



Title	化学物質に対する生体防御機構としての鳥類の異物代謝酵素シトクロムP450
Author(s)	渡邊, 研右
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 甲第11288号
Issue Date	2014-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k11288
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/58178
Type	theses (doctoral)
File Information	Kensuke_Watanabe.pdf



[Instructions for use](#)

化学物質に対する生体防御機構としての鳥類の異物代謝酵素シトクロム P450

**Avian cytochrome P450 enzymes
as a protection system to environmental chemical compounds**

2014年3月

北海道大学大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座毒性学教室

渡邊研右

目次

略語一覧.....	6
図一覧.....	8
表一覧.....	9
第一章 序論：本研究の背景と目的	10
1.1. 鳥類における環境化学物質被害と感受性の種差.....	10
1.1.1. 環境化学物質による被害事例	
1.1.2. 化学物質感受性と種差	
1.1.3. 鳥類種の系統	
1.1.4. 毒性学研究に用いられる鳥類種	
1.1.5. 化学物質感受性予測の困難さ：数多存在する外来異物	
1.2. 異物代謝酵素シトクロム P450	15
1.2.1. シトクロム P450 の機能と分類	
1.2.2. CYP：基質特異性、化学物質感受性、その種差、個体差	
1.2.3. CYP の種差を生み出した進化	
1.2.4. 鳥類における CYP 研究の現状	
1.3. 本研究の目的	19
1.4. 本論文の構成	19
1.5. 参考文献	20
第二章 鳥類 CYP 遺伝子の網羅的同定と分類、 鳥類の異物代謝において重要な CYP 分子種の特定	23
2.1. 背景	23
2.1.1. 哺乳類の CYP 遺伝子と発現量	
2.1.2. 鳥類 CYP 分子種に関する知見	
2.1.3. 目的	
2.2. 材料・方法	26
2.2.1. 鳥類 CYP 遺伝子の網羅的同定と分類	
2.2.2. ニワトリ肝臓での主要 CYP 分子種の発現量解析	

2.3. 結果	29
2.3.1. 鳥類 CYP 1-3 遺伝子の概要	
2.3.2. CYP1	
2.3.3. CYP2	
2.3.4. CYP3	
2.3.5. ニワトリ肝臓での主要 CYP 分子種の発現量解析	
2.4. 考察	42
2.4.1. 遺伝子の保存性と機能	
2.4.2. ヒト-鳥類間での遺伝的な種差	
2.4.3. CYP 遺伝子の鳥類間種差	
2.4.4. 鳥類における各 CYP 分子種の重要性	
2.4.5. ニワトリ成体での PB による CYP 分子種の誘導	
2.4.6. ニワトリの異物代謝	
2.5. 小括	46
2.6. 参考文献	47
第三章 鳥類 CYP2C サブファミリー遺伝子の種差検討と機能解析	51
3.1. 背景と目的	51
3.1.1. ヒトでの CYP2C の重要性	
3.1.2. 鳥類 CYP2C に関する知見の現状	
3.1.3. 目的	
3.2. 方法	53
3.2.1. 動物	
3.2.2. CYP2C23 遺伝子のクローニングおよび解析	
3.2.3. 鳥類 CYP2C23 タンパク質発現量の鳥類種間比較	
3.2.4. ニワトリ CYP2C タンパク質の機能解析	
3.3. 結果	58
3.3.1. 得られた鳥類種 CYP2C23 遺伝子の部分配列	
3.3.2. CYP2C23 遺伝子のホモロジー解析	
3.3.3. CYP2C23 遺伝子の系統解析	

3.3.4.	<i>Galloanserae</i> 種に見られた CYP2C23 遺伝子の特徴	
3.3.5.	抗鳥類 CYP2C23 タンパク質のウサギポリクローナル抗体作成	
3.3.6.	抗鳥類 CYP2C23 抗体を用いた CYP2C タンパク質の発現量比較	
3.3.7.	P450-glo assay kit を用いたニワトリ CYP2C タンパク質の機能解析	
3.4.	考察	67
3.4.1.	鳥類 CYP2C23 遺伝子の進化と <i>Galloanserae</i> 種の特異性	
3.4.2.	ニワトリでの CYP2C タンパク質発現量	
3.4.3.	CYP2C23 タンパク質発現量の種差	
3.4.4.	抗鳥類 CYP2C23 抗体の Universal CYP2C 抗体としての有用性	
3.5.	小括	71
3.6.	参考文献	72

第四章 ワルファリン(WF)をモデル化合物とした

鳥類種間での感受性種差と、インビトロ評価系に関する検討	74
4.1. 背景と目的	74
4.1.1. 鳥類における抗凝固系殺鼠剤による二次的中毒事例	
4.1.2. 鳥類におけるクマリン系殺鼠剤の感受性種差	
4.1.3. WF の作用機序と感受性決定要因	
4.1.4. 抗凝固系殺鼠剤の種類	
4.1.5. 目的	
4.2. 材料・方法	78
4.2.1. 動物	
4.2.2. ニワトリでの WF 薬物動態解析	
4.2.3. 肝臓ミクロソーム画分の調製	
4.2.4. VKOR : 活性測定と WF による阻害、アミノ酸配列比較	
4.2.5. ワルファリン代謝	
4.2.6. 統計処理	
4.3. 結果	85
4.3.1. ニワトリでの WF 薬物動態解析	
4.3.2. VKOR:Kinetics 解析と WF による阻害、アミノ酸配列比較	

4.3.3.	WF 代謝	
4.4.	考察	99
4.4.1.	鳥類での WF の体内動態と影響— <i>in vitro</i> から <i>in vivo</i> へ—	
4.4.2.	WF 体内動態におけるニワトリの性差	
4.4.3.	鳥類で WF を代謝する CYP 分子種と代謝産物	
4.4.4.	猛禽類の CYP 依存異物代謝能と化学物質リスク	
4.4.5.	鳥類 VKOR について	
4.4.6.	化学物質感受性と <i>in vitro</i> アッセイ系での毒性予測	
4.5.	小括	103
4.6.	参考文献	104
第五章	結論	108
5.1.	総括	108
5.2.	鳥類の CYP 依存性異物代謝能と種差	108
5.2.1.	ニワトリについて	
5.2.2.	<i>Neoaves</i> 種について	
5.3.	今後の展望	109
付録		110
謝辞		116

略語一覽

4'-OH	4'-hydroxywarfarin
6-OH	6- hydroxywarfarin
7-OH	7- hydroxywarfarin
8-OH	8-hydroxywarfarin
10-OH	10-hydroxywarfarin
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AUC	Area under the curve
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLOSUM	Blocks of amino acid substitution matrix
β -NAPDH	beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
BSA	Bovine serum albumin
CAR	Constitutive androstane receptor
cDNA	Complementary DNA
CDS	Coding DNA sequence
CL	Clearance
C_{\max}	Maximum serum/plasma concentration
CPR	NADPH cytochrome P450 reductase
CYP	Cytochrome P450
CXR	Chicken xenobiotic receptor
DDE	Dichloro-diphenyl-dichloroethylene
DDT	Dichloro-diphenyl-trichloroethane
DMSO	Dimethylsulfoxide
DTT	Dithiothreitol
DW	Distilled water
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
FBS	Fetal bovine serum
G6P	Glucose-6-phosphate
G6PDH	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GGCX	Gamma-glutamyl carboxylase
Gla	Gamma-carboxyglutamate
Glu	Glutamate
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horse radish peroxidase

HSD	Honestly significant difference
i.v.	Intravenous
ISTD	Internal standard
K_i	Inhibition constant
K_m	Michaelis constant
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LD ₅₀	Median lethal dose
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MS	Mass-spectrometry
MYA	Million years ago
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PB	Phenobarbital
PBS	Phosphate buffered saline
PCB	Polychlorinated biphenyl
PCR	Polymerase chain reaction
PPCPs	Pharmaceutical and personal care products
PXR	Pregnane X receptor
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamidegel electrophoresis
SGAR	Second generation anticoagulant rodenticide
SNP	Single nucleotide polymorphism
SRS	Substrate recognition site
$T_{1/2}$	Elimination half-life
T_{max}	Time to maximum plasma concentration
UV	Ultraviolet
UCSC	University of California Santa Cruz
VK	Vitamin K1 quinone
VKO	Vitamin K1 epoxide
VKOR	Vitamin K epoxide reductase
VKORC1	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1
VKORC1L1	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like 1
V_{max}	Maximum velocity
WF	Warfarin

圖一覽

Figure 1-1. Phylogeny of birds.	14
Figure 2-1. Clearance mechanisms for the top 200 human-drugs prescribed in the United States in 2002.	25
Figure 2-2. mRNA expression levels in human liver and the contribution to the drug metabolism.	25
Figure 2-3. Phylogenetic tree and synteny of CYP1 family genes	30
Figure 2-4. Compressed phylogeny of CYP2 genes	34
Figure 2-5. Typical fully shared synteny of CYP2D, 2R and CYP2U	35
Figure 2-6. Synteny of CYP2 family genes	36
Figure 2-7. Phylogenetic tree and synteny of CYP3A genes	39
Figure 2-8. Comparison of basal mRNA expression levels and induction by PB of CYP genes in chicken liver.	41
Figure 3-1. Multiple alignment of CYP2C23 proteins.	59
Figure 3-2. Maximum likelihood tree of CYP2C23 genes	62
Figure 3-3. Immunoblot using the synthesized anti-CYP2C23 antibody	65
Figure 3-4. Activity of CYP2C proteins measured with P450-Glo assay	66
Figure 4-1. Warfarin: mode of action and the detoxification	75
Figure 4-2. Typical anticoagulant rodenticides	76
Figure 4-3. Extraction procedure for fecal samples	80
Figure 4-4. Plasma concentration of warfarin.	85
Figure 4-5. Plasma concentration of 4'-OH warfarin.	87
Figure 4-6. Metabolites and warfarin in fecal samples	88
Figure 4-7. Kinetic analysis of VKOR activity with liver microsomes.	90
Figure 4-8. Dixon plot to determine K_i	91
Figure 4-9. Alignment of VKORC1 and VKORC1L1 proteins of chicken and rat.	91
Figure 4-10. CYP contents in liver microsomes.	92
Figure 4-11. WF metabolic activity at the substrate concentration of 400 μ M.	93
Figure 4-12. Cumulative enzymatic efficiency of warfarin metabolism in liver microsomes. ...	94
Figure 4-13. Kinetic analysis of warfarin metabolism by CYP2C proteins.	97
Figure 4-14. Cumulative enzymatic efficiency of CYP2C proteins in warfarin metabolism	98

表一覽

Table 2-1. Primers for qRT-PCR in chicken liver	28
Table 2-2. CYP 1-3 gene numbers in each species	29
Table 3-1. Typical substrates of human CYP2C isoforms	51
Table 3-2. Animals	54
Table 3-3. Primers for cloning of avian CYP2C23 genes	55
Table 3-4. Identity and similarity between avian CYP2C23 proteins	61
Table 3-5. BLAST search result: Matched CYP2C proteins from mammals and birds.....	69
Table 4-1. LD ₅₀ of warfarin and typical SGAR on birds and mammals.	74
Table 4-2. Animals	78
Table 4-3. LC/MS-MS analysis condition	81
Table 4-4. Pharmacokinetic parameters of warfarin in chicken.....	86
Table 4-5. Comparison of plasma half-life.	86
Table 4-6. Kinetic parameters of VKOR activity.....	90
Table 4-7. inhibitor constants, K _i , in rats and birds.	91
Table 4-8. Kinetic parameters of warfarin metabolism in four avian species and rat.	95
Table 4-9. Kinetic parameters of CYP2C proteins in warfarin metabolism.....	98

第一章 序論：本研究の背景と目的

1.1. 鳥類における環境化学物質被害と感受性の種差

1.1.1. 環境化学物質による被害事例

レイチェル・カーソンが1962年に『Silent Spring (沈黙の春)』を出版し、農薬による環境汚染と、汚染による鳥類など生態系への影響について告発して50年余りが経つ。この間に、様々な天然、あるいは人工の化学物質による野生鳥類への被害が世界中で散発してきた。鳥類に被害を与えてきた化学物質は数多く、有機塩素系の殺虫剤である DDT (Dichloro-diphenyl-trichloroethane) や抗凝固系殺鼠剤などの農薬、ジクロフェナク (Diclofenac) などの医薬品、多環芳香族炭化水素 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) や重金属などの人的活動の副産物などが時には生態数を左右する影響を与えてきた。

殺虫剤として多く用いられていた DDT や DDE (Dichloro-diphenyl-dichloroethylene) は、1950年代から70年代にかけて北米で環境への影響が問題となっている。ミミヒメウ (*Phalacrocorax auritus*) やカシヨクペリカン (*Pelecanus occidentalis*)、シロカツオドリ (*Morus bassanus*)、ハヤブサ (*Falco peregrines*)、ハクトウワシ (*Haliaeetus leucocephalus*) などの肉食性鳥類や魚食性鳥類で卵殻の菲薄化と孵化率の減少、急激な個体数減少を引き起こした。アメリカでは70年代始めに DDT の使用が禁止されたものの、汚染が深刻だった五大湖付近では1990年代に入っても繁殖障害や成鳥の死亡率の増加が報告された (Bowerman *et al.*, 1995)。この他にも、DDT は様々な地域で長期間残留し、野生動物に影響を与えてきたが、これは、DDT およびその代謝物である DDE の脂溶性が高く、食物連鎖の中で生物濃縮が起こることに起因している。

ワルファリン (Warfarin) やダイファシノン (Diphacinone) といった、ネズミなどのげっ歯類や外来生物駆除に用いられる抗血液凝固系殺鼠剤は、1960年代以降、現在に至るまで北米やヨーロッパ、オセアニアなど世界中で鳥類の二次的中毒事例の原因になっている。特に、70年代以降に、ブロマジオロン (Bromadiolone) やブロジファクム (Brodifacum)、ジフェチアロン (Difethialone) など、生体内での残留性の高い、いわゆる第二世代殺鼠剤が開発・使用されるようになって以来、鳥類での被害も拡大している (Erickson and Urban, 2004)。これら抗血液凝固系殺鼠剤では、ネズミを捕食するフクロウなどの希少な猛禽類で被害が多いのが特徴である。現在でも野生鳥類での殺鼠剤残留や中毒事例について毎年10–20報程度が論文として報告され、抗血液凝固系殺鼠剤による二次的中毒が鳥類種および鳥類個体数の減少の重要な一因になっている (Lovett, 2012; Borrell, 2011)。

ジクロフェナク (Diclofenac) は、2000年代以降、インド、ネパール、パキスタンなどのインド半島一帯で見られているハゲワシ類の急激な減少の原因になっている (Oaks *et al.*, 2004; Shultz *et al.*, 2004)。これらの地域には、ベンガルハゲワシ (*Gyps bengalensis*)、インドハゲワシ (*Gyps indicus*)、ハシボソハゲワシ (*Gyps tenuirostris*) の3種類のハゲワシが棲息していることが知られているが1990年代からの約10年間に全個体数の95%以上が減少し、これら3

種は現在、国際自然保護連合(IUCN)のレッドデータブックに絶滅危惧 I A 種として記載されている (IUCN 2012)。これらの希少鳥類種の生態数減少は、その餌となるウシへの解熱鎮痛薬の過剰投与が引き起こしたもので、医薬品の環境問題 PPCPs (Pharmaceutical and Personal Care Products) が野生動物に影響を及ぼした代表的な例である。

薬剤や農薬による被害に加えて、PAHs による鳥類への影響も懸念されている。PAHs は燃焼によって発生し、また、原油等にも含まれている化学物質であり一部の PAHs は変異原性や発がん性が報告されている。1989 年には、アラスカ沖で Exxon-Valdez 号が座礁し、約 26 万バレルの原油がプリンスウィリアム湾に流出する世界最大級の原油流出事故が発生した。流出した原油によって数十万羽の海鳥、数千頭の海生哺乳類が事故後 1 カ月以内に死亡したと報告されている(Loughlin *et al.*,1996; Piatt *et al.*,1990)。こうした短期的な影響だけでなく、残留した原油に含まれる PAHs が土壌や海水、貝類を介して鳥類に生理学的な悪影響を及ぼし、シノリガモ(*Histrionicus histrionicus*)などの個体数減少につながっているという報告もある(Albers *et al.*, 2002)。原油流出事故は Exxon-Valdez 号の事故後にも継続的に頻発しており、深刻な環境汚染を引き起こしている。

上記の他にも、数多くの化学物質・新規化合物が人間活動によって環境中に放出され、野生鳥類に被害を与えている。しかし、後述の通り、鳥類の種差を考慮した化学物質の毒性試験や影響予測が正確に行われていないため、実際に野生鳥類に被害が出るまで環境における使用や規制を見直せていないのが現状である。

1.1.2. 化学物質感受性と種差

毒性学の父といわれるパラケルスス (1493-1541 年) は”The dose makes the poison (どんな物質も多量では毒になる)”という言葉を残した。この言葉の通り、必須栄養素などを含めてあらゆる化合物は、過量では毒性を示しうる。また一方で、現代の理解では、化学物質の毒性は化学物質の用量に加えて、その化学物質を摂取する生物の感受性によって決まると言える。

生物側の因子として、化学物質感受性は大きなファクターとなっており、化学物質の体内動態と標的タンパク質の感受性(親和性など)で決まると考えられる。体内動態とは、吸収、分布、代謝、排泄といういわゆる ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) であり、標的タンパク質の感受性とは、タンパク質が化学物質による影響を受ける程度とそのタンパク質の生体での重要性を反映する。

体内動態や標的タンパク質の感受性は、種間で大きく異なる。例えば、昆虫成長制御剤と呼ばれる殺虫剤は、昆虫に特有の変態などに必要な生理機能に特異的に作用する。これは哺乳類には存在しない生理機能であるため、哺乳類ではほとんど毒性を示さない。また、同じく殺虫剤であるピレスロイドや有機リン剤は、昆虫・哺乳類の両方に存在する神経系に作用するが、ヒトでは代謝酵素の機能によりすみやかに分解されるため、昆虫に比べて毒性が発現しにくい。哺乳類間でも、解熱剤であるアセトアミノフェンはヒトで薬剤とし

て用いられているが、ネコに対しては薬効よりも毒性が強いため禁忌とされている。これは、ネコではアセトアミノフェンに対するグルクロン酸抱合活性が欠損しているために毒性の強い中間代謝物による影響を受けやすいためである。

一方、鳥類では、ニワトリやウズラなどの家禽種については毒性試験が行われてきたが、野生鳥類に関しては化学物質感受性についてほとんど研究がなされていない。後述の通り、鳥類は、種によって魚食性や肉食性、蜜食性など様々な食性、様々な棲息環境を持ち、多様な生態系地位を占めることから、鳥類間でも化学物質感受性に大きな種差があることが予想される。

1.1.3. 鳥類種の系統

鳥類で現存する約1万種は、大きく、*Paleognathae* と *Neognathae* に分類され、*Neognathae* はさらに、*Galloanserae* と *Neoaves* に分類される (Figure 1-1)。それぞれに属する種数は、*Paleognathae* で50種 (ダチョウ、エミュなど)、*Galloanserae* で500種 (ニワトリ、ウズラ、キジなどのいわゆるキジカモ目であり、大半の家禽種がこれに属する)、*Neoaves* が9500種程度 (鳥類の95%以上が *Neoaves* であり、野生鳥類の大半を占める) である。

鳥類の系統関係については、古くは形態学的な分類に始まり、1988年には鳥類系統を網羅した形でのDNA-DNAハイブリダイゼーションを利用した分類が発表された(Sibley et al., 1988)。このSibley-Ahlquist分類は現在もお標準的な分類とされているが、一方で、近年はDNAなどのゲノム情報を元にした分子系統学的分類が試みられている。最も広範な種について深い理解を与えたのは、Hackett et al. (2008)による分類である。彼らは鳥類169種についてゲノムDNA上の19ヶ所、32 kbに渡り遺伝子の配列を明らかにし、それを元に系統解析を行った。結果、ハヤブサはワシタカ目とはかけ離れたオウム目であることや、オウム目がスズメ目に近縁であることなどが明らかになり、鳥類種の収斂進化や適応放散が明らかになった。

鳥類種の分岐年代としては、*Paleognathae-Neognathae* 間、および *Galloanserae-Neoaves* 間の分岐年代は、66-85.8 MYA (Million years ago) の間に連続して起こったものと考えられている (Benton and Donoghue, 2007; Feduccia, 2003)。なお、上記の鳥類種分岐の前後に哺乳類で起きた分岐としては、イヌ-ウマ (62.3-71.2 MYA)、ヒト-マウス (61.5-100.5 MYA)、ヒト-ウシ (95.3-113 MYA) などが挙げられる。なお、哺乳類-鳥類間の分岐年代は312-330 MYAと推定されている。

1.1.4. 毒性学研究に用いられる鳥類種

鳥類に対する化学物質の毒性学的研究では、主にニワトリやウズラが実験動物として用いられてきた。鳥類の毒性試験では、試験鳥種としてマガモ(*Anas platyrhynchos*)やコリンウズラ(*Colinus virginianus*)、ドバト(*Columba livia*)、ウズラ(*Coturnix japonica*)、コウライキジ(*Phasianus colchicus*)、アカアシワシヤコ(*Alectoris rufa*)が推奨されており、2010年より、

急性毒性の追加試験用にキンカチョウ(*Taeniopygia guttata*)とセキセイインコ(*Melospittacus undulatus*)が追加された(OECD, 2010)。上記の鳥類種の多くは *Galloanserae* 種 (キジカモ目) であり、*Neoaves* 種はドバト (ハト目)、セキセイインコ (オウム目)、キンカチョウ (スズメ目) が含まれている。これまで、毒性学分野では、実験動物として扱いやすい *Galloanserae* 種を用いてほとんどの試験が行われてきたが、大半の野生鳥類が *Neoaves* 種でありガイドラインでは網羅されていない。実際に、*Galloanserae* 種で毒性が見られなかった農薬や薬剤などの化学物質が、野外では野生鳥種に甚大な被害を起こしているのが現状である。従って、化学物質の生態系への影響を推測する為には、*Galloanserae* 種を中心に試験を行う妥当性とその結果の *Neoaves* 種への外挿性に関する検討の余地が残っていると云える。

また、遺伝的解析の基礎となるゲノム情報については、2013 年 12 月時点で、Ensembl database (<http://asia.ensembl.org/>)にて、ニワトリ(*Gallus gallus*)、マガモ(*Anas platyrhynchos*)、キンカチョウ(*Taeniopygia guttata*)、シチメンチョウ(*Meleagris gallopavo*)、シロエリヒタキ(*Ficedula albicollis*) という 5 種の鳥類ゲノムが公開されている。また、UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/index.html>)ではガラパゴスフィンチ(*Geospiza fortis*)、セキセイインコ(*Melospittacus undulatus*)についても利用可能である。さらに、2013 年 9 月以降に、Groundpecker (*Parus humilis*)やハヤブサ(*Falco peregrinus*)、セーカーハヤブサ(*Falco cherrug*)、カワラバト(*Columba livia*)についてもゲノム解読がなされたという報告が出ている。この他にも現在多くの *Neoaves* 種についてゲノム解読プロジェクトが進行しており、このような情報を毒性学研究にも活用することが求められている。

1.1.5. 化学物質感受性予測の困難さ：数多存在する外来異物

環境中には無限に近い膨大な数の化学物質が存在する。例えば、タバコの煙中からは既に 4000 程度の化学物質が検出、同定されており、天然、人工を問わず人間活動により流通している化学物質の数は 5 万を超えている (Rodgman, Alan and Thomas Albert Perfetti, 2013)。

これらの化学物質はそれぞれに物性が異なり、生体影響も異なる。ヒトの場合だけでも、2 万種類程度のタンパク質を持ち、化学物質ごとに異なる標的分子・標的臓器がある。従って、現存する 1 万種の鳥類に対し、新規に上市される化学物質について個別の種について毒性試験を行うことは困難である。

そこで、本研究では、生体への影響などの化学物質側からの毒性予測ではなく、生物側の化学物質感受性決定要因としてシトクロム P450(CYP)に着目した。異物代謝酵素 CYP は、全ての生物種に共通して存在する解毒酵素群でありながら、化学物質感受性に種差を生み出す主要原因にもなっている(Lauer et al., 2009; Hengstler et al., 1999; Lewis et al., 1998; Kato and Yamazoe, 1992)。

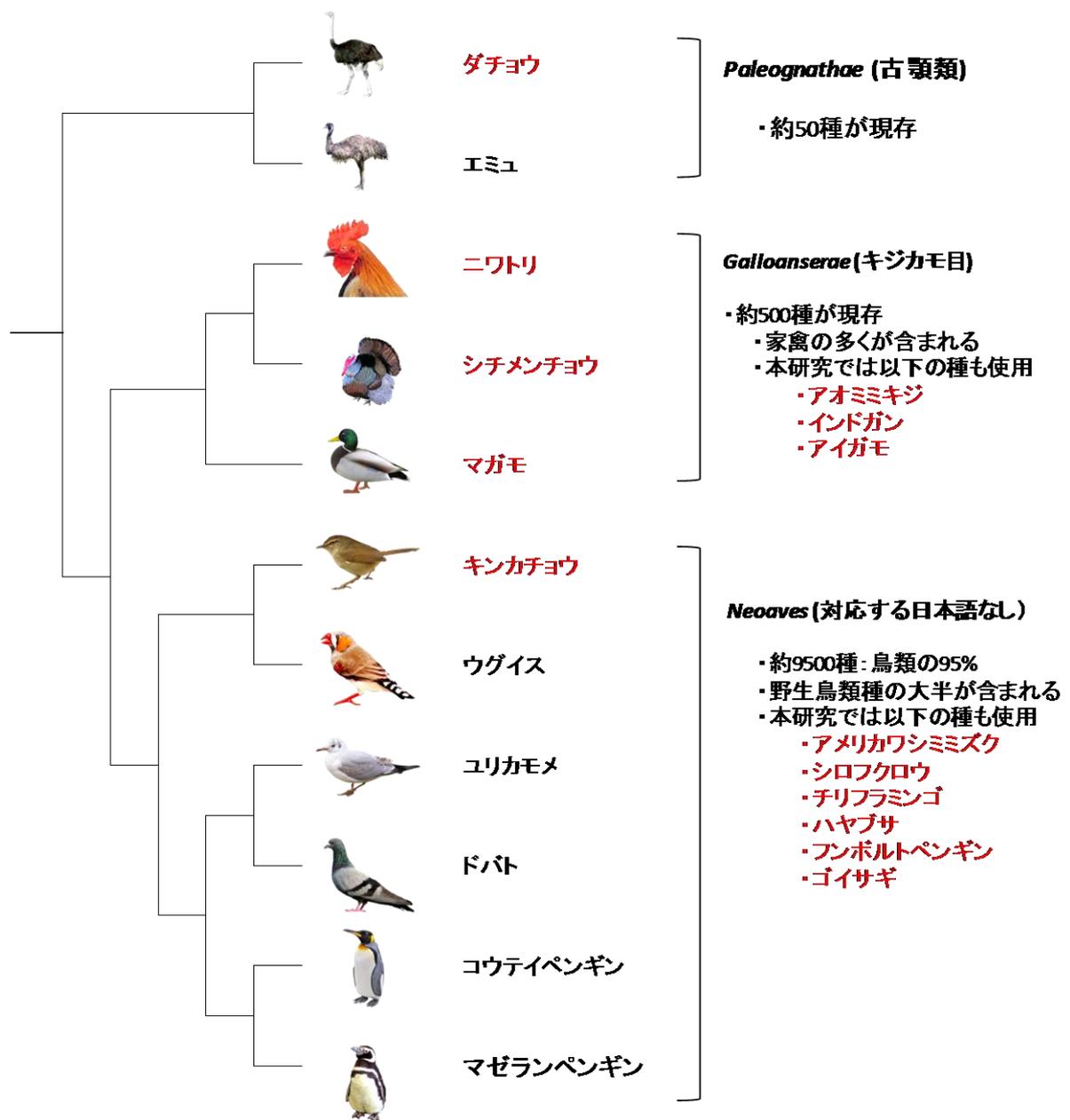


Figure 1-1. Phylogeny of birds.

Hackett et al. (2008)の分類に基づいて作成。本研究に用いた種を赤字で示した。

*図中の絵は、独立行政法人科学技術振興機構バイオサイエンスデータベースセンターの提供による (http://biosciencedbc.jp/taxonomy_icon/taxonomy_icon.cgi)

1.2. 異物代謝酵素シトクロム P450

1.2.1. シトクロム P450 の機能と分類

ヘムタンパク質であるシトクロム P450(CYP)は、微生物から植物、動物まで全ての生物に存在する一群の酵素スーパーファミリーである。そのほとんどが化合物への一酸化付加反応を触媒することが知られている。

ヒトでは 57 分子種の CYP が存在し、コレステロールやステロイド、ビタミン類など必須化合物の生合成やアラキドン酸などの脂肪酸の代謝、異物代謝など様々な酸化反応を担う (Lewis, 2004)。この中でも、ヒトの CYP 1-3 ファミリーに属する 23 分子種は薬物や環境汚染物質などの生体外由来異物の代謝 (Xenobiotic metabolism) において中心的な存在であることが知られている。また、その他の CYP の多くは内因性代謝に働くことが知られている。

ヒト以外でも、1980 年代には、ダイオキシン類などの環境汚染により CYP1A などの CYP 分子種が誘導されることが明らかになり、鳥類など多くの野生動物種で解析が行われた。現在では、環境汚染物質などが哺乳類の Arylhydrocarbon receptor (AhR) や Constitutive androstane receptor (CAR)、Pregnane X receptor (PXR) などの核内受容体のリガンドとなり、Xenobiotic responsive element (XRE) などを介して CYP 分子種を誘導することが知られている。

1.2.2. CYP : 基質特異性、化学物質感受性、その種差、個体差

異物代謝に関わる CYP は様々な化学物質の代謝を触媒し、代謝された化学物質の多くは水溶性が高まることで排泄されやすくなる。また、代謝により生理活性を持つ (代謝的活性化) 物質もあり、ベンゾピレン(Benzo[a]pyrene)の変異原性やプロドラッグの薬理作用発現にも関与している。

異物代謝に関わる CYP は基質選択性が低く多様な化学物質を代謝することで知られている (Foti et al., 2011)。CYP 研究が最も進んでいるのはヒトであるが、ヒトではわずか 5 分子種程度の CYP が薬物代謝の大半を担う。一方で、他の動物種であれば、相同分子種であっても基質選択性や活性に大きな種差が存在することも珍しくない。この CYP の種差が、化学物質の代謝と体内動態の種差、ひいては化学物質感受性の種差を生み出しているのである。

1.2.3. CYP の種差を生み出した進化

CYP の起源に関していくつかの仮説が提出されておりその起源は明らかになっていないが、CYP 1-3 ファミリー遺伝子の異物代謝機能は、進化の過程で新しく獲得されたものと考えられている (Sezutsu and Feyereisen, 2013)。CYP 1-3 は他の内因性代謝に関わる分子種と比べて、進化の過程で頻繁に遺伝子重複と欠失を起し、分子種内での多様性を獲得してきたことが明らかになっている (Thomas, 2007)。つまり、元来は内因性代謝で特定の基質に選択的に働いてきた祖先 CYP 分子種のうち、異物代謝に特化した遺伝子が遺伝子重複とそれ

に続く新機能獲得(Neofunctionalization)や潜在的機能分化(Subfunctionalization)、偽遺伝子化(Pseudogenization)を繰り返し、現在の CYP 1-3 ファミリー遺伝子を構成していると考えられるのである。

このことから 2 つの推察がなされる。第一に、特定の基質の内因性の化学物質代謝に関わる CYP が種を越えて不可欠な遺伝子であったのに対し、外因性代謝に関わる CYP 1-3 ファミリー遺伝子は生命にとって不可欠というわけではなく、機能的制約の少ない中で自由に進化してきたこと、第二に、異物代謝 CYP が受けてきた機能的制約は環境依存的なものだったことである。

これらの CYP 進化の推察は、異物代謝 CYP に種差が大きく存在することを示しているだけでなく、その生物の棲息域や食性などによって CYP の種や系統特異的な進化がありえたことを示唆している。実際、Rainio et al. (2012)や Fossi et al. (1995)は雑食性が高いほどアルドリンエポキシ化活性や EROD (Ethoxyresorufin O-deethylase)活性が高い傾向が見られることを報告している。このように進化の過程で生まれてきた異物代謝能の種差が化学物質感受性の種差に直結しており、従って、鳥類の CYP の進化や分化を考慮する際には、食性などの行動様式も含め鳥類種の系統関係を考慮して検討する必要があるだろう。

1.2.4. 鳥類における CYP 研究の現状

前述の通り、これまで鳥類における CYP 研究の大半は、ニワトリやウズラなど *Galloanserae* 属種を用いて行われてきた。これらの研究は、主に肝臓ミクロソームを用いた特定の化学物質に関する代謝能解析や、特定の CYP 分子種をクローニングし、その機能解析を行ったものである。また、野生鳥類では、汚染状況のモニタリングを目的として CYP1A 等のクローニングおよび誘導に関する研究が行われてきた。

1.2.4.1. 環境汚染物質による CYP 誘導

CYP は環境汚染に関するバイオマーカーになるとされ、1980 年代から様々な動物種で CYP 誘導の研究がなされてきた。鳥類においては、DDT や PCB などの汚染により CYP の mRNA やタンパク質が誘導されることが研究された(例: Fujita et al., 2001)。しかし、これらの研究は主に環境汚染に焦点を当てたものだった。例えば、野生鳥類種を用いたウェスタンブロットでは抗体の交差反応を利用して「CYP1A-like protein」の発現量を定量し、活性は哺乳類でプローブとなる基質を用いた「CYP1A-like activity」として測定して、誘導を環境汚染の指標として扱っていた。しかし、実際にそのタンパク質が同定されることは稀で、鳥類 CYP の種差や、分子種ごとの解毒酵素としての重要性などにはほとんど注目されなかった。

1.2.4.2. 肝臓ミクロソームを用いた代謝活性

鳥類の CYP 活性については、EROD (Ethoxyresorufin O-deethylase)活性を始めとして、い

くつかの薬物、異物について鳥類間での比較がなされている(Murcia et al., 2011; Cortright et al., 2006; Liukkonen-Anttila et al., 2003; Tanhuanpa'a et al., 1999; Gupta et al., 1998; Walker et al., 1998)。鳥類と哺乳類の比較もなされており、哺乳類と較べてニワトリでは CYP 含量が少ないことや、多くの基質で哺乳類以下の活性しか持たないことがわかっている(Khalil et al., 2001)。

同じ鳥類種の中での個体差の原因としては、性差と年齢差について報告されている。Blevins et al. (2011)は、ニワトリで、4-8 週齢程度から徐々に CYP3A-like な活性が低下していくことを示した。一方で、Hu (2013)は CYP2C-like な活性については孵化直後で最も活性が高く、1-4 週齢では低く、その後 7-8 週齢まで活性が上がり続けるという報告をしている。性差については、CYP 含量やシトクロム P450 還元酵素(NADPH-cytochrome P450 reductase, CPR)についてニワトリのオスでメスよりも高く、さらに、その他の多くの化合物に対してもオスの方が代謝活性が高いという報告がなされている(Pampori et al., 1993)

1.2.4.3. 鳥類 CYP 遺伝子

一方で、近年になって、ニワトリの CYP 遺伝子に関する機能解析や系統解析が盛んになされるようになってきた。これまでに、CYP1A4/1A5 や CYP2D49、CYP3A37 に関する遺伝子クローニングと機能解析、系統解析がなされている(Shang, 2013; Yang et al, 2013; Yuan et al., 2013; Cai et al., 2012; Jönsson et al., 2011; Kubota et al., 2010; Goldstone et al., 2006; Ourlin et al., 2000)。また、CYP への電子伝達系として重要な CPR についても研究が行われている(Zhou et al., 2011)。

ニワトリ以外の鳥類で比較的詳細に異物代謝 CYP の解析がなされているのはカワウである。カワウでは、PCB 等による汚染と関連して CYP1A や CYP2C に関する機能解析、発現量解析がなされている(Kubota et al, 2009; Kubota et al., 2005)。シチメンチョウでは、Turkey X disease との関連から CYP3A37 についてクローニング・機能解析が行われた(Rawal et al., 2011; Rawal et al., 2010)。また、ダチョウでは次世代シーケンサーを用いて CYP 遺伝子のクローニングを行い、肝臓中での mRNA 発現量が分子種間で比較されている (Kawai et al., 2013)。しかしながら、これまでに鳥類種の中で CYP 1-3 遺伝子の全貌が明らかにされたことはなく、哺乳類 CYP の知見を基盤として研究がなされてきた。

1.2.4.4. 鳥類 CYP 研究に不足している知見

上述の通り、鳥類の CYP 研究には長い歴史がある。しかし毒性学上もっとも問題となるのは、これらの知見の多くが *in vivo* とつなげられておらず、実際に CYP が化学物質の体内動態や感受性にどの程度寄与しているのか明らかになっていないことである。また、*in vitro* の活性についても、広範な鳥類種を用いた代謝活性の比較や進化を考慮してバランスの取れた鳥類種間での比較検討がなされておらず、鳥類内での代謝能の種差が十分に明らかにされていないことも課題となっている。さらに、遺伝的な解析の基礎となる CYP 遺伝子に

ついても、ゲノム解読がなされているニワトリですら全ての CYP 分子種が同定、分類されておらず、どのような分子種が存在するのか明らかになっていない。そのため、鳥類間の遺伝的な種差も明らかになっていないのが現状である。

1.3. 本研究の目的

鳥類では、これまでに化学物質感受性について正確な毒性予測がなされてこず、それが環境汚染による鳥類での予想外の被害の一因となっている。毒性予測が正確になされていない原因は、化学物質が無数に存在し、かつ、鳥類種のうち *Galloanserae* に属する家禽種を用いてきたことにあり、その結果、大半の野生鳥類種が属する *Neoaves* の化学物質感受性が明らかになってこなかったことが挙げられる。

そこで、本研究では様々な化学物質に対する生体防御機構として重要な CYP に着目し、鳥類間での代謝能の種差とその原因解明を目的とした。さらに、鳥類の化学物質リスク評価に必須と考えられる *in vitro* での化学物質感受性種差の検出が可能か否か検証することを目的とした。

1.4. 本論文の構成

本論文は鳥類 CYP と化学物質感受性について概説した本章(第一章)に続き、第二章から第四章は実験の部にあたる。

第二章では、哺乳類に比してこれまでほとんど研究がなされてこなかった鳥類の異物代謝 CYP 遺伝子について、その遺伝子の全貌と鳥類 CYP の特徴、および鳥類種間での遺伝的種差を明らかにした。さらに、CYP 全分子種を明らかにした上で、異物代謝上の寄与が大きいと考えられる分子種を特定した。

第三章では、環境化学物質による誘導を最も受けやすいと考えられた CYP2C23 遺伝子に着目した。CYP2C23 遺伝子はその誘導機構については詳細な研究がなされているが、機能は未知のままである。そこで、多種鳥類での CYP2C23 遺伝子の部分配列クローニングを行い、遺伝的種差と発現量の種差を明らかにした。さらに、ニワトリの CYP2C タンパク質について、活性比較を行った。

第四章では、実際に鳥類で被害が報告されているワルファリンをモデル化合物として、CYP および標的酵素に関して *in vitro* アッセイ系により感受性の種差が検出されるか検証した。ワルファリンを始めとするクマリン系殺鼠剤は、猛禽類を始めとする種々の鳥類で二次的被害を起こし、鳥類個体減少の原因になっている。一方で、ワルファリンはニワトリではほとんど致死性を発現しないことが知られており、鳥類種間での感受性の種差が大きいものと予想される化合物である。本章ではワルファリン代謝に見られる鳥類間での種差の大きさや、ニワトリで *in vitro* と *in vivo* での代謝パターンの比較などを行った。

これらの実験で得られた知見に基づき、第五章では鳥類の異物代謝機構とその種差のあり方に関する考察と今後の展望について述べた。

1.5. 参考文献

- Albers PH, Hoffman DJ, Rattner BA (2002). Petroleum and Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Handbook of Ecotoxicology, second edition, 354-356, CRC Press
- Benton MJ, Donoghue PC (2007). Paleontological evidence to date the tree of life. *Mol. Biol. Evol.* 24(1), 26-53.
- Borrell B (2011) Where eagles die, Nature News, doi:10.1038/news.2011.24,
- Bowerman WW, Giesy JP, Best DA, Kramer VJ (1995). A review of factors affecting productivity of bald eagles in the Great Lakes region: implications for recovery. *Environ. Health Persp.* 103(Suppl 4), 51.
- Cai H, Jiang J, Yang Q, Chen Q, Deng Y (2012). Functional characterization of a first avian cytochrome P450 of the CYP2D subfamily (CYP2D49). *PloS One*, 7(6), e38395.
- Carson R (1962). *Silent spring*. Boston, MA: Houghton Mifflin.
- Erickson W, Urban D (2004). *Potential risks of nine rodenticides to birds and nontarget mammals: a comparative approach*. Environmental Protection Agency Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Washington, D.C., USA.
- Feduccia A (2003). 'Big bang' for tertiary birds?. *Trends Ecol. Evol.* 18(4), 172-176.
- Fossi MC, Massi A, Lari L, Marsili L, Focardi S, Leonzio C, Renzoni A (1995). Interspecies differences in mixed function oxidase activity in birds: relationship between feeding habits, detoxication activities and organochlorine accumulation. *Environ. Pollut.* 90(1), 15-24.
- Foti RS, Honaker M, Nath A, Pearson JT, Buttrick B, Isoherranen N, Atkins WM (2011). Catalytic versus inhibitory promiscuity in cytochrome P450s: implications for evolution of new function. *Biochemistry* 50(13), 2387-2393.
- Fujita S, Chiba I, Ishizuka M, Hoshi H, Iwata H, Sakakibara A, et al. (2001). P450 in wild animals as a biomarker of environmental impact. *Biomarkers* 6(1), 19-25.
- Goldstone HM, Stegeman JJ (2006). A revised evolutionary history of the CYP1A subfamily: gene duplication, gene conversion, and positive selection. *J. Mol. Evol.* 62(6), 708-717.
- Hackett SJ, Kimball RT, Reddy S, Bowie RC, Braun EL, Braun MJ, et al. (2008). A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320(5884), 1763-1768.
- Hengstler JG, van der Burg B, Steinberg P, Oesch F (1999). Interspecies differences in cancer susceptibility and toxicity. *Drug Metab. Rev.* 31(4), 917-970.
- IUCN (2012). IUCN Red list of threatened species. Version 2012.1.
- Jönsson ME, Woodin BR, Stegeman JJ, Brunström B (2011). Cytochrome p450 1 genes in birds: evolutionary relationships and transcription profiles in chicken and Japanese quail embryos. *PloS One*, 6(12), e28257.
- Kato R, Yamazoe Y (1992). Sex-specific cytochrome P450 as a cause of sex-and species-related

- differences in drug toxicity. *Toxicol. Lett.* 64, 661-667.
- Kawai YK, Watanabe KP, Ishii A, Onuma A, Sawa H, Ikenaka Y, Ishizuka M (2013). *De novo* sequence analysis of cytochrome P450 1–3 genes expressed in ostrich liver with highest expression of CYP2G19. *Comp. Biochem. Physiol. D* 8(3), 201-208.
- Khalil WF, Saitoh T, Shimoda M, Kokue E (2001). *In vitro* cytochrome P450-mediated hepatic activities for five substrates in specific pathogen free chickens. *J. Vet. Pharmacol. Thera.* 24(5), 343-348.
- Kubota A, Stegeman JJ, Goldstone JV, Nelson DR, Kim EY, Tanabe S, Iwata H (2011). Cytochrome P450 CYP2 genes in the common cormorant: Evolutionary relationships with 130 diapsid CYP2 clan sequences and chemical effects on their expression. *Comp. Biochem. Physiol. C* 153(3), 280-289.
- Kubota A, Kim EY, Iwata H (2009). Alkoxyresorufin (methoxy-, ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyresorufin) *O*-dealkylase activities by *in vitro*-expressed cytochrome P450 1A4 and 1A5 from common cormorant (*Phalacrocorax carbo*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 149(4), 544-551.
- Kubota A, Iwata H, Tanabe S, Yoneda K, Tobata S (2005). Hepatic CYP1A induction by dioxin-like compounds, and congener-specific metabolism and sequestration in wild common cormorants from Lake Biwa, Japan. *Environ. Sci. Technol.* 39(10), 3611-3619.
- Lauer B, Tuschl G, Kling M, Mueller SO (2009). Species-specific toxicity of diclofenac and troglitazone in primary human and rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 179(1), 17-24.
- Lewis DF (2004). 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* 5(3), 305-318.
- Lewis DF, Ioannides C, Parke DV (1998). Cytochromes P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen. *Environ. Health Persp.* 106(10), 633-641.
- Loughlin TR, Ballachey BE, Wright BA (1996). Overview of studies to determine injury caused by the Exxon Valdez oil spill to marine mammals. In American Fisheries Society Symposium (Vol. 18).
- Lovett RA (2012) Killing rat is killing birds, Nature News, doi:10.1038/nature.2012.11824
- Murcia HW, Díaz GJ, Cepeda SM (2011). Enzymatic activity in turkey, duck, quail and chicken liver microsomes against four human cytochrome P450 prototype substrates and aflatoxin B1. *Journal of Xenobiotics* 1(1), e4.
- Nebert DW, Russell DW (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360(9340), 1155-1162.
- Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson RT, Meteyer CU, Rideout BA, et al. (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427(6975), 630-633.
- OECD (2010). Test No. 223: Avian Acute Oral Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of

Chemicals, Section 2, OECD Publishing.

- Ourlin JC, Baader M, Fraser D, Halpert JR, Meyer UA (2000). Cloning and functional expression of a first inducible avian cytochrome P450 of the CYP3A subfamily (CYP3A37). *Arch Biochem. Biophys.* 373(2), 375-384.
- Pampori NA, Shapiro BH (1993). Sexual dimorphism in avian hepatic monooxygenases. *Biochem Pharmacol* 46(5), 885-890.
- Piatt JF, Lensink CJ, Butler W, Kendziorek M, Nysewander DR (1990). Immediate impact of the Exxon Valdez oil spill on marine birds. *The Auk* 387-397.
- Rainio MJ, Kanerva M, Wahlberg N, Nikinmaa M, Eeva T (2012). Variation of basal EROD activities in ten passerine bird species—relationships with diet and migration status. *PLoS One*, 7(3), e33926.
- Rawal S, Kim JE, Coulombe R (2010). Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Res. Vet. Sci.* 89(3), 325-331.
- Rawal S, Coulombe R (2011). Metabolism of aflatoxin B1 in Turkey liver microsomes: The relative roles of cytochromes P450 1A5 and 3A37. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 254(3), 349-354.
- Rodgman A, Thomas AP (2013) The chemical components of tobacco and tobacco smoke. CRC press.
- Sezutsu H, Le Goff G, Feyereisen R (2013). Origins of P450 diversity. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 368(1612).
- Shang S, Jiang J, Deng Y (2013). Chicken Cytochrome P450 1A5 Is the Key Enzyme for Metabolizing T-2 Toxin to 3'OH-T-2. *Int. J. Mol. Sci.* 14(6), 10809-10818.
- Shultz S, Baral HS, Charman S, Cunningham AA, Das D, Ghalsasi GR, et al. (2004). Diclofenac poisoning is widespread in declining vulture populations across the Indian subcontinent. *Proc. R. Soc. B* 271(Suppl 6), S458-S460.
- Sibley CG, Ahlquist JE, Monroe BL (1988). A classification of the living birds of the world based on DNA-DNA hybridization studies. *The Auk*, 409-423.
- Yang J, An J, Li M, Hou X, Qiu X (2013). Characterization of chicken cytochrome P450 1A4 and 1A5: Inter-paralog comparisons of substrate preference and inhibitor selectivity. *Comp. Biochem. Physiol. C* 157(4), 337-343.
- Yuan Y, Zhou X, Yang J, Li M, Qiu X (2013). T-2 toxin is hydroxylated by chicken CYP3A37. *Food Chem. Toxicol.* 62, 622-627.
- Zhou X, Li M, Sheng C, Qiu X (2011). NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase from the chicken (*Gallus gallus*): Sequence characterization, functional expression and kinetic study. *Comp. Biochem. Physiol. C* 153(1), 53-59.

第二章

鳥類 CYP 遺伝子の網羅的同定と分類、 鳥類の異物代謝において重要な CYP 分子種の特定

2.1. 背景

2.1.1. 哺乳類の CYP 遺伝子と発現量

ヒトには、57 分子種の CYP が存在している(Nebert and Russel, 2002)。

ヒトでは、薬物代謝の 75%以上を CYP が担っていると言われ、その中心が異物代謝を担う CYP 1-3 ファミリーの 23 分子種である(Williams et al, 2004)。CYP による薬物代謝の中では、CYP3A4 がその 50%近くを担っており、ヒトの異物代謝で最も重要な分子種と言える (Figure 2-1)。CYP の異物代謝の寄与では、ヒトでは CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP1A2 がこれに続き、CYP3A4 を合わせたこの 5 分子種で、CYP による薬物代謝の 90%が行われている。

異物代謝 CYP が多数の薬物・異物を代謝できるのは、その基質特異性の低さによる。CYP タンパク質の基質認識部位は、分子量や構造が異なる数多くの化合物を受け入れ酸化反応を触媒するのに十分な大きさを持ち、その結果、異なる分子種でも同じ化合物の同じ酸化反応を触媒するようなオーバーラップが生じるのである。

しかしながら、5 分子種という少数の CYP 分子種で、CYP 依存といわれる薬物の 90%を代謝できるのはなぜだろうか。これは多分に肝臓での CYP 発現量の多さによる。実際、Temesvari et al. (2012)や Ohtsuki et al.(2011)はヒト肝臓での CYP 分子種ごとのタンパク質発現量を明らかにし、分子種ごとの発現量が大きく異なり、その中でも異物代謝への寄与が大きい CYP3A4 や CYP2C9、CYP1A2 のタンパク質発現量が大きいことを示している。mRNA 発現量についても、タンパク質発現量と同様の傾向が見られている。つまり、翻訳後調節を受ける CYP2E1 を例外として、その他の分子種では一般に mRNA 発現量が大きいほど、タンパク質発現量と異物代謝への寄与が大きくなる傾向がある (Figure 2-2、Bieche et al., 2007; Anderson et al., 1998)。さらに、CYP3A4・CYP2C9 は他の分子種に比べて活性部位のキャビティが広く、他の分子種に比べて多くの化合物を代謝できる (Gay et al., 2011)。多様な基質を代謝し、タンパク質としての発現量も多いために、薬物代謝への寄与が大きいと考えられる。

2.1.2. 鳥類 CYP 分子種に関する知見

これまで、ニワトリなどの家禽種について、肝臓ミクロソームを用いた *in vitro* での CYP 活性に関する研究が多く行われてきた(Gupta and Abou-Donia, 1998; Walker et al., 1998)。特に、哺乳類で用いられる CYP 分子種特異的なプローブ基質(e.g. CYP1A 活性のための EROD など)を用いて、「mammalian-CYP1A-like activity」といった形での活性研究が多く、実際に鳥

類で相同な分子種が代謝しているのか、分子種—基質の直接的な関係性から検討した例はほとんどない(1.2.3.参照)。同様に、タンパク質発現に関しても、交差反応を利用してウェスタンブロットを行った例が多くあるが、検出されているタンパク質が直接的に同定・検証された例はない。つまり、特定の基質を代謝する CYP 分子種や、特定の抗体で検出される分子種が肝臓ミクロソーム中に存在することが確認できても、その分子種が同定されることがない。

このような現状の原因として、鳥類が持つ CYP 分子種や遺伝子が明らかでなく、哺乳類と相同な遺伝子が存在するであろうという前提の元で研究が行われているということがある。そのため、活性レベルでの鳥類種間比較は可能だが、種差の原因となっている分子種が不明なままだった。さらに、鳥類の保持する CYP 分子種の全貌が明らかでないことから、個別の CYP 分子種がどの程度異物代謝に寄与しているのか評価できず、ヒトにおける CYP3A4 に相当するような鳥類の異物代謝上重要な分子種が特定できていない。

2.1.3. 目的

鳥類ではヒトのように、特定の基質の代謝における個別 CYP 分子種の寄与は考慮されていない。そもそも、鳥類においてはどのような分子種が存在するのか全貌が明らかにならず、遺伝的な種差もまた明らかになっていない。

そこで本章では、鳥類の異物代謝 CYP 遺伝子を網羅的に同定し、その種差、特に毒性試験種・家禽種として重要な *Galloanserae* と、鳥類の 95%以上を占める *Neoaves* での遺伝子レベルでの種差を明らかにすることを目的とした。さらに、ニワトリの肝臓において CYP 分子種間で mRNA 発現量を比較し、ニワトリの異物代謝上重要な分子種を特定することを目的とした。

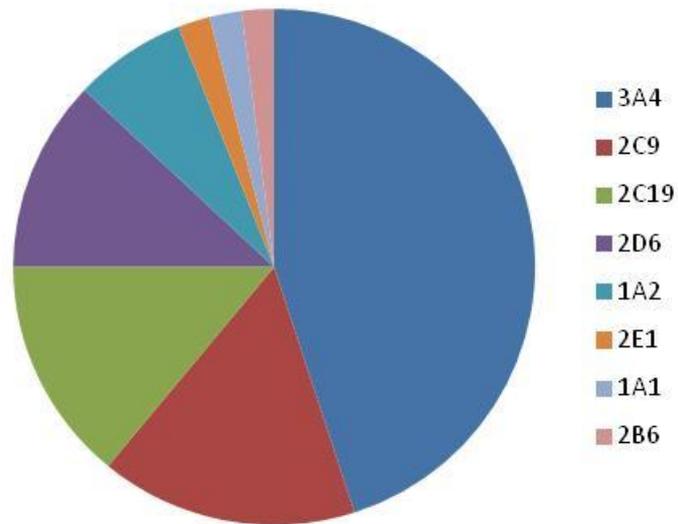


Figure 2-1. Clearance mechanisms for the top 200 human-drugs prescribed in the United States in 2002. (Williams et al., 2004)

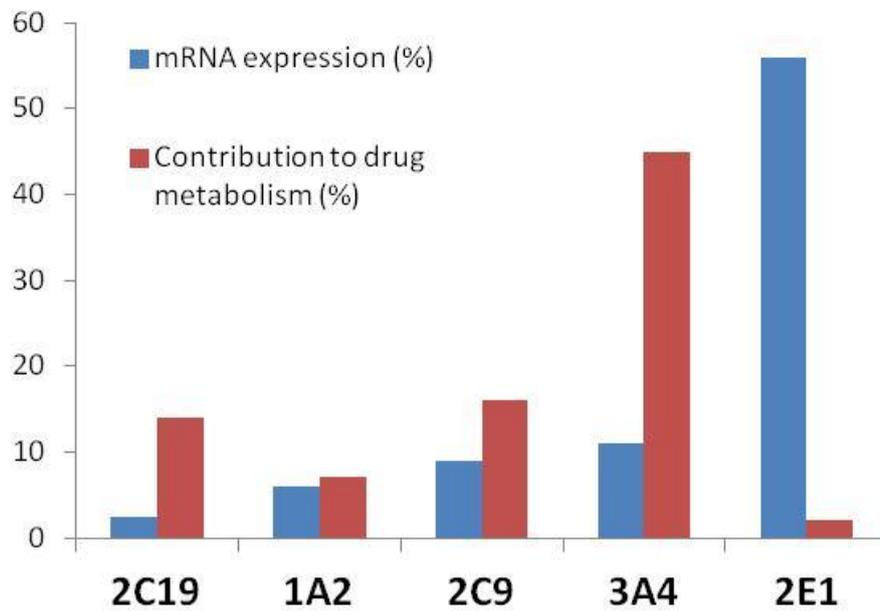


Figure 2-2. mRNA expression levels in human liver and the contribution to the drug metabolism. (Modified from Bieche et al., 2007; Williams et al., 2004)

2.2. 材料・方法

2.2.1. 鳥類 CYP 遺伝子の網羅的同定と分類

2.2.1.1. CYP 遺伝子の収集と CYP 1-3 分子種の同定

ニワトリ、キンカチョウおよびシチメンチョウに関する公開ゲノム情報 (GenBank、Ensembl) を用いて解析を行った。用いたゲノムバージョンは、それぞれ Build 3.1、Build 1.1 および Build 1.1 だった。また、比較対象としたヒトについては Build 37.1 で、いずれも解析時点で最新のものを使用した。

GenBank と BLAST 検索を用いて CYP 遺伝子の収集を行った。最初期の遺伝子セットでは CYP 1-3 以外の CYP 遺伝子が含まれていたため、Neighbor-joining 法による系統解析により CYP 1-3 遺伝子のみを抽出し解析に用いた (Saitou and Nei, 1987)。

2.2.1.2. 系統解析

CYP 1-3 の各ファミリーに属する遺伝子について、塩基配列から予測されるアミノ酸配列を用いて系統解析を行った。塩基配列は、MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tamura et al., 2011) にてアミノ酸配列に置換し、MUSCLE を用いて多重アラインメントを行った (Edgar, 2004)。このアラインメントを元に系統樹作製のためのモデル選択および最尤法 (Maximum likelihood 法) による系統樹作製を行った。予備的な解析から、塩基配列、アミノ酸配列のいずれを用いてもほぼ相同な系統樹が得られていたことから、本解析ではアミノ酸配列を用いた。5%以上の配列で欠失しているアミノ酸部位は系統解析から除外した。また、それぞれのクレードの信頼性をブートストラップ検定法 (100 反復) により算定した。

2.2.1.3. シンテニー解析

染色体上のシンテニー地図を作成するため、NCBI の MapViewer を用いた。種間で比較し、欠損している遺伝子がある場合などには、Ensembl database と UCSC BLAT により補足的に確認を行った。系統解析およびシンテニー解析により同定、分類された遺伝子については、Cytochrome P450 Nomenclature Committee にて遺伝子の命名を受けた (Nelson et al., 2004)。

2.2.2. ニワトリ肝臓での主要 CYP 分子種の発現量解析

2.2.2.1. 動物

北海道中央種鶏場 (北海道、夕張郡) より雌雄各 8 羽のニワトリ (白色レグホン) を購入した。ニワトリはプラスチックケージで飼育し、通常の餌 (Nihon Nosan Kogyo Co., Kanagawa, Japan) と水を ad libitum で与え、12 時間間隔での明暗周期と $25 \pm 2^\circ\text{C}$ の温度で飼育した。

ニワトリは、生理食塩水投与群 (コントロール群) とフェノバルビタール (PB) 投与群

の2群各4羽ずつに分けた。PB群にはCYP誘導の実験で頻用されるプロトコルにてPB投与を行い、コントロール群にはPBの代わりに生理食塩水を投与した。すなわち、PB投与群には、生理食塩水に溶解したPBを80mg/kg body weightで3日間連続で腹腔内投与し、生理食塩水投与群では等量の生理食塩水を投与した。3回目の投与から24時間後に、二酸化炭素を用いた安楽殺を行い、素早く肝臓を採取した。肝臓は液体窒素にて凍結し、実験使用時まで-80℃で保存した。安楽殺した時点で、ニワトリは8週齢だった。上記の動物実験は、北海道大学動物実験委員会の承認を得、その規定に従って行った(承認番号10-0067)。

2.2.2.2. mRNA抽出とcDNA合成

生理食塩水投与およびPB投与を受けたニワトリの肝臓から、RNeasy Mini Kit (Qiagen, CA, USA)を用いTotal RNAの抽出を行った。抽出されたRNAは、電気泳動によるRNA qualityの確認を行い、NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, DE, USA)により定量した。その際、A260/280とA260/230について全てのサンプルで1.8以上の値を示すことを確認した。抽出されたRNA 2 µgを元に、ReverTraAce (Toyobo, Tokyo, Japan)を用いてFinal Volume 40 µlにてcDNA合成を行った。

2.2.2.3. 定量的リアルタイムPCR

StepOnePlusリアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems, CA, USA)を用いて、遺伝子特異的に定量的リアルタイムPCRを行った。使用したプライマーをTable 2-1に示す。反応液は、Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)と、センスプライマー、アンチセンスプライマーを各200 nM、total RNA 10 ng相当のcDNAを含み、10 µlの反応系で行った。肝臓由来cDNAサンプルおよび検量線作成のためのスタンダードサンプルの両方共、Duplicateで解析した。増幅サイクルは、95℃20秒の後に、95℃3秒、60℃30秒を40サイクルし、PCR runの終わりに60-95℃でのPCR産物のメルトカーブ解析を行った。PCR産物は、電気泳動およびダイレクトシーケンス、メルトカーブ解析により単一の目的とするPCR産物のみを含むことを確認した。グリセルアルデヒド3リン酸脱水酵素(GAPDH)遺伝子を内因性コントロールとして用いた。また、ネガティブコントロールとして、逆転写酵素を含まずにcDNA合成したサンプルではいずれもCt値が35以上になることを確認した。

各遺伝子のコピー数を算出するための検量線スタンダードには、目的とする配列を含むプラスミドを用いた。プラスミドは、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, CA, USA)を用いpCR2.1-TOPOベクターにPCR産物を組み込んで作成したものをを用いた。

Table 2-1. Primers for qRT-PCR in chicken liver

Gene		Sequence (5' → 3')	Amplicon (bp)	Reference	Accession	Gene name in NCBI
1A4	Forward	TAAGGACGTC AATGCTCGTTTC	89	Head et al. (2006)	NM_205147.1	Gallus gallus cytochrome P450 1A4 (CYP1A4), mRNA
	Reverse	CGTCCCGAATGTGCTCCTTAT				
1A5	Forward	ACAGCTGTGGAAGAGCACTACCA	85	Head et al. (2006)	NM_205146.1	Gallus gallus cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1), mRNA
	Reverse	TCTCCACGCACTGCTCGAT				
1B1	Forward	CATCTTCTCATCAGGTATCCAAAAGT	130	Johnsson et al. (2011)	XM_419515.3	PREDICTED: Gallus gallus cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1), mRNA
	Reverse	GTACAGGAAAGCCACGATGTAG				
1C1	Forward	TGTGCCCATCACCATTCCACAT	99	Johnsson et al. (2011)	XM_001233594.1	PREDICTED: Gallus gallus cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1), mRNA
	Reverse	ACTGACCACTGGTTGACAAAAGAC				
2D49	Forward	TCCGATGGGCGTTCCTGTTCATGCT	100	original	NM_001195557.1	Gallus gallus cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6 (CYP2D6), mRNA
	Reverse	ATGGTGGGCGGTTCGGTTTCTTCCA				
2C23a	Forward	GTGACCAGCAATGGGGAGAC	188	original	NM_001001616.1	Gallus gallus cytochrome P450 2H1 (CYP2H1), mRNA
	Reverse	GCAACAGCATGGATTAAGAACTTCC				
2C23b	Forward	GTGACCAGCAATGGGGAGAG	190	original	NM_001001757.1	Gallus gallus cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18 (CYP2C18), mRNA
	Reverse	TGGAAACAGCATGCATTAATAAACACAG				
2C45	Forward	ATCCAGCGCTTCATCACTCT	151	original	NM_001001752.1	Gallus gallus cytochrome P-450 2C45 (CYP2C45), mRNA
	Reverse	TTGGGTTTGGAAACTCCTTG				
3A37	Forward	AGCCTGCGGTTGTTGTCATG	132	original	NM_001001751.1	Gallus gallus cytochrome P450 A 37 (CYP3A7), mRNA
	Reverse	CTTCAGCTAATGAGACAGCGTTTC				
3A80	Forward	ACCACCAGCTCCACCCTCAGCTACA	171	original	XM_414782.3	PREDICTED: Gallus gallus cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4 (CYP3A4), mRNA
	Reverse	CCGCAGGGATTCAATCACCACCATGTC				
GAPDH	Forward	CTCTGTGTTGACCTGACCT	125	original	NM_204305.1	Gallus gallus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), mRNA
	Reverse	CAACCTGGTCCTCTGTGTAT				

2.3. 結果

2.3.1. 鳥類 CYP 1-3 遺伝子の概要

本研究では、主に CDS (Coding DNA sequence) 全長を含み、終止コドンを含まない機能的遺伝子を中心として解析を行った。系統解析およびシンテニー解析を元に分類された遺伝子と対照として用いたヒト CYP 1-3 遺伝子の一覧を付録 A-D に示した。

各鳥類種が持つ CYP 遺伝子の数をファミリー別に表 Table 2-2 に示す。CYP 1-3 ファミリー遺伝子の総計では鳥類種とヒトに大差はなかった。また、ファミリーごとに各鳥類種が持つ遺伝子数に大きな差は見られなかったが、CYP2 ファミリーには明らかに CYP1、CYP3 ファミリーより多くの遺伝子が存在していた。

Table 2-2. CYP 1-3 gene numbers in each species

Family	Chicken	Finch	Turkey	Human
1	4	3	3	3
2	21	16	18	16
3	2	2	2	4
Total	27	21	23	23

2.3.2. CYP1

CYP1 ファミリーの系統樹は、JTT (Jones, Taylor, and Thornton) モデルにより作成した (Jones et al., 1992)。解析に含まれたアミノ酸数は 243 残基だった。外群としてヒト CYP1 ファミリーに近縁なヒト CYP2A13 を用いた (Figure 2-3)。

鳥類 CYP1A4、CYP1A5 に対し、ヒト CYP1A1、CYP1A2 が相同な遺伝子であることが知られている (Goldstone et al., 2006)。今回の解析から、CYP1A4、CYP1A5、CYP1B1 については、3 種の鳥類で完全にシンテニーが保存されており、鳥類間での遺伝子の相同関係が明らかだった (Figure 2-3)。一方で、CYP1C1 はキンカチョウ、シチメンチョウ、ヒトではストップコドンを含み偽遺伝子化していた。ニワトリでは CYP1C1 にはストップコドンが含まれず全長が保存された機能的遺伝子そのまま保持されているものと考えられた。

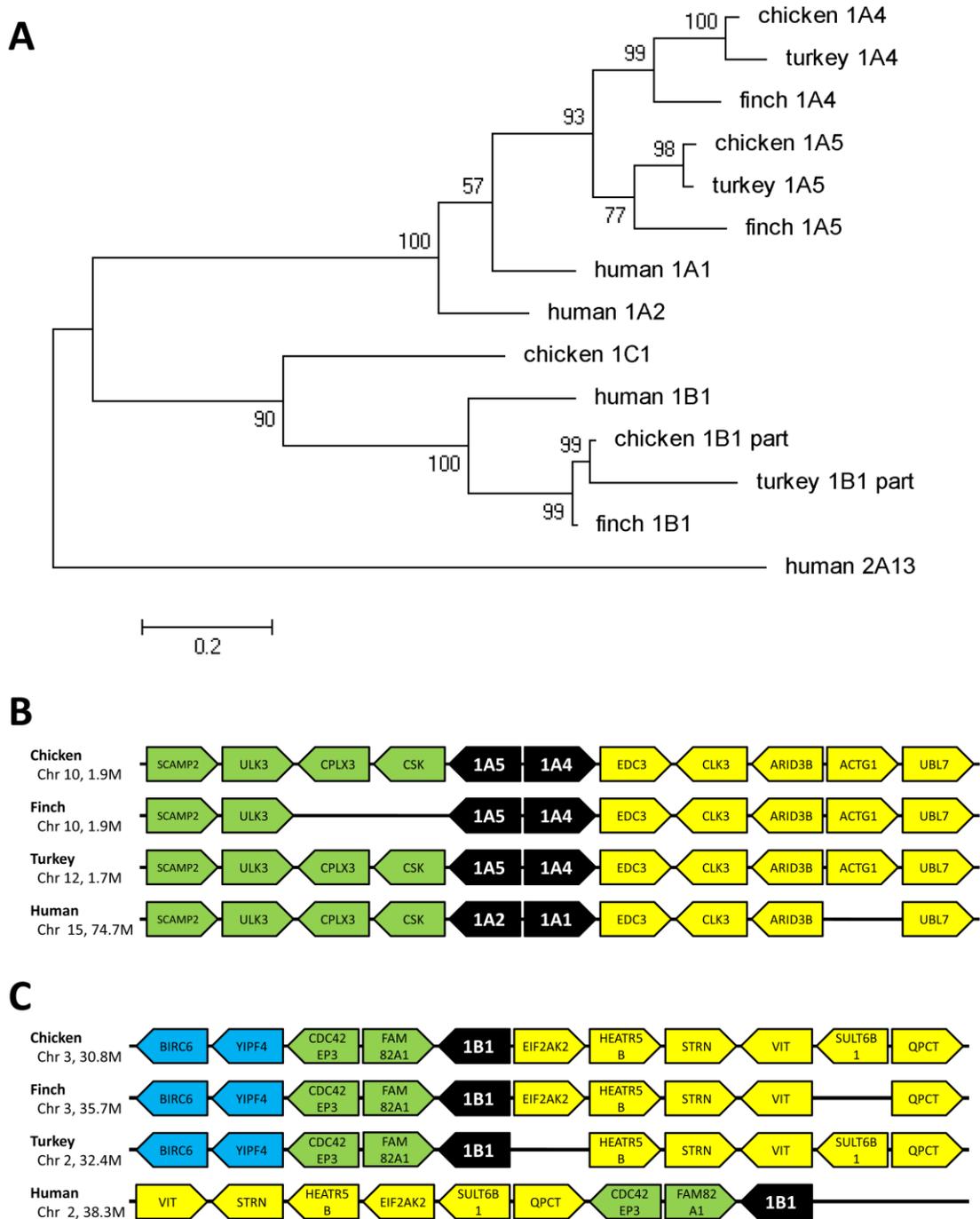


Figure 2-3. Phylogenetic tree and synteny of CYP1 family genes

(A) Phylogeny of CYP1 amino acid sequences from chicken, zebra finch, turkey, and human. The maximum likelihood tree was created using MEGA5 software. The numbers on the branches indicate the number of times per 100 bootstrap replicates that the branch appeared in the trees, estimated by a random resampling of the data. The scale bar represents 20 substitutions per 100 residues.

(B) Synteny of CYP1A4 and CYP1A5 genes (orthologues of human CYP1A1 and CYP1A2).

(C) Synteny of CYP1B1 genes.

2.3.3. CYP2

CYP2 系統樹は、JTT モデルにより 441 残基を用いて作製した (Figure 2-4 にサブファミリーごとに Compress した系統樹、付録 E に系統樹全体を示す)。外群にはヒト CYP1A1 を用いた。鳥類では、CYP2J、CYP2AB、CYP2AC、CYP2W サブファミリーに複数の遺伝子が含まれることが明らかになった。これらのサブファミリーについて、ヒトでは単一の遺伝子、もしくは偽遺伝子のみが含まれている。また、ゲノム情報の不備の可能性はあるが、CYP2B や CYP2E といった哺乳類の染色体上の CYP2ABFGST クラスタに含まれる遺伝子は見つからなかった。

2.3.3.1. CYP2D、CYP2R、CYP2U

CYP2D、2R、2U サブファミリーには、鳥類の 3 種で共通して単一の遺伝子が存在していた。CYP2R1、CYP2U1 については、ヒトも含めて単一の遺伝子がゲノム上での周辺遺伝子と合わせて完全に保存されていた (Figure 2-5)。CYP2D についても同様に、ヒトで偽遺伝子 2 つが認められたものの、シンテニーはヒト-鳥類間でほぼ完全に保存されていた。

2.3.3.2. CYP2ABFGST クラスタ

ヒト、マウスにおいては、CYP2ABFGST 遺伝子クラスターがそれぞれ染色体の 19 番目と 7A3 に存在していることが知られている (Nelson et al., 2004)。Kirischian et al. (2011) はこれまでに CYP2A、CYP2B、CYP2F、CYP2G、CYP2S が哺乳類特有の遺伝子であると示してきた。今回鳥類で CYP2ABFGST クラスタ遺伝子を探索したが、鳥類のゲノム上に CYP2ABFGST クラスタが存在せず、また、いずれの遺伝子も存在が認められなかった。一方で、Kawai et al. (2013) は、次世代シーケンスによりダチョウに CYP2G 遺伝子が存在していることを示しており、またアノールトカゲにおいても CYP2G が存在することが知られている。また、ニワトリ EST データベースの検索から CYP2G-like な配列が確認されている。CYP2G に関しては鳥類でも存在する可能性が高いと思われるが、鳥類の CYP2A や CYP2B に関しては存在が確認できていないことから、CYP2ABFGST クラスタ自体は鳥類に存在せず、CYP2G 遺伝子のみが残っている可能性が示唆された。

2.3.3.3. CYP2C/2E

鳥類の CYP2C23 遺伝子は、もともと鳥類特有の遺伝子と考えられ、CYP2H1、CYP2H2 と命名されていた。近年、Kubota et al. (2010) による系統解析およびシンテニー解析によりこれらの遺伝子が哺乳類の CYP2C 遺伝子に対する相同遺伝子であることが示された。今回鳥類 3 種の遺伝子を含めた系統解析では、ヒト CYP2C・CYP2E 遺伝子が、鳥類 CYP2C23 遺伝子および CYP2C45 遺伝子とは明確に異なる単一のクレードを形成した (付録 E)。コンセンサスツリーでは、ヒト CYP2C/CYP2E、鳥類 CYP2C23、鳥類 CYP2C45 が三分岐となり、相同な系統関係が認められなかった。

染色体上では、鳥類 CYP2C23 遺伝子と CYP2C45 遺伝子は同一染色体上に 1Mb 程度離れて存在していた (Figure 2-6)。鳥類-ヒトで CYP2C 領域を比較すると、鳥類 CYP2C45 がヒト CYP2Cs に相同な位置に認められ、鳥類 CYP2C23 に対してはヒト CYP2C62p が対応して

いた。

CYP2C23 遺伝子領域において、鳥類の CYP2C23a 遺伝子は BLOC1S2 と ALOX5 の間に存在していた。また、ニワトリのみ CYP2C23a 以外の CYP2C23 遺伝子、つまり CYP2C23b 遺伝子と CYP2C23b-like な偽遺伝子を PAX2 と HIF1AN の間に持っていた。ヒトにおいても、PAX2、HIF1AN、BLOC1S2、CPN1 の染色体上位置は保存されていたが、CYP2C62 偽遺伝子は CPN1 に隣接して存在していた。シチメンチョウでは、CYP2C23-like な部分配列が ALOX5 と CPN1 の間に存在していたが、配列中に停止コドンを含み、完全長ではない偽遺伝子になっていた。また、鳥類とヒトの比較では、鳥類で BLOC1S2 と CPN1 の間にそれぞれ 70 以上の遺伝子が含まれていたが、ヒトでは BLOC1S2 と CPN1 遺伝子の間に CYP2C62 偽遺伝子を含む 6 つの遺伝子しか認められず、また、CYP2C62 偽遺伝子が鳥類 CYP2C23 遺伝子に相同と考えられたものの、その遺伝子の向きは異なっていた。以上より、BLOC1S2 と CPN1 間の CYP2C 遺伝子領域が、哺乳類と鳥類間で異なる進化を遂げてきたことが示された。

CYP2C45 遺伝子のゲノム領域は種間で変化に富んでいた。ニワトリで、CYP2C45 遺伝子と、CYP2C45 遺伝子に隣接する CYP2C21-like 偽遺伝子は CYP2C23 遺伝子領域の約 0.8Mb 上流に存在していた。鳥類 CYP2C45 遺伝子は SORBS1-PDLIM-HELLS-ZP4 クラスターと TLL2-TM9SF3 クラスターの間に存在していた。一方で、ヒトでこれに対応している領域では、4 つの CYP2C 遺伝子 (CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2C19) が SORBS1-C10orf129 クラスターと HELLS 遺伝子の間に存在しており、TM9SF3-TLL2 クラスターは鳥類と比べて反対側に存在していた。ヒト CYP2E1 遺伝子は染色体 10 番の 135Mb 領域の OR7M1P と SYCE1 遺伝子の間に存在していた一方で、4 つの CYP2C 遺伝子は同じ染色体の 96.4-101.9Mb 領域に存在していた。ヒト CYP2E1 遺伝子に対応する領域および遺伝子群は鳥類では認められなかった。

2.3.3.4. CYP2J

ヒトでは CYP2J 遺伝子が一つしか確認されていないのに対し、鳥類では複数の CYP2J 遺伝子が存在していた。GenBank の他に、Ensembl、UCSC BLAT を使用して CYP2J 遺伝子を探索した結果、ニワトリでは 1 つの部分配列を含む 6 遺伝子、キンカチョウでは染色体上にマッピングされていない 2 遺伝子を含む 4 遺伝子、シチメンチョウでは 1 つの部分配列を含む 3 遺伝子が認められた。染色体上の遺伝子配置に関しては、いずれも MYSM1-FGGY-HOOK1 クラスターと NFIA-TM2D1-INADL クラスターの間に存在しており、その遺伝子数のみが異なっていた (Figure 2-6)。系統解析からは、*Galloanserae* の共通祖先種で遺伝子重複が起きた可能性が示された (付録 E)。

2.3.3.5. CYP2AB

CYP2AB 遺伝子については、鳥類では共通して 5 つの CYP2AB 遺伝子が確認された一方で、ヒトでは CYP2AB1p という単一の偽遺伝子のみが認められた (Figure 2-6)。また、キンカチョウでは CYP2AB1 遺伝子が CDS 中に停止コドンを含む偽遺伝子化しており、シチメンチョウ CYP2AB3 遺伝子は GenBank には存在せず、Ensembl データベース上で発見された。CYP2AB 遺伝子のシンテニーは、鳥類でいずれも CHRND-CHRNA2-EIF4E2 クラスター

と CAPN10-RNPEPL1-ABCC5 クラスターの間で明確に保存されていた。一方で、ヒトでは第 3 染色体の PARL-MIR4448-RPSAP31 クラスターと ABCC5-EEF1AL6-HTR3D クラスターに存在し、ABCC5 以外には鳥類と共通する遺伝子が認められなかった。なお、ヒトでは CHRND-CHRNG-EIF4E2 クラスターと CAPN10-RNPEPL1 クラスターはそれぞれ第 2 染色体の 233.4Mb、241.5Mb に存在しており、その近傍には CYP 遺伝子が存在していなかった。偽遺伝子を除外した系統解析では、鳥類 CYP2AB は、CYP2AB1、CYP2AB4、CYP2AB5、と、CYP2AB2、CYP2AB3 という 2 つのクレードに分岐した。このことから、鳥類の *Neognathae* 祖先種で既に 5 分子種に重複が起こっていたと考えられた。

2.3.3.6. CYP2AC1/2

CYP2AC 遺伝子について、いずれの種でもこれらの遺伝子が CRISP2-RHAG クラスターと CENPQ-MUT クラスター間に存在し、相同関係も系統樹により明らかだった (Figure 2-5)。ヒトでは CYP2AC1p という偽遺伝子のみが存在しており、ニワトリ、シチメンチョウでは 2 つの遺伝子、CYP2AC1、CYP2AC2、キンカチョウでは CYP2AC2 のみが存在していた。また、キンカチョウでは CYP2AC1 遺伝子の痕跡も認められなかった。このことから、哺乳類と鳥類の共通祖先では 1 つだけ CYP2AC 遺伝子が存在し、この遺伝子が鳥類の *Galloanserae-Neoaves* の分岐後に *Galloanserae* でのみ遺伝子重複したと考えられる。

2.3.3.7. CYP2AC7/2W

CYP2AC7、CYP2W 遺伝子は、ヒトでは CYP2W1 遺伝子のみ、鳥類では、ニワトリ・シチメンチョウで CYP2AC7 と 2 つの CYP2W 遺伝子、キンカチョウでは CYP2AC7 と 1 つの CYP2W 遺伝子が認められた。これらの遺伝子は、いずれの種でも PRKAR1B-ADAP1-COX19 クラスターと GPR146-PSMG3 クラスター間に位置し、系統樹からその相同関係も明らかだった。キンカチョウでは CYP2W2 が見られなかったことから、ゲノム情報の欠損、もしくは、*Galloanserae* でのみ CYP2W 遺伝子の重複が起きたと考えられる。

また、系統樹では CYP2AC7 遺伝子と CYP2W 遺伝子がクレードを形成し、CYP2AC1、CYP2AC2 遺伝子クレードとは姉妹関係だった。このことから、CYP2AC1-CYP2AC2 遺伝子群と、CYP2AC7-CYP2W 遺伝子群は、異なる染色体に存在するものの (ニワトリでは前者が第 14 染色体、後者が第 3 染色体上に位置する) 単一の祖先遺伝子から遺伝子重複により生まれた遺伝子であり、その中でヒトでは CYP2W1 のみが維持され、鳥類では 3-5 遺伝子が維持されているものと考えられた。

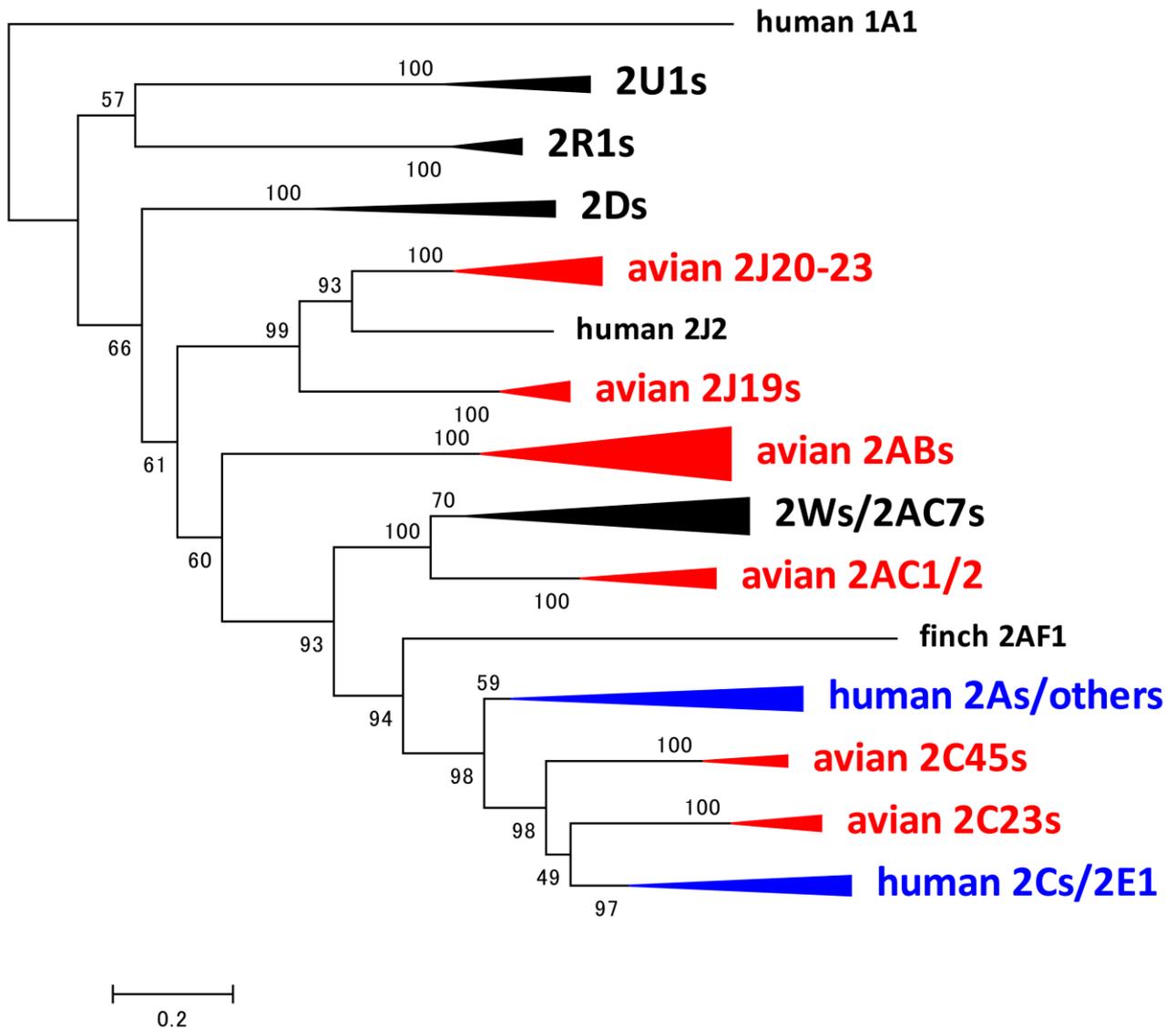


Figure 2-4. Compressed phylogeny of CYP2 genes

Phylogeny of CYP2 amino acid sequences from chicken, zebra finch, turkey, and human. The maximum likelihood tree was created using MEGA5 software. The numbers on the branches indicate the number of times per 100 bootstrap replicates that the branch appeared in the trees, estimated by a random resampling of the data. The scale bar represents 20 substitutions per 100 residues. The triangles indicate genes in the same subfamily. The size of the triangles indicates the number of genes included in the branch. Blue triangle and red triangle indicate avian specific branch and human specific branch, respectively. The detailed phylogeny is shown in Appendix B.

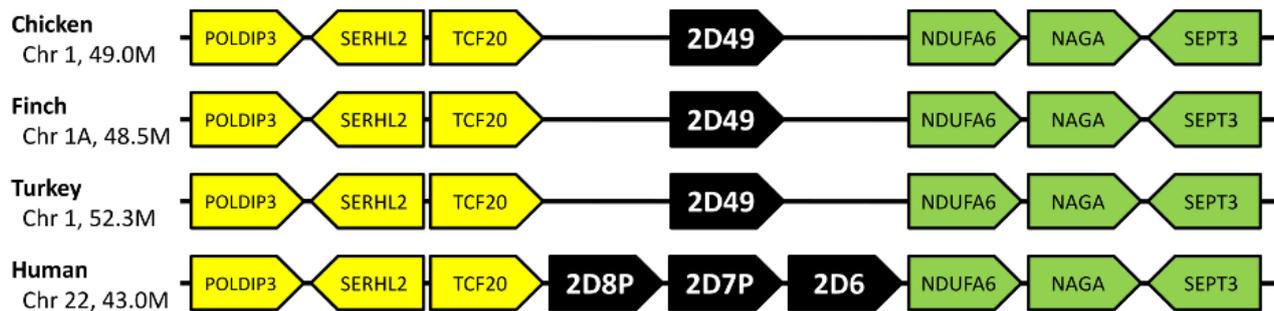
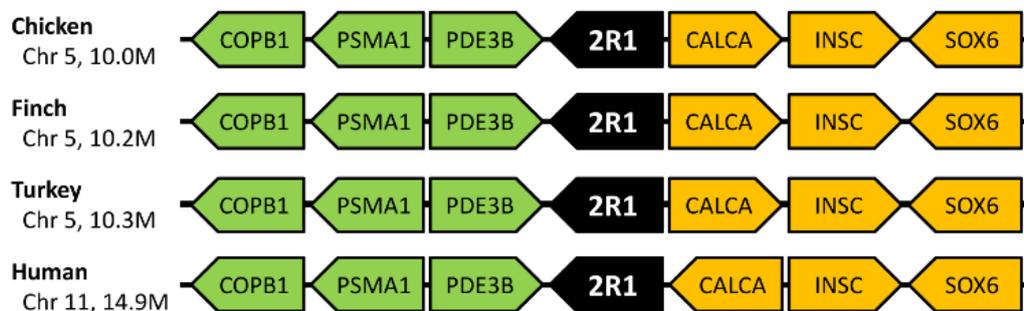
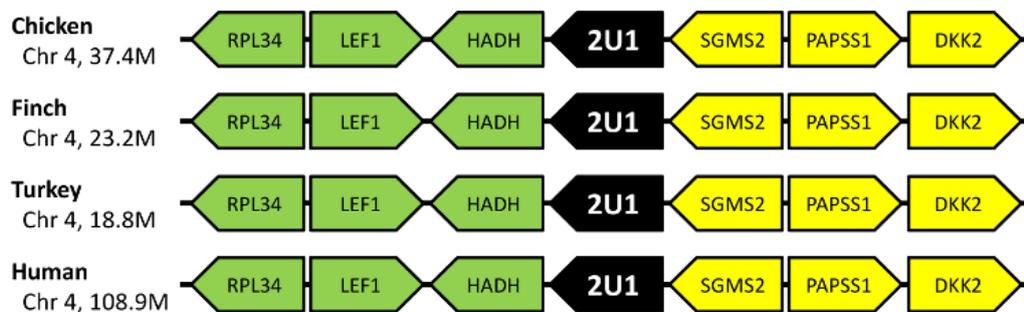
A**B****C**

Figure 2-5. Typical fully shared synteny of CYP2D, 2R and CYP2U

Synteny was well conserved for the following genes (A) CYP2D genes. (B) CYP2R1, (C) CYP2U1. CYP2R1 and CYP2U1 are known to metabolize endogenous compounds in mammal, while chicken CYP2D49 has been reported to metabolize bufuralol, a beta blocker drug.

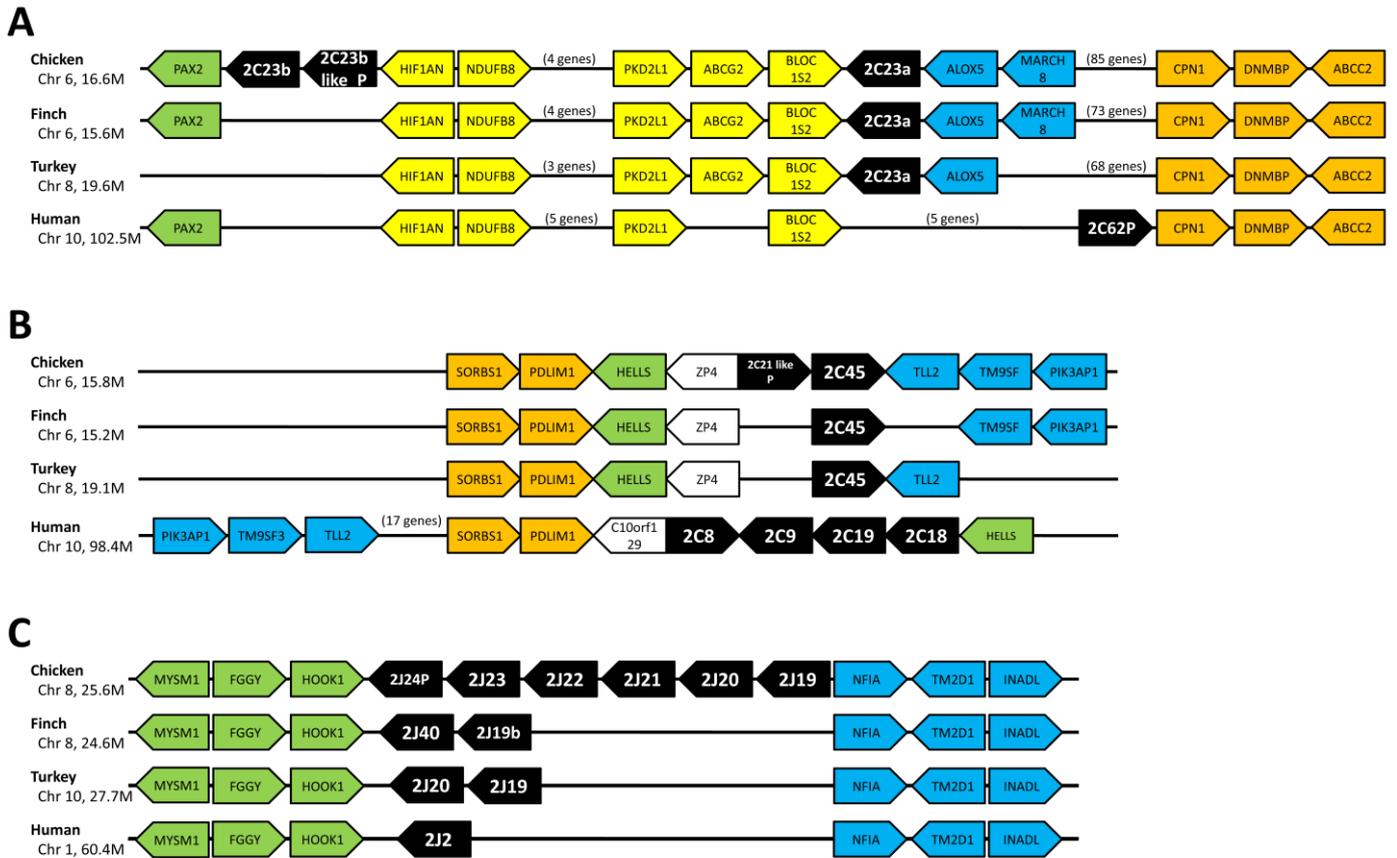


Figure 2-6. Synteny of CYP2 family genes

(A) Synteny of CYP2C23 genes. Only chicken had two CYP2C23 genes, whereas the other two birds possessed only one CYP2C23a gene. Avian CYP2C23 genes have been reported to be orthologous to human CYP2C62P, rat CYP2C23 and mouse CYP2C44.

(B) Synteny of CYP2C45 genes. CYP2C45 genes were generally conserved among bird species. Although both avian CYP2C45 genes and human CYP2C genes located nearby SORBS1-PDLIM1 cluster, phylogeny did not suggest that avian CYP2C45 genes are related to human CYP2C genes. These results implied that the avian and human CYP2C genes having gone through independent duplication events in each lineage.

(C) Synteny of CYP2J genes. Two of the zebra finch CYP2J genes were not localized to the chromosome and are not shown in this figure.

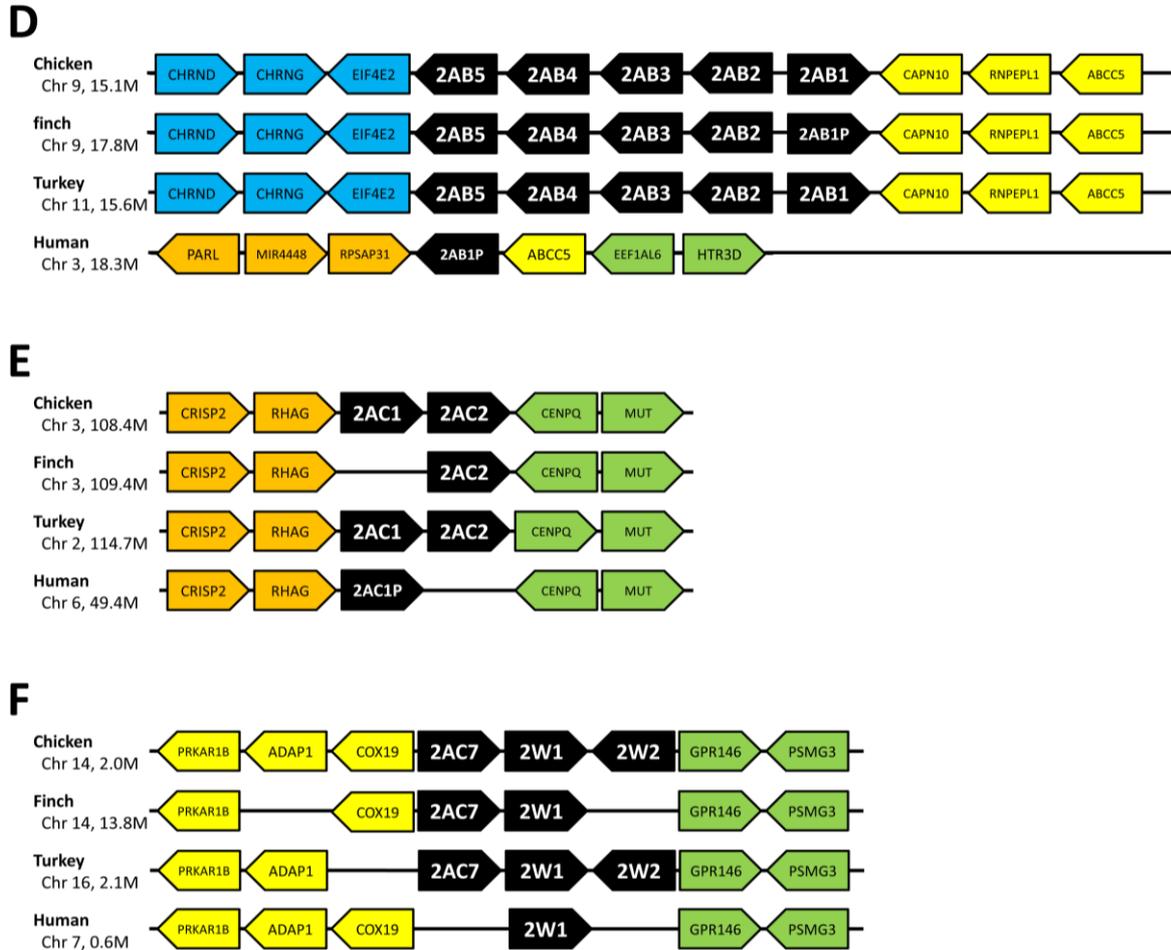


Figure 2-6. Synteny of CYP2 family genes, continued

(D) Synteny of CYP2AB genes. Five avian CYP2AB genes were fully conserved among bird species, while human have only one pseudogene.

(E) Synteny of CYP2AC1 and CYP2AC2 genes. While avian species possessed one or two intact CYP2AC genes, human possessed only one pseudogene. The synteny was generally shared among bird species and human.

(F) Synteny of CYP2AC7 and CYP2W genes. The gene orders around CYP2AC7 and CYP2W genes were generally conserved among species, although bird species possessed another CYP2W gene and CYP2AC7 gene in addition to CYP2W1. CYP2AC7 genes were thought to have diverged from CYP2W genes, and became a parent gene for CYP2AC1 and CYP2AC2.

2.3.4. CYP3

CYP3 遺伝子の系統樹は、ヒト CYP4B1 を外群として JTT モデルにより 315 残基を用いて作成した (Figure 2-7)。CYP3 遺伝子は大きく二つの系統に分かれ、一つは鳥類の CYP3A37 遺伝子と CYP3A80 遺伝子を含み、他方にはヒトが持つ四つの CYP3A 遺伝子がすべて含まれた。ブートストラップ値から、CYP3A は鳥類 CYP3A37 クレードと鳥類 CYP3A80 クレード、ヒト CYP3A という 3 群に分岐していることがある程度妥当と考えられる。

CYP3A 遺伝子のゲノム上位置は、鳥類間では TRRA 遺伝子から 34-44 遺伝子離れて CYP3A80-CYP3A37-PDAP1-ATPAF2 クラスターが存在し、遺伝子の配置が完全に保存されていた (Figure 2-7)。一方で、ヒトでは 2 つの CYP3A 偽遺伝子を含む CYP3A 遺伝子クラスターが TRRA-PDAP1 に隣接していた。鳥類 CYP3A37 と CYP3A80 は、いずれも種間での相同遺伝子が明らかだったが、鳥類-ヒト間では 3A 遺伝子の相同関係が明確には認められなかった。

Qiu et al. (2008) は、CYP3A 遺伝子の系統について鳥類-哺乳類の共通祖先種では 2 つの遺伝子が存在しており、ヒトではその一方の系統が偽遺伝子化していることを示した。これに対し、McArthur et al. (2003) は、サル目とネズミ目の祖先種では単一の CYP3A 遺伝子が存在しており、種分化後、それぞれの系統内で独立して遺伝子重複による CYP3A 遺伝子の増加が起こったものと示している。

今回の解析は鳥類-哺乳類の祖先種での CYP3A 遺伝子数を考察するに十分な種・遺伝子を用いていないが、鳥類 CYP3A とヒト CYP3A がそれぞれ単系統から派生して現存する遺伝子数まで重複し、鳥類-ヒト間では相同遺伝子が存在しない (Paralogue ではあるが、Orthologue ではない) という点ではいずれの報告とも矛盾しない。

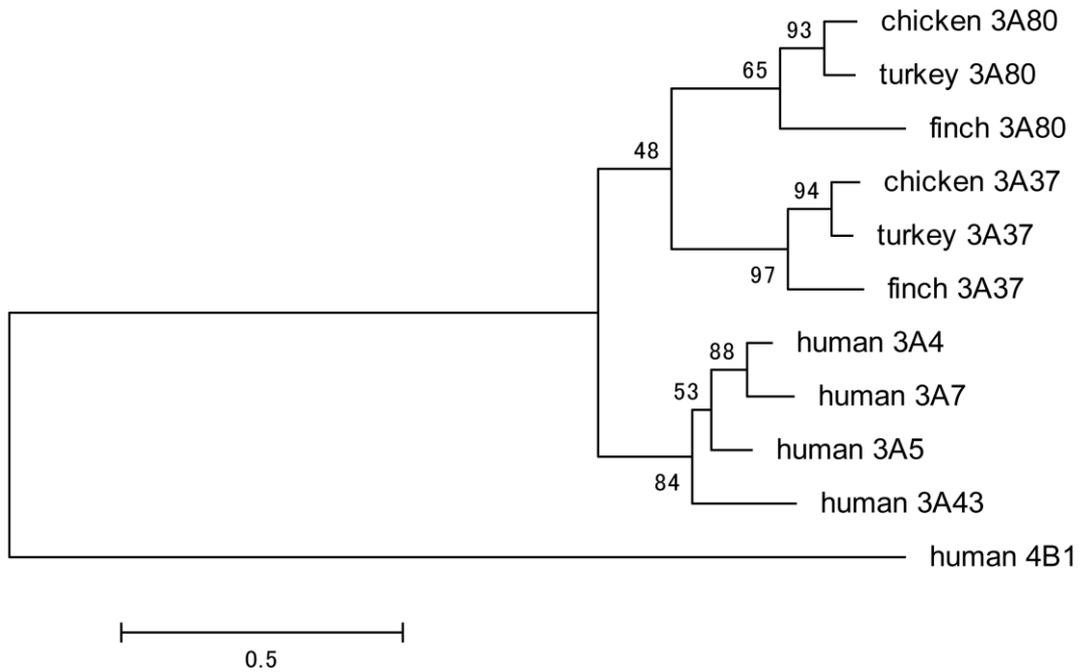
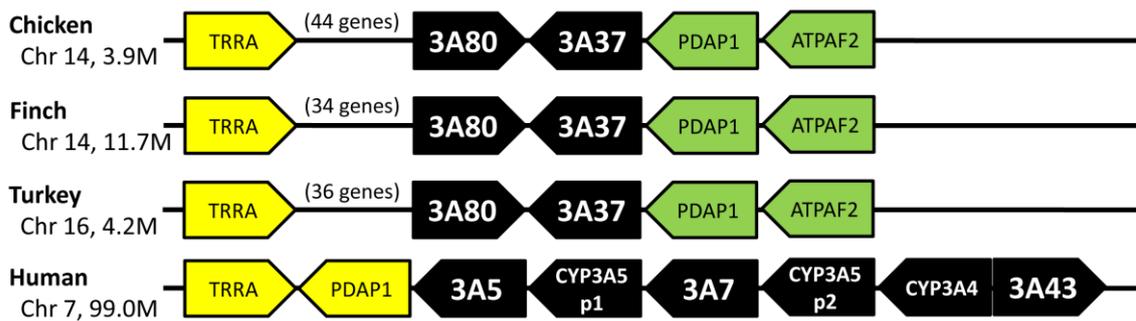
A**B**

Figure 2-7. Phylogenetic tree and synteny of CYP3A genes

(A) Phylogeny of CYP3 amino acid sequences from chicken, zebra finch, turkey, and human. The maximum likelihood tree was created using MEGA5 software. The numbers on the branches indicate the number of times per 100 bootstrap replicates that the branch appeared in the trees, estimated by a random resampling of the data. The scale bar represents 50 substitutions per 100 residues.

(B) Avian species possessed two *CYP3A* genes, whereas humans possessed six genes including two pseudogenes. Although the loci of *CYP3A* genes were almost conserved between avian species and human, none of the avian *CYP3A* genes showed clear correspondence to any of the human *CYP3A* genes.

2.3.5. ニワトリ肝臓での主要 CYP 分子種の発現量解析

2.3.5.1. 生理的条件下での mRNA 発現量

哺乳類の異物代謝で中心的な分子種に相同なニワトリ CYP の 10 分子種について、肝臓での mRNA 発現量の解析を行った (CYP1A4、CYP1A5、CYP1B1、CYP1C1、CYP2C23a、CYP2C23b、CYP2C45、CYP2D49、CYP3A37、CYP3A80)。内因性コントロール遺伝子として予備試験で GAPDH と beta-actin について測定した所、PB により beta-actin が誘導されていたため、GAPDH を選択した。

薬物無処置での肝臓における CYP の恒常的な発現量では、ニワトリのオス・メスともに、CYP2C45 が最も発現量が多く、次いで CYP1A5 > CYP2C23a > CYP3A37 > CYP3A80 の順に多く発現していた。鳥類の CYP についてサブファミリーを越えて分子種間で mRNA 比較を行った報告はこれまでになく、ニワトリの異物代謝における CYP2C45 の重要性が強調される結果だった。また、CYP3A は、ヒトではタンパク質発現量の多さと、キャピティが大きいことによる基質特異性の広さが、ヒトの薬物・異物代謝における CYP3A4 の重要性を高めているものと考えられるが、ニワトリでは CYP3A は CYP1A5、CYP2C23a、CYP2D49 につぐ発現量しか見られなかった。

2.3.5.2. PB 投与時の mRNA 誘導

PB は、哺乳類の Constitutive Androstane Receptor (CAR) を活性化して核内移行を引き起こし、CYP2B 遺伝子や CYP3A 遺伝子の転写を誘導することが知られている。CAR は AhR・PXR に並び、哺乳類において異物代謝 CYP 遺伝子の調節に関わる最も重要な受容体の一つである。一方で、鳥類では哺乳類に存在する CYP2B 遺伝子が存在せず、また、哺乳類の CAR・PXR に相同する遺伝子として Chicken Xenobiotic Receptor (CXR) のみを持つ。CXR も哺乳類の CAR と同様に PB による活性化を受けることが明らかになっている (Moore et al., 2002)。

これまでにニワトリの胚やニワトリ由来細胞株で PB による CYP 遺伝子の誘導が研究されてきたが、一方でニワトリ成体での CYP 遺伝子誘導に関する報告はほとんどない。そこで、今回は、ラットなどで用いられる CYP 誘導剤の投与量に合わせてニワトリに PB を投与し、CYP 遺伝子の誘導を観察した (80mg/kg、腹腔内投与、3 日間)。その結果、CYP2C23b が 10 倍程度と最も強く誘導され、CYP2C23a、CYP2C45 がそれに続き、CYP3A37 は 4 番目に強く誘導されていた。

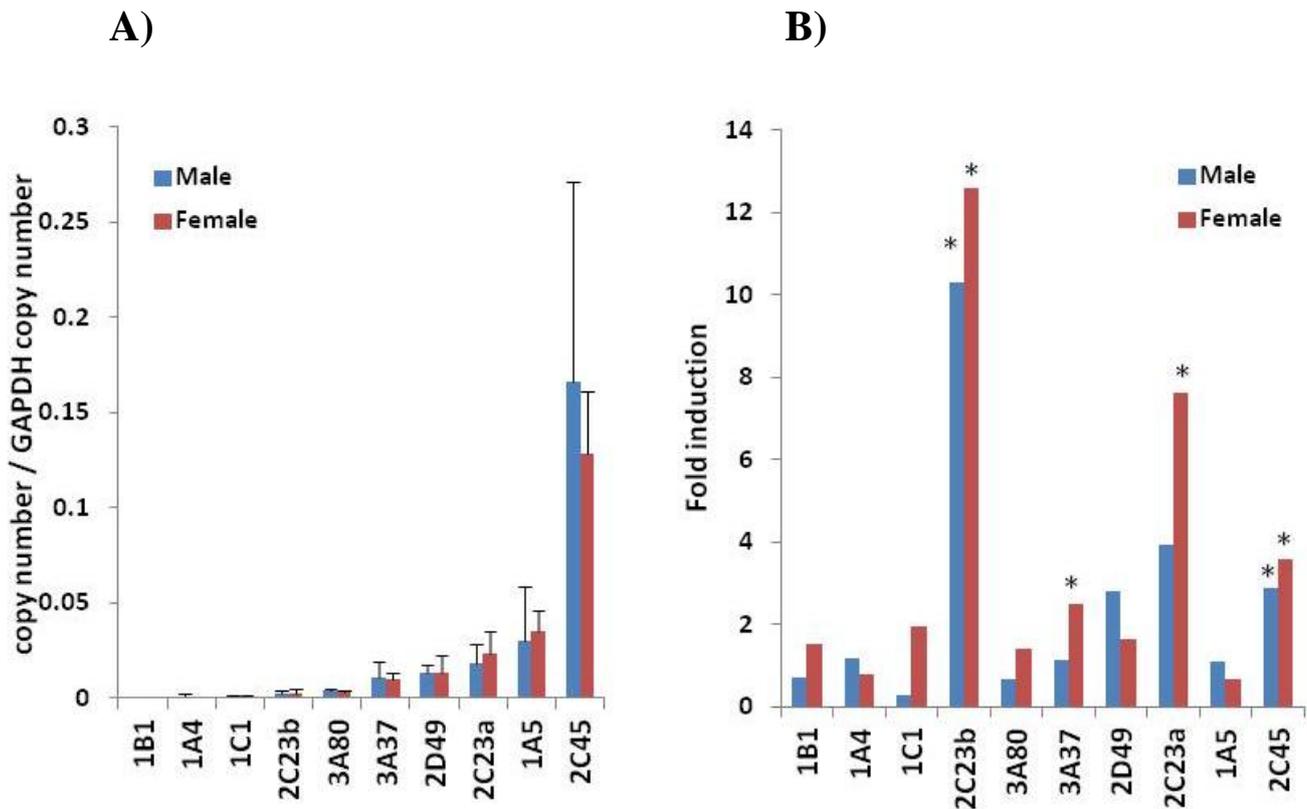


Figure 2-8. Comparison of basal mRNA expression levels and induction by PB of CYP genes in chicken liver

qRT-PCR was performed with cDNAs derived from chicken liver for following genes: *CYP1A4*, *CYP1A5*, *CYP1B1*, *CYP1C1*, *CYP2C23a*, *CYP2C23b*, *CYP2C45*, *CYP2D49*, *CYP3A37*, and *CYP3A80*. The transcripts of each gene were calculated using plasmid standards. The values represent the expression levels normalized with *GAPDH* gene transcripts.

(A) basal expression levels in non-treated chicken liver. Data are expressed as an average \pm SD

(B) fold induction levels by PB are indicated by the ratio of the mRNA expression levels of PB-treated chicken liver and saline-treated chicken liver for each gene. The fold induction level is shown by an average, and the significant induction of genes in PB-treated chicken compared to saline-treated chicken is indicated by an asterisk. N=4 for each group.

2.4. 考察

2.4.1. 遺伝子の保存性と機能

Thomas (2007)は、CYP 遺伝子の種を越えた保存性について研究を行い、内因性代謝を担う CYP 分子種が保存されているのに対し、異物代謝を行う分子種では遺伝子重複や偽遺伝子化が起こっていることを示し、それぞれを *stable gene* と *unstable gene* と名づけた。

今回の結果からは、CYP2R1 と CYP2U1、CYP2D49 が鳥類-ヒト間で最も良く保存されている分子種で、典型的な *stable gene* であることが示された。CYP2R1、CYP2U1 はそれぞれヒトでビタミン D 代謝とアラキドン酸代謝という内因性代謝に関わる遺伝子であることが示されている (Cheng et al., 2004; Chuang et al., 2003)。また、ヒト CYP2D6 は抗うつ剤やプロプラノロールなどの外因性代謝にも重要な役割を担っているが、セロトニンを含むヒドロキシトリプタミン類などの内因性代謝も担うことが知られている (Ingelman-Sundberg, 2004)。これらは鳥類でも必須な物質と考えられるため、CYP2R1、CYP2U1、CYP2D49 は鳥類でもヒトと同様の内因性代謝に関わっているものと考えられた。

Unstable gene としては、CYP2C 遺伝子が挙げられた。哺乳類 CYP2C は異物代謝だけでなく、ステロイド代謝やアラキドン酸代謝に関与することが知られている。鳥類の CYP2C23 遺伝子、CYP2C45 遺伝子は、それぞれヒトの CYP2C62p と CYP2Cs に対応するものと考えられたが、相同関係は明確ではなかった。また、ニワトリでのみ CYP2C23 遺伝子が重複しているなど、変化に富む遺伝子であることが明らかになった。これらは CYP2C 遺伝子が鳥類では内因性代謝という種を超えて必須な機能ではなく、むしろ異物代謝などに特化していることを示唆している。今後、CYP2C の基質の特定などの機能解析を行い、鳥類での CYP2C の基質や活性、異物代謝への寄与について明らかにしていく必要がある。

CYP2J や CYP2AB、CYP2AC は、ヒトには 1 遺伝子のみ、もしくは偽遺伝子化している。一方で、鳥類内ではこれらの分子種のほとんどが重複したまま保存されていた。このことから、これらの分子種は哺乳類では必須ではないが、鳥類内で保存された必須の機能を担っている可能性が高いものと考えられた。

CYP2J は肝臓以外の臓器で高いを示す分子種として知られている。例えば、ヒト CYP2J2 は、小腸や心臓、骨格筋、胎盤などで他の分子種に比べ多く mRNA が発現しており、肝臓では比較的少ない (Bieche et al., 2007)。基質としてはアラキドン酸やビタミン D などの内因性物質の他、抗ヒスタミン薬エバスタチン、駆虫薬アルベンダゾールなどの代謝にも関わる (Askari et al., 2013; Wu et al., 2013; Hashizume et al., 2002)。小腸での初回通過効果などで異物代謝にも寄与しているが、心臓や骨格筋などでも多く発現していることから本来的には内因性代謝に関与していた分子種と考えられる。今回調査していないが、鳥類においても肝外発現を示し個別の臓器で内因性代謝に関与している可能性が高いだろう。

CYP2AB、CYP2AC に関してはマウスやラットで遺伝子の存在が知られ、系統解析などがなされている (Kirischian et al., 2011)。しかし、哺乳類でも基質や機能については研究されおらず、唯一、マウスでの臓器別 mRNA 発現量に関する報告がなされているのみである (Renaud et al., 2011)。CYP2AB、CYP2AC は哺乳類においては *Unstable gene* のように遺伝子数に種差が見られるが、鳥類内ではほぼ相同の遺伝子が保存されていた。このことから、CYP2AB、CYP2AC は哺乳類とは異なり鳥類固有の内因性代謝機能を持つ可能性が考えられる。

2.4.2. ヒト-鳥類間での遺伝的な種差

今回の解析では、CYP の発現量や機能についてヒトで最もよく理解されていることから、比較対象にヒトを用いた。その結果、偽遺伝子を含めると CYP サブファミリーレベルでの遺伝子の有無にはヒトと鳥類で違いがなく、サブファミリー内での遺伝子数には多くの違いが見られた。

鳥類では CYP2J や 2AB、CYP2AC・CYP2W サブファミリー内で 3-5 遺伝子と複数が見られ、これらのサブファミリーではヒトでは単一の遺伝子もしくは偽遺伝子しかなかった。これらの遺伝子は鳥類間では良好に保存されていたことから、*Galloanserae-Neoaves* の共通祖先で既に重複しており、そのまま現在まで維持されているものと考えられる。また、CYP2AB、CYP2AC は哺乳類でも機能解析がなされていないが、鳥類間で保存されていることから、鳥類特有の未知機能を有していることが予想される。

その他に、CYP3A や CYP2C という哺乳類の異物代謝で重要な分子種についても遺伝子数の違いが見られた。CYP3A、CYP2C の両者とも基質の結合するキャビティサイズが大きく基質特異性は広いものと考えられるため、鳥類でもその発現量により異物代謝への寄与が決定されるものと考えられる。

2.4.3. CYP 遺伝子の鳥類間種差

鳥類は大きく *Paleognathae*、*Galloanserae*、*Neoaves* に分けられる。*Galloanserae* は 500 種程度と種は少ないが、ニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ、カモなどの重要な家禽種、毒性試験種を含む。一方、*Neoaves* は鳥類の 95% 以上を含み、野生鳥類種はほとんどが *Neoaves* である。そこで、*Galloanserae* と *Neoaves* 間での遺伝的な種差を検討するため、それぞれの種を比較して解析した。

その結果、CYP2C23 についてニワトリだけで 2 遺伝子 (CYP2C23a、CYP2C23b) が見られ、これは *Galloanserae-Neoaves* の分岐以降に起こった遺伝子重複と考えられた。他に、CYP2W や CYP2AB などに遺伝子数の違いが見られたが、これはゲノム情報の不完全さによる可能性もあり、また機能も明らかになっていないことから、遺伝的な種差として重要なものとは認められなかった。

今回の研究は、ニワトリ、シチメンチョウ、キンカチョウという 3 種のみを用いた解析ではあるが、*Galloanserae-Neoaves* 間で保存されている分子種が大半であり、これらは全種の鳥類で保存されていると考えられる (ただし、機能的遺伝子か偽遺伝子かは個別に調べる必要がある)。

2.4.4. 鳥類における各 CYP 分子種の重要性

無処置ニワトリでの分子種間の mRNA 発現量比較により、CYP2C45 がニワトリ肝臓では最も多く発現していることが明らかになった。

ヒト・ラットでは、mRNA 発現量と薬物代謝への寄与、あるいは mRNA 発現量とタンパク質発現量の間にある程度相関が見られることが知られている。今後この結果を踏まえて各 CYP 分子種のタンパク質発現量、異物代謝への寄与を明らかにしていく必要がある。さ

らに、今回の研究は代表的な *Gallanserae* 種であるニワトリでの結果を示したが、*Neoaves* 種でも同様に CYP2C45 が高発現を示し、異物代謝上重要な分子種である可能性が高い。なお、第3章(3.3.5.)では、ニワトリの肝臓ミクロソームで CYP2C45 が CYP2C23 よりも高いタンパク質発現量を示す結果が得られており、本章の mRNA 発現量と合致していた。

異物代謝における各 CYP 分子種の寄与の大きさは、個別の分子種の基質特異性の広さとタンパク質発現量の大きさで決まると考えられる。酵素における基質特異性の広さについて、”Promiscuity (基質を選ばない程度)”という指標を用いた研究がなされており、外因性代謝に関わる CYP 分子種では”Promiscuity”が高く内因性 CYP では低い (Foti et al., 2011)。また、CYP では一般にキャビティサイズにより、代謝できる化合物のサイズ・分子量が限定される面がある。キャビティサイズは基質との結合状態での立体構造解析から算出され、ヒトでは CYP3A4 が最もキャビティサイズが大きく (500-2700 Å³程度)、それに CYP2C8 (950-1600 Å³程度) や CYP2C9 (700-1500 Å³程度) が続く (Dong et al., 2011; Gay et al., 2011)。また、CYP1A や CYP2D では比較的キャビティサイズが小さい(各 375-410 Å³、510-800 Å³)。

今回 CYP2C45 について CYP1A5 が強く発現していた。ヒト CYP1A2 では Promiscuity が CYP3A4・CYP2C9 と同程度ながら、キャビティサイズは 400 Å³程度であり、コプラナーな基質をよく代謝することが知られている (Brown et al., 2008)。

上記より、鳥類 CYP2C45 の高発現は、タンパク質発現量の高さだけでなく、基質特異性の幅広さも予想されるため、ニワトリの異物代謝に大きく寄与していると予想できる。また、CYP1A5 については、発現量が高いながらも、相対的に基質特異性が低いことから、PAHs などに限った代謝に効率よく貢献しているものと予想される。

今回雌雄を用いて性差の解析も行ったが、CYP 各分子種の mRNA 発現量に明確な雌雄差は認められなかった。Pampori et al. (1993)は、ニワトリの CYP 活性の雌雄差に着目し、ECOD (Ethoxycoumarin-O-deethylase)や EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase)、HXOH (Hexobarbital hydroxylase)、COH (Coumarin-7-hydroxylase)活性や、アンドロゲン水酸化活性について、一般にオスのほうがメスの 2-4 倍程度高い活性を持つこと、さらに、CYP 含量にも 2 倍程度の差があることを明らかにしている。このことから、CYP の mRNA 発現レベルでは性差がないものの、タンパク質への翻訳効率、タンパク質安定性などにより活性の性差が生まれているものと考えられた。

2.4.5. ニワトリ成体での PB による CYP 分子種の誘導

PB による CYP 誘導について、鳥類では、ニワトリ肝癌由来 LMH 細胞 (Leghorn male hepatoma) などの細胞や鶏卵を用いた *in vitro*、*in ovo* の系で詳細に研究がなされている。LMH では、PB による誘導は CYP2C23a が CYP3A37 の 4-5 倍程度強い (Ourlin et al., 2002)。また、CYP2C23 や CYP2C23b、CYP2C45 については CXR-binding site や HNF-3 binding site が存在し、CXR や LXR (Liver X receptor) を介して PB により誘導されることが明らかになっている (Baader et al., 2002; Handschin et al., 2001; Handschin et al., 2000a; Handschin et al., 2000b; Dogra et al., 1999; Hahn et al., 1991)。今回の実験から、これら *in vitro* や *in ovo* で見られた誘導が実際に *in vivo* で観察された。一方で、これまで研究されていない CYP3A80 についても弱く誘導されていることが示唆された。

PB による誘導率については、CYP2C23b で 10-12 倍、CYP2C23a で 4-8 倍、CYP2C45 で 3

倍、CYP3A37 では 1-2 倍程度だった。同様のプロトコルで CYP の mRNA 発現量を解析している論文は多く、マウスでは 100mg/kg 単回投与で CYP2B が 22 倍、CYP3A が 17 倍(Corcus et al., 1998)、ラットでは 80mg/kg、4 日間で CYP2B が 71 倍、CYP3A が 15 倍(Hartley et al., 2000) 60mg/kg、3 日間で CYP2B が 3,000 倍、CYP3A が 4-8 倍(Kishida et al., 2008)、ウサギでは 80mg/kg、4 日間で CYP2B が 20,000 倍程度に誘導される(Marirni et al., 2007) などの報告がある。これら哺乳類の結果と比較すると、今回ニワトリの *in vivo* で見られた誘導は比較的弱いものと考えられる。

2.4.6. ニワトリの異物代謝

本章の mRNA 発現量比較により、ニワトリで発現量が大きく異物代謝に寄与している分子種の候補として CYP2C45 や CYP1A5、CYP2C23a、CYP2D49 が挙げられた。

哺乳類では CYP3A や CYP2D、CYP1A などいくつかの分子種がある程度高いタンパク質発現量を持つことで多くの基質を代謝し、結果として肝臓ミクロソーム中の CYP 含量はニワトリの 2 倍程度の値を示す(Ohtsuki et al., 2011)。一方、ニワトリは哺乳類と較べて肝臓ミクロソームタンパク質中の CYP 含量が半分程度である(Hu, 2013)。また、多くの基質について哺乳類と比べて極めて低い代謝活性が見られるのに対し、哺乳類と較べても非常に高い代謝活性を示す基質が存在することもわかっている(Khalil et al, 2001)。このことから、ニワトリでは、CYP2C45 や CYP1A5 などごく少数の分子種のみが高発現しており、その分子種の基質であれば非常に高い代謝活性を示し、そうでなければ低い代謝活性を示す、という状況であることが予想される。

2.5. 小括

本章の研究より、初めて鳥類種で存在する CYP 1-3 遺伝子が網羅的に同定された。遺伝子解析による遺伝的な種差の検討では、哺乳類—鳥類間でサブファミリーレベルでの遺伝子の存在の有無ではほとんど種差がないものの、CYP2AB や CYP2AC、CYP2J などで鳥類に特徴的な遺伝子の重複が認められた。これらは鳥類 CYP に特有の機能を保持している可能性があり、今後鳥類研究の焦点の一つになるものだろう。

鳥類間では、今回目的とした *Galloanserae-Neoaves* 間の比較により、保持する CYP 遺伝子についてこの両属を通してサブファミリーレベルではほとんど相同な遺伝子で構成されており、種差がないことが示された。毒性学的な観点からは、*Galloanserae* と *Neoaves* の CYP の遺伝子構成に普遍的な種差はなく、活性の種差は、個別の CYP の機能性や発現量、あるいは生息環境に起因する誘導などに由来すると考えるのが妥当であろう。

さらに、ニワトリを用いた CYP 分子種間での mRNA 発現量比較を行い、異物代謝の中心的臓器である肝臓で高発現している分子種として CYP2C45 を特定することができた。これまで研究されてきたニワトリでの *in vitro* 代謝活性について CYP2C45 が大きく関わってきた可能性を示す重要な知見である。これを踏まえ、今後さらにニワトリでの個別の分子種の異物代謝への寄与や、他の鳥類種での CYP 分子種の mRNA 発現量解析などが望まれる。

2.6. 参考文献

- Andersen MR, Farin FM, Omiecinski CJ (1998). Quantification of multiple human cytochrome P450 mRNA molecules using competitive reverse transcriptase-PCR. *DNA and cell biology*, 17(3), 231-238.
- Askari A, Thomson SJ, Edin ML, Zeldin DC, Bishop-Bailey D (2013). Roles of the epoxygenase CYP2J2 in the endothelium. *Prostaglandins Other lipid mediat.* 107, 56-63
- Baader M, Gnerre C, Stegeman JJ, Meyer UA (2002). Transcriptional activation of cytochrome P450 CYP2C45 by drugs is mediated by the chicken xenobiotic receptor (CXR) interacting with a phenobarbital response enhancer unit. *J. Biol. Chem.* 277, 15647-15653.
- Bieche I, Narjoz C, Asselah T, Vacher S, Marcellin P, Lidereau R, Beaune P, de Waziers I (2007). Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP) 1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet. Genomics* 17(9), 731-742.
- Blevins S, Siegel PB, Blodgett DJ, Ehrich M, Lewis RM (2012). Liver enzymes in White Leghorns selected for the sheep red blood cell immune response. *Poult. Sci.* 91, 322-326.
- Cai H, Jiang J, Yang Q, Chen Q, Deng Y (2012). Functional Characterization of a First Avian Cytochrome P450 of the CYP2D Subfamily (CYP2D49). *PLoS One* 7, e38395.
- Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW (2004). Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 7711-7715.
- Chuang SS (2003). CYP2U1, a novel human thymus- and brain-specific cytochrome P450, catalyzes omega- and (omega-1)-hydroxylation of fatty acids. *J. Biol. Chem.* 279, 6305-6314.
- Corcos L, Marc N, Wein S, Fautrel A, Guillouzo A, Pineau T (1998). Phenobarbital induces cytochrome P4501A2 hnRNA, mRNA and protein in the liver of C57BL/6J wild type and aryl hydrocarbon receptor knock-out mice. *FEBS letters* 425(2), 293-297.
- Dogra SC, Davidson BP, May BK (1999). Analysis of a phenobarbital-responsive enhancer sequence located in the 5' flanking region of the chicken CYP2H1 gene: identification and characterization of functional protein-binding sites. *Mol. Pharmacol.* 55(1), 14-22.
- Dong D, Wu B (2012). Substrate selectivity of drug-metabolizing cytochrome P450s predicted from crystal structures and in silico modeling. *Drug Metab. Rev.* 44(1), 1-17.
- Edgar RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792-1797.
- Foti RS, Honaker M, Nath A, Pearson JT, Buttrick B, Isoherranen N, Atkins WM (2011). Catalytic versus inhibitory promiscuity in cytochrome P450s: implications for evolution of new function. *Biochemistry* 50(13), 2387-2393.
- Gay SC, Roberts AG, Halpert JR (2010). Structural features of cytochromes P450 and ligands that affect drug metabolism as revealed by x-ray crystallography and NMR. *Future Med. Chem.* 2(9), 1451-1468.
- Goldstone HMH, Stegeman JJ (2006). A Revised Evolutionary History of the CYP1A Subfamily:

- Gene Duplication, Gene Conversion, and Positive Selection. *J. Mol. Evol.* 62, 708-717.
- Gupta RP, Abou-Donia MB (1998). Cytochrome P450 enzymes in chickens: characteristics and induction by xenobiotics. *Comp Biochem Physiol C* 121, 73.
- Hahn CN, Hansen AJ, May BK (1991). Transcriptional regulation of the chicken CYP2H1 gene. Localization of a phenobarbital-responsive enhancer domain. *J. Biol. Chem.* 266(26), 17031-17039.
- Hackett SJ, Kimball RT, Reddy S, Bowie RCK, Braun EL, et al. (2008). A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320, 1763-1768.
- Handschin C, Podvinec M, Looser R, Amherd R, Meyer UA (2001). Multiple enhancer units mediate drug induction of cyp2h1 by xenobiotic-sensing orphan nuclear receptor chicken xenobiotic receptor. *Mol. Pharmacol.* 60(4), 681-689.
- Handschin C, Podvinec M, Meyer UA (2000a). CXR, a chicken xenobiotic-sensing orphan nuclear receptor, is related to both mammalian pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(20), 10769-10774.
- Handschin C, Meyer UA (2000b). A conserved nuclear receptor consensus sequence (DR-4) mediates transcriptional activation of the chicken CYP2H1 gene by phenobarbital in a hepatoma cell line. *J. Biol. Chem.* 275(18), 13362-13369.
- Hartley DP, Klaassen CD (2000). Detection of chemical-induced differential expression of rat hepatic cytochrome P450 mRNA transcripts using branched DNA signal amplification technology. *Drug Metab. Dispos.* 28(5), 608-616.
- Hashizume T, Imaoka S, Mise M, Terauchi Y, Fujii T, Miyazaki H, et al. (2002). Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Thera.* 300(1), 298-304.
- Hu SX (2013). Effect of age on hepatic cytochrome P450 of Ross 708 broiler chickens. *Poult. Sci.* 92(5), 1283-1292.
- Ingelman-Sundberg M (2004). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* 5(1), 6-13.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *CABIOS* 8(3), 275-282.
- Jönsson ME, Woodin BR, Stegeman JJ, Brunström B (2011). Cytochrome P450 1 genes in birds: evolutionary relationships and transcription profiles in chicken and Japanese quail embryos. *PLoS One* 6, e28257.
- Kawai YK, Watanabe KP, Ishii A, Onuma A, Sawa H, Ikenaka Y, Ishizuka M (2013). *De novo* sequence analysis of cytochrome P450 1-3 genes expressed in ostrich liver with highest expression of CYP2G19. *Comp. Biochem. Physiol. D* 8(3), 201-8.
- Khalil WF, Saitoh T, Shimoda M, Kokue E (2001). *in vitro* cytochrome P450-mediated hepatic activities for five substrates in specific pathogen free chickens. *J. Vet. Pharmacol. Thera.* 24(5), 343-348.
- Kirischian N, McArthur AG, Jesuthasan C, Krattenmacher B, Wilson JY (2011). Phylogenetic and

- Functional Analysis of the Vertebrate Cytochrome P450 2 Family. *J Mol Evol* 72, 56-71.
- Kishida T, Muto SI, Hayashi M, Tsutsui M, Tanaka S, Murakami M, Kuroda J (2008). Strain differences in hepatic cytochrome P450 1A and 3A expression between Sprague-Dawley and Wistar rats. *J. Toxicol. Sci.* 33(4), 447-457.
- Kubota A, Stegeman JJ, Goldstone JV, Nelson DR, Kim EY, et al. (2011). Cytochrome P450 CYP2 genes in the common cormorant: Evolutionary relationships with 130 diapsid CYP2 clan sequences and chemical effects on their expression. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 153, 280-289.
- Marini S, Nannelli A, Sodini D, Dragoni S, Valoti M, Longo V, Gervasi PG (2007). Expression, microsomal and mitochondrial activities of cytochrome P450 enzymes in brain regions from control and phenobarbital-treated rabbits. *Life sciences* 80(10), 910-917.
- McArthur AG, Hegelund T, Cox RL, Stegeman JJ, Liljenberg M, et al. (2003). Phylogenetic Analysis of the Cytochrome P450 3 (CYP3) Gene Family. *J. Mol. Evol.* 57, 200-211.
- Moore LB, Maglich JM, McKee DD, Wisely B, Willson TM, et al. (2002). Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol. Endocrinol.* 16(5), 977-986.
- Nebert DW, Russell DW (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360, 1155-1162.
- Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SMG, Maltais LJ, Wain HM, et al. (2004). Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenet. Genom.* 14(1), 1-18
- Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, et al. (2011). Simultaneous Absolute Protein Quantification of Transporters, Cytochromes P450, and UDP-Glucuronosyltransferases as a Novel Approach for the Characterization of Individual Human Liver: Comparison with mRNA Levels and Activities. *Drug. Metab. Dispos.* 40, 83-92.
- Ourlin JC, Baader M, Fraser D, Halpert JR, Meyer UA (2000). Cloning and Functional Expression of a First Inducible Avian Cytochrome P450 of the CYP3A Subfamily (CYP3A37). *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 375-384.
- Pampori NA, Shapiro BH (1993). Sexual dimorphism in avian hepatic monooxygenases. *Biochem. Pharmacol.* 46(5), 885-890.
- Qiu H, Taudien S, Herlyn H, Schmitz J, Zhou Y, et al. (2008). CYP3 phylogenomics: evidence for positive selection of CYP3A4 and CYP3A7. *Pharmacogenet. Genom.* 18(1), 53-66.
- Renaud HJ, Cui JY, Khan M, Klaassen CD (2011). Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome P450 mRNAs in mice. *Toxicol. Sci.* 124(2), 261-277.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.

- Temesvari M, Kobori L, Paulik J, Sarvary E, Belic A, et al. (2012). Estimation of Drug-Metabolizing Capacity by Cytochrome P450 Genotyping and Expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 341, 294-305.
- Thomas JH (2005). Rapid Birth-Death Evolution Specific to Xenobiotic Cytochrome P450 Genes in Vertebrates. *PLoS Genet* 3(5): e67.
- Walker C (1998). Avian forms of cytochrome P450. *Comp. Biochem. Physiol. C* 121, 65-72.
- Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, et al. (2004). Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab. Dispos.* 32(11), 1201-1208.
- Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, Falck JR, Zeldin DC (1996). Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *J. Biol. Chem.* 271(7), 3460-3468.
- Wu Z, Lee D, Joo J, Shin JH, Kang W, Oh S, et al. (2013). CYP2J2 and CYP2C19 Are the Major Enzymes Responsible for Metabolism of Albendazole and Fenbendazole in Human Liver Microsomes and Recombinant P450 Assay Systems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(11), 5448-5456.

第三章

鳥類 CYP2C サブファミリー遺伝子の種差検討と機能解析

3.1. 背景と目的

3.1.1. ヒトでの CYP2C の重要性

ヒトには CYP 1-3 分子種が計 23 分子種存在し、CYP2C サブファミリーとして CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2C19 という 4 分子種を有している。この内、CYP2C9 および CYP2C19 がヒトの臨床で使用される薬物の約 3 割の代謝に寄与し、ヒトの薬物代謝上重要な分子種である(Williams et al., 2004、Table 3-1)。ヒト CYP2C 遺伝子は、調節領域に CAR (Constitutive androstane receptor) や PXR (Pregnane X receptor)、GR (Glucocorticoid receptor)、HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4 α) などの応答因子を持ち、これら核内受容体のリガンドによる転写調節を受ける(Chen and Goldstein, 2009)。特に CAR activator であるフェノバルビタール(PB)、PXR リガンドであるリファンピシンなどによる誘導機構がよく知られている。

Table 3-1. Typical substrates of human CYP2C isoforms

	基質	適応・薬効(種類)
CYP2C8	パクリタキセル(タキソール) セリバスタチン トルブタミド	抗癌剤 高コレステロール症 糖尿病
CYP2C9	ジクロフェナク イブプロフェン フェニトイン テトラヒドロカンナビノール トルブタミド フルオキセチン ヘキソバルビタール ロサルタン S-ワルファリン	解熱鎮痛薬(NSAIDs) 解熱鎮痛薬(NSAIDs) 抗てんかん薬(ヒダントイン) 向精神薬 糖尿病 抗うつ剤(SSRI) 睡眠薬(バルビツール酸) 高血圧症 血栓塞栓症(抗凝固剤)
CYP2C18	S-メフェニトイン ジアゼパム	抗てんかん薬(ヒダントイン) 抗不安薬、鎮静薬(ベンゾジアゼピン)
CYP2C19	S-メフェニトイン アミトリプチリン クロミプラミン オメプラゾール ジアゼパム プロプラノロール ヘキソバルビタール	抗てんかん薬(ヒダントイン) 三環系抗うつ薬 三環系抗うつ薬 胃酸抑制薬 抗不安薬、鎮静薬(ベンゾジアゼピン) 高血圧症、狭心症(β ブロッカー) 睡眠薬(バルビツール酸)

SSRI: 選択的セロトニン再取り込み阻害薬(Selective Serotonin Reuptake Inhibitor)

薬物代謝学(第2版)より改変。

3.1.2. 鳥類 CYP2C に関する知見の現状

鳥類の CYP2C 遺伝子については、主にニワトリやニワトリ肝癌由来細胞株(LMH)などを用いて研究されてきた。

1986年にはHobbs et al. (1986)が、PBによりニワトリの肝臓で誘導される CYP 分子種として、初めて CYP2C23a 遺伝子をクローニングした。続いて 1989年に Hansen and May (1989)により CYP2C23b 遺伝子が同定された。これら CYP2C23a、CYP2C23b は当初鳥類特有の遺伝子と考えられ、CYP2H1、CYP2H2 と命名されたが、ゲノム解読完了後に、哺乳類 CYP2C 遺伝子(マウス 2C44、ヒト 2C62p)との相同関係が示され、CYP2C 遺伝子に改名された(Kubota et al., 2010)。

2000年には、CYP2C23 遺伝子の誘導に関わる転写因子として、Chicken Xenobiotic Receptor (CXR)がクローニングされた(Handschin et al., 2000)。CXR は、CYP2C23a 遺伝子上流に存在する Phenobarbital responsive unit (PBRU)に結合し、CYP2C23 遺伝子の発現を誘導することが明らかにされた。一方で、CXR は哺乳類の CAR、PXR の相同遺伝子であるが、哺乳類では2種類が存在する核内受容体に対して、ニワトリでは CXR という1遺伝子のみしか存在しないことが示唆された。2002年には、ニワトリで3つ目の CYP2C 遺伝子として CYP2C45 遺伝子がクローニングされ、CYP2C23 と同様に CXR による調節を受けることが明らかになった(Baader et al., 2002)。このような先行研究があるものの、CYP2C タンパク質の基質については、唯一、CYP2C45 がスコパロン代謝を行うということが知られているのみであり、鳥類の CYP2C23 についてはこれまで研究が行われていない(Baader et al., 2002)。

ニワトリ以外の鳥類では、環境汚染との関連から野生鳥類でも、CYP2C 遺伝子や CYP2C-like なタンパク質の誘導に関して、交差反応によるウェスタンブロットなどを利用していくつかの研究が行われてきた(Kubota et al., 2005)。しかし、野生鳥類種の CYP2C 遺伝子配列についてはほとんど報告されておらず、実際に交差反応で検出してきたタンパク質が CYP2C23、CYP2C45、あるいは他の CYP 分子種だったのか明らかにされていない。また、鳥類種間での CYP2C タンパク質の配列や発現量、機能の種差については不明のままである。

3.1.3. 目的

鳥類において、CYP2C 分子種の誘導機構についてはニワトリで詳細に解析されてきたが、その機能や異物代謝全体への寄与、鳥類種間での種差についてはほとんど研究されてこなかった。第二章では、ニワトリ肝臓での mRNA 発現量解析により、生理的状态では CYP2C45 が最も高い発現を示し、CXR 活性化剤である PB 処置により、CYP2C23a、CYP2C23b が最も強く誘導されることを示した。

そこで、本章では、CYP2C23 遺伝子を複数の鳥類種からクローニングし、*Paleognathae*、*Galloanserae*、*Neoaves* という鳥類全体で CYP2C23 の系統関係を明らかにし、タンパク質発現量を種間で比較すること、また、ニワトリで既にクローニングされている CYP2C サブファミリーの3分子種について機能解析を行うことを目的とした。

3.2. 方法

3.2.1. 動物

本章の実験に用いた鳥類種と個体情報を下記 Table3-2 に示す。これらの個体は死亡後すぐに肝臓を採取し、液体窒素による急速凍結後、実験に用いるまで-80℃にて保存した。

3.2.2. CYP2C23 遺伝子のクローニングおよび解析

3.2.2.1. CYP2C23 遺伝子の PCR クローニング

Darwish et al. (2010)の方法により、肝臓サンプルより total RNA 抽出、cDNA 合成、PCR およびダイレクトシーケンスを行い、CYP2C23 遺伝子をクローニングした。PCR およびシーケンス反応に用いたプライマーを Table 3-3 に示す。PCR は、94℃30 秒、53-62℃30 秒、72℃60 秒を 35 サイクル行った後、72℃にて 1 分間伸長反応を行った。サイクルシーケンス反応は、96℃30 秒、50℃30 秒、60℃4 分間を 25 サイクル行い、最後に 60℃にて 3 分間伸長させた。その後、定法に従ってエタノール沈殿による精製を行い、風乾後、Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, CA, USA) に再溶解したものを ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)により分析した。

Table 3-2. Animals

和名	英名	学名	分類	目	年齢	性別	提供元
ダチョウ	Ostrich	<i>Struthio camelus</i>	P	ダチョウ目	2才	オス	オーストリッチファームクロダ(芽室町)
アオミミキジ	Blue-eared pheasant	<i>Crossoptilon auritum</i>	G	キジ目	1才	メス	円山動物園(札幌市)
インドガン	Bar-headed goose	<i>Anser indicus</i>	G	カモ目	1才	オス	円山動物園(札幌市)
マガモ	Mallard	<i>Anas platyrhynchos</i>	G	カモ目	9週齢	オス	北星園(幌延市)
シロフクロウ	Snowy owl	<i>Bubo scandiacus</i>	N	フクロウ目	不明	オス	円山動物園(札幌市)
					不明	オス	円山動物園(札幌市)
アメリカワシミミズク	Great-horned owl	<i>Bubo virginianus</i>	N	フクロウ目	不明	オス	円山動物園(札幌市)
チリーフラミンゴ	Chilean flamingo	<i>Phoenicopterus chilensis</i>	N	フラミンゴ目	不明	メス	円山動物園(札幌市)
ハヤブサ	Falcon	<i>Falco peregrinus</i>	N	ハヤブサ目	8才	メス	円山動物園(札幌市)
フンボルトペンギン	Humboldt penguin	<i>Spheniscus humboldti</i>	N	ペンギン目	8才	オス	円山動物園(札幌市)
ゴイサギ	Black-crowned night heron	<i>Nycticorax nycticorax</i>	N	コウノトリ目	不明	不明	円山動物園(札幌市)

分類のP、G、Nはそれぞれ、*Paleognathae*、*Galloanserae*、*Neoaves*を表す

Table 3-3. Primers for cloning of avian CYP2C23 genes

	Number	Sequence (5'-3')	Tm
Forward	232	GTGGTGCTGTATGGCTA	47
Forward	337	ACAGGCATTGTGACCAGCAATGG	52
Forward	559	TTTGGGGATCGGTTTACTA	50
Forward	817	AAAATGGAACAGGAGAAAG	45
Forward	1004	TYGGCCGAGACCGAAGCCC	57
Forward	1220	ATCCAGAAAAATTTGACCCAGG	51
Reverse	358	TGCTGGTCACAATRCCTGTGCC	56
Reverse	809	AAAGCATCAATAAAATCTCGAGG	50
Reverse	1295	AATGGCATGAAGTAGTCACTC	50
Reverse	1380	AAAGTTCTGCAGGATGGATGTTAA	52
Reverse	1425	TAATGGGGAAATGTCAATGTCC	51
Reverse	1453	GTCGGGGCATATTTGCCAGA	54
Reverse	1496	CTGTCTTCACTTGGCTAACG	52

* Number of the primer indicate the position of chicken CYP2C23 genes.

3.2.2.2. アラインメント、系統解析およびホモロジー解析

PCR クローニングにより得られた配列に GenBank から収集した塩基配列を加え、MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tamura et al., 2011)を用いて多重アラインメントと系統樹作成、アミノ酸配列への変換を行った。多重アラインメントは MUSCLE (Edgar, 2004) を使用し、モデル選択により選ばれた JTT+G モデルによる系統樹作成を行った。ホモロジー解析には EMBOSS pairwise alignment algorithms により、Identity (同一性)および Similarity (相同性)の算出を行った。(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/>; スコアマトリックスには Blosum62 を使用)。NCBI GenBank データベースからは下記の配列を取得し解析に用いた; ニワトリ CYP2C23a ([AF236668](#)), CYP2C23b ([NP_001001757.1](#)), キンカチョウ CYP2C23 (*Taeniopygia guttata*, predicted protein, [XP_002198228.1](#)), ウズラ CYP2C23b (*Cortunix japonica*, [AB359053](#))。

3.2.3. 鳥類 CYP2C23 タンパク質発現量の鳥類種間比較

3.2.3.1. 鳥類 CYP2C23 タンパク質に対する Universal な抗ペプチド抗体の作製

8 種の鳥類から得られた 2C23 遺伝子の配列と、GenBank から得られた既知配列の多重アラインメントを行い、ニワトリ CYP2C23a および CYP2C23b タンパク質の 400-414 残基に相当する 15 アミノ酸(KEFPNPEKFDPGHFL)が大半の鳥類種で保存されていることが明らかになった。この配列の N 末端にシステインを付加したアミノ酸に対し、N-succinimidylbromoacetate をクロスリンカーとしてキャリアタンパク質 Keyhole limpet hemocyanine (KLH)をコンジュゲートし、抗原とした。ウサギの免疫および血清採取は Sigma Aldrich Japan GK (Hokkaido, Japan)にて行った。10 週齢のメス、ニュージーランドホワイト種を用い、免疫前に血清採取(4.5 ml)を行った後、Freund's complete アジュバントを用い抗原 200 µg の皮下投与を行い、2 週間ごとに Freund's incomplete アジュバントを用い抗原 100 µg でブーストし、これを 5 回行った。最終投与 2 週間後に抗血清採取を行い、ウェスタンブロットに用いた。

3.2.3.2. 鳥類肝臓ミクロソームと発現ニワトリ 2C タンパクを用いたウェスタンブロット

鳥類肝臓ミクロソーム 25 µg または、酵母発現ニワトリ CYP2C タンパク質 0.5 pmol を、SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) 法により分離した。一次抗体として 2,000 倍希釈した抗 CYP2C23 抗体、二次抗体として 4,000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horseradish peroxidase, HRP)標識抗ウサギ IgG 抗体を用い、ウェスタンブロットを行った。検出には化学発光法(Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, IL, USA)を用いた。発光量を Image J ソフトウェア(National Institute of Health, MD, USA)により定量した。他の鳥類種の肝臓ミクロソーム 25 µg についても同様に解析した。

3.2.4. ニワトリ CYP2C タンパク質の機能解析

3.2.4.1. ニワトリ CYP2C タンパク質発現酵母マイクロソームの調製

Ikushiro et al. (2004) の手法に修正を加え、ニワトリ CYP2C23a、CYP2C23b、CYP2C45、および、ラット CYP2C11 を過剰発現させた酵母のマイクロソームを調製した。それぞれの遺伝子をコードする全長配列を PCR により増幅し、In-Fusion HD Cloning Kit (Takara, Tokyo, Japan)を用いて *Saccharomyces cerevisiae* 由来 P450 還元酵素を含む発現ベクター(pGYR1)にサブクローニングした。酢酸リチウム法により発現ベクターで *S. cerevisiae* (AH22 株)の形質転換を行った。形質転換後、ロイシン要求性によりコロニーを選抜し、20mg/l ヒスチジン、2% D-グルコース、0.67% Yeast nitrogen base without amino acids を含む最少培地にて培養した。培養した酵母から、Oeda et al. (1985)の方法によりマイクロソーム画分を調製した。酵母マイクロソーム画分中の CYP 含量は Omura and Sato (1964)の方法により定量した。また、タンパク質含量は BCA protein assay reagent (Nakalai Chemical Co., Kyoto, Japan)を用い、Bovine serum albumin をスタンダードとして定量した。

3.2.4.2. P450-Glo Assay Kit を用いた代謝活性の測定と比較

ニワトリ CYP2C23a、CYP2C23b、CYP2C45、およびラット CYP2C11 を発現した酵母マイクロソームについて、P450-Glo CYP2C8 assay (Promega Corporation, WI, USA)と CYP2C9 assay を用いて酵素活性を測定した。それぞれ、ヒト CYP2C8 と CYP2C9 に特異的な Luciferin 6' methyl ether (luciferin-ME、100 μ M)の脱メチル化と 6'deoxy luciferin (luciferin-H、100 μ M)の水酸化活性を測定するものである。

活性測定の際の操作を以下に示す。ポリスチレン製の白色不透明 96 ウェルプレート中で、それぞれの基質に CYP 1.0 pmol、50mM リン酸緩衝液を加え、37°Cで 10 分間のプレインキュベーションを行った。これに NADPH regenerating system (終濃度 NADPH 1.3 mM、G6PDH 0.4 IU/ml、G6P 3.3 mM、MgCl₂ 3.3 mM)を加え、30 分間反応させた。反応後、Reconstituted luciferin reagent 50 μ l を加え、さらに室温にて 30 分間インキュベートした。この反応液の発光量を測定した。また、NADPH regenerating system の代わりにリン酸緩衝液を加えたものをブランクとした。反応は Triplicate により行った。

3.3. 結果

3.3.1. 得られた鳥類種 CYP2C23 遺伝子の部分配列

PCR クローニングにより、アオミミキジでのみ 732 bp、他の 7 種類の鳥類種からは 738 bp の部分塩基配列が得られた。ここからそれぞれ 244 残基、246 残基のアミノ酸配列が得られ、多重アラインメントによりニワトリ CYP2C23a および CYP2C23b タンパク質の 200-443 残基に相当することがわかった。ニワトリ CYP2C23a/CYP2C23b の 200-443 残基には、活性中心となるヘム結合領域と 4 つの基質認識部位(Substrate recognition site、SRS、CYP2C では 6 つの SRS が存在)が含まれていると考えられる(Gotoh, 1992)。得られた塩基配列は Cytochrome P450 Nomenclature Committee に提出し、CYP2C23a と命名された(Nelson et al., 2004)。これらの CYP2C23a の塩基配列は GenBank に登録された； **AB795985** (シロフクロウ), **AB795986** (ハヤブサ), **AB795987** (ダチョウ), **AB795988** (フンボルトペンギン), **AB795989** (アメリカワシミミズク), **AB795990** (チリフラミンゴ), **AB795991** (アオミミキジ), **AB795992** (ゴイサギ)。

Figure3-1 に、鳥類 CYP2C23 タンパク質の多重アラインメントを示す。SRS-3 と SRS-4 の間で、アオミミキジ、ニワトリでのみ、2 残基の欠失が見られた。SRS-4、SRS-5 では種間でも良好に保存されていたが、SRS-2、SRS-3 では種間での違いが多く見られた。*Paleognathae* と *Neoaves* ではこの 2 残基が存在していることから、*Galloanserae* 種の系統でのみ、この 2 残基が欠失したものと考えられる。また、CYP のモチーフ構造として全 CYP 分子種に共通して K helix 上に存在する EXXR モチーフや、一酸素付加反応を触媒する CYP 分子種に共通する I helix 上の conserved Thr は全ての配列で完全に保存されていた。

```

Ostrich 200 LLELLEENNKIQNSIQTQLYNFFERVLEHFGPEQTMVKNLEAVDKVESEITMAHQESLDFTCPRDFVDAFLNRMEQEKGNHSEFTTET 289
Chilean_flamingo 200 LLDLLEENNKIQNSIQVQLYNFFFAVMEYFPGCYKRIKKNKKVDQFTSEITABHQETLDFTCPRDFIDAFLNRMEQEKGNHSEFTTET 289
Humboldt_penguin 200 LLELLINENNKIQNSIQTQLYNFFFAVMEYFPGPEKRIKKNKKVDQFTSEITABHQETLDFTCPRDFIDAFLNRMEQEKGNHSEFTTET 289
Black-crowned_night_heron 200 LLELLEENNKIQNSIQTQLYNFFFAVMEYFPGPEKRIKKNKKVDQFTSEITABHQETLDFTCPRDFIDAFLNRMEQEKGNHSEFTTET 289
Zebra_finch_2C23 200 LLDLLEENNKIQNSIQTQLYNFFFAVMEYFPGPEKRIKKNKKVDQFTSEITABHQETLDFTCPRDFIDAFLNRMEQEKGNHSEFTTET 289
Pelegrine_falcon 200 IVDTLLEENSKIQNSIQTQLYNFFFAVMEYFPGPEKRIKKNKKVDQFTSEITABHQETLDFTCPRDFIDAFLNRMEQEKGNHSEFTTET 289
Great-horned_owl 200 LLELLEENNKIQNSIQTQLYNFFFAVMEYFPGPEKRIKKNKKVDQFTSEITABHQETLDFTCPRDFIDAFLNRMEQEKGNHSEFTTET 289
Snowy_owl 200 LLELLEENNKIQNSIQTQLYNFFFAVMEYFPGPEKRIKKNKKVDQFTSEITABHQETLDFTCPRDFIDAFLNRMEQEKGNHSEFTTET 289
Blue-eared_pheasant 200 IVEMLEENNKIQNSIQTQLYNFFFAVMEYFPGPEKRIKKNKKVDQFTSEITABHQETLDFTCPRDFIDAFLNRMEQEKGNHSEFTTET 287
Japanese_quail_2C23b 200 LLELLEENNKIQNSIQTQLYNFFFAVMEYFPGPEKRIKKNKKVDQFTSEITABHQETLDFTCPRDFIDAFLNRMEQEKGNHSEFTTET 287
Chicken_2C23a 200 LLELLEENNKIQNSIQTQLYNFFFAVMEYFPGPEKRIKKNKKVDQFTSEITABHQETLDFTCPRDFIDAFLNRMEQEKGNHSEFTTET 287
Chicken_2C23b 200 LLELLEENNKIQNSIQTQLYNFFFAVMEYFPGPEKRIKKNKKVDQFTSEITABHQETLDFTCPRDFIDAFLNRMEQEKGNHSEFTTET 287

```

SRS-2

SRS-3

```

Ostrich 290 LVRTLDLDFLAGTGTTSNLRYGLLILIKKPEETBEIKKEIDRVIQRDRSPGMADRSQMPYTDVAVHEIQRFIDFLEPLNVPHAVTKDKKE 379
Chilean_flamingo 290 LSKSLLELFLAGTGTTSNLRLHGLLILIKKPEETBEIKKEIDRVIQRDRSPGMADRSQMPYTDVAVHEIQRFIDFLEPLNVPHAVTKDKKE 379
Humboldt_penguin 290 LSRTLDLDFLAGTGTTSTLRLHGLLILIKKPEETBEIKKEIDRVIQRDRSPGMADRSQMPYTDVAVHEIQRFIDFLEPLNVPHAVTKDKKE 379
Black-crowned_night_heron 290 LSRTLDLDFLAGTGTTSTLRLHGLLILIKKPEETBEIKKEIDRVIQRDRSPGMADRSQMPYTDVAVHEIQRFIDFLEPLNVPHAVTKDKKE 379
Zebra_finch_2C23 290 LSRTLDLDFLAGTGTTSTLRLHGLLILIKKPEETBEIKKEIDRVIQRDRSPGMADRSQMPYTDVAVHEIQRFIDFLEPLNVPHAVTKDKKE 379
Pelegrine_falcon 290 LVRTLDLDFLAGTGTTSTLRYGLLILIKKPEETBEIKKEIDRVIQRDRSPGMADRSQMPYTDVAVHEIQRFIDFLEPLNVPHAVTKDKKE 379
Great-horned_owl 290 LSRTLDLDFLAGTGTTSTLRLHGLLILIKKPEETBEIKKEIDRVIQRDRSPGMADRSQMPYTDVAVHEIQRFIDFLEPLNVPHAVTKDKKE 379
Snowy_owl 290 LSRTLDLDFLAGTGTTSTLRLHGLLILIKKPEETBEIKKEIDRVIQRDRSPGMADRSQMPYTDVAVHEIQRFIDFLEPLNVPHAVTKDKKE 379
Blue-eared_pheasant 288 LVRTLDLDFLAGTGTTSTLRYGLLILIKKPEETBEIKKEIDRVIQRDRSPGMADRSQMPYTDVAVHEIQRFIDFLEPLNVPHAVTKDKKE 377
Japanese_quail_2C23b 288 LVRTLDLDFLAGTGTTSTLRYGLLILIKKPEETBEIKKEIDRVIQRDRSPGMADRSQMPYTDVAVHEIQRFIDFLEPLNVPHAVTKDKKE 377
Chicken_2C23a 288 LVRTLDLDFLAGTGTTSTLRYGLLILIKKPEETBEIKKEIDRVIQRDRSPGMADRSQMPYTDVAVHEIQRFIDFLEPLNVPHAVTKDKKE 377
Chicken_2C23b 288 LVRTLDLDFLAGTGTTSTLRYGLLILIKKPEETBEIKKEIDRVIQRDRSPGMADRSQMPYTDVAVHEIQRFIDFLEPLNVPHAVTKDKKE 377

```

SRS-4

SRS-5

```

Ostrich 380 RDYFIIPKDTMIFPILLSVLEHDSKEFFNPEKFDPGHFLNANGTEPKKSDYFMPFSA GKRICAGEGLAR 445
Chilean_flamingo 380 RDYFIIPKDTMIFPILLSVLEHDSKEFFNPEKFDPGHFLNANGTEPKKSDYFMPFSA GKRMCGEGLAR 445
Humboldt_penguin 380 RDYFIIPKDTMIFPILLSVLEHDSKEFFNPEKFDPGHFLNANGTEPKKSDYFMPFSA GKRICAGEGLAR 445
Black-crowned_night_heron 380 RDYFIIPKDTMIFPILLSVLEHDSKEFFNPEKFDPGHFLNANGTEPKKSDYFMPFSA GKRICAGEGLAR 445
Zebra_finch_2C23 380 RDYFIIPKDTMIFPILLSVLEHDSKEFFNPEKFDPGHFLNANGTEPKKSDYFMPFSA TGKRICAGEGLAR 445
Pelegrine_falcon 380 RDYFIIPKDTMIFPILLSVLEHDSKEFFNPEKFDPGHFLNADGTEPKKSDYFMPFSA GKRICVGEGLAR 445
Great-horned_owl 380 RDYFIIPKDTMIFPILLSVLEHDSKEFFNPEKFDPGHFLNANGTEPKKSDYFMPFSA GKRICAGEGLAR 445
Snowy_owl 380 RDYFIIPKDTMIFPILLSVLEHDSKEFFNPEKFDPGHFLNANGTEPKKSDYFMPFSA GKRICAGEGLAR 445
Blue-eared_pheasant 378 RDYFIIPKDTMIFPILLSVLEHDSKEFFNPEKFDPGHFLNADGTEPKKSDYFMPFSA GKRICAGEGLAR 443
Japanese_quail_2C23b 378 RGYFIIPKDTMIFPILLSVLEHDSKEFFNPEKFDPGHFLNANGTEPKKSDYFMPFSA TGKRICAGEGLAR 443
Chicken_2C23a 378 RDYFIIPKDTMIFPILLSVLEHDSKEFFNPEKFDPGHFLNANGTEPKKSDYFMPFSA GKRICAGEGLAR 443
Chicken_2C23b 378 RDYFIIPKDTMIFPILLSVLEHDSKEFFNPEKFDPGHFLNANGTEPKKSDYFMPFSA GKRICAGEGLAR 443

```

Heme-binding region

Figure 3-1. Multiple alignment of CYP2C23 proteins

Multiple alignment of the deduced amino acid sequences from the cloned CYP2C23 genes are shown. The obtained peptide sequences contained four of totally six SRS regions, and heme-binding region as indicated by the box and broken line (Gotoh, 1992).

3.3.2. CYP2C23 遺伝子のホモロジー解析

EMBOSS NEEDLE でホモロジー解析を行ったところ、得られた CYP2C23 配列間での同一性は最小で 72.0% (ニワトリ CYP2C23b-ハヤブサ間)、最大で 98.0% (アメリカワシミミズク-シロフクロウ間)だった(Table3-3)。Paleognathae、Galloanserae、Neoaves の各系統間では、75.6-77.6% (Paleognathae-Galloanserae 間)、76.4-83.3% (Paleognathae-Neoaves 間)、72.0-78.9% (Galloanserae-Neoaves 間)、89.3-93.4% (Galloanserae 内)、78.5-98.0% (Neoaves 内)だった。鳥類種としては、Paleognathae が最初期に分岐し、その後 Galloanserae と Neoaves が分岐しているが、Galloanserae-Neoaves 間でのホモロジーが Paleognathae-Neoaves より小さいという特徴が見られた。

3.3.3. CYP2C23 遺伝子の系統解析

得られた塩基配列を元に、ニワトリ CYP2C45 を外群として JTT+G モデルを用いた最尤法(Maximum likelihood 法)により系統樹を作成した(Figure3-2)。その結果、CYP2C23 遺伝子の系統関係は Paleognathae、Galloanserae、Neoaves という鳥類の系統関係を反映したものであり、妥当な結果と考えられた。ニワトリの CYP2C23a、CYP2C23b は単一のクレードを形成し、他種鳥類の CYP2C23 遺伝子はその外に位置した。このことから、CYP2C23 遺伝子はニワトリ-ウズラの分岐後、もしくは Galloanserae-Neoaves の分岐後に、ニワトリを含む系統でのみ遺伝子重複を起こしたものと考えられた。この結果は、第一章で見られた CYP2C23 遺伝子のシテニー解析結果とも一致しており、また、CYP2C23a-CYP2C23b 間での非常に高い同一性、相同性もこれを支持するものだった。

Table 3-4. Identity and similarity between avian CYP2C23 proteins

	Ost	2C23a	2C23b	BP	CF	HP	BNH	GH	SO	PF	ZF	
<i>Paleognathae</i> Ostrich		77.6	75.6	76.4	78.5	79.9	81.3	82.5	83.3	78.0	76.4	
<i>Galloanserae</i> Chicken 2C23a	88.2		93.4	91.0	75.6	77.6	77.6	78.0	78.9	73.2	74.8	identity (above the diagonal line)
Chicken 2C23b	88.6	97.1		89.3	74.4	75.2	76.0	75.6	76.4	72.0	73.2	
Blue-eared pheasant	87.8	94.7	95.1		75.6	76.8	77.2	77.6	78.5	75.2	74.0	
<i>Neoaves</i> Chilean flamingo	89.0	87.8	87.7	87.8		86.2	87.8	88.6	89.4	81.7	80.1	
Humboldt penguin	89.0	88.2	88.2	88.6	94.7		91.1	90.7	91.1	84.6	80.9	
Black-crowned night heron	89.0	88.6	88.2	88.2	93.9	97.2		93.1	93.5	83.3	82.5	
Great horned owl	89.4	89.0	88.6	89.0	94.7	95.9	96.7		98.0	85.4	83.3	
Snowy owl	89.4	89.0	88.6	89.0	94.7	95.9	96.7	99.2		85.0	83.7	
Peregrine falcon	87.0	84.1	85.0	85.4	91.1	90.2	90.2	91.5	90.7		78.5	
Zebra finch	88.2	86.2	86.6	87.8	91.5	90.7	90.2	91.5	91.9	89.8		

similarity (below the diagonal line)

Deduced amino acid sequences from the obtained partial sequences were analyzed for the percentage identity and similarity, by using EMBOSS pairwise alignment algorithms. Deduced amino acid sequences corresponded to 200-443 amino acid residues of chicken CYP2C23a and CYP2C23b. Percentage similarity were determined based on BLOSUM62 score matrix.

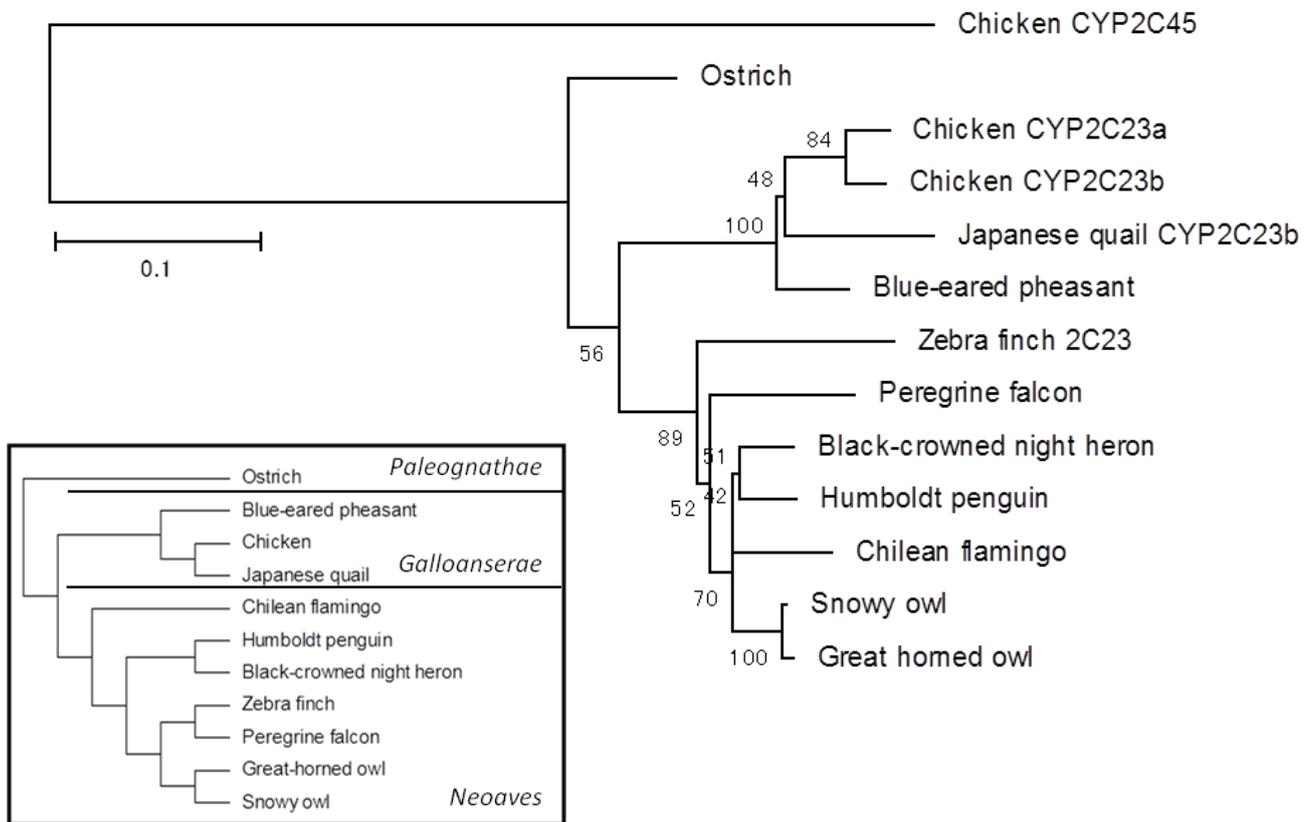


Figure 3-2. Maximum likelihood tree of CYP2C23 genes

The maximum likelihood tree was created using MEGA5 software. The numbers on the branches indicate the number of times per 100 bootstrap replicates that the branch appeared in the trees, estimated by a random resampling of the data. The scale bar represents 10 substitutions per 100 residues. The tree in the box shows the speciation history of avian species.

3.3.4. *Galloanserae* 種に見られた CYP2C23 遺伝子の特徴

Galloanserae 種の CYP2C23 遺伝子では、他種に比べ 3 つの特徴が見られた。すなわち、1) ニワトリでのみ確認されている CYP2C23 遺伝子の重複、2) *Galloanserae* 種(ニワトリ、アオミミキジ、ウズラ)で見られた SRS-3 と SRS-4 間での 2 アミノ酸欠失、3) *Paleognathae* と比べ *Neoaves* 種に対する低い同一性・相同性である。鳥類内では *Paleognathae* が最も古く分岐しているが、CYP2C の遺伝子、タンパク質に関しては鳥類内でも *Galloanserae* が特徴的だった。このことから、*Galloanserae* の系統では CYP2C23 が何らかの系統特異的な選択圧にさらされ *Paleognathae* 種、*Neoaves* 種と比べ異なる進化を遂げてきたことが示唆された。

3.3.5. 抗鳥類 CYP2C23 タンパク質のウサギポリクローナル抗体作製

得られた配列情報をアラインメントし、ほとんどの鳥類で保存されているペプチド配列 (KEFPNPEKFDPGHFL、15 残基) に対するウサギ由来抗血清を作製した (Figure 3-3.A)。この配列を用いた BLAST 検索の結果、ニワトリでは CYP2C23a、CYP2C23b が完全に一致したのに次いで、CYP2C45 で 12 残基、CYP2J2-like、CYP2J6-like で 9 残基の一致が見られた。他のタンパク質ではこれらより高い同一性を示すものはなかった。

作製した抗体を用いてニワトリ肝臓ミクロソーム(タンパク質 25 μ g)でウェスタンブロットをしたところ、45kDa と 70kDa のマーカーの間に 2 本のバンドが特異的に検出された (Figure 3-3.B)。さらに、酵母で異種発現した CYP2C タンパク質(各 0.5 pmol/lane)では、CYP2C23a、CYP2C23b の両方が、ミクロソームで検出されたバンド 2 本のうち、分子量の小さいバンドに含まれていることがわかった。CYP2C45 タンパク質は分子量が大きいバンドに相当する位置で検出され、タンパク質ロード量は同じながらも CYP2C23a、CYP2C23b に比べシグナル発光量が小さかった。このことから、今回得た抗体が、ニワトリの CYP2C23 を特異的に検出し、CYP2C45 に対しても弱く交差反応するものと結論付けられた。また、肝ミクロソームでは CYP2C23a/2C23b のバンドと交差性の低い CYP2C45 が同程度のシグナル強度を示したことから、CYP2C45 の発現量が CYP2C23 より極めて大きいものと考えられた。

3.3.6. 抗鳥類 CYP2C23 抗体を用いた CYP2C タンパク質の発現量比較

得られた抗体を用い、複数の鳥類種の肝臓ミクロソーム(ダチョウ、インドガン、シロフクロウ、アメリカワシミミズク、アイガモ、各タンパク質 25 μ g)でウェスタンブロットを行った所、全ての鳥類種でニワトリ CYP2C23a、CYP2C23b とほぼ同程度の分子量のタンパク質が特異的に検出された (Figure 3-3.C)。インドガン、アイガモについてはアミノ酸配列が明らかになっていないが、これらは全て CYP2C23a タンパク質であると考えられた。

検出されたバンドのシグナル強度を ImageJ により定量した結果を Figure 3-3.C に示す。ニワトリでは CYP2C23a、CYP2C23b 両方を含むバンドをまとめて定量した。その結果、ニワトリで最大のシグナル強度、また、インドガンで最小のシグナル強度が得られ、その差

は4倍程度だった。今回用いた抗体は、配列が明らかになっている12種の鳥類のうち9種で完全に保存されている配列を抗原として作製したが、ミスマッチのためにタンパク質の検出力が弱くなると考えられるダチョウ、アメリカワシミミズク、アイガモでもシグナルの差がこの4倍の幅の中に収まっていた(配列不明のインドガンも含む)。各鳥類種の個体数が少なく発現量の種差について検定できなかったが、鳥類間でCYP2C23タンパク質の発現量に大きな種差がないことを示唆する結果だった。

3.3.7. P450-glo assay kit を用いたニワトリ CYP2C タンパク質の機能解析

ヒトCYP2C8およびCYP2C9のプローブとして活性測定に用いられるP450-Glo assay kit (Luciferin H、Luciferin-ME)により、鳥類CYP2Cタンパク質の活性比較を行った。なお、ラットCYP2C11をレファレンスサンプルとして用いた。

活性測定の結果、いずれの基質についても、活性はCYP2C23a > 2C23b > 2C45の順に高かった。また、CYP2C23aとCYP2C45の差は10倍程度であった。この結果から、鳥類CYP2Cの3分子種がヒトCYP2C8およびCYP2C9のプローブとなる基質を認識し代謝すること、また、その活性には大きな差があることが示された。特に、CYP2C23a、CYP2C23bはアミノ酸配列でも同一性が93.4%と非常に類似した配列でありながら、活性が大きく異なる点が興味深い発見だった。

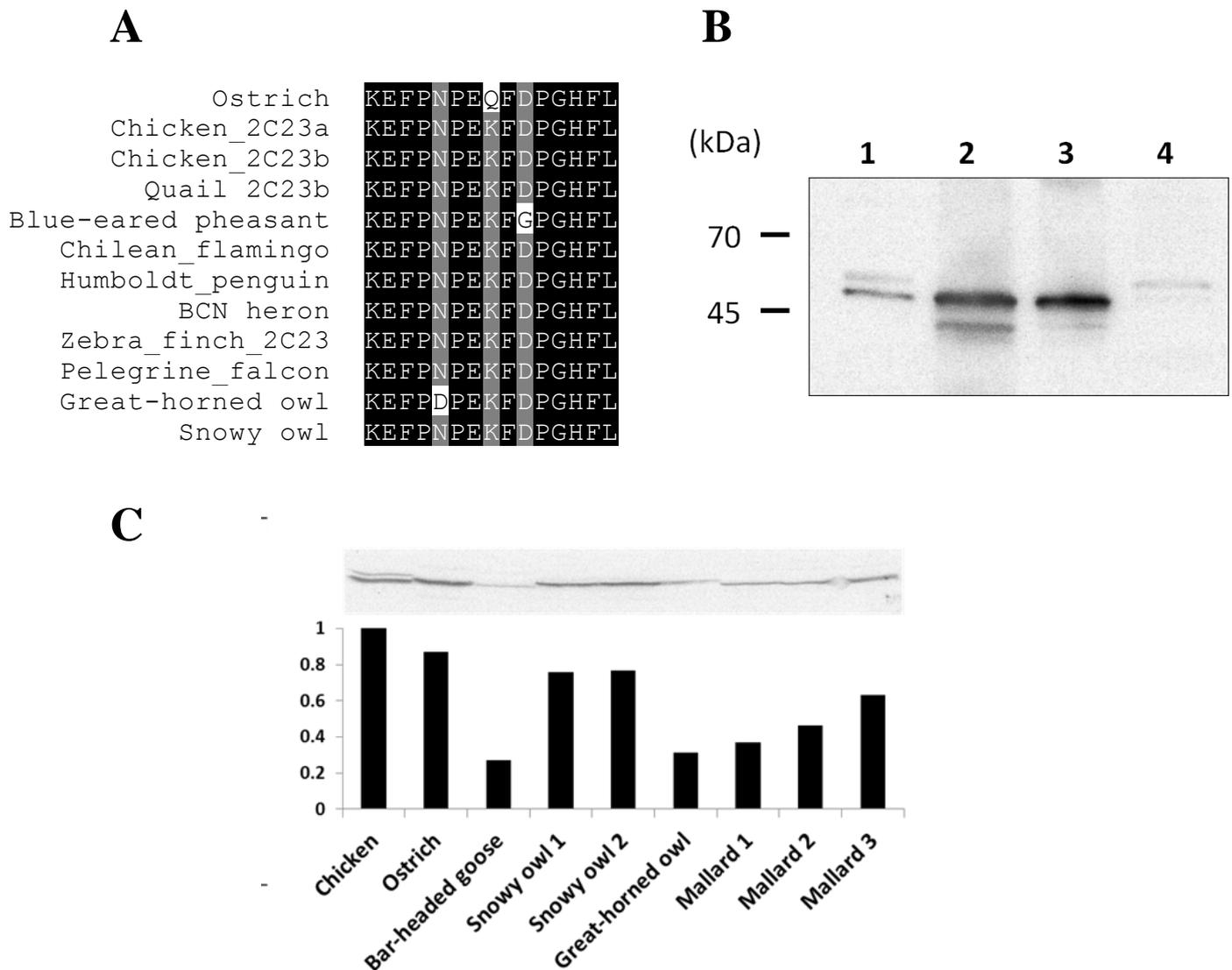


Figure 3-3. Immunoblot using the synthesized anti-CYP2C23 antibody

A) Alignments of the deduced CYP2C23 proteins corresponding to antigen peptide sequence (400-414 aa). The antigen peptide sequence was completely conserved in 8 bird species out of 12 species examined.

B) Immunoblotting of chicken microsome and recombinant CYP2C23 proteins. Specific recognition of CYP2C23a and CYP2C23b was confirmed. Lane 1, chicken microsome (25 µg of protein); lane 2, recombinant chicken CYP2C23a (0.5 pmol); lane 3, recombinant chicken CYP2C23b (0.5 pmol); lane 4, recombinant chicken CYP2C45 (0.5 pmol)

C) Immunoblotting with liver microsomes (25 µg of protein) of several avian species using the synthesized antibody. Specific cross-reactions to the putative CYP2C23 proteins of all the species were confirmed. The light intensities were quantitated relative to chicken CYP2C23a and CYP2C23b using ImageJ software.

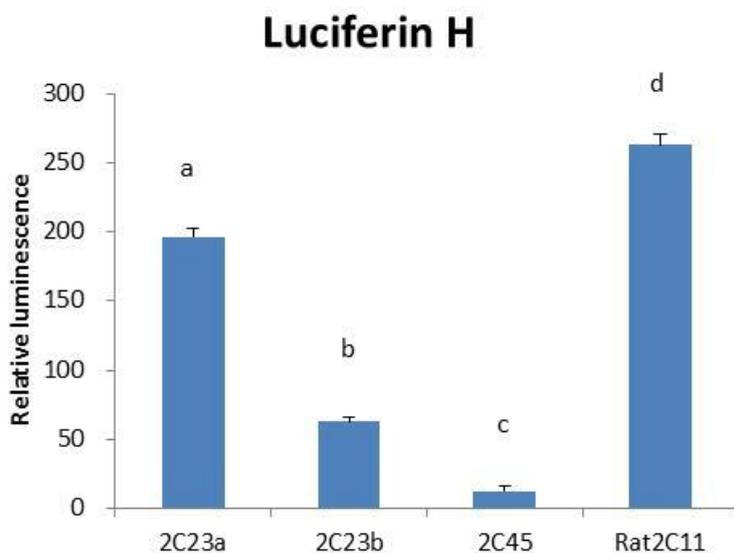
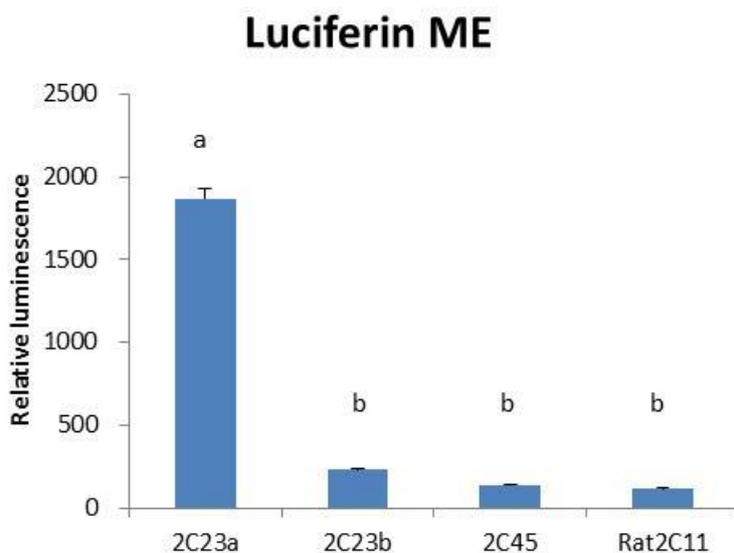
A**B**

Figure 3-4. Activity of CYP2C proteins measured with P450-Glo assay

Activity of CYP2C23a, CYP2C23b and CYP2C45 proteins were examined with P450-Glo assay kit.

A) Luciferin H is a substrate for CYP2C8 assay kit, and B) Luciferin ME is for CYP2C9 assay kit.

The assays were performed in triplicate. Data are expressed as an average \pm SE, with a unit of relative luminescent unit. Different characters indicate significant differences (Tukey's HSD test, $p < 0.05$).

3.4. 考察

3.4.1. 鳥類 CYP2C23 遺伝子の進化と *Galloanserae* 種の特異性

今回の結果から、ニワトリ、もしくはニワトリを含む *Galloanserae* 属種の CYP2C23 遺伝子について 3 つの特徴が見られた。すなわち、1) ニワトリのみが CYP2C23 遺伝子を 2 つ保持していること、2) *Galloanserae* 種(ニワトリ、アオミミキジ)でのみ見られた SRS-3 と SRS-4 の間の 2 残基欠失、そして、3) *Neoaves*、*Paleognathae* に対する低いアミノ酸相同性、同一性である。これらはいずれも *Galloanserae* の CYP2C23 遺伝子のみが特異な淘汰圧の元で進化を遂げてきた可能性を示唆するものである。淘汰圧の要因としては、遺伝的な選抜や特異的な交配、非飛翔性の行動様式などが考えられる。

この結果は、*Galloanserae* CYP2C23 遺伝子の特殊な進化だけでなく、現在の鳥類間の種差、つまり CYP2C23 遺伝子が *Neoaves* 種間では比較的保存されている一方で、*Galloanserae-Neoaves* 間での種差が大きいことをも示唆している。このことから、少なくとも CYP2C23 遺伝子については、*Galloanserae* に属する家禽種を試験に用いるよりも、*Neoaves* 種であるキンカチョウなどを使う方が鳥類でのリスク評価の上でより正確な外挿になることが予想される。

本項は部分配列を元にした解析だが、4 つの SRS を含む重要な領域で得られた結果であるため、ホモロジー解析や系統解析結果についてある程度の妥当性があると考えられる。

3.4.2. ニワトリでの CYP2C タンパク質発現量

ウェスタンブロットにより、抗 CYP2C23 抗体は、ニワトリの CYP2C45 に対しても交差反応を示し、かつその親和性は CYP2C23 に比べ 1/10 程度であることが示された。一方で、ニワトリ肝ミクロソームを用いた時には CYP2C45 は CYP2C23a・CYP2C23b で見られたバンドと同程度のシグナル強度を示した。このことから、無処置ニワトリにおいて、CYP2C45 は CYP2C23 に比べタンパク質発現量が非常に高いと考えられた。この結果は、第一章に示した mRNA 発現量の分子種間差の結果と相補し合う結果であった。

3.4.3. CYP2C23 タンパク質発現量の種差

CYP2C23 は、ラットでは腎臓のアラキドン酸代謝などに関与することが知られているが、第 2 章で示したとおり、ヒトでは CYP2C62p として相同な遺伝子が偽遺伝子化している (Imaoka et al., 1993)。鳥類では、CXR を介した転写誘導を強く受けるため生体外由来異物に反応する分子種として重要と考えられるが、鳥類 CYP2C23 の基質は見つかっていない。

後述する通り、第 4 章では、ニワトリーフクロウ間でワルファリン代謝活性に 50 倍程度の種差が認められ、ニワトリ CYP2C23 もワルファリン代謝に寄与することを明らかにした。

本章で CYP2C23 タンパク質発現量について鳥類種間での比較を行った所、鳥類間で大きな種差は見られなかった。一方で、Luciferin ME を用いた活性測定ではニワトリの CYP2C23a-CYP2C23b 間でも 8 倍程度の差が認められたことから、鳥類種間で CYP2C23 の

タンパク質発現量が同程度であっても、活性・機能で大きな種差があることが予想された。今回得られたタンパク質発現量の知見を基礎として、各鳥類種での CYP2C23 の誘導されやすさの種差や機能、基質について検討が必要である。

3.4.4. 抗鳥類 CYP2C23 抗体の Universal CYP2C 抗体としての有用性

今回抗原としたペプチド配列(KEFPNPEKFDPGHFL)について哺乳類についても BLAST 検索を行ったところ、多数の哺乳類で CYP2C と完全にマッチした(Table 3-5)。予備的に行ったウェスタンブロットでは、ウシ、ウマ、ヒツジ、シカ、ラクダなどで CYP2C と考えられるタンパク質が特異的に検出できた。一方で、魚類(ゼブラフィッシュ、メダカ)や両生類(アフリカツメガエル)ではバンドが検出されなかった(Data not shown)。また、Table 3-6 に示す通り、哺乳類、両生類、爬虫類、魚類のいずれでも今回抗原とした配列では CYP2C タンパク質が上位にヒットした。このことから、今回用いた配列が CYP2C で種を越えて広く保存されている特異的な配列であり、得られた抗体も CYP2C に対する Universal な抗体であると考えられた。

Table 3-5. BLAST search result: Matched CYP2C proteins from mammals and birds.

	和名	種名	Definition in GenBank	
哺乳類	アフリカゾウ	<i>Loxodonta africana</i>	2C23-like	
	ミンククジラ	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	2C78	
	ドブネズミ	<i>Rattus norvegicus</i>	2C11 2C70 2C79(predicted)	
	ウマ	<i>Equus caballus</i>	2C23-like	
	ウシ	<i>Bos taurus</i>	2C	
	マウス	<i>Mus musculus</i>	2C44 2C70 2C50 isoform 1-precursor 2C54 2C65 (93%)	
	ブタ	<i>Sus scrofa</i>	2C33	
	ウサギ	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	2C30-like 2C3	
	チャイニーズハムスター	<i>Cricetulus griseus</i>	2C29-like isoform1 2C29-like isoform2 2C5 2C70-like isoform1 (93%)	
	スマトラオランウータン	<i>Pongo abelii</i>	2C21-like isoform1 2C21-like isoform2	
	アカゲザル	<i>Macaca mulatta</i>	2C76 pre 2C3-like	
	カニクイザル	<i>Macaca fascicularis</i>	2C76	
	テンジクネズミ	<i>Cavia porcellus</i>	2C23-like	
	鳥類	ニワトリ	<i>Gallus gallus</i>	2H1 2H2
		キンカチョウ	<i>Taeniopygia guttata</i>	2H1
		ウズラ	<i>Cortunix japonica</i>	2C18
		シチメンチョウ	<i>Meleagris gallopavo</i>	2H2-like (93%)

BLASTp searched with the antigen peptide sequence, KEFPNPEKFDPGHFL. 100 % matched sequences are listed in the table, other than mouse CYP2C65, Chinese hamster CYP2C70-like, and turkey CYP2H2-like.

Table 3-6. BLAST search result: typical mammal, amphibians, reptile, and fish.

Species	Identity (%)	Identical #	Definition in GenBank
ヒト	93	14	2C18
<i>Homo sapiens</i>	87	13	2C8 2C19 2C9
	73	11	2 E1
	60	9	1B1
	53	8	2A7 2A6 2A4 4V2 4A11 4A22 2W1
カモノハシ	80	12	2A13-like
<i>Ornithorhynchus</i>	60	9	2C39-like
<i>anatinus</i>	53	8	2B2-like
ネッタイツメガエル	67	10	PREDICTED: cytochrome P450 2H2-like
<i>Xenopus tropicalis</i>	60	9	PREDICTED: cytochrome P450 2G1-like PREDICTED: cytochrome P450 2F2-like Cyp2f2 protein
	53	8	cyp2c37 2C18
	47	7	2C8 2C20
アフリカツメガエル	67	10	2C8
<i>Xenopus laevis</i>	53	8	2A13
アノールトカゲ	93	14	PREDICTED: cytochrome P450 2C21-
<i>Anolis carolinensis</i>	87	13	PREDICTED: cytochrome P450 2C29- PREDICTED: cytochrome P450 2C18- PREDICTED: cytochrome P450 2H2-like
	80	12	PREDICTED: cytochrome P450 2C29- PREDICTED: cytochrome P450 2C20-
	73	11	PREDICTED: cytochrome P450 2G1-like
	67	9	PREDICTED: cytochrome P450 2J2-like
	53	8	PREDICTED: cytochrome P450 2F3-like
ゼブラフィッシュ	73	11	17A1
<i>Danio rerio</i>			2AD2 2AD3

CYP isoforms in typical genome-sequenced species, hit by BLASTp search with antigen peptide sequence, are listed. Identical # indicate the number of identical residues. Red characters show CYP2C subfamily isoforms and black characters show other than CYP2C proteins.

3.5. 小括

本章では、鳥類 CYP2C23 遺伝子の部分配列クローニングを行い、遺伝子レベルでの種差および進化過程について検討した。その結果、CYP2C23 遺伝子に関しては、ニワトリもしくは *Galloanserae* でのみ特殊な進化をしてきたと考えられた。このことから、CYP2C23 についてはニワトリを代表的鳥類種として毒性試験に用い、他の野生鳥類種に外挿することの妥当性に疑問符がついたといえる。また、今回推測された「ニワトリの CYP2C23 に特異的な淘汰圧」は、他の異物代謝 CYP 分子種の進化にも同様の影響を及ぼしてきた可能性がある。今後、CYP2C45 など鳥類で異物代謝上重要と考えられる分子種について *Galloanserae-Neoaves* 間での種差を検討することが、野生鳥類種に外挿するに適した鳥類種を選定することにつながるだろう。

さらに、鳥類で広範に保存されたアミノ酸領域を認識する抗体を作製したことで、CYP2C23 タンパク質の発現量に鳥類種間で大きな種差がないことが明らかになった。今後 CYP2C23 の機能面での種差を解析することで、鳥類種間で見られる異物代謝活性の種差の原因を明らかにすることにつながるだろう。また、今回のようなアプローチを用いることで、CYP2C45 などについても同様に鳥類種間でタンパク質発現量比較をすることができると考えられる。

3.6. 参考文献

- Chen Y, Goldstein JA (2009). The transcriptional regulation of the human CYP2C genes, *Curr. Drug Metab.* 10(6), 567-78.
- Darwish WS, Kawai Y, Ikenaka Y, Yamamoto H, Muroya T, Ishizuka M (2010). Identification and phylogenetic analysis of novel cytochrome P450 1A genes from ungulate species, *J. Vet. Med. Sci.* 72(9) 1237-1241.
- Edgar RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-1797.
- Gotoh O (1992). Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences, *J. Biol. Chem.* 267, 83-90.
- Hansen AJ, May BK (1989). Sequence of a chicken phenobarbital-inducible cytochrome P450 cDNA: regulation of two P450 mRNAs transcribed from different genes, *DNA*, 8(3), 179-191.
- Hobbs AA, Mattschoss LA, May BK, Williams KE, Elliott WH (1986). The cDNA and protein sequence of a phenobarbital-induced chicken cytochrome P-450, *J. Biol. Chem.* 261, 9444-9449.
- Ikushiro S, Sahara M, Emi Y, Yabusaki Y, Iyanagi T (2004). Functional co-expression of xenobiotic metabolizing enzymes, rat cytochrome P450 1A1 and UDP-glucuronosyltransferase 1A6, in yeast microsomes, *Biochem. Biophys. Acta.* 1672, 86-92.
- Imaoka S, Wedlund PJ, Ogawa H, Kimura S, Gonzalez FJ, Kim HY (1993). Identification of CYP2C23 expressed in rat kidney as an arachidonic acid epoxygenase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267(2), 1012-1016.
- Kubota A, Stegeman JJ, Goldstone JV, Nelson DR, Kim EY, Tanabe S, Iwata H (2010). Cytochrome P450 CYP2 genes in the common cormorant: Evolutionary relationships with 130 diaspid CYP2 clan sequences and chemical effects on their expression, *Comp. Biochem. Physiol. C* 153(3), 280-9.
- Kubota A, Iwata H, Tanabe S, Yoneda K, Tobata S (2005). Hepatic CYP1A induction by dioxin-like compounds, and congener-specific metabolism and sequestration in wild common cormorants from Lake Biwa, Japan, *Environ. Sci Technol.* 39, 3611-19.
- Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SMG, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW (2004). Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenet. Genom.* 14(1), 1-18.
- Oeda K, Sakaki T, Ohkawa H (1985). Expression of rat liver cytochrome P-450MC cDNA in

Saccharomyces cerevisiae. *DNA* 4, 203–210.

Omura T, Sato R (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239, 2370–2378.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.

Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, Ball SE (2004). Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab. Dispos.* 32(11), 1201-1208.

第四章 ワルファリン(WF)をモデル化合物とした 鳥類種間での感受性種差と、インビトロ評価系に関する検討

4.1. 背景と目的

4.1.1. 鳥類における抗凝固系殺鼠剤による二次的中毒事例

イギリスやニュージーランド、ハワイ、日本などでは、渡り鳥の繁殖地などでげっ歯類の拡大が見られており、殺鼠剤を用いた駆除が行われている。その際に、ワルファリン(Warfarin, WF)を始めとするクマリン系殺鼠剤、および、ダイファシノンを始めとするインダンジオン系殺鼠剤が頻用されているが、これらの抗血液凝固系の殺鼠剤が鳥類にも二次的な被害を引き起こしている(Erickson and Urban, 2004)。渡り鳥や、げっ歯類を捕食する猛禽類で多く被害が見られており、希少種個体数の減少と絶滅を招くことが危惧されている(Lovett, 2012; Borrell, 2011)。この問題は猛禽類の棲息数減少の原因として挙げられる等、今まさに深刻化しており、世界中で殺鼠剤による鳥類での死亡事例や汚染状況に関して報告がなされている(Hughes et al., 2013; Sánchez-Barbudo et al., 2012; Albert et al., 2009; Walker et al., 2008; Johnston et al., 2005; Dowding et al., 1999; Howald et al., 1999; Stone et al., 1999)。

4.1.2. 鳥類におけるクマリン系殺鼠剤の感受性種差

鳥類では、WF やクロロファシノンなどの殺鼠剤について、主に家禽での LD₅₀ が算出されている(Table 4-1)。WF の LD₅₀ は、ニワトリでは 942mg/kg、コリンウズラでは >2150mg/kg とげっ歯類に比して致死にいたる曝露量が大きく、哺乳類に比べ鳥類では毒性が低いものと考えられてきた。しかし、野生鳥類種においては抗血液凝固系の殺鼠剤によるものと推定される死亡事例が相次いでいる。このことから、抗血液凝固性の殺鼠剤に対してニワトリなどの家禽は殺鼠剤感受性が低く、野生鳥類種では感受性が高い、という鳥類種間での感受性種差が存在することが予想される。

Table 4-1. LD₅₀ of warfarin and typical SGAR on birds and mammals.

LD ₅₀ (mg/kg)	Warfarin	Bromadiolone	Brodifacoum
Rat (norway, roof)	1.65	0.56-0.84	0.39, 0.56
Mouse (laboratory, house)	4.35, 11.0	1.75	0.4
Cat	2.5-20	>25	<25
Dog	20-50, 200-300	8.1	0.25-1.0
Chicken	942	-	4.5
Mallard	620	-	0.26, 4.6
Canada goose	-	-	<0.75
Ring-necked pheasant	-	-	10
Northern bobwhite	>2150	138, 170	-

Modified from Erickson and Urban (2004).

4.1.3. WF の作用機序と感受性決定要因

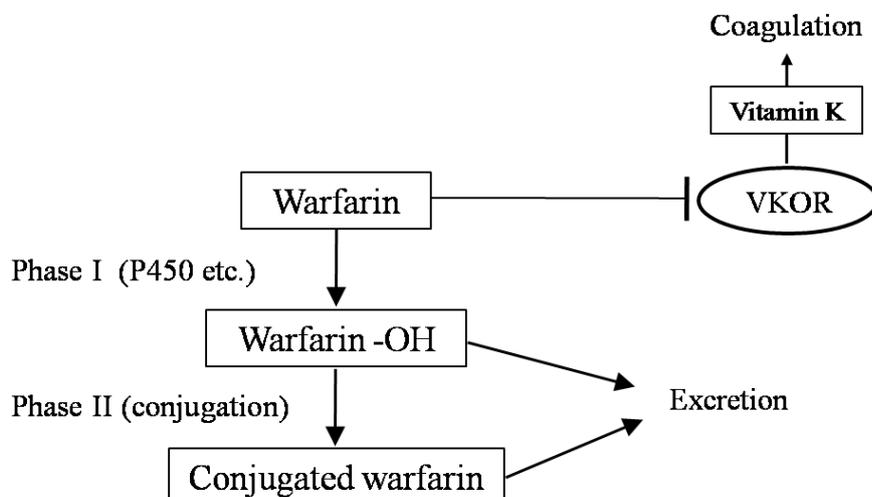
クマリン系殺鼠剤、およびインダンジオン系殺鼠剤はともに、ビタミン K エポキシド還元酵素(Vitamin K epoxide reductase, VKOR)を阻害する(Figure 4-1)。還元型ビタミン K は血液凝固因子などのビタミン K 依存性タンパク質を活性化する上で不可欠であり、抗血液凝固系殺鼠剤は、VKOR を阻害することで血中の還元型ビタミン K を枯渇させ、内出血などによる失血死を引き起こす。

第一世代クマリン系殺鼠剤である WF は、ヒトで脳梗塞治療などの臨床薬としても用いられる。投与必要量の個体差が非常に大きいことから WF は扱いの難しい薬とされているが、現在でも多用されており、ヒトで WF 感受性決定要因とその個人差についての研究が活発に行われている。

WF 感受性決定要因として最大のものは、ヒトの投与必要量の個人差のうち、30-50%程度を説明すると言われる VKORC1 (Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1)と CYP2C9 の一塩基多型(Single nucleotide polymorphism, SNP)である(Schwartz, 2008; Wadelius, 2007; Zhu, 2007; Rieder, 2005; Sconce, 2005)。一部の VKOR の SNPs は、ビタミン K 還元活性の低下を招く(Rost et al., 2004)。ワルファリンは S 体と R 体のラセミ体として用いられるが、ヒト VKOR には S 体が 3 倍程度強く作用する。CYP2C9 は S-WF のうち 80-85%を代謝するため、SNPs による活性低下が WF の体内動態に大きく影響する(Lane et al., 2012; Kaminsky, 1997)。

VKOR と CYP2C9 以外の遺伝的要因としては、CYP4F2 (1-2%程度、Takeuchi, 2009)や、CYP2C 遺伝子上流域の SNPs (5%程度、Perera et al., 2013)が報告されている。この他の個体差の多くは、遺伝的要因ではなく、性別や年齢差、健康状態、環境要因などによるものと考えられている。

Figure 4-1. Warfarin: mode of action and the detoxification



4.1.4. 抗凝固系殺鼠剤の種類

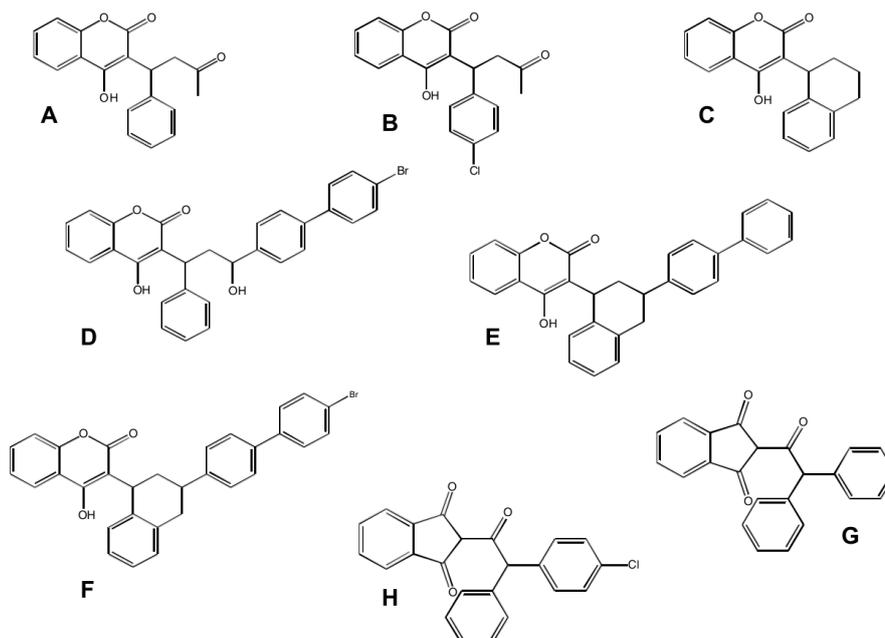
鳥類で被害が報告される殺鼠剤は、クマリン系(第一世代：WF、クマテトラリル、第二世代：ジフェナクム、ブロジファクム、ブロマジオロン)、インダンジオン系(第一世代：クロロファシノン、ダイファシノン)などがある(Figure 4-2)。

WFなどの第一世代殺鼠剤は、速やかにCYPにより代謝を受け体内の残留性が低いことから、げっ歯類駆除のためには反復投与が必要である。そのため、殺鼠剤としては、げっ歯類が同じ場所に食餌に現れる習性を利用することで反復投与を実現している。それに対し、第二世代殺鼠剤は、第一世代殺鼠剤を骨格として、残留性を高めた構造を持っている。その結果、単回投与でも血中濃度が長期に渡って維持され、十分な致死性をもたらすのである(Vandenbrouk et al., 2008; Fisher et al., 2003)。これら生体での残留性の高い第二世代殺鼠剤の登場により、野生鳥類での被害も増加している。

なお、本邦でも、外来種が増殖している小笠原諸島(東京都)では2007年にダイファシノンが使用され、西島ではクマネズミ(*Rattus rattus*)の根絶に成功している(橋本, 2009)。また、ドブネズミ(*Rattus norvegicus*)繁殖により海鳥や渡り鳥への悪影響が懸念されているユルリ島・モユルリ島(北海道)でも2009年以降にダイファシノン散布が行われている。

Figure 4-2. Typical anticoagulant rodenticides

(A) warfarin, (B) coumachlor, (C) coumatetralyl, (D) Bromadiolone, (E) difenacoum, (F) Brodifacoum, (G) diphacinone, (H) chlorofacinone



4.1.5. 目的

鳥類種間では WF の感受性に大きな種差があることが想定されるが、これまで VKOR や CYP に関する酵素学的な研究が全く行われてこなかった。そこで、被害が報告される猛禽類と、毒性試験が行われている家禽種を用いて、VKOR と CYP という 2 つの観点から鳥類種間での種差を明らかにすることを目的とした。

4.2. 材料・方法

4.2.1. 動物

本章の実験に用いた動物を Table 4-2 に示す。ニワトリは、北海道中央種鶏場(Hokkaido, Japan)より白色レグホンを購入した。ニワトリはプラスチックケージで飼育し、通常の餌(Nihon Nosan Kogyo Co., Kanagawa, Japan)と水を ad libitum で与え、12 時間間隔での明暗周期と 25±2°C の温度で飼育した。4-5 週齢で二酸化炭素を用いた安楽殺を行い、素早く肝臓を採取した。肝臓は液体窒素にて凍結し、実験使用時まで -80°C で保存した。動物実験は、北海道大学動物実験委員会の承認を得、その規定に従って行った(承認番号 10-0067)。

Table 4-2. Animals

和名	学名	個体数	性別	年齢	用途
ニワトリ	<i>Gallus gallus</i>	3	オス	4-5 週齢	マイクロソーム
ダチョウ	<i>Struthio camelus</i>	3	オス	2-6 才	マイクロソーム
アイガモ	<i>Anas platyrhynchos</i>	3	オス	9 週齢	マイクロソーム
シロフクロウ	<i>Bubo scandiacus</i>	2	オス	3 才、12 才	マイクロソーム
アメリカワシミミズク	<i>Bubo virginianus</i>	1	オス	2 才	マイクロソーム
ラット(Wistar)	<i>Rattus norvegicus</i>	3	オス	10 週齢	マイクロソーム
ニワトリ	<i>Gallus gallus</i>	4	オス	6 週齢	WF 動態解析
		4	メス	6 週齢	WF 動態解析

4.2.2. ニワトリでの WF 薬物動態解析

4.2.2.1. 投与～サンプル保存

ニワトリは投与 12 時間前から絶食させ、DW (Distilled water) に溶解したワルファリンナトリウム塩(3 mg/ml) 1.5 mg/kg を経口投与した。その後、0.5、1、2、3、6、9、12、24、72 時間後に、それぞれ 200 µl の血液を翼静脈から採取し、ヘパリン 2 µl を加えた。採血後 30 分以内に 30 分間 1,000 g での遠心分離を行い、上清の血漿を別のエッペンドルフチューブにうつし、-20°C で保存した。

4.2.2.2. 血漿中濃度の分析

血漿からの WF 抽出は Jones et al. (2011) の方法に従った。血漿 50 µl に内部標準として 7 位水酸化クマリン(10 µl/ml) 10 µl を加えた。4°C にて 12 時間平衡化を行った後、0.2 % ギ酸を含む DW 190 µl、0.2% ギ酸を含むアセトニトリル 1 ml を加え、ボルテックスミキサーにて混合した。4°C にて 30 分間静置した後、12,000 g にて 15 分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清 1ml をエッペンドルフチューブに回収し、エバポレーターにより乾固した。DW 100 µl、メタノール 100 µl を加えて再溶解し、50 µl を液体クロマトグラフィー(High performance

liquid chromatography, HPLC)による分析に供した。

分析、定量には HPLC-UV を用いた。分析波長は 308 nm とし、TSKgel ODS-120T (TOSOH, Tokyo, Japan)カラムを用いて分離を行った。移動相には、15 mM リン酸二水素カリウム(pH 3)：メタノール：アセトニトリル=55:30:15 を用いた。定量された血漿中濃度から、薬物動態解析ソフト WinNonLin (Pharsight, CA, USA) を使用し、薬物動態パラメータの算出を行った。解析には、血漿中濃度推移に最もよく合致していた 1 compartment モデル(No lag time, input and elimination rate was 1st order)を用いた。

4.2.2.3. 排泄物中代謝物の分析

排泄物は、糞便を投与後 9 時間の時点で 20 ml のメタノール中に回収し、抽出・分析まで -20°Cにて保存した。

サンプルをホモジナイザーによりホモジナイズした後、超音波洗浄器にて 25°C10 分間超音波処理を行った。これを 2,000 g、5°Cにて 20 分間遠心し、その上清を回収した。このペレットに再度メタノールを加え、同様に超音波処理と遠心後の上清回収を行った。このサンプルを Figure 4-3 に示す方法により Sulfatase 10 IU/ml と β -glucuronidase 4,000 IU/ml を用いてグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体について脱抱合処理を行い、LC-MS/MS (Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry Detection) での分析に供した。LC-MS/MS での分析条件を Table 4-3 に示した。

Figure 4-3. Extraction procedure for fecal samples

Samples in MeOH

↓ Evaporation

Mess up to 50 ml

↓

Deconjugation

0.1M CH₃COONa pH5 270 µl

Sample 30 µl

Sulfatase 10 IU/ml 200 µl

β-glucuronidase 4,000 IU/ml 200 µl

↓

Incubated 37°C 8 h>

↓

add MeOH+Coumarin 150nM 500 µl IS

add MeOH 100 µl

total 1,300 µl

↓

4,000

Centrifuge rpm 5 min

↓

Collect supernatant

↓ DISMIC 0.20 µm filter

LC/MS/MS 10 µl injection

→

↓

↓

Deconjugation (negative control)

0.1M CH₃COONa pH5 270 µl

Sample 30 µl

BSA 1mg/1ml 200 µl

↓

incubated 37°C 8 h>

↓

add MeOH+Coumarin 150nM 500 µl IS

add MeOH 300 µl

total 1,300 µl

↓

4,000

centrifuge rpm 5 min

↓

Collect supernatant

↓ DISMIC 0.20 µm filter

LC/MS/MS 10 µl Injection

Table 4-3. LC/MS-MS analysis condition

HPLC condition	
Device	: Prominence UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Column	: ODS-120T (TOSOH, Tokyo, Japan)
Flow rate	: 0.3 ml/min
Column temp.	: 50 °C
Inj. Volume	: 10 µl
Mobile phase	: A : DW (0.1% acetic acid) : B : Methanol (0.1% acetic acid)
Gradient profile	: Time (min) 0 2 27 : B (%) 10 10 90
MS/MS condition	
Device	: LCMS-8030 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Ionization	ESI (+)
Ionization mode	: MRM
SRM trace (m/z)	
4-, 6-, 7-, 8-OH	: 323.1 > 265.2
10-OH	: 323.1 > 251.2
Warfarin	307.1 > 161.25

4.2.3. 肝臓ミクロソーム画分の調製

4.2.3.1. 肝臓ミクロソーム画分の調製

各動物種の肝臓から、Omura and Sato (1964)の手法により肝臓ミクロソーム画分を調製した。5 g の肝臓に 15ml のリン酸バッファー(KPB、0.1 M、pH7.4)を加え、氷上にてホモジナイズした。これを 4 °C にて 9,000 g、20 分間遠心し、その上清を回収後、さらに 4°C にて 105,000 g、60 分間遠心した。得られたペレットに KPB を加えて再度 105,000 g、60 分間遠心してミクロソームを精製した。遠心後得られたミクロソーム画分のペレットに適量の KPB を加えてホモジナイズし、これを肝臓ミクロソーム画分として後述の代謝活性測定に用いた。実験に用いるまで、液体窒素にて凍結後、-80°C で保存した。

4.2.3.2. ミクロソーム中のタンパク質含量と CYP 含量の定量

Lowry 法により肝臓ミクロソーム画分中のタンパク質含量の定量を行った(Lowry et al., 1951)。検量線スタンダードとして BSA を用い、定量の際の検量線では $R^2=0.999$ 以上の値が得られていた。また、Omura and Sato (1964)による CO 差スペクトル法により肝臓ミクロソーム画分中の CYP 含量を測定した。

4.2.4. VKOR : 活性測定と WF による阻害、アミノ酸配列比較

4.2.4.1. ビタミン K エポキシドの合成

Tishler et al. (1940)の方法を用いてビタミン K₁ キノン(VK1)を原材料としてビタミン K₁、2-3 エポキシド(VKO)を合成した。

100 mg のビタミン K₁ を 5 ml のエタノールに溶解し、これを 50 ml の三角フラスコ中で 75 °C、2 分間プレインキュベートした。これに Na₂CO₃ 100 mg (DW 250 µl に溶解)と過酸化水素(H₂O₂) 1 ml を加え、75 °Cで 10 分間激しく振盪した。その後、室温にて 5 分間冷却後、DW 10 ml を加えた後に、50 ml の遠心チューブに分注し、それぞれ 20 ml のジエチルエーテルを添加し、5 分間激しく攪拌した。1,000 g にて 10 分間遠心し、VKO を含む上清を回収し、遠心エバポレータにより減圧蒸留を行い乾固させた。これを DW・メタノール混合物(100:3)にて再溶解し、分取カラムを用いた HPLC-UV システムで分取、精製した。これを再度乾固させ、99.5%エタノールに溶かしたものを活性測定の基質として用いた。また、スタンダードとする VK₁ 溶液、基質とする VKO 溶液は 4°Cにて遮光して保存した。

なお、VKO はエタノールで溶解後、HPLC-UV による純度の検定を行い、さらに、吸光度計(266nm)にて得られた吸光度からモル吸光係数(30,800 M⁻¹ cm⁻¹)を用いて VKO 濃度を測定した(Wallin and Martin, 1987)。

4.2.4.2. VKOR の Kinetics 解析

VKOR 活性測定は肝臓ミクロソームを用いて Lasseur et al. (2005)の方法に修正を加えて行った。

反応液は、終濃度でミクロソーム 1.0 mg/ml、HEPES バッファー 0.1 M を含む。基質として、VKO を終濃度 12.5、25、50、100、200、300、400 µM となるように加えた。なお、いずれの反応用試験管でも VKO を溶解しているエタノール濃度が一定となるように調製し、反応液量は 500 µl とした。反応を行う恒温槽は、各動物種の体温を考慮し、ラットでは 37°C、ダチョウでは 38°C、ニワトリでは 42°C と設定した(Richards, 1971 ; Schmidt-Nielsen et al., 1969)。5 分間のプレインキュベーションの後、2 mM DTT (Dithiothreitol)を加え反応を開始した。5 分間の反応後、内部標準としてビタミン E (VE)を加え氷冷したジクロロメタン 1 ml を添加することで反応を停止した。その後、0.5%塩化ナトリウム溶液 0.5 ml とジクロロメタン 3.7 ml を添加し、5 分間ボルテックスミキサーにて攪拌した。その後 1,000 g、10 分間の遠心を行い、上清をアスピレーターにて取り除いた後、下層 3 ml を別のチューブに回収した。これを遠心エバポレータにて乾固させ、3% DW を含むメタノール 110 µl にて再溶解した。これをサンプルとして、HPLC-UV により分析を行った。

HPLC-UV は、波長 270nm とし、VKO、VK₁、VE について定量を行った。分離カラムには TSKgel ODS-120T (250×4.6 mm、粒径 5 µm、TOSOH)を用い、移動相には DW : メタノール 3:100 を用いた。予備試験により、反応時間、タンパク質濃度については、直線性を損なわない範囲であることを確認した。

4.2.4.3. WFによるVKOR活性阻害と、阻害定数の算出

VKORのKinetics解析と同様の実験系にWFを加えて活性を測定し、Dixon plot法により阻害定数 K_i の推定を行った。

予備試験では、DMSOに溶解したWFを、終濃度0.5、1、3、5、10 μM となるように加えて実験を行った。この結果、ラット、ダチョウでは低い濃度でも顕著にVKOR活性が阻害され、ニワトリでは高濃度でも強い阻害を受けなかった。この結果を踏まえ、本実験でのWF終濃度を下記の通りとした；ラット(0.05-0.5 μM)、ニワトリ(1-10 μM)、ダチョウ(0.1-1.0 μM)。また、基質となるVKOは50 μM と100 μM の2点を用いた。この結果得られた活性から、Dixon (1953)の手法により K_i を推定した。

4.2.4.4. VKORタンパク質の配列比較

VKORタンパク質の配列比較には、GenBankより取得した下記の配列を用いた。ClustalWにて多重アラインメントを作製した。

- NP_996530 Chicken VKORC1
- NP_001001328 Chicken VKORC1L1
- NP_976080 Rattus norvegicus, VKORC1
- NP_976083 Rattus norvegicus, VKORC1L1

4.2.5. WF代謝

4.2.5.1. 肝臓ミクロソームを用いたKinetics解析

Kaminsky et al. (1979)によるWF代謝活性測定系に修正を加えて、WF代謝活性を測定した。反応液は、塩化マグネシウム(終濃度3 mM)、G6P (Glucose-6-phosphate, 5 mM)、基質とするワルファリンナトリウム塩、肝臓ミクロソーム(1.0 mg/ml)を加えて500 μl とした。この反応液を37°Cにて5分間プレインキュベートし、G6PDH (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, 2 IU/ml)、 β -NAPDH (beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 0.5 mM)を加えて反応を開始した。10分間反応後、60%の過塩素酸20 μl を加えて反応を停止した。

この反応液を4°Cにて3,000 g、10分間遠心した上清を回収し、HPLCにより代謝物の分離・分析を行った。HPLCカラムとしてTSKgel-120Tを用い、HPLC-UV (308 nm)、もしくは、LC-MS/MSにより定量を行った。移動相に15mM KH_2PO_4 (pH3) : メタノール : アセトニトリル=55:30:15を用いたアイソクラティック分析、もしくは、A:メタノール(0.1%酢酸)、B:DW (0.1%酢酸)を用いたグラジエント分析を行った。

基質としてVKOを12.5、25、50、100、200、400 μM にて用い、代謝物として生成されたWF水酸化体の生成量から代謝活性の算出を行った。代謝物は、4'-OH、6-OH、7-OH、8-OH、10-OHの、5種類について定量を行った。

4.2.5.2. 発現 CYP2C タンパク質を用いた *Kinetics* 解析

ニワトリの CYP2C タンパク質(CYP2C23a、CYP2C23b、CYP2C45)と、対照としてラット CYP2C11 について、3.2.4.に用いたものと同じ酵母発現タンパク質を用いて、代謝活性の測定を行った。代謝活性測定は肝臓ミクロソームと同様に、反応液量 300 μ l、発現 CYP 10 pmol を用いて測定を行った。

4.2.6. 統計処理

WF 体内動態の雌雄差の検定には Student t 検定を用いた。VKOR および WF 代謝活性の *Kinetics* 解析では、GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, CA, USA)を用いて V_{\max} 、 K_m 、 V_{\max}/K_m の推定を行った。また、得られたパラメータの種差の検定には、JMP (SAS Institute, NC, USA)により Tukey's HSD (Honestly significant difference) test を行った。

4.3. 結果

4.3.1. ニワトリでの WF 薬物動態解析

4.3.1.1. 体内動態：WF と代謝産物

ニワトリ(雌雄各4羽)でのWFの血漿中濃度推移と得られた薬物動態パラメータをそれぞれ Figure 4-4、Table 4-4 に示す。

雌雄での比較では、 C_{max} のみ有意にメスで高かった。また、有意ではなかったものの、最高血漿中濃度到達時間(T_{max})がメスで小さく、血漿中半減期($T_{1/2}$)、血中薬物濃度時間曲線下面積(Area under the curve, AUC)はオスで小さい傾向が見られた。このことから、吸収はメスで早く、代謝・排泄はオスで早いと考えられた。

Table 4-5 に、今回得たニワトリでの結果と他の動物で報告されている血漿中半減期の値を示す。鳥類では WF の薬物動態に関するデータが他になく、哺乳類と比較したところ、哺乳類ではヒトで最も半減期が長く(34.0–42.0 時間)、ニワトリはそれとほぼ同等の長さだった(オス 27.4 時間、メス 34.0 時間)。

また、血漿中では、WF の代謝物のうち、4'位水酸化体(4'-OH)のみが検出、定量できた(Figure 4-6)。4'-OH は WF と異なり、腸肝循環と思われる血漿中濃度推移を示した。このことから、4'-OH は親化合物と 16 程度分子量が大きいのみだが、グルクロン酸などの抱合を受けて胆汁中排泄され、腸肝循環しているものと考えられた。また、4'-OH の濃度減少に要する時間は WF よりも長い傾向があった。

Figure 4-4. Plasma concentration of warfarin

The plasma concentration after the oral administration of WF (1.5 mg/kg) are shown as the average \pm SD for male and female (N=3 for each).

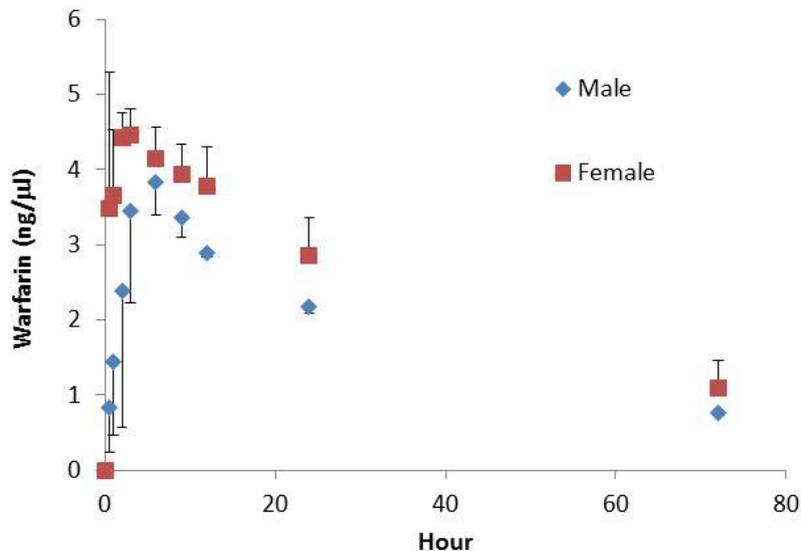


Table 4-4. Pharmacokinetic parameters of warfarin in chicken

Chicken		AUC ($\mu\text{g hour/ml}$)	K01_HL (hour)	K10_HL (hour)	CL_F ml/min/kg BW	T_{max} (hour)	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)
Female	1	249	0.851	34.5	0.008	4.7	4.55
	2	166	0.134	25.0	0.012	1.0	4.47
	3	282	0.157	42.6	0.007	1.3	4.50
Male	1	175	0.887	30.5	0.011	4.7	3.57
	2	173	1.003	30.4	0.012	5.1	3.51
	3	142	6.085	21.4	0.014	15.4	2.79
Average (SD)	Female	232 (60)	0.38 (0.41)	34.0 (8.8)	0.009 (0.003)	2.3 (2.0)	4.51 (0.04) *
	Male	163 (19)	2.66 (2.97)	27.4 (5.3)	0.012 (0.002)	8.4 (6.1)	3.29 (0.44)

Pharmacokinetic parameters are shown for each individual of male and female chickens, and for the average of male and female. K01_HL, K10_HL and CL_F represent absorption half-life, elimination half-life ($T_{1/2}$) and apparent clearance, respectively. Sex difference was observed only in C_{max} (student t test, $p < 0.05$).

Table 4-5. Comparison of plasma half-life.

	N	Half-life (hour)	Reference
Chicken	3 (male)	27.4	Present study
	3 (female)	34.0	
Rat	10	11.6	Yacobi and Levy (1974)
	13	7.1	Sawada et al. (1985)
Man	10	42.0	O'Reilly (1974)
	12	36.3	Vessel and Shively (1974)
	10	34.0	Sawada et al. (1985)
Dog	4	18.4	Bachmann et al. (1975)
Monkey	4	10.9	Scott et al. (1984)
Possum	8	11.9	Eason et al. (1999)
Cat	10	26.2	Smith et al. (2000)

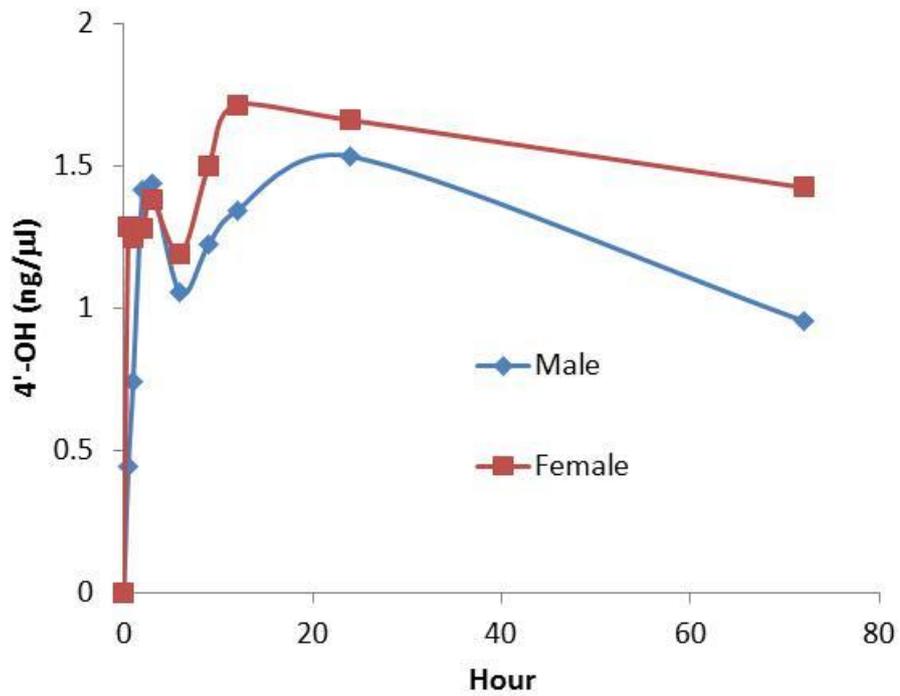


Figure 4-5. Plasma concentration of 4'-OH warfarin.

Typical individuals are shown for each one male and female. 4'-OH was the only metabolite observed and quantitated in plasma. The shape of the curve suggested the enterohepatic circulation of this metabolite.

4.3.1.2. 排泄物中の代謝物

投与後9時間の段階で各個体の排泄物を回収し、排泄物中の代謝物組成を分析した。Figure 4-7 に排泄物に含まれていた WF と代謝物の組成を示す。オス、メスともに 8-OH、10-OH は検出されなかった。また、メスでのみ 7-OH が見られた。オス、メスの両方で主に存在していた 4'-OH、6-OH、WF については、t 検定により有意な組成比の性差が見られた。

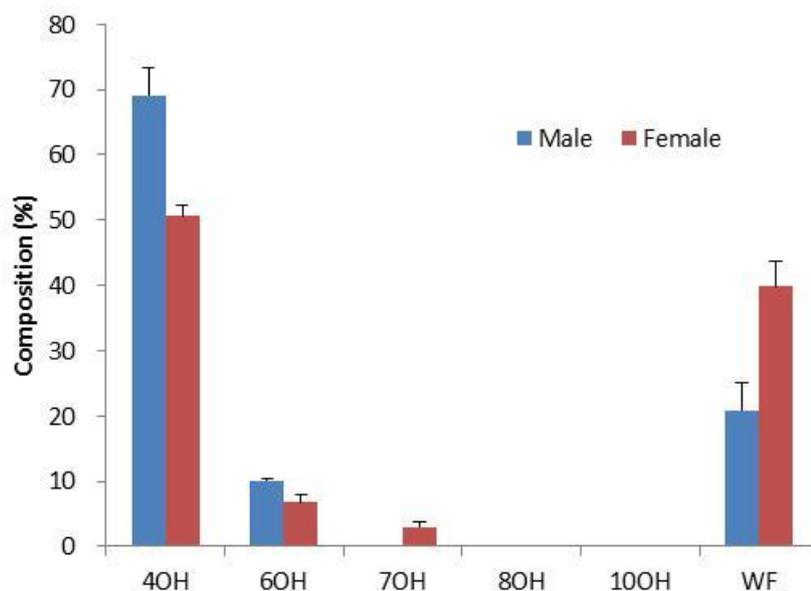


Figure 4-6. Metabolites and warfarin in fecal samples

Samples were collected at 9 hours after the oral administration of warfarin. After the extraction and deconjugation procedures, each metabolites were quantitated by LC-MS/MS. The values are shown as average \pm SD.

4.3.2. VKOR:Kinetics 解析と WF による阻害、アミノ酸配列比較

4.3.2.1. Kinetics 解析

予備試験から、ラットについては最高濃度 150 μM で試験した Lasseur et al. (2005)と同程度の K_m が得られた。そこで、本実験では基質濃度の最大を 400 μM として、ニワトリ・ダチョウ・ラットの VKOR 活性の Kinetics 解析を行った(Figure 4-7, Table 4-6)。

V_{\max} について、最小はニワトリ (71.7 ± 6.5 pmol/min/mg protein)で、ダチョウ・ラットでは有意に高かった(157.6 ± 20.0 pmol/min/mg protein, 514.5 ± 31.5 pmol/min/mg protein)。 K_m については有意な差は認められなかった(ニワトリ : 165.8 ± 41.3 μM 、ダチョウ : 187.5 ± 14.6 μM , rat: 176.1 ± 14.2 μM)。 V_{\max}/K_m で算出される酵素効率、 V_{\max} での種差が反映され、ラット > ダチョウ > ニワトリの順に有意差が見られた。

4.3.2.2. Dixon plot 法による阻害定数の推定

予備試験より、WF による阻害の受けやすさは、ラット > ダチョウ > ニワトリになることが予想され、種別に阻害剤濃度を設定して本実験を行った。本実験で得られた活性値から Dixon plot 法により阻害定数 K_i の推定を行った。

ニワトリは WF 10 μM 程度の共存下で VKOR 活性が半減するのに対し、ダチョウ・ラットでは WF が 1 μM 未満でも VKOR 活性が半減することが明らかになった。Dixon plot 法により、 K_i はニワトリ (11.3 ± 2.5 μM)、ダチョウ (0.64 ± 0.39 μM)、ラット (0.28 ± 0.09 μM) と推定され、ニワトリは他の 2 種より有意に高い阻害定数だった。

4.3.2.3. アミノ酸配列比較

ラットとニワトリについて、VKOR 活性の本態であると考えられる VKORC1 についてアミノ酸配列が明らかになっており、また、WF 結合部位も予測されている。そこで、ラットとニワトリの VKORC1 についてアミノ酸配列の比較を行った。また、VKOR 活性には Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1)も寄与していることが明らかにされたため、VKORC1L1 についても比較した。

その結果、VKORC1 タンパク質の WF 結合部位について、ラットではアミノ酸配列が **TYA** であるのに対し、ニワトリでは **TYV** と一アミノ酸に違いが見られた(Figure 4-9)。また、VKOR 活性中心については、多くの哺乳類で保存されている C₁VC モチーフがニワトリでは CLVC と違いが見られた。この異なるアミノ酸配列のモチーフが、VKOR 活性の違いを生み出している可能性が考えられた。

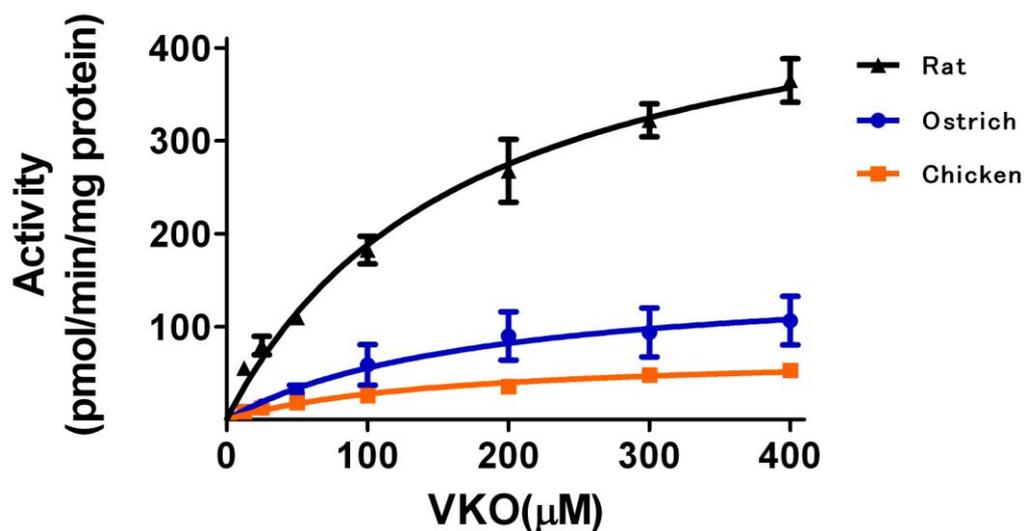


Figure 4-7. Kinetic analysis of VKOR activity with liver microsomes.

Vitamin K epoxide reductase (VKOR) activity versus various concentrations of vitamin K epoxide in rats, ostriches and chickens. Data were fitted to nonlinear regression curves with the Michaelis–Menten equation. The plots show the mean \pm SE. $n = 3$ for each species.

Table 4-6. Kinetic parameters of VKOR activity

	<i>V_{max}</i> (pmol/min/mg protein)	<i>K_m</i> (μM)	<i>V_{max}/K_m</i>
Chicken	71.70 \pm 6.5 *	165.8 \pm 41.3	0.47 \pm 0.09 *
Ostrich	157.6 \pm 20.0 *	187.5 \pm 14.6	0.87 \pm 0.18 *
Rat	514.5 \pm 31.5	176.1 \pm 14.2	2.9 \pm 0.10

Kinetic parameters of VKOR-dependent activities were estimated in chicken, ostrich and rat liver microsomes. The values are given as means \pm SE in each animal ($n = 3$).

*Significant difference from rats ($p < 0.05$).

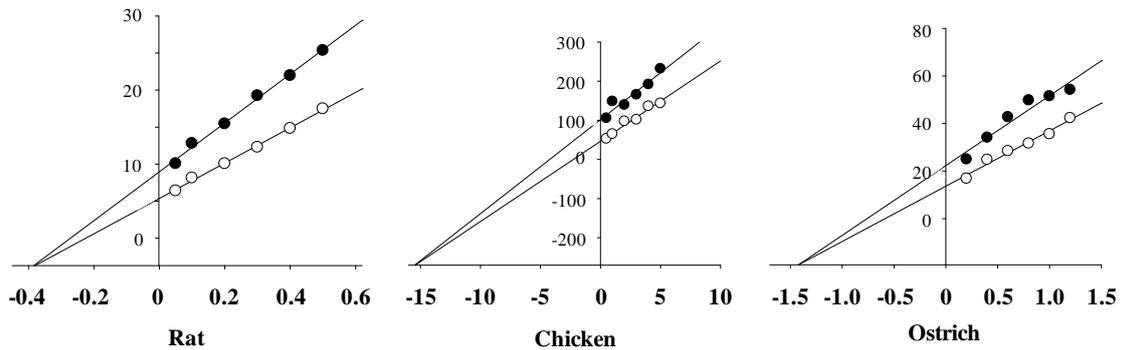


Figure 4-8. Dixon plot to determine K_i .

The K_i for VKOR toward warfarin was estimated in chicken, ostrich and rat liver microsomes. The X-axis shows the warfarin concentration (μM), and the y-axis is the reciprocal of activities. The x-coordinates of intersection points show the $-K_i$.

Table 4-7. inhibitor constants, K_i , in rats and birds.

	K_i (μM)		
Chicken	11.3	\pm	2.5
Ostrich	0.64	\pm	0.39
Rat	0.28	\pm	0.09

Inhibitor constants, K_i , are shown in the table. Values are mean \pm SE.

* indicates significant difference from ostriches and rats ($p < 0.05$).

Figure 4-9. Alignment of VKORC1 and VKORC1L1 proteins of chicken and rat.

```

#rat_C1      MG-----T TWRSRGLRL ALCLAGLALS LYALHVKAAR ARNEDYRAIC DVGTAISCSR VFSSRWGRGF GLVEHVLGAD SILNQSNSIF
#chicken_C1 -----MAA.A ...AV....A G.....ER.H E.DPT...S...L.PSV...T...A.....L...L.AFV.R...AI.VP..VI
#rat_L1     .AAPVLLRVS VP.WERVA.Y .V.A..IL.. I..Y..EREK E.DPEH...L.PWVK...A ALA.....LGSIF.K GV...P..V.
#chicken_L1 .AAPVLLRVS VP.WERVA.S .V.A..IL.. ...C.LEREK G.DLH.Q...L.SERVE...A AIT.....LGSIF.K .AI.....V.

                                VKOR active   Warfarin binding
                                |
GCMFYTIQLL LGCLRGRWAS ILLILSSLVS VAGSLYI... LFFVLYDFCI VQITTYAINA GLMLLSFQKV P-----E HKVKKP*-
.IA..SL.HC SAQC.A.AS. AA.LVT.VT. .LA.....LV .A.G.H.I.L ..LS..VV.. A.LF.NWRRW RRCG-----Q TA.R.RE*
.LI..IL... .MTASAV.A LV.MT..I.. .V.....Y. .Y...KE... I.V...VL.F L.LIINYKRL VYLNEAWKRQ LQP.ED.-
.LV..IL.M. .MTASAV.A LI.MT..I.. .V.....Y. .Y...KE...VI..IL.F I.FIINYKRL VYLNEAWKRQ LQP.QE.-

```

C1: VKOR complex subunit 1

L1: VKOR complex subunit 1 like 1

4.3.3. WF 代謝

4.3.3.1. 肝臓ミクロソーム中の CYP 含量

CYP 含量を Figure 4-10 に示す。平均値では下記の順になった:カラス (0.78 ± 0.04 nmol/mg protein) > ラット (0.75 ± 0.07) > ダチョウ (0.42 ± 0.08) > ニワトリ (0.39 ± 0.03) > アイガモ (0.20 ± 0.01) > フクロウ (0.15 ± 0.04)。カラスが最大で、最小のフクロウに対して平均値では 5.2 倍の種差が見られた。ニワトリでの測定結果はこれまでに報告されている濃度とほぼ同等であった(Hu, 2013)。鳥類のうちカラスのみがラットと同程度の CYP 含量を持ち、他の種ではより少なかった。

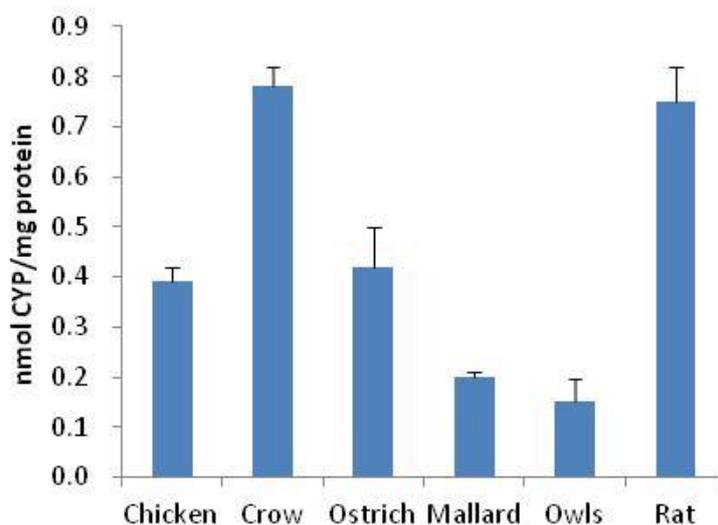


Figure 4-10. CYP contents in liver microsomes.

Values are shown as mean \pm SD.

4.3.3.2. 肝臓ミクロソームでの代謝能の種差

WF 代謝活性について、複数の基質濃度を用い Kinetics 解析を行った。ただし、フクロウでは代謝活性が低く、基質濃度 1 点(400 μ M)での比較を行った(Figure 4-11)。フクロウは最も代謝活性が低く、最も高いニワトリは 46 倍、ラットでも 10 倍程度の活性が見られた。

Figure 4-12 に 5 つの代謝産物に関する酵素効率 (V_{max}/K_m) の積算値、Table 4-9 に算出された Kinetic parameter を示した。酵素効率は下記の順に高かった；カラス(36.6 \pm 3.9 μ l/min/nmol CYP) > ニワトリ(24.5 \pm 2.3 μ l/min/nmol CYP) > ダチョウ(10.3 \pm 0.5 μ l/min/nmol CYP) > ラット(4.2 \pm 0.4 μ l/min/nmol CYP) > アイガモ(3.3 \pm 0.8 μ l/min/nmol CYP)。これらの値は肝臓ミクロソームタンパク質中の CYP 含量で補正したものだが、実際には CYP 含量にも同じパターンの傾向が見られていることから、*in vivo* の条件ではこれ以上の活性の種差が生まれるものと予想される。

WF 代謝物の組成としては、今回試験した鳥類では共通して 4'-OH が主要な代謝産物だった。酵素効率に占める割合では、最小のマガモでも 66.7%、最大のカラスでは 94.0%が 4'-OH だった。また、4'-OH は他の代謝物に比べて、 K_m が低く、 V_{max} が高い傾向が見られた。

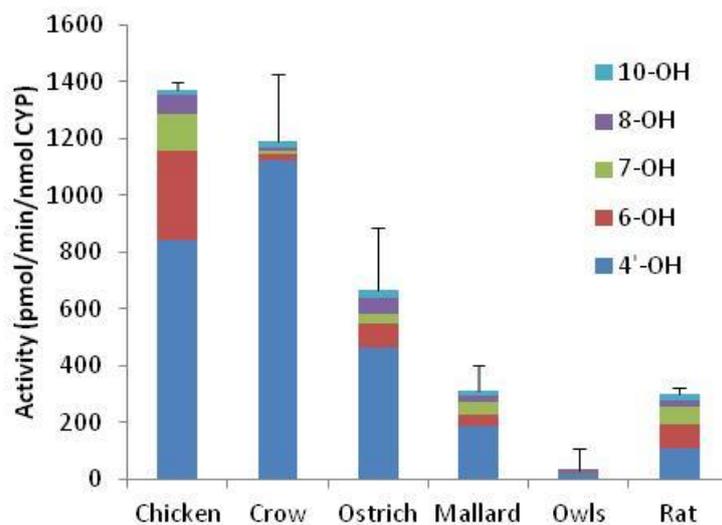


Figure 4-11. WF metabolic activity at the substrate concentration of 400 μ M.

The activity were measured with 400 μ M of warfarin as a substrate. The values are shown as average \pm SD.

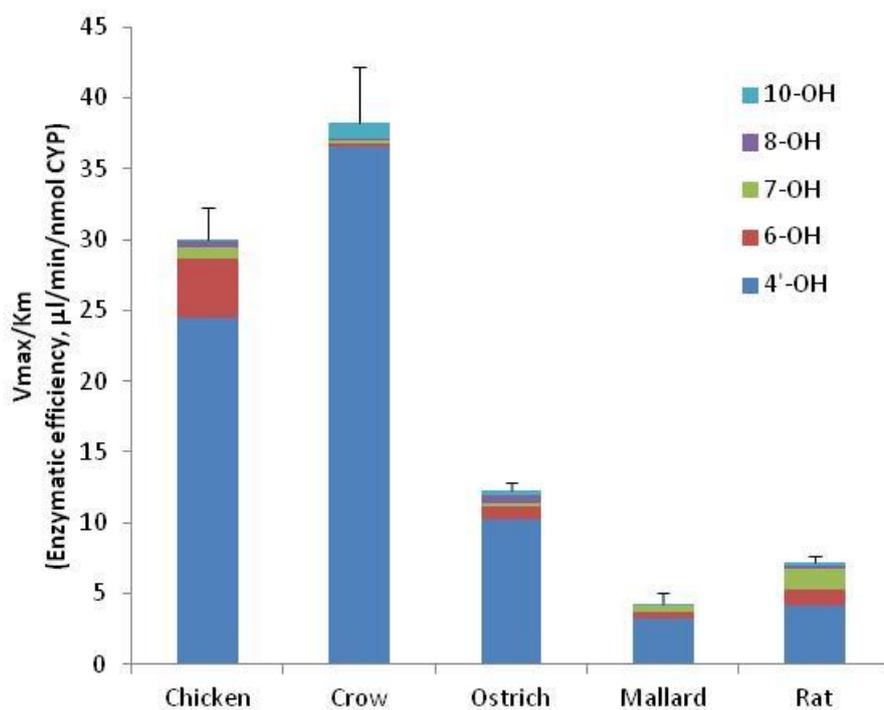


Figure 4-12. Cumulative enzymatic efficiency of warfarin metabolism in liver microsomes. Enzymatic efficiency for each metabolites were summed and shown as average \pm SD.

Table 4-8. Kinetic parameters of warfarin metabolism in four avian species and rat.

Metabolite		Chicken			Crow			Ostrich			Mallard			Rat		
4'-OH	V_{\max}	917.8	±	87.3 ^a	1162	±	189.2 ^a	530	±	90.8 ^b	225.2	±	56.6 ^c	139.4	±	15.3 ^c
	K_m	48.4	±	3.9 ^{bc}	33.2	±	4.4 ^c	64	±	12.1 ^b	104.8	±	7.9 ^a	110.2	±	19.1 ^a
	V_{\max} / K_m	19	±	1.7 ^b	35	±	3.5 ^a	8.3	±	0.9 ^c	2.2	±	0.6 ^d	1.3	±	0.1 ^d
6-OH	V_{\max}	399.6	±	166.7 ^a	50.1	±	21.4 ^b	106.5	±	35.6 ^b	63.1	±	34.8 ^b	97.8	±	9.4 ^b
	K_m	94.7	±	38.4	346.2	±	324.7	139.5	±	4	161.1	±	129.8	94.9	±	25.6
	V_{\max} / K_m	4.2	±	0.4 ^a	0.2	±	0.1 ^c	0.8	±	0.3 ^{bc}	0.4	±	0.1 ^{bc}	1.1	±	0.2 ^b
7-OH	V_{\max}	217.7	±	91.8 ^a	13.4	±	4.3 ^b	49.5	±	27.5 ^b	52.6	±	18.5 ^b	64	±	10.8 ^b
	K_m	277.4	±	23.6 ^a	85.9	±	10.6 ^{cd}	159.4	±	44.3 ^b	122.8	±	10.6 ^{bc}	42.3	±	5.8 ^d
	V_{\max} / K_m	0.8	±	0.3 ^b	0.2	±	0.1 ^c	0.3	±	0.1 ^c	0.4	±	0.1 ^{bc}	1.5	±	0.1 ^a
8-OH	V_{\max}	127.9	±	48.5 ^a	11.2	±	3.6 ^b	79.9	±	35.4 ^{ab}	50.6	±	31.1 ^{ab}	38.8	±	31.1 ^{ab}
	K_m	350.2	±	100.1	182.3	±	50.7	150.8	±	28.8	606.5	±	441.4	181.7	±	132.4
	V_{\max} / K_m	0.4	±	0.04 ^{ab}	0.1	±	0.04 ^c	0.5	±	0.1 ^a	0.1	±	0.04 ^c	0.2	±	0.04 ^{bc}
10-OH	V_{\max}	30.8	±	6.2	26	±	1.4	26.9	±	7.9	26.7	±	8.8	38.9	±	4.6
	K_m	232.6	±	32 ^a	23.5	±	8.5 ^c	68.1	±	21.3 ^{bc}	186.5	±	74.4 ^{ab}	221.1	±	60.3 ^a
	V_{\max} / K_m	0.1	±	0.05 ^b	1.2	±	0.3 ^a	0.4	±	0.2 ^b	0.1	±	0.03 ^b	0.2	±	0.03 ^b

V_{\max} : pmol/min/nmol CYP

K_m : μ M

V_{\max} / K_m : μ l/min/nmol CYP

Different characters indicate the significant differences among the species (Tukey's HSD test, $p < 0.05$).

4.3.3.3. 酵母発現ニワトリ CYP2C タンパク質による WF 代謝活性評価

肝臓ミクロソームを用いた WF 代謝活性測定により、鳥類では哺乳類と異なり、4'-位水酸化体が中心的な代謝物であることが明らかになった。ヒトやラットでは 4'-OH は CYP2C 分子種により生成される(Kaminsky et al., 1997; Guengerich et al., 1982)。また、第二章より、ニワトリでは CYP2C 分子種が異物代謝上の寄与が大きいと予想されたため、本章ではニワトリの CYP2C 分子種に着目し、酵母発現タンパク質を用いて WF 代謝活性測定を行った。

Kinetics 解析を行った結果、これらの CYP2C タンパク質では 4'-OH、6-OH、7-OH という 3 つの代謝物が見られ、8-OH、10-OH は検出されなかった(Figure 4-13、Table 4-10)。また、ニワトリ CYP2C45 では 6-OH も生成されず、4'-OH と 7-OH のみが生成された。

低濃度での活性値を示す酵素効率(V_{\max}/K_m)については、CYP2C23a > CYP2C23b >> ラット CYP2C11 > CYP2C45 という順で高かった(Figure 4-14)。また、その内訳としては CYP2C23a、CYP2C23b では 4'-OH が 7 割以上を占めていたのに対し、CYP2C45 では 4'-OH と 7-OH がほぼ同程度の割合だった。

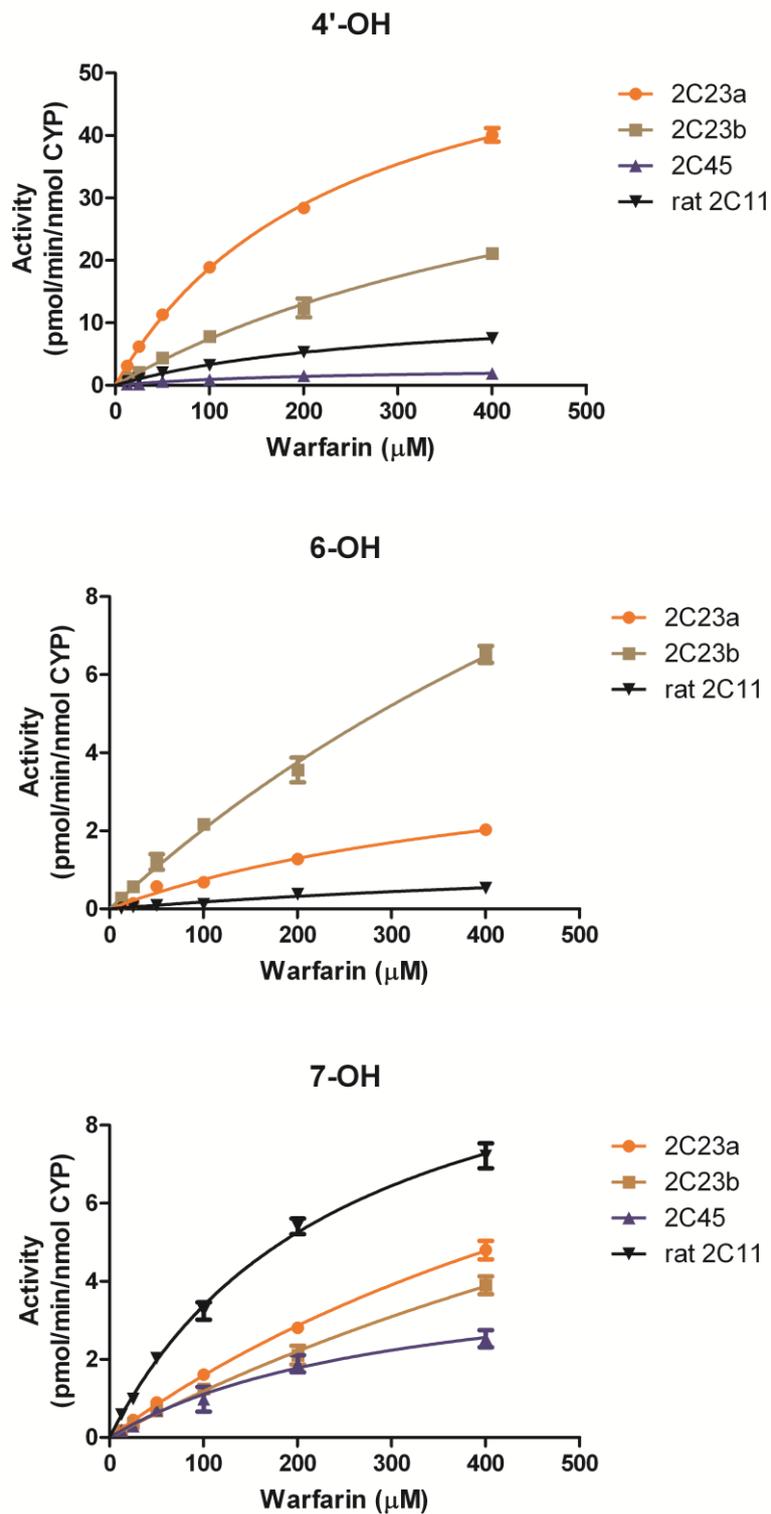


Figure 4-13. Kinetic analysis of warfarin metabolism by CYP2C proteins

Warfarin metabolism activity versus various concentrations of warfarin in CYP2C proteins. Data were fitted to nonlinear regression curves with the Michaelis–Menten equation. The plots show the mean \pm SE. The experiments were run in triplicate. .

Table 4-9. Kinetic parameters of CYP2C proteins in warfarin metabolism

	4'-OH			6-OH			7-OH		
	V_{max}	K_m	V_{max}/K_m	V_{max}	K_m	V_{max}/K_m	V_{max}	K_m	V_{max}/K_m
2C23a	63.8	239.9	265.7	4.6	508.0	9.0	14.5	814.1	17.8
2C23b	52.7	607.5	86.7	23.3	1042.0	22.4	15.7	1224.0	12.9
2C45	3.0	215.6	13.8	ND	ND	ND	4.6	312.8	14.6
rat 2C11	13.0	292.0	44.4	1.7	852.9	2.0	11.8	249.9	47.3

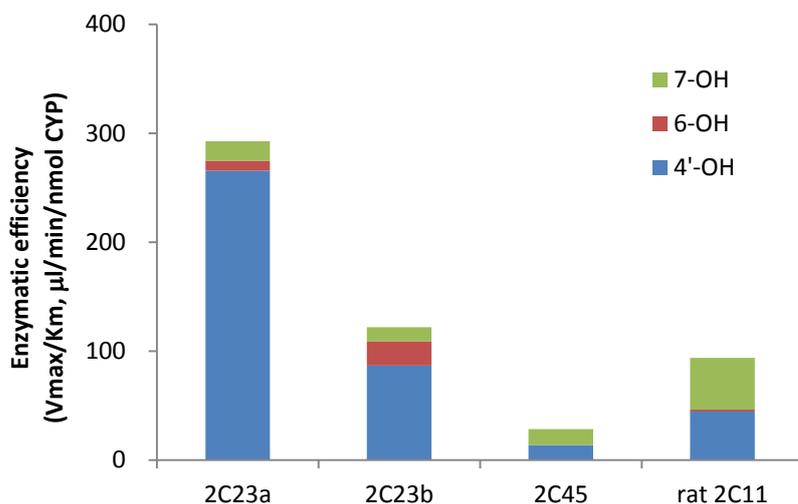


Figure 4-14. Cumulative enzymatic efficiency of CYP2C proteins in warfarin metabolism

Only 4'-, 6- and 7-OH were produced by CYP2C proteins, and neither 8-OH nor 10-OH were observed. The estimated V_{max}/K_m for the produced metabolites by each CYP2C isoforms were summed and indicated in the graph.

4.4. 考察

4.4.1. 鳥類での WF の体内動態と影響—*in vitro* から *in vivo* へ—

今回、ニワトリでは WF 代謝活性が非常に高く、また、VKOR 活性が WF による阻害を受けにくいことを明らかにした。これらはニワトリで WF の LD₅₀ が高く、致死に至りにくいことの原因になっていると考えられた。一方で、ダチョウではラットと同程度に WF によって VKOR 活性が阻害されやすく、フクロウではニワトリの 1/60 程度の WF 代謝活性しか見られなかった。このような要因が重なっている種ではニワトリと比べて格段に WF 感受性が高まるものと考えられる。これまでにクマリン系殺鼠剤による被害が多く報告されている猛禽類では、VKOR の阻害されやすさと CYP による代謝活性の低さが両方ある可能性が高いと考えられた。

さらに、ニワトリ生体を用いた薬物動態試験により、ニワトリでの WF 血清中半減期が 40 時間程度とラットの 4 倍程度、哺乳類の中でも半減期の長いヒトと同程度であることが明らかになった。WF は反復投与によりげっ歯類に致死性をもたらすが、これは半減期が短いためである。鳥類では、WF 代謝活性が高いニワトリですら 40 時間と半減期が長く、さらに、他の鳥類ではより半減期が長いことが予想される。このことから、鳥類での WF の体内動態は、単回摂取でも高濃度が長期にわたって維持されうることが考えられた。

鳥類において、WF の体内動態や VKOR に関する知見は本論文が初めてであり、今回試験していない猛禽類の VKOR や、他の鳥類種での WF 代謝活性に関する知見はない。今後、ニワトリなどの家禽種以外の野生鳥類種、特に中毒死の報告が多い猛禽類での WF 体内動態や、VKOR の阻害されやすさを明らかにしていく必要がある。

4.4.2. WF 体内動態におけるニワトリの性差

体内動態解析から、雌雄間では C_{max} で有意差が見られた他に、オスのほうが吸収が遅く、排泄が早いという傾向が見られた。Pampori et al (1993) は、ニワトリのオスの方がメスに比べて CYP 含量が多く、様々な基質に対する代謝活性が高いという結果を報告しているため、今回の結果では *in vivo* でこの性差が現れたものと考えられ、体内動態という観点からはニワトリのオスのほうが感受性が低いものと推測される。

なお、今回の実験では経口投与時のみで体内動態を解析した。ヒトではワルファリン経口投与時の吸収率は 98% 程度と非常に高いことが知られているが、ニワトリでの吸収率は不明であり、今回見られた薬物動態パラメータの雌雄差が吸収率の性差に起因する可能性を否定できない(Zhao et al., 2002)。この点については静脈内投与による詳細な体内動態解析が必要である。

4.4.3. 鳥類で WF を代謝する CYP 分子種と代謝産物

ニワトリを含む鳥類 5 種の肝臓ミクロソームを用いた WF 代謝試験により、鳥類では

4'-OH が主要な代謝産物であることが明らかになった。この結果は、鳥類では種を越えて存在する相同な CYP 分子種が 4'-位水酸化活性を担っていることを示唆した。

ヒトやラットでは、6-OH や 7-OH が主要な代謝産物であり、4'-OH はそれにつぐ代謝産物である。ヒト・ラットの 4'-OH はいずれも CYP2C 分子種により生成されること、また、第二章より、ニワトリでは CYP2C45 などが肝臓で高く発現していたことから、ニワトリの CYP2C タンパク質による WF 代謝試験を行った。その結果、CYP2C23a、CYP2C23b、CYP2C45 という 3 分子種全てで 4'-OH、7-OH が生成され、2C23a、2C23b では 6-OH も観察された。いずれの分子種でも 4'-OH が中心的な代謝産物であり、肝臓ミクロソームを用いて得られた結果(生成量：4'-OH > 6-OH > 7-OH > 8-OH)とも非常に近い代謝産物組成が得られた。

この結果より、ニワトリでは CYP2C タンパク質が WF 代謝の中心的な分子種であると考えられた。また、他の鳥類でも同様に CYP2C タンパク質が 4'-OH 生成を担っていることを示唆する結果であった。

4.4.4. 猛禽類の CYP 依存異物代謝能と化学物質リスク

フクロウ目では、CYP 含量が低く、また、WF 代謝活性も極めて低いことが明らかになった。動物の異物代謝能の進化については、植物が動物の捕食を避けるために植物アルカロイドなどの毒性物質を合成し、動物はそれに対応して解毒酵素を進化させたという”Plant-Animal warfare”という仮説が提唱されている(Gonzalez and Nebert, 1990)。鳥類の CYP 活性について、Fossi et al. (1995)は植物や穀物、昆虫などを食べる雑食性の強さとアルドリンエポキシド活性について相関が見られることを報告しており、この仮説を支持する結果だった。

今回観察された通り、猛禽類では植物を摂取しないことによる CYP 誘導の弱さと進化上の不要性という両面から、外来性の化学物質に対する異物代謝能が恒常的に低いままである可能性がある。CYP による代謝が遅ければ外来化学物質の体内残留期間が長くなり、化学物質全般に対するリスクを高める要因になる。今後、猛禽類についてはさらに詳細な検討が必要である。

4.4.5. 鳥類 VKOR について

近年、哺乳類の VKOR 活性は VKORC1 だけでなく、ホモログである VKORC1L1 も寄与していることが明らかにされた(Hammed et al., 2013)。ニワトリでも同様に VKORC1 と VKORC1L1 の両方の遺伝子が存在しており、今回 Eadie-Hofstee plot より、ニワトリの肝ミクロソームにおける VKOR 活性が Biphasic であることが確認できていることから、ニワトリではこれらの双方が活性に寄与しているものと考えられた(Data not shown)。

ラットと鳥類の肝臓ミクロソームでの VKOR 活性は、ラットで最も高く、ニワトリ、ダチョウでは低かった。Will et al. (1992)は、ニワトリとラットで血中の VK₁、VKO 濃度を比較し、ラットではほとんどが還元された VK₁ であるのに対し、ニワトリでは還元されてい

ない VKO も同程度存在していることを示した。今回見られた鳥類での VKOR 酵素効率の低さはこれと合致しており、ニワトリとダチョウでのビタミン K リサイクル効率の低さが見られた。このことから、鳥類全般でも VKOR 活性が低くビタミン K リサイクル効率が低いという可能性が示唆された。

WF による VKOR 代謝活性阻害では、ダチョウがラットと同程度に阻害されやすいのに対し、ニワトリでは K_i がダチョウの 20 倍近く、非常に阻害されにくいことが明らかになった。この結果はニワトリの WF 感受性が低いことと合致している反面、他の鳥類種ではラットと同程度に WF に対して感受性の高い VKOR を持っている種が存在することが明らかになった。

ヒトやラットなど WF 阻害定数の低い VKOR を持つ種では、VKOR 配列上の WF 結合部位は TYA であることが示されている(Rost et al., 2009)。今回 VKORC1 と VKORC1L1 配列のアラインメントにより、ニワトリでは WF 結合部位に一アミノ酸の置換が見られ、TYV だった。哺乳類ではほとんど見られない配列だが、この配列が WF 抵抗性の原因になっているものと考えられた。また、VKORC1L1 遺伝子については、多くの動物で TYV の配列を持っている。今後、このアミノ酸置換が実際に K_i を高めているのかどうか検証する必要がある。また、実際に TYV が K_i を高めるのであれば、今後鳥類のリスクアセスメント上、VKORC1 遺伝子上のこの配列が重要になるだろう。

4.4.6. 化学物質感受性と *in vitro* アッセイ系での毒性予測

化学物質のハイリスク種を特定し毒性予測をする上では、種を比較することで感受性の高い種、低い種を区別する必要がある。今回、VKOR の WF 阻害については、肝臓ミクロソームを用いたアッセイ系でも十分に WF 感受性の種差を検出できるものと考えられた。

WF 代謝に関しても同様に肝臓ミクロソームを用いた活性測定により、種差が検出できた。さらに、肝臓ミクロソーム中の CYP 含量にも種差が見られ、CYP 含量が低いほど、個体としての代謝能も低くなると考えられた。これらはニワトリなどの *Galloanserae* 種で報告されている高い LD_{50} と、猛禽類で頻繁に被害が報告されている現状を十分に説明するものだった。また、ニワトリでは、肝臓ミクロソームで見られた代謝パターンと、排泄物中で検出された代謝物のパターンが非常によく似ていた。このことから、*in vitro* の代謝活性測定から、*in vivo* での代謝とその種差が良好に予測できるものと考えられる。

以上より、CYP 依存性代謝活性が感受性に関わる化学物質に関しては、第一に CYP 依存性代謝活性の種差について検討し、種ごとのリスクを相対的に評価できるものと考えられた。一方で、ニワトリでラットに比べて非常に高い代謝活性を持つのに対し、血漿中半減期はラットより長かったことから、WF についてニワトリ固有の排泄の遅さが示唆された。哺乳類では WF を含む化学物質全般の排泄に関わる第 II 相反応(抱合反応)、第 III 相反応(輸送体によるトランスポート)について詳細に研究されているが、鳥類では WF に限らず第 II 相反応と第 III 相反応の研究がほとんどなされていない。今回観察されたニワトリの WF 排

泄の遅さは WF 以外の化学物質にも通じる鳥類の特徴である可能性がある。この排泄速度がニワトリや *Galloanserae* 種に固有のものか、*Neoaves* も含めた鳥類の特徴なのか、また、WF 以外の化学物質でも同様な哺乳類-鳥類間の種差があるのか、今後明らかにする必要がある。

4.5. 小括

本章では、鳥類間で感受性種差が大きいと予想される WF を用い、感受性決定要因として重要な VKOR と CYP について *in vitro* での種差の検出と評価を行った。その結果、WF に感受性の低いニワトリと感受性が高いと想定される猛禽類の種差が、肝臓ミクロソームを用いて検出できたものと考えられる。また、ニワトリでの体内動態を検証したことで、*in vivo* でも *in vitro* と同様の代謝パターンが見られることが確認でき、*in vitro* での毒性予測系が有効であることが裏付けられた。

CYP による WF 代謝に関して、ニワトリとフクロウの間で 50 倍近い代謝活性の種差が見られた。これは鳥類種間で CYP 依存性代謝活性に極めて大きな種差が存在し、感受性決定要因として重要であることを示す知見として重要である。

WF に限らず化学物質全般の CYP 依存性代謝活性と感受性に鳥類間で種差が存在し得る。今後さらに多くの化学物質に関して CYP 依存性代謝活性に基づいて鳥類種間での代謝能と感受性の種差を明らかにしていく必要がある。膨大な鳥類種と化学物質について代謝能の種差を予測しハイリスク種を推定する上では、鳥類種の系統関係や食性、棲息地域などを考慮して試験種を設定することや、種間での CYP 分子種に関する比較(アミノ酸配列やタンパク質発現量、アミノ酸配列を元にした *in silico* 解析など)、構造や物性に基づいた化学物質の分類などの工夫が必要だろう。

さらに、ニワトリとラットの体内動態比較により、鳥類では固有の排泄速度の遅さが見られた。化学物質の排泄に関して鳥類種間、特に *Galloanserae-Neoaves* 間での種差を検討することにより、鳥類種での化学物質感受性種差のより良好な予測につながると考えられる。

4.6. 参考文献

- Albert CA, Wilson LK, Mineau P, Trudeau S, Elliott JE (2010). Anticoagulant rodenticides in three owl species from western Canada, 1988–2003. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58(2), 451-459.
- Bachmann KA, Burkman AM (1975). Phenylbutazone - warfarin interaction in the dog. *J. Pharm. Pharmacol.* 27(11), 832-836.
- Borrell B (2011) Where eagles die, Nature News, doi:10.1038/news.2011.24,
- Dixon M (1953). The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* 55(1), 170-171.
- Dowding JE, Murphy EC, Veitch CR (1999). Brodifacoum residues in target and non-target species following an aerial poisoning operation on Motuihe Island, Hauraki Gulf, New Zealand. *N. Z. J. Ecol.* 23(2), 207-214.
- Eason CT, Wright GRG, Gooneratne R (1999). Pharmacokinetics of antipyrine, warfarin and paracetamol in the brushtail possum. *J. Appl Toxicol.* 19(3), 157-161.
- Erickson W, Urban D (2004). *Potential risks of nine rodenticides to birds and nontarget mammals: a comparative approach*. Environmental Protection Agency Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Washington, D.C., USA.
- Fisher P, O'Connor C, Wright G, Eason CT (2003). *Persistence of four anticoagulant rodenticides in the livers of laboratory rats*. Wellington, New Zealand: Department of Conservation.
- Fossi MC, Massi A, Lari L, Marsili L, Focardi S, Leonzio C, Renzoni A (1995). Interspecies differences in mixed function oxidase activity in birds: relationship between feeding habits, detoxication activities and organochlorine accumulation. *Environ. Pollut.* 90(1), 15-24.
- Gonzalez FJ, Nebert DW (1990). Evolution of the P450 gene superfamily:: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet.* 6, 182-186.
- Guengerich FP, Danna GA, Wright ST, Martin MV, Kaminsky LS (1982). Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or β -naphthoflavone. *Biochemistry* 21, 6019-6030.
- Hammed A, Matagrín B, Spohn G, Prouillac C, Benoit E, Lattard V (2013). VKORC1L1, an Enzyme Rescuing the Vitamin K 2, 3-Epoxy Reductase Activity in Some Extrahepatic Tissues during Anticoagulation Therapy. *J. Biol. Chem.* 288(40), 28733-28742.
- Howald GR, Mineau P, Elliott JE, Cheng KM (1999). Brodifacoum poisoning of avian scavengers during rat control on a seabird colony. *Ecotoxicology* 8, 431-447.
- Hu SX (2013). Effect of age on hepatic cytochrome P450 of Ross 708 broiler chickens. *Poult Sci* 92(5), 1283-1292.

- Hughes J, Sharp E, Taylor MJ, Melton L, Hartley G (2013). Monitoring agricultural rodenticide use and secondary exposure of raptors in Scotland. *Ecotoxicology*, 1-11.
- Johnston JJ, Pitt WC, Sugihara RT, Eisemann JD, Primus TM, Holmes MJ, Crocker J, Hart A (2005). Probabilistic risk assessment for snails, slugs, and endangered honeycreepers in diphacinone rodenticide baited areas on Hawaii, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1557-1567.
- Jones DR, Boysen G, Miller GP (2011). Novel multi-mode ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for profiling enantiomeric hydroxywarfarins and warfarin in human plasma. *J. Chromatogr. B* 879(15), 1056-1062.
- Kaminsky, L. S., Zhang, Zhi-Yi, 1997. Human P450 metabolism of warfarin, *Pharmacol. Ther.* 73, 67-74.
- Kaminsky LS, Fasco MJ, Guengerich FP (1979). Comparison of different forms of liver, kidney, and lung microsomal cytochrome P-450 by immunological inhibition of regio- and stereoselective metabolism of warfarin. *J. Biol. Chem.* 254, 9657-9662.
- Lane S, Al-Zubiedi S, Hatch E, Matthews I, Jorgensen AL, Deloukas P, et al. (2012). The population pharmacokinetics of R- and S-warfarin: effect of genetic and clinical factors. *Bri. J. Clin. Pharmacol.* 73(1), 66-76.
- Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Videmann B, Billeret M, Berny P, Benoit E (2005). Warfarin resistance in a French strain of rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19(6), 379-385.
- Lovett RA (2012). Killing rat is killing birds, Nature News, doi:10.1038/nature.2012.11824
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 1, 265-275.
- Omura T, Sato R (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378.
- O'Reilly RA (1974). Studies on the optical enantiomorphs of warfarin in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* 16(2), 348.
- Pampori NA, Shapiro BH (1993) Sexual dimorphism in avian hepatic monooxygenases. *Biochem. Pharmacol.* 46(5), 885-890.
- Perera MA, Cavallari LH, Limdi NA, Gamazon ER, Konkashbaev A, Daneshjou R, et al. (2013). Genetic variants associated with warfarin dose in African-American individuals: a genome-wide association study. *Lancet.* 382(9894), 790-796
- Richards SA (1971). The significance of changes in the temperature of the skin and body core of the chicken in the regulation of heat loss. *J. Physiol.* 216, 1-10.
- Riederer MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, et al. (2005). Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N. Engl. J. Med.* 352(22), 2285-2293.

- Riviere JL (1992). Hepatic microsomal monooxygenase activities in natural populations of the mallard duck *Anas platyrhynchos*, the tufted duck *Aythya fujigula* and the great crested grebe *Podiceps cristatus*. *Ecotoxicology* 1, 117-135.
- Rost S, Pelz HJ, Menzel S, MacNicoll AD, León V, Song KJ, Jäkel T, Oldenburg J, Müller CR (2009). Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice – a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *BMC genet.* 10, 4.
- Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz HJ, et al. (2004). Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427(6974), 537-541.
- Sánchez-Barbudo IS, Camarero PR, Mateo R (2012). Primary and secondary poisoning by anticoagulant rodenticides of non-target animals in Spain. *Sci. Total Environ.* 420, 280-288.
- Sawada Y, Hanano M, Sugiyama Y, Iga T (1985). Prediction of the disposition of nine weakly acidic and six weakly basic drugs in humans from pharmacokinetic parameters in rats. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 13(5), 477-492.
- Schmidt-Nielsen K, Kanwisher J, Lasiewski RC, Cohn JE, Bretz WL (1969). Temperature regulation and respiration in the ostrich. *Condor* 71, 341- 352.
- Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y, Li C, Dudek SM, Frye-Anderson A, et al. (2008). Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N. Engl. J. Med.* 358(10), 999-1008.
- Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, et al. (2005). The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 106(7), 2329-2333.
- Scott AK, Park BK, Breckenridge AM (1984). Interaction between warfarin and propranolol. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 17(5), 559-564.
- Smith SA, Kraft SL, Lewis DC, Freeman LC (2000). Plasma pharmacokinetics of warfarin enantiomers in cats. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 23(6), 329-337.
- Stone WB, Okoniewski JC, Stedelin JR (1999). Poisoning of wildlife with anticoagulant rodenticides in New York. *J. Wildl. Dis.* 35, 187-193.
- Tishler M, Fieser LF, Wendler NL (1940). Hydro, oxido and other derivatives of vitamin K₁ and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 62, 2866-2871.
- Vandenbroucke V, Bousquet-Melou A, Backer PD, Croubels S (2008). Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 31, 437-445.
- Vesell ES, Shively CA (1974). Liquid chromatographic assay of warfarin: similarity of warfarin half-lives in human subjects. *Science* 184(4135), 466-468.

- Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, Bumpstead S, Ghori J, Wadelius C, et al. (2007). Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Human genet.* 121(1), 23-34.
- Walker LA, Turk A, Long SM, Wienburg CL, Best J, Shore RF (2008). Second generation anticoagulant rodenticides in tawny owls (*Strix aluco*) from Great Britain. *Sci. Total Environ.* 392, 93-98.
- Wallin R, Martin LF (1987). Warfarin poisoning and vitamin K antagonism in rat and human liver. Design of a system in vitro that mimics the situation in vivo. *Biochem. J.* 241, 389-396.
- Wang PP, Beaune P, Kaminsky LS, Dannan GA, Kadlubar FF, Larrey D, Guengerich FP (1983). Purification and characterization of six cytochrome P-450 isozymes from human liver microsomes. *Biochemistry* 22, 5375-5383.
- Will BH, Usui Y, Suttie JW (1992). Comparative metabolism and requirement of vitamin K in chicks and rats. *J. Nutr.* 122, 2354-2360.
- Yacobi A, Levy G (1974). Pharmacokinetics of the warfarin enantiomers in rats. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 2(3), 239-255.
- Zhao YH, Abraham MH, Le J, Hersey A, Luscombe CN, Beck G, et al. (2002). Rate-limited steps of human oral absorption and QSAR studies. *Pharm. Res.* 19(10), 1446-1457.
- Zhu Y, Shennan M, Reynolds KK, Johnson NA, Herrnberger MR, Valdes R, Linder MW (2007). Estimation of warfarin maintenance dose based on VKORC1 (-1639 G>A) and CYP2C9 genotypes. *Clinic. Chem.* 53(7), 1199-1205.
- 橋本琢磨 (2009) 小笠原におけるネズミ類の根絶とその生態系に与える影響、地球環境、14(1), 93-101

第五章 結論

5.1. 総括

第二章では、異物代謝に関わる鳥類の CYP 1-3 ファミリー遺伝子を網羅的に同定し、鳥類種間での遺伝的な種差を明らかにした。鳥類では、CYP3A や CYP2C、CYP1A といった哺乳類で重要とされるサブファミリー遺伝子について *Galloanserae* と *Neoaves* では互いに相同遺伝子を保持し、遺伝子構成にほとんど種差がないことを示した。また、*Galloanserae*、*Neoaves* をわたって、鳥類では CYP2AB や CYP2AC といった哺乳類で全く研究がされていない分子種について複数の遺伝子が保存されていることを示した。さらに、ニワトリ肝臓での分子種別 mRNA 発現量比較から、鳥類の異物代謝では CYP2C45 が重要な分子種であり、CXR activator である PB により CYP2C23 遺伝子が強く誘導されることを示した。

第三章では、CYP2C23 遺伝子について、鳥類種系統を網羅するように選んだ複数の鳥類種から部分配列の取得を行い、その遺伝的な種差と発現量の種差を明らかにした。その結果、部分配列を元にした解析ではあるが、ニワトリなどの *Galloanserae* 種の CYP2C23 遺伝子が鳥類の 95% 以上を占める *Neoaves* 種とは異なる進化過程を経てきたことが推察された。このことから、*Galloanserae* 種を鳥類全体の代表種として毒性試験種とすることの妥当性に疑問が持たれた。

第四章では、野生鳥類種減少の一因になっているクマリン系抗血液凝固殺鼠剤 WF をモデル化合物として、鳥類種間の化学物質感受性の種差を *in vitro* 系で評価することに取り組んだ。その結果、ニワトリの WF 抵抗性は、CYP による高い代謝能と、WF の標的酵素である VKOR の WF 抵抗性という両面から説明されるものであった。また、実際に被害が多く報告される猛禽類では WF 代謝能が極めて低く、個体としての感受性を高める要因になっていることが推測された。本章では WF をモデル化合物として、鳥類種間で化学物質感受性の種差につながりうる「異物代謝能の大きな種差」があることを初めて実証した。さらに、WF のように CYP 依存性代謝により感受性が決定される化学物質については、肝臓ミクロソームのみを用いた *in vitro* アッセイでも感受性の種差を相対的に評価できる可能性が示された。

5.2. 鳥類の CYP 依存性異物代謝能と種差

5.2.1. ニワトリについて

ニワトリでは、CYP 含量が低いのが、一方で CYP2C45 などが高発現しており、それらに代謝されるものは高効率に代謝され、そうでないものはほとんど代謝を受けないという図式が浮かび上がった。ニワトリ CYP2C45 に関する構造解析はなされていないが、哺乳類では CYP2C タンパク質は一般に基質キャビティが広く、様々な化学物質を代謝することができる。ニワトリでも、CYP1A や 2D など基質が限定される分子種に比べ、CYP2C 分子種が高

発現していることで効率的な異物代謝が実現されてきたものと考えられる。今後、分子種間でのタンパク発現量比較や、様々な化学物質代謝における CYP2C45 の寄与を調べる必要がある。

5.2.2. *Neoaves* 種について

Neoaves 種の異物代謝能については、これまでほとんど研究が行われてこなかった。本研究では、複数の鳥類種について肝臓ミクロソーム中の CYP 含量や WF 代謝活性について検討を行った。その結果、野外サンプルであるため環境汚染物質等による誘導を受けている可能性が否定できないが、カラスのようにラットと同程度の CYP 含量を示す種があるのに対し、多くの鳥類種では CYP 含量はラットより低かった。この結果は、鳥類では一般に異物代謝能が低いことを示唆した。

WF 代謝においては、すべての鳥類で 4'-OH が主要な代謝産物になっており、このことから、種を越えて相同な分子種が異物代謝を担っていることが示唆された。一方で、代謝活性には種差が大きく、猛禽類では CYP 量当たりの代謝活性が低だけでなく、CYP 含量も低かった。異物代謝能の低さは、個体としての化学物質排泄が遅れる要因となるため、CYP 依存性代謝活性の低い種は化学物質ハイリスク種とみなされるべきである。特に、鳥類においては食性が進化に与えてきた影響が大きいものと考えられるため、今後は猛禽類などの植物非摂取種の異物代謝能について検討がなされるべきものと考えられる。

さらに、化学物質感受性は、代謝以降の排泄メカニズムによるところも大きい。今回ニワトリの WF 体内動態を試験した結果から、鳥類では哺乳類と違って体内残留期間が長くなるメカニズムが存在することが示唆された。これが WF やニワトリに限定されたものか、化学物質や種によらず鳥類の特徴であるのか、検証が必要である。

5.3. 今後の展望

本研究により、鳥類の CYP 遺伝子セットとその種差に関する基盤的知見が得られた。また、WF をモデル化合物として異物代謝能を指標とした化学物質感受性の種差を推定し、これが他の化学物質についても同様に毒性予測のアプローチとして用いることができる可能性を示した。化学物質による鳥類への被害を減らす上で毒性予測は重要であり、肝臓ミクロソームを用いた *in vitro* アッセイ系での毒性予測は野生鳥類種においては有用であると考えられる。

鳥類の化学物質感受性と種差の関係を研究する上で、CYP は多くの化学物質代謝に関与する重要な化学物質感受性決定要因である。さらに、CYP の種差について検討する上では、食性など進化の上で淘汰圧になってきた要素や鳥類の系統関係など、鳥類の進化史を考慮しなければならない。今回同定された鳥類固有と考えられる CYP 分子種や、ニワトリでの排泄の遅さなど、鳥類では化学物質感受性についてまだまだ未知の事項が多い。今後のさらなる研究発展が望まれる。

付録

A. CYP 1-3 genes of chicken

Definition in Genbank (Chicken, Build 3.1)	Accession number	Isoform	Ensembl genome browser
Gallus_gallus_cytochrome_P450_1A4_(CYP1A4)_mRNA.	NM_205147	1A4	
Gallus_gallus_cytochrome_P450_family_1_subfamily_A_polypeptide_1_(CYP1A1)_mRNA.	NM_205146	1A5	
PREDICTED:_Gallus_gallus_cytochrome_P450_family_1_subfamily_B_polypeptide_1_(CYP1B1)_mRNA.	XM_419515	1B1	
PREDICTED: Gallus gallus cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1), mRNA	NM_001233594.1	1C1	
Gallus_gallus_cytochrome_P450_2H1_(CYP2H1)_mRNA._NM_001001616	NM_001001616.1	2C23a	
Gallus_gallus_cytochrome_P450_family_2_subfamily_C_polypeptide_18_(CYP2C18)_mRNA.	NM_001001757	2C23b	
Gallus_gallus_cytochrome_P-450_2C45_(CYP2C45)_mRNA.	NM_001001752	2C45	
Gallus_gallus_cytochrome_P450_family_2_subfamily_D_polypeptide_6_(CYP2D6)_mRNA.	NM_001195557	2D49	
PREDICTED:_Gallus_gallus_cytochrome_P450_2J2-like_(LOC424729)_mRNA.	XM_422553	2J19	
PREDICTED:_Gallus_gallus_cytochrome_P450_family_2_subfamily_J_polypeptide_2_(CYP2J2)_mRNA.	XM_422511	2J20	ENSGALT00000017750
Gallus gallus mRNA for hypothetical protein clone 33b23	emb AJ721037.1	2J21	ENSGAL00000017750
Gallus_gallus_cytochrome_P450_2J2-like_(LOC424677)_mRNA.	XM_422510	2J22	
Gallus_gallus_cytochrome_P450_2J2-like_(LOC424676)_mRNA.	XM_422509	2J23	
PREDICTED: Gallus gallus cytochrome P450 family 2 subfamily R polypeptide 1 (CYP2R1) mRNA	XM_420996.3	2R1	
PREDICTED:_Gallus_gallus_cytochrome_P450_2U1-like_(LOC422528)_mRNA.	XM_420491	2U1	
PREDICTED:_Gallus_gallus_cytochrome_P450_family_2_subfamily_W_polypeptide_1_(CYP2W1)_mRNA.	XM_003642141	2W1	ENSGALP00000006227
PREDICTED:_Gallus_gallus_cytochrome_P450_family_2_subfamily_W_polypeptide_1_(CYP2W1)_mRNA.	XM_414762	2W2	ENSGALP00000006436
PREDICTED:_Gallus_gallus_cytochrome_P450_2J2-like_(LOC424944)_mRNA.	XM_422751	2AB1	ENSGALP00000013465
PREDICTED:_Gallus_gallus_cytochrome_P450_2J2-like_(LOC770119)_mRNA.	XM_001233444	2AB2	ENSGALP00000013290
PREDICTED:_Gallus_gallus_cytochrome_P450_2J6-like_(LOC424943)_mRNA.	XM_422750	2AB3	ENSGALP00000013284
PREDICTED:_Gallus_gallus_cytochrome_P450_2J6-like_(LOC429153)_mRNA.	XM_426708	2AB4	ENSGALP00000013145
PREDICTED:_Gallus_gallus_cytochrome_P450_2J6-like_(LOC429152)_mRNA.	XM_426707	2AB5	ENSGALP00000013083
PREDICTED:_Gallus_gallus_cytochrome_P450_2K1-like_(LOC422046)_mRNA.	XM_420052	2AC1	
PREDICTED:_Gallus_gallus_cytochrome_P450_family_2_subfamily_B_polypeptide_7_pseudogene_1_(CYP2B7P1)_mRNA.	XM_003641058	2AC2	
PREDICTED:_Gallus_gallus_cytochrome_P450_family_2_subfamily_A_polypeptide_13_(CYP2A13)_mRNA.	XM_425230	2AC7	ENSGALP00000006228
Gallus_gallus_cytochrome_P450_A_37_(CYP3A7)_mRNA._NM_001001751	NM_001001751.1	3A37	
PREDICTED:_Gallus_gallus_cytochrome_P450_family_3_subfamily_A_polypeptide_4_(CYP3A4)_mRNA.	XM_414782	3A80	

B. CYP 1-3 genes of zebra finch

Definition in Genbank (Zebra finch, Build 1.1)	Accession number	Isoform	Ensembl genome browser
Taeniopygia_guttata_chromosome_10_reference_assembly_(based_on_Taeniopygia_guttata-3.2.4)_whole_genome_shotgun_sequence	NC_011474	1A4	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_similar_to_cytochrome_P450_1A5_(LOC100230890)_mRNA.	XM_002195752	1A5	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_similar_to_cytochrome_P450_1B1_(LOC100230258)_mRNA.	XM_002191289	1B1	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_similar_to_cytochrome_P450_2H1_(LOC100224142)_mRNA.	XM_002198192	2C23	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_similar_to_cytochrome_P-450_2C45_(LOC100228872)_mRNA.	XM_002197658	2C45	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata similar to Cytochrome P450 2D14 (LOC100222415), partial mRNA	XM_002192485.1	2D49	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_hypothetical_protein_LOC100224220_(LOC100224220)_mRNA.	XM_002198481	2J40	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_similar_to_cytochrome_P450_2J2_(LOC100230439)_mRNA.	XM_002187970	2J19aP	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_similar_to_cytochrome_P450_2J2_(LOC100217987)_mRNA.	XM_002190498	2J19b	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_similar_to_cytochrome_P450_2J2_(LOC100224206)_mRNA.	XM_002194707	2J19cP	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_similar_to_cytochrome_P450_family_2_subfamily_R_polypeptide_1_(LOC100229624)_mRNA.	XM_002197639	2R1	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_hypothetical_protein_LOC100229295_(LOC100229295)_mRNA.	XM_002194701	2U1	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_similar_to_cytochrome_P450_family_2_subfamily_W_polypeptide_1_(LOC100224214)_mRNA.	XM_002191305	2W1	
		2AB1	ENSTGUP00000010335
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_hypothetical_protein_LOC100218227_(LOC100218227)_mRNA.	XM_002191599	2AB2	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_hypothetical_protein_LOC100221075_(LOC100221075)_mRNA.	XM_002191565	2AB3	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_hypothetical_protein_LOC100224002_(LOC100224002)_mRNA.	XM_002191540	2AB4	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_hypothetical_protein_LOC100226896_(LOC100226896)_mRNA.	XM_002191509	2AB5	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_hypothetical_protein_LOC100224630_(LOC100224630)_mRNA.	XM_002189914	2AC2	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_hypothetical_protein_LOC100221290_(LOC100221290)_mRNA.	XM_002191338	2AC7	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_similar_to_cytochrome_P450_family_2_subfamily_C_polypeptide_8_(LOC100219254)_mRNA.	XM_002195283	2AF1	ENSTGUG00000005088
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_similar_to_cytochrome_P450_A_37_(LOC100226034)_mRNA.	XM_002190672	3A37	
PREDICTED: Taeniopygia_guttata_similar_to_cytochrome_P450_3A80_(LOC100223162)_mRNA.	XM_002190700	3A80	

C. CYP 1-3 genes of turkey

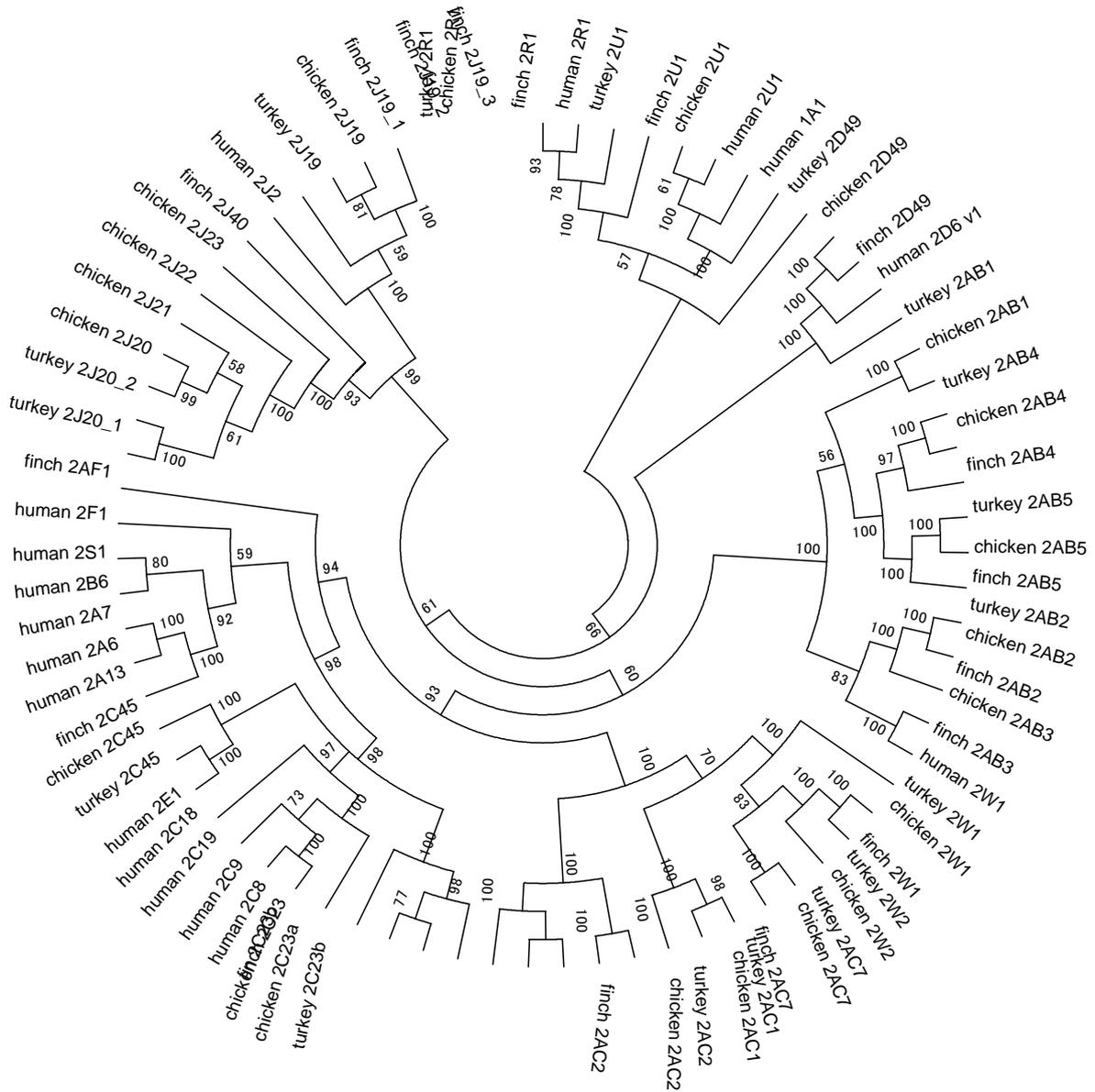
Definition in Genbank (Turkey, Build 1.1)	Accession number	Isoform	Ensembl genome browser
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_1A4-like_(LOC100542486)_mRNA.	XM_003209325	1A4	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_family_1_subfamily_A_polypeptide_5_(CYP1A5)_mRNA.	XM_003209324	1A5	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_1B1-like_(LOC100542888)_mRNA.	XM_003203963	1B1	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2H2-like_(LOC100545683)_mRNA.	XM_003207992	2C23	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2C29-like_(LOC100544448)_mRNA.	XM_003207984	2C45	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2D3-like_(LOC100548322)_mRNA.	XM_003202322	2D49	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2J2-like_transcript_variant_1_(LOC100547794)_mRNA.	XM_003208883	2J20v1	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2J2-like_transcript_variant_2_(LOC100547794)_mRNA.	XM_003208884	2J20v2	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2J2-like_(LOC100549121)_mRNA.	XM_003208892	2J19	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_vitamin_D_25-hydroxylase-like_(LOC100547524)_mRNA.	XM_003206243	2R1	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2U1-like_(LOC100543147)_mRNA.	XM_003205492	2U1	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2W1-like_(LOC100546874)_mRNA.	XM_003210555	2W1	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2W1-like_(LOC100547030)_mRNA.	XM_003210556	2W2	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2J2-like_(LOC100541927)_mRNA.	XM_003209165	2AB1	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2J2-like_(LOC100541770)_mRNA.	XM_003209164	2AB2	
		2AB3	ENSMGAT00000009610
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2J6-like_(LOC100541617)_mRNA.	XM_003209163	2AB4	ENSMGAT00000009605
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2J2-like_(LOC100541465)_mRNA.	XM_003209162	2AB5	ENSMGAT00000020369
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2K1-like_(LOC100548279)_mRNA.	XM_003204643	2AC1	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2K1-like_(LOC100548433)_mRNA.	XM_003204644	2AC2	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_2K1-like_(LOC100546724)_mRNA.	XM_003210554	2AC7	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_3A37_(CYP3A37)_mRNA.	XM_003210582	3A37	
PREDICTED: Meleagris_gallopavo_cytochrome_P450_3A80_(CYP3A80)_mRNA.	XM_003210584	3A80	

D. CYP 1-3 genes of human

Definition in Genbank (Human, Build 37.3)	Accession number	Isoform
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_1_subfamily_A_polypeptide_1_(CYP1A1)_mRNA	NM_000499	1A1
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_1_subfamily_A_polypeptide_2_(CYP1A2)_mRNA	NM_000761	1A2
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_1_subfamily_B_polypeptide_1_(CYP1B1)_mRNA	NM_000104	1B1
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_A_polypeptide_13_(CYP2A13)_mRNA	NM_000766	2A13
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_A_polypeptide_6_(CYP2A6)_mRNA	NM_000762	2A6
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_A_polypeptide_7_(CYP2A7)_transcript_variant_1_mRNA	NM_000764	2A7
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_B_polypeptide_6_(CYP2B6)_mRNA	NM_000767	2B6
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_C_polypeptide_8_(CYP2C8)_transcript_variant_1_mRNA	NM_000770	2C8
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_C_polypeptide_9_(CYP2C9)_mRNA	NM_000771	2C9
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_C_polypeptide_18_(CYP2C18)_transcript_variant_1_mRNA	NM_000772	2C18
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_C_polypeptide_19_(CYP2C19)_mRNA	NM_000769	2C19
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_D_polypeptide_6_(CYP2D6)_transcript_variant_1_mRNA	NM_000106	2D6
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_E_polypeptide_1_(CYP2E1)_mRNA	NM_000773	2E1
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_F_polypeptide_1_(CYP2F1)_mRNA	NM_000774	2F1
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_J_polypeptide_2_(CYP2J2)_mRNA	NM_000775	2J2
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_R_polypeptide_1_(CYP2R1)_mRNA	NM_024514	2R1
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_S_polypeptide_1_(CYP2S1)_mRNA	NM_030622	2S1
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_U_polypeptide_1_(CYP2U1)_mRNA	NM_183075	2U1
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_2_subfamily_W_polypeptide_1_(CYP2W1)_mRNA	NM_017781	2W1
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_3_subfamily_A_polypeptide_4_(CYP3A4)_mRNA_complete_cds	DQ924960	3A4
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_3_subfamily_A_polypeptide_43_(CYP3A43)_transcript_variant_1_mRNA	NM_022820	3A43
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_3_subfamily_A_polypeptide_5_(CYP3A5)_transcript_variant_1_mRNA	NM_000777	3A5
Homo_sapiens_cytochrome_P450_family_3_subfamily_A_polypeptide_7_(CYP3A7)_mRNA	NM_000765	3A7

E. Bootstrap majority-rule consensus tree by maximum likelihood method of CYP2 genes.

The evolutionary history was inferred using the Maximum Parsimony method. The bootstrap consensus tree inferred from 100 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The analysis involved 72 amino acid sequences. There were a total of 441 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5.



論文発表および学会発表

本研究は、以下の通りに学術誌に発表した。

Kensuke P. WATANABE, Aksorn SAENGTIENCHAI, Kazuyuki D. TANAKA, Yoshinori IKENAKAN, Mayumi ISHIZUKA (2010) Comparison of warfarin sensitivity between rat and bird species, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152, 1, 114-119.

Kensuke P. WATANABE, Yusuke K KAWAI, Yoshinori IKENAKA, Minami KAWATA, Shin-ichi IKUSHIRO, Toshiyuki SAKAKI, Mayumi ISHIZUKA (2013) Avian Cytochrome P450 (CYP) 1-3 Family Genes: Isoforms, Evolutionary Relationships, and mRNA Expression in Chicken Liver. *PLoS ONE* 8(9): e75689.

—謝辞—

本研究は、著者が北海道大学大学院獣医学研究科博士課程在学中に同大学獣医学研究科毒性学教室 石塚真由美教授の指導のもとに行ったものです。本研究を進めるにあたり、多くの方々にお世話になりました。ここに深く感謝の意を表します。

本研究を完成させるにあたり、指導教官である石塚真由美先生には学部、大学院と併せて6年間、格別なるご指導とご尽力を賜りました。私が実験、研究をする姿に歯がゆく感じるが多々あったものと思いますが、先生は安易に助言や指示をせず、暖かく見守ってくださいました。そのおかげで、私なりに研究の面白さを見つけながら本研究を進めることができました。先生のご指導のもとに過ごした研究生生活を心の糧として、次の新しい環境に飛び込んでいきたいと思っています。ここに深甚なる謝意を表します。

本論文の副査をしていただいた岩田久人先生（愛媛大学環境沿岸科学研究センター環境毒性学研究室、教授）、坪田敏男先生（北海道大学大学院獣医学研究科野生動物学教室、教授）、乙黒兼一先生（北海道大学大学院獣医学研究科薬理学教室、准教授）、池中良徳先生（北海道大学大学院獣医学研究科毒性学教室、准教授）には、本博士論文を完成する上で欠かすべからざる的確なご指導とご意見を頂きました。先生方に深く感謝いたします。

学外においては、榊利之先生（富山県立大学工学部生物工学科、教授）、生城真一先生（同大、准教授）には、学会でお世話になった他、実験に関するご指導とご支援を賜りました。また、山本秀明先生（札幌市円山動物園）には、貴重なサンプルを提供して頂きました。先生方のサンプル提供とご支援がなければ本研究を進めることはできませんでした。心より感謝いたします。

研究者としては、毒性学教室の前任教授である藤田正一先生の豪放磊落な生き様に多くの学びを頂きました。また、多田幸雄先生（東京大学創薬オープンイノベーションセンター、特任研究員）の創薬に懸ける情熱に感化され、諸橋憲一郎先生（九州大学大学院医学研究院、教授）には研究者としてのあるべき姿を教わりました。先生方のおかげで私の研究生生活は豊かなものになりました。篤く御礼申し上げます。

研究室では、先輩方や後輩、スタッフの方々に、研究、日常生活などあらゆる面で支えられました。共同研究をした川合佑典君、一瀬貴大さん、西山義広君、河田みなみさん、石井千尋さんに行った議論の中で、多くの学びと気づきをもらうことができました。中山翔太先生、田中和之さん、大野円実さんとは、実に長い年月を研究室で共に過ごさせていただきました。また、私が学部生だった時に博士課程を修了された酒井紀彰さんが研究や

後輩指導をする姿と人柄を思い出し、酒井さんのような大学院生になれるようにと過ごした大学院生活でした。ここには書ききれませんが、研究室の皆様に支えられて過ごした 4 年間でした。本当にありがとうございました。

研究活動費においては、日本学術振興会特別研究員奨励費 (DC1) からご支援を頂戴しました。深く感謝いたします。

博士課程を通して私を全面的に支えてくれた父 義文と母 厚子、そして、妻 由梨乃と長男 恭右に深く感謝いたします。

最後に、本研究は実験に供された動物たちの尊い命の上に成り立っています。本研究の遂行にあたり犠牲になった動物たちに感謝するとともに、心からご冥福をお祈り申し上げます。