

【研究ノート】

環境汚染物質に対する動物の感受性の種間の差

平野将司^{リ*}

1 熊本高等専門学校生物化学システム工学科 〒866-8501 八代市平山新町 2627

要 旨

鳥類は、ダイオキシン類に対して、種によって異なる感受性を有することが知られている。ダイオキシン類は主にアрил炭化水素受容体 (AHR) を介して毒性を発現するが、ダイオキシンに対する生物の感受性を規定する分子機序については不明な点が未だに多い。これまでの研究から、鳥類 AHR はリガンド結合能を決定する2つのアミノ酸によって、高感受性型 (I324 と S380)、中間型 (I324 と A380)、低感受性型 (V324 と A380) の3種類に分類されることが明らかにされている。しかしながら、これらのダイオキシン結合における役割やその構造的相違については不明なままである。そこで、本研究では、それぞれ高感受性型、中間型、低感受性型を示すニワトリ、アホウドリ、カワウの AHR について、コンピューターシミュレーションの技法を用いてそれらの立体構造を構築し、鳥類間における比較を行った。TCDD-各鳥類 AHR の結合状態について、分子動力学計算により溶媒効果を調べ、鳥類間で比較したところ、ニワトリの高感受性型 AhR (I324 と S380) の Ser380 では、他の Ala380 と比較して良好な溶媒効果が期待できることが判明した。つまり、TCDD との相互作用が強固になるため、高感受性を示すことが明らかになった。

キーワード：AHR, 鳥類, ダイオキシン, 遺伝子型, 感受性

1 はじめに

筆者はこれまで環境中に存在する化学物質の生物に対する安全性・有害性について、細胞の核内受容体タンパク質との相互作用を中心に研究を行ってきた。核内受容体タンパク質とは、ステロイドホルモンや甲状腺ホルモンなど生理活性物質と結合して、細胞の核で新たな遺伝子合成を仲介する機能をもつ、発生・分化・恒常性・代謝などの生命現象に必須のタンパク質である。環境汚染物質が細胞内に取り込まれると、誤ってこの

核内受容体と結合することによって、恒常性維持に悪影響をもたらすことがある。そのため、環境汚染物質と細胞の核内受容体との相互作用の理解は、化学物質の生物界に及ぼす脅威という観点から、環境化学を志向する研究者には重要な研究課題の1つとなってきた。

本学会の活動の対象地域である不知火海・球磨川流域圏には、他種多様な生物が生息し、豊かな生態系を形成している。これらの生物の安定した生活の営みを長期的に保全し、我々もその恵みを楽しんでいくという観点からも、また、我々自身の健康な生活を維持していく観点からも、環境中

*Corresponding author: e-mail: hirano@kumamoto-nct.ac.jp

に存在する化学物質と自然環境・生態系の保全の関係について考える必要性が十分に認められる。そこで、今回寄稿した「研究ノート」では、環境問題の1つである環境汚染物質と生物の遺伝的背景の関わりを取り上げることとする。

遺伝子を構成するDNA配列の種差(種による差、遺伝子型)は、ある因子に対する動物の種類による感受性の違いを付与する。代表的な例として、アルコール感受性遺伝子(アルデヒドデヒドロゲナーゼ²⁾)が挙げられる。いわゆる、お酒に強い・弱いといった体質を決定する遺伝子型として広く知られている。これはヒトの疾病・健康に限ったものではない。環境中に生息する生物でも同様なことが規定されており、環境汚染物質に対する感受性も異なってくる。つまり、遺伝子型の変異がタンパク質の立体構造を変化させるため、ある環境汚染物質に対する受容体タンパク質の親和性が強くなったり弱くなったりすることで、毒性に差が生じてくることを意味する。本稿では、鳥類を題材として、環境汚染物質の代表例であるダイオキシンに対する感受性の種間の差について概説する。

II ダイオキシンによるAHR活性化

ダイオキシンは工業的に製造される化合物ではなく、焼却の過程などで非意図的に生成されるため、環境中に広く微量に存在するという特徴がある。毒性の強い化学物質であるが、塩素の数と位置により210個の異性体が存在し、その異性体の種類によって毒性の強さが大きく異なるため、毒性がもっとも強い2,3,7,8-TCDD^{注1)}(以下TCDDと略す)を毒性評価の基準としている¹⁾。

ダイオキシンは脂溶性が高く、生物の体内に蓄積されやすい。細胞中に取り込まれると、脊椎動

物では「アリル炭化水素受容体(AHR)」が受容体タンパク質となる。このタンパク質は、低次生物からヒトまで生物界に広く保存されている。細胞内ではダイオキシンと強力に結合し、シトクロムP450 1(CYP1)等の薬物代謝酵素の発現を誘導することで、ダイオキシン様化合物の毒性反応を媒介する(図1)。その他、サイトカインやシグナル伝達分子など多くの遺伝子の発現を活性化させることが知られている。近年では、自己免疫疾患との関連性も示唆されている²⁾。ちなみに、脊椎動物などの高等生物のAHRはダイオキシン結合能を有するが、下等な無脊椎動物(節足動物、線虫など)のAHRはダイオキシンと結合しないことから、AHRのダイオキシン結合能は進化の過程で獲得された細胞内の機能の1つと考えられている³⁾。

III 鳥類におけるダイオキシン感受性の種間差

ダイオキシンの生物毒性には種間差がある。鳥類ではニワトリ>アホウドリ>カワウの順でダイオキシンに対して感受性が高い。すなわち、ダイオキシンに対する抵抗性が低いことを意味する。ニワトリは微量で細胞影響・致死がみられるため敏感種、カワウは鈍感種と位置づけられ、その毒性をもたらす濃度には両者で約100倍の差がある⁴⁾。そこで、筆者はこの毒性の違いを引き起こす要因としてAHRの遺伝子型に着目し、毒性の種間差という観点からAHRのダイオキシンとの相互作用を解析する研究を行ってきた。

高等生物におけるAHRは、哺乳類では一種のAHRのみ保持しているのに対し、鳥類は3種

注1) 2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-1,4-ジオキシンの略。塩素を4つもつダイオキシン異性体の1つで、もっとも生物に対する毒性が強い。

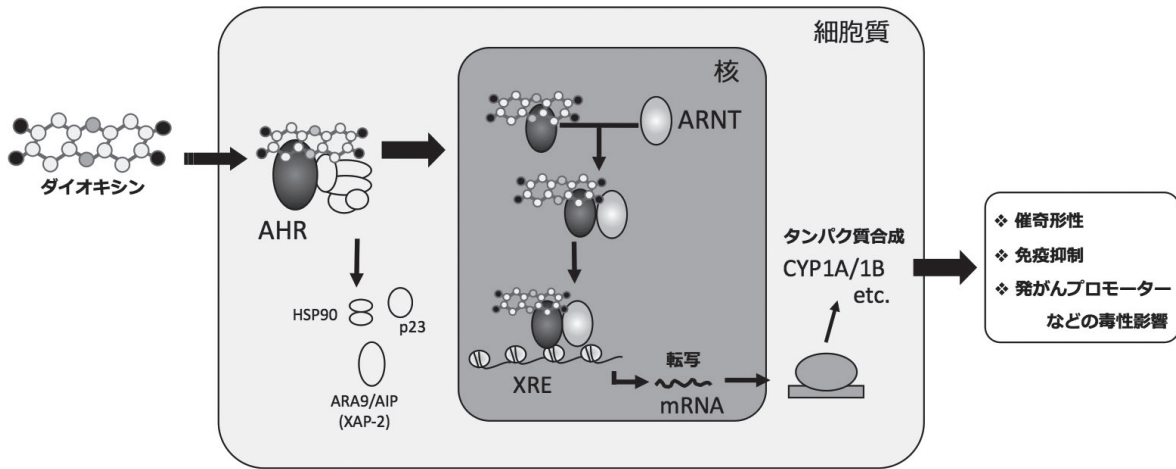


図1 環境汚染物質であるダイオキシンが細胞に取り込まれて、AHR を介して核内の遺伝子と反応し、シトクロム P450 1 (CYP1) 等の薬物代謝酵素の発現を誘導する経路。この酵素群を含む複数のタンパク質が、ダイオキシンの毒性影響を引き起こしている。

の AHR アイソフォーム^{注2)} (AHR1・AHR1β・AHR2) を有する。近年、鳥類 AHR1 の TCDD に対する感受性 (CYP1A5 転写活性化能) はリガンド結合領域のたった 2ヶ所のアミノ酸残基^{注3)} の組み合わせに大きく依存することを報告した (図2)⁵⁾。具体的には、鳥類 AHR1 のアミノ酸配列はほとんど同じであるものの、リガンドと結合するタンパク質の領域に遺伝子型の変異が起こり、これに伴って遺伝子型がコードする 2ヶ所のアミノ酸がニワトリ、アホウドリ、カワウで異なっている (図2)。TCDD に対して高感受性であるニワトリの AHR1 では、これらアミノ酸残基は「Ile324 - Ser380 型」であるのに対して、

約 10 倍感受性が低いアホウドリは「Ile325 - Ala 381 型」、もっとも感受性が低い鈍感種であるカワウの AHR1 は「Val325 - Ala381 型」となっている。

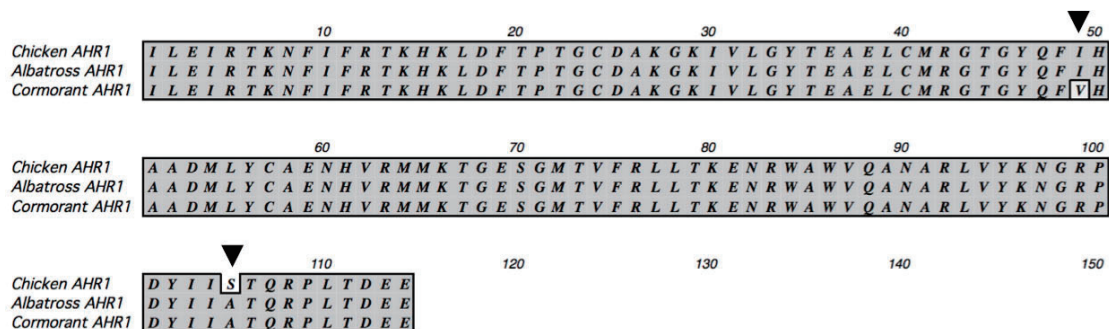
IV ダイオキシン感受性を解明するため *in silico* アプローチ

筆者は、鳥類 (ニワトリ・アホウドリ・カワウ) AHR の構造的特徴とリガンド^{注4)} 選択性 (感受性) を関連付けるために、コンピューターシミュレーションによる計算科学的解析によるアプローチを選択した。この手法は計算科学の進展によってコンピュータ上でタンパク質と薬剤の相互作用を可視化することができ、さらに分子間力を調べる強力なツールとして、近年注目されている研究手法である。具体的には、タンパク質の立体構造として X 線結晶構造が明らかにされているヒトのホロ型 HIF-2α (低酸素誘導因子) の三次元立

注2) アイソフォーム：異なる分子構造を有しているが、同じはたらきを有するタンパク質を指す。

注3) アミノ酸：タンパク質の材料となる天然アミノ酸は 20 種類に限られる。セリン (Ser, S) は水酸基をもつ親水性アミノ酸で、側鎖は短い。アラニン (Ala, A) は疎水性アミノ酸で、側鎖がもっとも短い。バリン (Val, V) とイソロイシン (Ile, I) は疎水性アミノ酸で、側鎖に枝分かれをもつ。イソロイシンはバリンよりも側鎖が長い。

注4) リガンド：特定の受容体とだけ結合する物質の呼称。本稿では、ダイオキシンを指している。



ニワトリ: Ile/Ser

アホウドリ: Ile/Ser

カワウ: Val/Ser



EC₅₀値 (nM)^a: 0.0047

0.077

0.36

ダイオキシン感受性: 高

>

中

>

低

図2 鳥類におけるダイオキシンに対する感受性の違い

上段: 各鳥類 AHR1 のアミノ酸配列 (一文字表記) を比較した結果を示す。アミノ酸配列で変異が起きている箇所には逆黒三角を付す。Ile, Val, Ser, Ala は、それぞれアミノ酸のイソロイシン, バリン, セリン, アラニンを示す。

EC₅₀ 値 (nM)^a: ショ糖密度勾配沈降法を用いた [³H]TCDD に対する結合能から得られた半数影響濃度を示す。低い値ほど、結合能が高いことを表す。

体構造を鋳型として、鳥類 AHR リガンド結合ドメインのホモロジーモデル^{注5)}を構築した。さらに、構築した鳥類 AHR に対して、ダイオキシン様化合物との結合様式を *in silico* ドッキングシミュレーション^{注6)}にて解析した。

解析の結果、鳥類 AHR1 とダイオキシン様化合物の相互作用エネルギーは、ダイオキシン様

化合物の置換塩素原子数とともに増加する傾向を示し、各化合物の *in vitro* AHR 転写活性化能と有意な相関関係を示した。このことは、分子シミュレーションからダイオキシン毒性 (AHR への作用の強さ) を予測可能とした。また、TCDD—AHR 相互作用の分子動力学シミュレーションを行うことで、この2ヶ所のアミノ酸に

注5) ホモロジーモデリング: 実験により解明されたタンパク質の立体構造を鋳型として、構造が未解明なタンパク質の立体構造をコンピュータ上で予測する手法のこと。生物進化において類縁関係のあるタンパク質はアミノ酸配列が類似しているため、その立体構造も似てくるという経験則に基づいている。

注6) ドッキングシミュレーション: 薬剤, ホルモン, 栄養素といった化合物とタンパク質の相互作用における安定した構造をコンピュータ上で計算的に推定する手法のこと。膨大な化合物データベースの中から特定のタンパク質に結合すると予測される薬剤を効率的に探索することもできる。

ついて、ダイオキシンとの結合状態における側鎖原子の動きを追跡した。重要アミノ酸の動きを観察することで、ダイオキシンとの結合に対する関連性の強さを明らかにすることを試みた。

重要アミノ酸の動きを追跡したところ、ダイオキシンに対してもっとも敏感であるニワトリ AHR1 の Ile324 と Ser380 の平均二乗変位^{注7)}は、他の AHR1/2 の該当アミノ酸残基の値より低いと推定され、アミノ酸配列の変異によって高感受性になっていることを示した (図3)。さらに、3D-RISM 法で溶媒 (水) 分子の確率密度を解析することにより、鳥類 AHR に結合する TCDD の分子的安定性 (感受性) は、ニワトリ AHR1 の Ile324・Ser380 に相当する2ヶ所のアミノ酸残基の溶媒和効果に起因すると予想された。ニワトリの高感受性型 AHR (I324 と S380) の Ser380 は親水性アミノ酸であり、他の Ala381 と比較し

て良好な溶媒効果が期待できることが判明した。また、Ser は側鎖も短いことから、TCDD が入り込む十分なスペースをもたらしていることも要因の1つと考えられた。すなわち、TCDD との相互作用を強固にできることが分かり、高感受性を規定する分子機序が明らかとなった。

V まとめ

以上のように、鳥類におけるダイオキシン感受性の研究から、ヒトの疾病や健康に関わる遺伝的背景だけではなく、生物全般において感受性は非常に重要な研究課題であることがわかる。このような遺伝的背景は生物の淘汰にも関わっている。環境汚染に関して考えると、汚染物質に対して鈍感な種は生き残り、敏感な種は早期に絶滅危惧となる可能性も含んでいる。環境汚染物質の問題については、その使用・排出・分布・挙動などについて適切な把握と管理が必要であるが、それ加えて、環境汚染物質を蓄積する生物の遺伝的背景の理解も不可欠である。近年のテクノロジー発展によっ

注7) 平均二乗変位: Mean Square Displacement (MSD). 側鎖原子について動きやすさの指標となる。MSD が高いと動きが大きいため、結合においては不安定である。逆に MSD が低い場合、結合によって自由な運動が束縛されているため、結合に関係していることを示す。

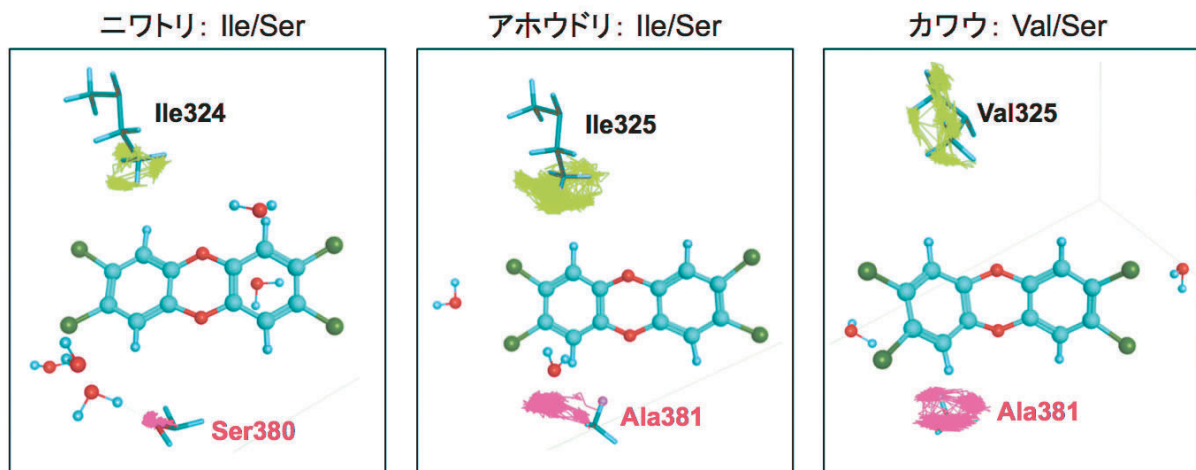


図3 鳥類 AHR1 と TCDD の結合状態における重要アミノ酸の側鎖原子の挙動。化合物: ダイオキシンの炭素 (水色), 塩素 (緑色), 酸素 (赤色) を示す。アミノ酸: グリーン, マゼンタは、それぞれのアミノ酸の軌跡を示す。

て様々な生物種のゲノム解読が進んでおり、このような環境問題と遺伝子型の関わりについても、さらに理解が深まっていくものと期待される。

VI 引用文献

- 1) Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld AT, Brunström B, Cook P, Feeley M, Giesy JP, Hanberg A, Hasegawa R, Kennedy SW, et al. 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives* 106: 775–792.
- 2) Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Betelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL 2008. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453: 65–71.
- 3) Harn ME 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chemico-Biological Interactions* 141: 131–160.
- 4) Head JA, Kennedy SW 2010. Correlation between an *in vitro* and an *in vivo* measure of dioxin sensitivity in birds. *Ecotoxicology* 19: 377–382.
- 5) Hirano M, Hwang JH, Park HJ, Bak SM, Iwata H, Kim EY 2015. *In silico* analysis of the interaction of avian aryl hydrocarbon receptors and dioxins to decipher isoform-, ligand-, and species-specific activations. *Environmental Science and Technology* 49: 3795–3804.