

論文内容の要旨

獣医学専攻

平成9年度博士課程入学

氏名： 江崙 英剛

指導教官名： 熊谷進

げっ歯類動物におけるグルタチオントランスフェラーゼによるアフラトキシン解毒の研究

穀物汚染カビにより産生されるアフラトキシン (AF) B1 は、強力な毒性及び発がん性を現すことが知られている。アフラトキシン B1 は体内では主に肝臓において代謝を受け、肝臓ミクロソームのシトクローム P-450 の働きにより AFM1、AFP1、AFQ1 等の比較的毒性の低い代謝産物が産生される。一方、アフラトキシン B1 エポキシドはこれらと同様に P-450 の働きにより生成されるが非常に反応性に富み、DNA やたんぱく質などの細胞内の高分子化合物に結合し、その結果毒性や発がん性を引き起こす。AFB1 エポキシドは肝臓サイトゾルに存在するグルタチオントランスフェラーゼ (GST) によりグルタチオン抱合体に変換され体外に排泄される。

AFB1 の毒性に対する感受性には、動物種差及び性差が存在することが知られており、ラットは感受性であるが、ハムスター及びマウスは耐性動物として知られている。ラットについては感受性に性差が認められており、雌は雄に比べ耐性である。また、これら動物種と同じげっ歯類動物であるマストミスについても、最近 AFB1 の毒性に対し著しく高い耐性を示すことが判明した。これまでの研究から、AFB1 に対する GST の活性と AFB1 毒性に対する感受性との間に相関が認められ、GST が AFB1 に対する感受性の動物種差を決定する要因として重要な役割を担っているものと考えられている。

本研究においては、マストミスを中心とするげっ歯類動物の肝臓とその他の臓器における AFB1 に対する GST の性質と意義を究明するために以下の研究を行った。

1. 肝臓ミクロソームとサイトゾルを用い、AFB1 のエポキシ化活性及び AFB1-エポキシドの GST 抱合活性等の代謝活性を調べ、マストミスと他げっ歯類動物 (ラット、ハムスター、マウス) 間の比較を行った。その結果、肝臓ミクロソームにおける AFB1 の AFM1 等への酸化的代謝活性及びエポキシ化活性の動物種差は AFB1 毒性感受性の動物種差と対応していなかったが、AFB1 に対する GST 活性の動物種差は AFB1 毒性感受性の動物種差と対応していた。即ち、耐性動物であるマストミス、ハムスター、マウスにおいては、ラットに比して、肝臓サイトゾルの AFB1 に対する感受性が高かった。一方、AFB1 エポキ

シ化活性については、マストミスとハムスターにおいて比較的高いこと、AFM1 等への酸化代謝活性については、ハムスターにおいて他動物種より高いことがそれぞれ認められた。これらの成績から、ハムスターやマウスにおいてと同様に、マストミスにおいてはエポキシ化によって活性化された AFB1 が GST により効率よく抱合化、排泄されることによって AFB1 の毒性に対して耐性を示すものと考えられた。

ラットにおいては GST 活性に性差が認められ、雌は雄よりも高い活性を示した。GST がホルモンによる発現調節を受けていることやエソキシキン等の薬剤の投与によりラット肝臓の GST が活性化されることが既に知られていることから、ラットの GST に及ぼすゼアラレノン、ゼラノール等のエストロゲン様物質と AFB1 の曝露の影響を検討した。その結果、雄ラットにおいてはこれら物質の曝露の影響は認められなかったが、雌ラットにおいては AFB1 を投与することにより GST 活性の上昇が認められ、とくに、新生時期にビスフェノール A またはゼアラレノンに曝露したラットに顕著な上昇が認められた。

2. AFB1 の毒性は主に肝臓において発現されるが、肝臓以外の臓器についても、肺にがんを、また腎臓においては腫瘍を形成することが知られている。小腸、脳及び精巣についても AFB1 の毒性の影響を受けること、またはその可能性が示唆されている。これら肝臓以外の臓器における AFB1 の特に GST による AFB1-エポキシドの抱合化活性を比較検討することを目的とし、1. で用いた動物種の肝臓以外の臓器について、ミクロソームのエポキシ化活性及びサイトゾルの GST 活性をそれぞれ調べた。その結果、ラット以外の動物種では肺において比較的高いエポキシ化活性が確認された。雌マストミスについては腎臓にも高いエポキシ化活性が認められたが、GST 活性も比較的高い活性を示したことから、GST による解毒が効率よく行われるものと考えられた。雄ハムスター及び雌雄ラットの腎臓には GST 活性が認められなかったことから、これらの動物種においては、AFB1 毒性の影響が比較的に強く発現するであろうと考えられた。全動物種において、小腸、脳、精巣のエポキシ化活性は低かった。小腸と精巣の GST 活性は比較的高かったことから、小腸と精巣においては AFB1-エポキシドの作用による毒性影響は小さいものと考えられた。また、マストミスは雌雄ともに小腸、腎臓、脳、肺において他動物種に比して高いエポキシ化活性を示したが、GST 活性についても高い活性を示した。マウスについても小腸以外の臓器において高い GST 活性が認められた。これらの動物種は肝臓同様に、それぞれの臓器においても GST による AFB1-エポキシドの抱合が効率よく行われるものと考えられた。

3. 1. ではマストミスが肝臓において AFB1 に対する高い GST 活性をもつことを明らかにした。AFB1 の毒性に対して感受性であるラットはエソキシキンなどの薬剤を投与することにより肝臓の GST 活性が上昇するが、これは GST の発現の誘導によることが判明している。一方、AFB1 に対して耐性動物であるマウスにおいては、この酵素が構成的に発現していることが知られている。このような酵素の量以外にも、活性の違いの理由としては質的な（比活性の）違いも考えられる。そこで、マストミスの肝臓 GST が他のげっ歯類動物と異質なものであるかどうかを調べる目的で、種々の基質を用いた GST 活性測定、他の齧

歯類動物種との GST 分子量比較、免疫反応、アミノ酸配列について他動物種との比較を行った。その際、マストミスと同様に高い肝臓 GST 活性を示したマウスを比較対照動物種として用いた。ラット、マウス、ハムスターにおいては α クラス GST が AFB1-エポキシドに対する高い抱合活性を示し、重要な働きをすることがこれまでの研究から分かっている。このことから、マストミスにおいても α クラス GST が高い活性を示すものと思われたが、このクラスの GST と高い反応性をもつ基質を用いて反応したところ、他動物種と同程度の活性しか示さなかった。また、全クラスの GST 活性及び μ クラス GST についても、他動物種と同程度の活性であったが、 π クラス GST については他動物種よりも高い活性を示した。次にマストミス肝臓 GST を精製し、SDS-PAGE に供したところ、3本のバンドが確認された。ゲル上での分子量は、マウス、ラットなどの既知の肝臓 GST と同程度の 24,000-26,000 であった。SDS-PAGE 上のたんぱくを、抗 α 、抗 μ 、抗 π ヒト GST を用いてウエスタンブロットで解析した結果、マウスについてはいずれの抗体との反応も認められなかったが、マストミスについては抗 α 、抗 μ 抗体との間に反応が認められた。ゲル上のバンドをそれぞれ切り出して N 末アミノ酸配列を解析した結果、一本のバンドについては既知の π タイプと一致する配列が見られ、残り二本のバンドについては μ タイプと一致する配列が認められた。後者のバンドについては抗原抗体反応において抗 α ヒト GST 抗体と反応したことから、微量の α クラス GST がバンド中に混在している可能性が考えられるが、もし、微量の α クラス GST がマストミスで見られる高い GST 活性を担っているとしたら、この α クラス GST は AFB1-エポキシドに対して、既知の GST よりも著しく高い活性を有していると考えられる。 μ クラスまたは π クラス GST が高い GST 抱合活性を担っているという可能性も考えられるが、これらのクラスが高い活性をもつという報告はこれまでに見られないことから、この場合には他の動物種の GST とは異質な GST をマストミスはもつものと考えられる。いずれの場合も、マストミスにおける AFB1-エポキシドに対する GST は、他の動物種のものとは異なる性質をもつものと推定される。

以上、本研究により、マストミスを中心としてげっ歯類動物の AFB1 に対する GST 活性とその他 AFB1 代謝産物について、また、マストミスの GST の特徴について新しい知見を得ることができた。即ち、AFB1 の毒性に対して耐性を示すマストミスは、他のげっ歯類動物に比して高い GST 活性を示すことが明らかにされた。また、肝臓について AFB1 毒性の影響を受けると考えられている肺及び腎臓も高い GST 活性を示すことが認められた。これらの臓器において、マストミスは AFB1-エポキシドを速やかに抱合、排除することにより、AFB1 の毒性に耐性を現わすものと考えられた。また、マストミスの肝臓 GST 中には他動物種と異なる性質を有する GST が存在し、これが AFB1-エポキシドに対する高い肝臓 GST 活性に寄与していることが示唆された。