

氏 名	か 鍛 じ 治 はる 晴 な 奈
学位(専攻分野)	博 士 (地球環境学)
学 位 記 番 号	地 環 博 第 23 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	地 球 環 境 学 舎 地 球 環 境 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	天然及び食品由来 AhR リガンドに関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 松 井 三 郎	教 授 杉 山 雅 人	助教授 松 田 知 成
--------	----------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、ダイオキシン類などに応答する核内受容体である AhR の天然由来及び食品由来リガンドに焦点を当て、それらの性質を明らかにすることでダイオキシン類の毒性リスク評価の一助となることを目的に遂行されたもので、7章から成る。

第1章は序論であり、本論文遂行に至る経緯と目的を示した。また、第2章は、研究背景として AhR の機能及び AhR を介した毒性発現系と本研究で対象とした天然由来、食品由来 AhR リガンドについて概観した。

第3章では、ヒトが食事などを通して摂取する天然由来及び食品由来の AhR リガンドが、AhR に対してダイオキシン類や多環芳香族炭化水素類 (PAHs) と競合的に作用しこれらの毒性に影響を及ぼすとの観点から、食品から摂取する AhR リガンド量やその生理活性について知見を得ることが重要であるとの考えの下に、飲料を対象に AhR リガンド活性の潜在量を検討及び強い活性を持つ物質の単離及び同定が試みられた。飲料のうちコーヒーに特に高い AhR リガンド活性を確認し、その物質が飲用で摂取する濃度で十分 AhR を活性化することを報告した。更に、コーヒーに存在するリガンド物質の単離精製を試みたところ、複数の AhR リガンド物質の存在を明らかにした。本章における成果からコーヒーに未知の強力な AhR リガンド物質が存在することをはじめて示した。

第4章では、高速液体クロマトグラフィー四重極タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) を用いて強力な天然由来 AhR リガンドであるインドール系化合物の高感度濃度分析系を樹立に成功した。今回樹立した同時分析系では、従来の分析系より100倍程度感度が高いため、分析試料作製のためのサンプル必要量が抑えられると期待できる。

第5章では、従来の知見から AhR リガンドがダイオキシン類と同様に AhR を活性化した後も代謝されず細胞に留まるもの、PAHs と同様に AhR を活性化した後、代謝を受け変異原性を獲得するもの、更に、速やかに代謝・排泄されるものの3種に大別することができるという考え方を提案し、「天然由来及び食品由来の AhR リガンドは AhR 活性化後速やかに代謝・排泄される物質群に属する」との仮説に基づいてインドール系化合物の代謝活性に関する検討を試みた。インディルビン, indolo[3,2-*b*]carbazole (ICZ) 及び FICZ をヒト CYPs と反応させ代謝させたところ、AhR 依存的に発現誘導される代謝酵素によって代謝され、リガンド活性を失うことを明らかにした。更に、これらインドール系化合物は DNA 損傷性を持たないことを確認し、以上から天然由来リガンドについて仮説を証明した。

第6章では、CYP1A1 発現プラスミドを酵母レポーター遺伝子アッセイ株 YCM3 に導入することで、ヒト AhR/Arnt ヘテロ二量体及びヒト CYP1A1 を同時に発現する新規酵母レポーター遺伝子アッセイ株, YCM3-P450 1A1 を樹立した。この株を用いて、既知 AhR リガンド及び未知リガンドを複数含む環境試料、食品試料について AhR リガンド活性の評価を行った結果、YCM3-P450 1A1 は速やかに代謝される物質のみに対して顕著なりガンド活性の低下を示すことができる株であった。以上から、YCM3-P450 1A1 と親株である YCM3 を同時に環境モニタリングに利用することで、サンプリング地点の AhR リガンド活性の強さ及びその毒性を二面的に評価できる有効なバイオアッセイ系となることを報告した。

最後に、第7章は結論であり、各章で示された主要な成果をまとめると共に、今後の課題についてまとめている。

論文審査の結果の要旨

ダイオキシン受容体はダイオキシン類、PCB類、多環芳香族類（PAHs）などの環境汚染物質による毒性発現に必須の受容体であり、この受容体の働きを解明することは、環境汚染物質の毒性メカニズムを知る上で重要である。

AhR リガンドとしては、ダイオキシン類や PAHs など環境汚染由来の物質のみならず天然および食品由来物質が存在する。天然由来物質とダイオキシン類や PAHs などの体内濃度バランスが毒性発現に何らかの影響を及ぼすことが予測されているが、その観点からの研究は不十分である。本論文は、天然および食品由来の AhR リガンドに関するモニタリング手法の開発を行い、微量汚染化学物質の効果的な毒性評価法を開発したものである。得られた成果は、次のとおりである。

- (1) 日常摂取する飲料のうちコーヒーに特に高い AhR リガンド活性を確認し、その物質が飲用で摂取する濃度で十分 AhR を活性化することを見出し、複数の AhR リガンド物質の存在をはじめて明らかにした。
- (2) 高速液体クロマトグラフィー四重極タンデム質量分析計（LC/MS/MS）を用いて強力な天然由来 AhR リガンドであるインドール系化合物の高感度濃度分析系を確立した。
- (3) AhR リガンドは、ダイオキシン類のように AhR 活性化後代謝されず細胞内に留まるもの、多くの PAHs のように AhR 活性化後、代謝を受け変異原性を獲得するもの、速やかに代謝・排泄されるものの3種に大別することができるという仮説を提案した。インディルビン、indolo[3,2-*b*]carbazole（ICZ）及び FICZ をヒト CYPs と反応させ代謝させたところ、AhR 依存的に発現誘導される代謝酵素によって代謝され、リガンド活性を失うことを明らかにした。さらに、これらインドール系化合物は DNA 損傷性を持たないことを確認し、天然由来や食品由来の AhR リガンドは AhR 活性化後速やかに代謝・排泄されるとの仮説を提示した。
- (4) CYP1A1 発現プラスミドを酵母レポータージーンアッセイ株 YCM3 に導入し、ヒト AhR/Arnt ヘテロ二量体及びヒト CYP1A1 を同時に発現する新規酵母レポータージーンアッセイ株、YCM3-P450 1A1 を樹立した。この株を用いて、既知 AhR リガンド及び未知リガンドを複数含む環境試料、食品試料について AhR リガンド活性の評価を行った結果、YCM3-P450 1A1 は速やかに代謝される物質のみに対して顕著なリガンド活性の低下を示すことができる株であった。以上から親株である YCM3 と同時に環境モニタリングに利用することで、サンプリング地点の AhR リガンド活性の強さ及びその毒性の継続性を二面的に評価できる有効なバイオアッセイ系となることを示した。

以上要するに、天然の新しい AhR リガンドを発見し、この受容体の真の役割解明に貢献するとともに、AhR リガンドの種類による毒性評価の簡便な方法を開発した。これらにより、本論文は地球環境学の発展に大きく貢献したことから博士（地球環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成19年1月18日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。