

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16134

研究課題名(和文) 異物代謝における魚類の脱臭素化能と尿素合成能の関係

研究課題名(英文) relationships between debromination and urea synthesizability on metabolism of xenobiotics by fish

研究代表者

水川 薫子 (MIZUKAWA, Kaoruko)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50636868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：魚類に優先的に起こるPBDEsの脱臭素化は甲状腺ホルモン活性化酵素である脱ヨウ素酵素によって起こるとされている。本研究では、PBDEs脱臭素化について魚類の異物代謝感受性を調べる上で重要な種差の要因を調べることを目的とした。PBDEsのうち、脱臭素化が最もされやすいと考えられているBDE99と高い脱臭素化能を持つアベハゼに着目し、様々な魚類筋中の蓄積状況と肝ミクロソームによる脱臭素化能の比較を行った。その結果、BDE99蓄積のない魚種の多くが脱臭素化能を持ち、一部例外は認められたものの両者の関係は概ね整合性が確認された。特に、アベハゼに限らずコイ科魚類全般にてBDE99の脱臭素化が認められた。

研究成果の概要(英文)：Debromination of PBDEs by fish has been considered that it would be caused by deiodinase which is the enzyme for activation of thyroid hormones. The aim of the study is to compare species specific debromination of PBDEs and reveal the factor. It is important knowledge for metabolic sensitivity of xenobiotics. BDE99 is the most debrominatable congener of PBDE. To compare accumulation of BDE99 in muscle tissues and debromination ability of BDE99 by hepatic microsome among many kinds of fishes, wild fishes were collected from Tama River and coastal area of Tokyo Bay, Japan. Some fishes had no BDE99 accumulation in their muscle tissues and had debromination ability of BDE99 by hepatic microsome. Especially the all 12 Cyprinidae indicated the relationships throughout the family. However there are no consistent relationships among 6 Gobidae. It is suggested that the difference of the debromination velocity of BDE99 among species are due to enzymatic structures of deiodinase.

研究分野：環境化学

キーワード：PBDEs 脱臭素化 魚類 異物代謝 甲状腺ホルモン 脱ヨウ素酵素

1. 研究開始当初の背景

異物代謝の一つに魚類に優先的に起こる脱臭素化という現象がある。脱臭素化は、難燃剤としてプラスチックや化学繊維に添加されてきた残留性有機汚染物質の一種であるポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)報告が散見されている。脱臭素化は甲状腺ホルモンを活性化させる脱ヨウ素酵素(DI)によって起こるとされているが、甲状腺ホルモンは脊椎動物等に普遍的に存在する物質であり、その活性化酵素である DI がなぜ魚類において優先的に脱臭素化を引き起こすのか、そしてなぜ魚種によって異なるかは不明である。種差のメカニズムを知ることは、異物代謝の感受性を知る上で重要なプロセスであると考えられる。そこで本研究は、PBDEsのうち脱臭素化をもっとも受けやすいと考えられる BDE99 と、高い脱臭素化能を持つハゼ科魚類のアベハゼに着目した。アベハゼはその生理的な特性として、高い尿素合成能を持つことが知られている。この生理機能が高い脱臭素化能との関係について、他の魚種と比較をすることでその特性を明らかにすることができると思われた。

2. 研究の目的

アベハゼ属およびその他の魚種における PBDEs 蓄積および脱臭素化能の比較を行うことにより、魚類における脱臭素化能の種差およびその要因を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料

2015年に東京都品川区京浜運河周辺でアベハゼおよびマハゼ、ドロメ、チチブを採取した。その他の魚類は、東京都を流れる多摩川上流から河口にかけての5地点および2地点の計7地点で採取した。25種37試料について筋肉組織を PBDEs 体内蓄積濃度の分析に用い、また17種43試料について肝臓組織を *in vitro* 脱臭素化実験に供した。また環境試料として石面付着物および魚類の餌となる水生生物についても分析を行った。

(2) 筋肉組織中 PBDEs 濃度の分析方法

筋肉組織はホモジナイズ後凍結乾燥を行い粉体化し、高速流体抽出装置を用いて有機溶媒にて抽出を行った。その後、5% H_2O 不活性化シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲル浸透クロマトグラフィー、活性化シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分画および精製を行い、定容後 GC-ITMS および GC-ECD にて同定・定量を行った。

(3) 脱臭素化実験方法

新鮮な肝臓組織にバッファーを加えて3段階の遠心分離を経て肝ミクロソーム画分を精製した。肝ミクロソーム画分中のタンパク質濃度を 1mg/mL に調整し、肝ミクロソーム

に対して BDE99 の標準物質をミクロソームあたり 15nM となるよう添加し、50rpm で振盪しながら 37°C の条件下で一定時間反応させた。反応液は液液抽出にて PBDEs を有機相に分配させ、固相抽出カートリッジ (Bond Elut SI) を用いて精製し、筋肉組織の試料と同様に GC-ITMS にて同定・定量を行った。

4. 研究成果

(1) 筋肉組織中 BDE99 の蓄積状況

筋肉組織の分析結果のうち、BDE99 および BDE 47 が脱臭素化した際の主要な同族異性体である BDE47 との相対組成を図 1 に示した。

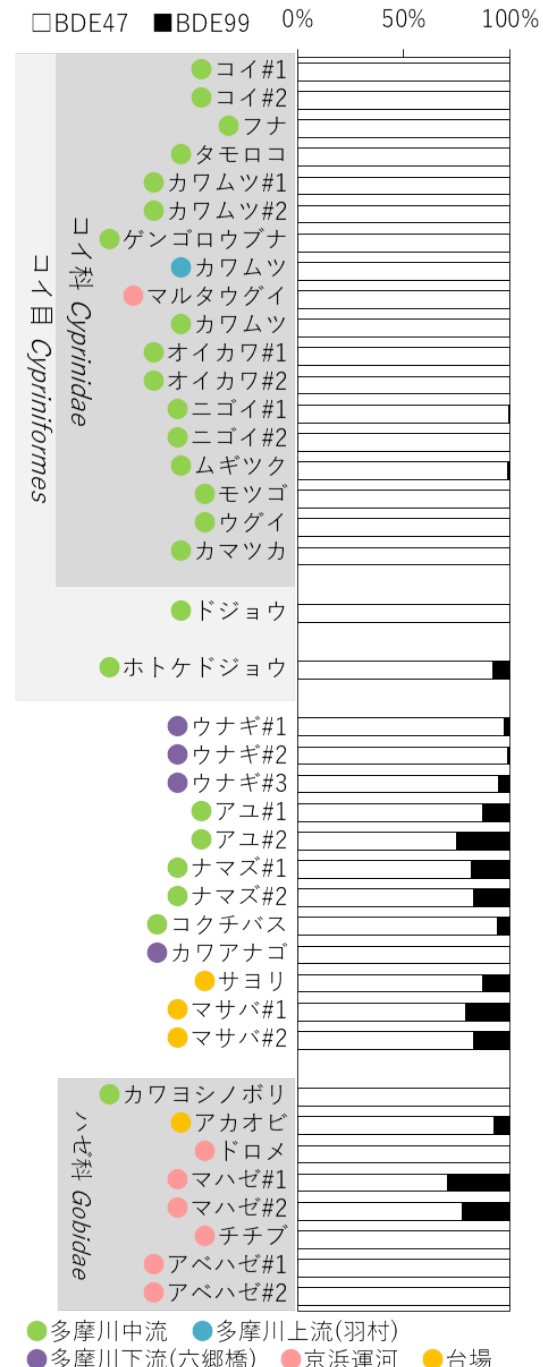


図 1 魚類筋組織中における BDE99 と BDE47 の相対組成 (アベハゼおよびマハゼのデータは Mizukawa et al. 2013 から引用)

ハゼ科のドロメおよびチチブからは BDE99 は検出されなかった一方で、アカオビシマハゼからは検出が認められた。既報にてアベハゼは BDE99 蓄積がなく、マハゼは BDE99 蓄積があることが明らかになっている。このことから、ハゼ科においては BDE99 蓄積状況は様でないことが明らかになった。一方、コイ目のコイ科およびドジョウ科の魚種においては BDE99 の蓄積がほとんどあるいは全く認められなかった。

(2) 肝ミクロソームを用いた脱臭素化実験
肝ミクロソームに BDE99 を添加し反応後、パラ位の臭素が脱臭素化した BDE47 の生成速度を魚種ごとに図 2 に示した。

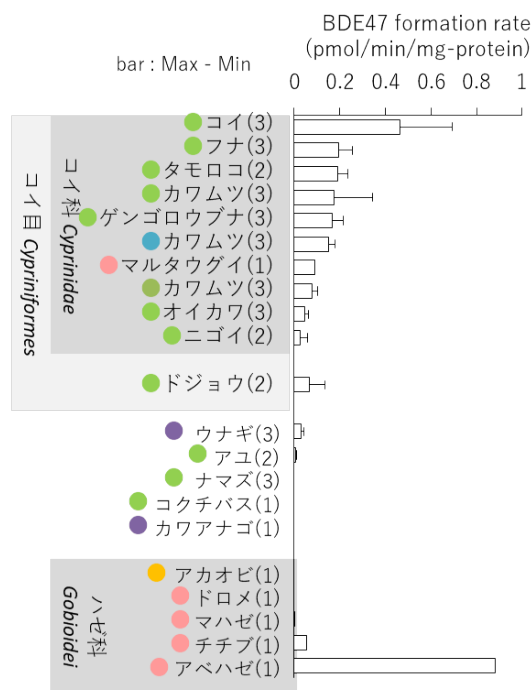


図 2 BDE99 脱臭素化による BDE47 生成速度 ()内はサンプル数、魚種名左の色は図 1 と同様の試料採取地点を示す。

本研究開始前よりアベハゼは高い脱臭素化能を持ち、マハゼは脱臭素化能が低いことが明らかになっていたが、ハゼ科のドロメ、チチブについて脱臭素化実験を行った結果、ドロメからは脱臭素化能が確認されなかったが、チチブにおいてアベハゼよりも低いものの脱臭素化能が確認された。このことから、脱臭素化能はアベハゼに特異的でないことが明らかになった。アベハゼの脱臭素化能が高いことは事実であったが、アベハゼに特異的な尿素合成能との関係性を調べるための飼育実験は実施しないこととした。

一方、コイ目コイ科・ドジョウ科に属する魚種において一様に BDE99 を BDE47 に脱臭素する能力の存在が確認された。またコイ目以外ではウナギおよびアユにおいて BDE99 の脱臭素化能が確認された。

そして脱臭素化能が確認された魚種間においても種間差および個体差があり、またカワムツのように同一種でも採取地によって脱臭素化能に差が見られた。脱臭素化能の確認されたコイ科とドジョウ科の魚種は体内での BDE99 の蓄積がほとんどなく、また脱臭素化能の確認されなかった魚種では体内での一定量の BDE99 蓄積が見られた。以上のことから、脱臭素化能の有無と体内における PBDEs 蓄積の有無には整合性が見られた。また、脱臭素化能がある場合でも、ウナギやアユの試料では BDE99 の体内蓄積が見られたことから、環境中での曝露量と脱臭素化速度のバランスによっては体内に取り込んだ BDE99 がすべて脱臭素化されず、体内に蓄積している場合もあることが示唆された。

さらに、ハゼ科魚類 3 種(アベハゼ、マハゼ、チチブ)およびコイ科魚類 2 種(コイ、ゲンゴロウブナ)、ウナギ(BDE99 蓄積あり、脱臭素化能あり)、ナマズ(BDE99 蓄積なし、脱臭素化能なし)について、基質濃度による代謝速度の変化を調べたものを図 3 に示す。

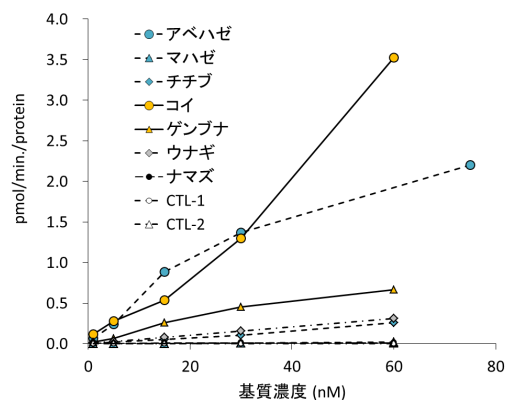


図 3 BDE99 脱臭素化における基質濃度変化に伴う BDE47 生成速度

この結果から脱臭素化が有意に確認できた魚種について、最大反応速度 V_{max} およびミカエリス定数 K_m を算出したものを表 1 に示した。

科名	魚種名	V_{max}	K_m
ハゼ科	アベハゼ	2.6	39
	チチブ	0.51	112
コイ科	コイ	3.5>	36>
	ゲンブナ	0.78	42
ウナギ科	ウナギ	0.12	10

ただし、コイにおける脱臭素化反応速度は本実験における基質濃度範囲では飽和にいたらなかったため、実測値から算出した暫定

値を示した。これらの結果から発現量および基質親和性の種差が示唆されたが、個体差も大きいことからより試料数を増やしていくことが今後の課題である。

こうした脱臭素化能の種差が生じる原因として、BDE99の脱臭素化反応を触媒すると考えられる脱ヨウ素化酵素の三次元的な構造の差異による基質との親和性が考えられた。そこで、NCBIのデータベースより脱ヨウ素酵素2型の塩基配列を調べたところ、脱ヨウ素酵素に特異的な配列である Deiodinase Insertion と呼ばれる領域はコイ科4種で同様であり、他の科の魚種30種とは異なっていた。コイ科の様な脱臭素化能がこの領域が関係していることが示唆された。一方、ハゼ科についてはデータベースに配列が登録されていなかったため、アベハゼについてRNAからcDNAを作成後、プライマーを設計し、脱ヨウ素酵素2型の配列をPCRにて増幅を試みたが、塩基配列の決定には至っていない。今後はこの配列の決定及び他の魚種との比較を行っていくことを検討していく必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

Kaoruko Mizukawa, Kazuya Yokota, Matthew Salanga, Jed Goldstone, John Stegeman, Hideshige Takada, PRIMO2017, 2017年7月, 松山”Species Specific Debromination Of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) And Structures Of Deiodinase”

横田和弥、水川薫子、高田秀重, 第26回環境化学討論会, 2017年6月, 静岡「淡水魚によるポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)脱臭素化能の種間比較」

Kaoruko Mizukawa, Kazuya Yokota, Matthew Salanga, Jed Goldstone, John Stegeman, Hideshige Takada, BFR2017, 2017年5月, York, UK ”Species specific debromination of PBDEs and relationships to deiodinase”

水川薫子, Matthew Salanga, Jed Goldstone, John Stegeman, 第25回環境化学討論会, 2016年6月, 新潟「ポリ臭素化ジフェニルエーテルの魚類による脱臭素化能と脱ヨウ素酵素の種差」

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

水川 薫子 (Kaoruoko Mizukawa)
東京農工大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号: 50636868

(2)研究分担者:なし

(3)連携研究者:なし

(4)研究協力者

高田 秀重 (Hideshige Takada) 東京農工大学
John J. Stegeman, Woods Hole Oceanographic Institution
Jed V. Goldstone, Woods Hole Oceanographic Institution
Matthew C. Salanga, Arizona University