数では一部の曝露群・孵卵日数で有意な差があったが (図 1B&C)、他のエンドポイントでは顕著な変化は確認されず、1nmol/g 卵以下の 1-ClPyr 濃度では表現型への影響が小さいことが示唆された。

肝臓トランスクリプトームでは、予想に反して、AHR1 および CYP1A1 の遺伝子発現が 1-ClPyr 曝露群で有意な減少傾向を示した (図 1D)。さらに、PPAR α 遺伝子 (PPARA) および RXR α 遺伝子 (RXRA) の発現が有意に減少し、ミトコンドリアで脂肪酸の β 酸化を担う CPT1A などの PPAR α シグナル伝達経路関連遺伝子の発現が減少した (図 1D&E)。これらの結果から、1-ClPyr は生存率に影響を与えない濃度で AHR シグナル伝達経路および PPAR α シグナル伝達経路の機能を攪乱することが示唆された。

次に、*in silico* 分子ドッキングシミュレーションを実施した (図 1F)。1-ClPyr は AHR1 との U_dock 値が -27.12 kcal/mol であり、TCDD (-24.87 kcal/mol) やレチノール (-17.67 kcal/mol) よりも有意に低く、高い結合能を示した (図 1G)。PPAR α では、1-ClPyr の U_dock 値はアゴニストの Wy14643 やアンタゴニストの GW6471 よりも高値を示した。RXR α と 1-ClPyr との相互作用エネルギーは、アゴニストの 9-cis-レチノイン酸やアンタゴニストの PA452 と顕著な差はなかった。したがって、1-ClPyr は AHR1 および RXR α のリガンド結合ポケットと相互作用する可能性が考えられる。先行研究において、AHR をノックダウンさせたマウスは、CYP1A1、PPAR α 、および CPT1A 等の PPAR α 標的遺伝子の発現が抑制されることが報告されており⁵⁾、この結果は本研究の結果と一致している。したがって、1-ClPyr は AHR1 と相互作用することでその機能を阻害し、AHR1 によって調節される PPAR α シグナル伝達経路関連遺伝子の発現を攪乱させる可能性が考えられる。

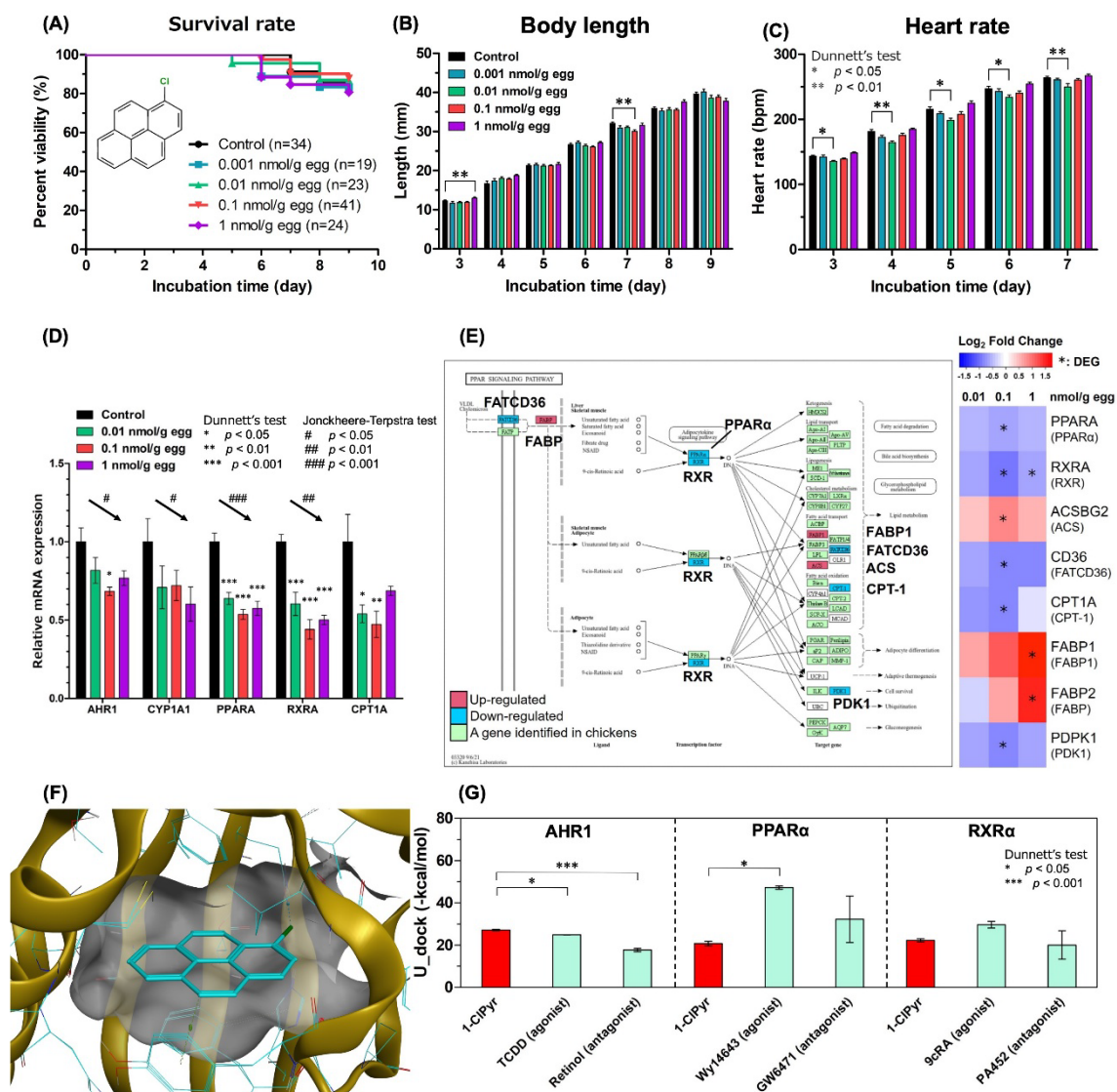


図 1. ニワトリ胚に対する 1-CIPyr 曝露による毒性影響。(A) 生存率, (B) 体長, (C) 心拍数, (D) AHR および PPAR α シグナル伝達関連遺伝子の相対的発現量, (E) PPAR シグナル伝達経路の KEGG パスウェイ解析結果, (F) AHR1 と 1-CIPyr のドッキングポーズ, (G) 核内受容体と 1-CIPyr との結合ポテンシャルエネルギー。

今後の課題

本研究により、1-CIPyr が AHR アンタゴニストである可能性が示唆されたが、AHR1 アゴニストとの共曝露試験などにより実証・確定する必要がある。また、ニワトリ胚の発生初期における毒性がみられたことから、発生が進んだニワトリ胚に対する 1-CIPyr 曝露の影響を評価する課題が残った。

引用文献

- 1) Ohura (2007) *TheScientificWorldJOURNAL* 7, 372–380.
- 2) Wickrama-Arachchige *et al.* (2020) *Environmental Pollution* 256, 113487.
- 3) Goswami *et al.* (2023) *Journal of Hazardous Materials* 460, 132502.
- 4) Head *et al.* (2015) *Environmental Science & Technology* 49, 6, 3787–3794.
- 5) Wang *et al.* (2011) *Environmental Health Perspectives* 119, 12, 1739–1744.