HOKKAIDO UNIVERSITY

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［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	渡邉, 研右
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11288号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56311
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kensuke_Watanabe_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：渡邉　研右

学位論文題名

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

第一章　序論

鳥類における環境汚染の影響に関する研究が始まって 50 年余りが経つ。この間にも、DDT やワルファリンなどの農薬を初めとする化学物質により様々な鳥類種で被害が起こり、時には鳥類の生態系を脅かしてきた。現在でも鳥類における化学物質の影響評価や、その種差に関する予測は未だに正確になされていない。この原因の一つとして、毒性学的研究では *Galloanserae* に属するニワトリなど家禽種が用いられてきたことがある。鳥類は *Paleognathae-Neognathae* の 2 群に分類され、*Neognathae* はさらに *Galloanserae-Neoaves* に分類される。鳥類の 95%以上は *Neoaves* に属し、*Galloanserae* はわずか 500 種程度しか含まない。つまり、*Galloanserae* 種に関する毒性試験が中心的に行われてきており、実際に被害が生じる *Neoaves* 種に関してはほとんど知見が蓄積されていない。

そこで本研究では外来化学物質全般の代謝を担い、化学物質感受性決定要因として重要なシトクロム P450 (CYP)に着目した。哺乳類では CYP 1-3 ファミリー分子種が異物代謝を担っており、哺乳類種間での化学物質感受性の種差の原因になっていることが知られている。一方、鳥類でも CYP が化学物質感受性に影響し、種差をもたらしていることが予想されるが、鳥類の CYP に関しては知見が十分に蓄積されていない。

本研究では、鳥類の CYP による異物代謝機構とその種差を明らかにし、さらに、鳥類種間での化学物質感受性の種差について、異物代謝能という観点から *in vitro* で評価することが可能か検討することを目的とした。

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

鳥類の持つ CYP 1-3 遺伝子を網羅的に同定・分類し、さらに、ニワトリの異物代謝上重要と考えられる CYP 分子種の特定を目的として研究を行った。

ニワトリ (*Galloanserae*)、シチメンチョウ(*Galloanserae*)、キンカチョウ(*Neoaves*)という鳥類 3 種の公開ゲノム情報を用いて網羅的に CYP 1-3 遺伝子の同定と分類を

行った。その結果、鳥類も哺乳類の CYP 1-3 遺伝子とほぼ相同な遺伝子を持ち、サブファミリーレベルでの遺伝子欠損はなかったが、CYP2J や CYP2AB、CYP2AC など哺乳類でほとんど注目されてこなかった分子種が複数存在し、かつ、それらが鳥類種間で明確に保存されていることが明らかになった。哺乳類に比べ鳥類特有と考えられる CYP 分子種が存在することから、これらは鳥類特有の異物代謝・内因性代謝機能を担っていることが示唆された。

哺乳類ではタンパク質発現量の多い分子種ほど異物代謝への寄与が大きく、タンパク質発現量は mRNA と相関することが知られている。そこでニワトリの異物代謝上重要な分子種を同定するために、ニワトリ肝臓での mRNA 発現量を CYP 分子種間で比較した。その結果、ニワトリ肝臓では CYP2C45 が最も多く発現しており、CYP1A5、CYP2D49、CYP2C23a、CYP3A37 がこれに続いた。鳥類の異物受容体 CXR (Chicken xenobiotic receptor)の活性化剤であるフェノバルビタール投与により、CYP2C23b、CYP2C23a、CYP2C45 の順に強く転写誘導された。これらのことから、ニワトリの異物代謝においては CYP2C45 を始めとした CYP2C 分子種や CYP1A5、CYP2D49、CYP3A37 などが重要な分子種と考えられた。

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

本章では、ニワトリでフェノバルビタールにより最も強く誘導された CYP2C23 遺伝子について、鳥類系統を網羅する 8 種類の鳥類から遺伝子クローニングを行い、遺伝子とタンパク質発現量について種差の検討を行った。系統解析およびアミノ酸配列に基づくホモロジー解析により、鳥類 CYP2C23 遺伝子について、ニワトリ、アオミミキジなどの *Galloanserae* 種でのみアミノ酸欠失などの特徴が見られた。これらは *Galloanserae* 種の CYP2C23 遺伝子が特殊な淘汰圧の元で進化してきたことを示唆しており、*Galloanserae* 種で得られた知見を *Neoaves* 種に直接的に外挿することが難しいことを示唆した。

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

抗血液凝固系殺鼠剤ワルファリンは、ニワトリなどの家禽種ではほとんど致死性を示さないことが知られているが、一方で、野外ではワルファリンを始めとする抗血液凝固系殺鼠剤により猛禽類で二次的中毒事故が頻発し深刻な問題になっている。ワルファリン感受性決定要因として、ヒトでは、ワルファリンを代謝する CYP と、ワルファリンにより阻害を受けるビタミン K 還元酵素(VKOR)が重要であり、鳥類種間でもこれらの酵素に種差があり、個体レベルでの感受性種差の原因になっていることが予想された。

そこで、肝臓ミクロソームを用いて、CYP 依存性ワルファリン代謝活性と、ワルファリンによる VKOR 阻害について種間比較を行ったところ、感受性の低いニワトリではワルファリン代謝活性が高く(ラットの 5 倍程度)、VKOR もワルファリンによる阻害を受けにくい(K_i=11.3 μM)ことが明らかになった。一方、ダチョウ VKOR はラットと同程度に阻害を受けやすく(K_i=0.64 μM)、被害が多く報告されるフクロ

ウ目ではワルファリン代謝活性がニワトリの 2%程度しかないことが明らかになった。これらは、ニワトリで感受性が低い一方で、猛禽類など他の鳥類では被害が起こっている現状を説明する結果だった。また、今回の結果は鳥類種間で異物代謝能に大きな種差が存在し得ることを実証した。さらに、酵母で異種発現した CYP2C23s および CYP2C45 を用いた *in vitro* アッセイ系でも *in vivo* と同様のワルファリン代謝パターンが見られ、*in vitro* アッセイ系を利用した化学物質感受性の相対的評価が可能であることが示唆された。

第五章　結論

本研究により、鳥類の異物代謝 CYP の遺伝子構成とその種差に関する基盤的知見が得られた。特に、ニワトリで CYP2C45 が高発現していることはこれまでに報告されておらず、重要な知見である。また、CYP2C23 については、ニワトリなど毒性学上頻用される *Galloanserae* 種でのみ特殊な進化をしてきた可能性が示唆された。このことから正確な毒性予測のためには、大半の野生鳥類種が属する *Neoaves* に関する知見の蓄積が必要であると考えられた。

また、ワルファリンをモデル化合物として CYP 代謝を比較した場合、鳥類種間で異物代謝能に数十倍といった種差がありうることを実証した。代謝能の種差は個体としての化学物質感受性の種差の原因となりうる。野生鳥類種では *in vivo* アッセイが困難であることから、今回用いたような *in vitro* アッセイ系が鳥類種内での化学物質リスクの相対的評価に有用であると考えられた。