

平成21年6月15日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580226
 研究課題名（和文） 前鰓類におけるレチノイドX受容体の機能解析：雄性生殖器の分化・成長との関係
 研究課題名（英文） Analysis of physiological functions of the retinoid X receptor in prosobranch gastropods
 研究代表者
 堀口 敏宏 (HORIGUCHI TOSHIHIRO)
 独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・主席研究員
 研究者番号：30260186

研究成果の概要：前鰓類における RXR の機能解析を雄性生殖器の分化・成長との関係に着目して実施した。フィールドでの定期採集により RXR 遺伝子発現と雄性生殖器の発達の季節変化を示し、室内実験により TBT 曝露に伴うペニス形成部位の形態変化と RXR 遺伝子発現の経時変化を示した。免疫染色により RXR が前鰓類に広く分布することを示した。筋肉注射試験の結果、9-cis レチノイン酸の効果にも種差は見られないと考えられた。生殖輸管の分化・形成機序を組織学的に解析した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：海洋生態毒性学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：前鰓類、インボセックス、レチノイドX受容体、雄性生殖器

1. 研究開始当初の背景

前鰓類におけるインボセックス（雌に対する雄性生殖器（ペニスと輸精管）の形成並びに発達）は、船底防汚塗料などとして世界各地で使用されてきた有機スズ化合物（トリブチルスズ(TBT)及びトリフェニルスズ(TPT)化合物）によって特異的に引き起こされる内分泌かく乱現象であることが知られている。また、有機スズの水中作用濃度がpptレベルのごく低濃度であること、年齢に関係なく有機スズ曝露に伴ってインボセックスが発症すること、インボセックス症状は不可逆的である

こと、重症の場合には陰門閉塞や卵巣の精巢化などに伴って産卵不能となること、などの特徴がある。有機スズ化合物という人工の化学物質による環境汚染の結果として生じるインボセックスは、世界中の前鰓類のうちの少なくとも150種以上で確認されており、各地でインボセックスが主因となって個体群の減少や消滅が観察されてきたことから、前鰓類の生態にきわめて重篤な影響を及ぼしてきたことが明らかである。

一方、ごく微量の有機スズによって雌が雄に性転換する現象とも考えられるインボセ

ックスは、生物学的にはきわめてユニークな現象とも受け止められてきた。有機スズ化合物が前鰓類にインボセックスを引き起こすメカニズムとして、これまでに 1)アロマトーゼ阻害説、2)アンドロゲン排出阻害説、3)脳神経節障害説、及び 4)APGWamide 関与説という 4つの仮説が提起されてきたが、研究代表者らによる追試の結果、これらはいずれも十分に再現されず、したがって支持されなかった。

そうした中で、研究代表者らは、核内受容体の一種であるレチノイドX受容体 (RXR) が前鰓類のインボセックスの発症に極めて重要な役割を演じていることを見出した (Nishikawa, J., Mamiya, S., Kanayama, T., Nishikawa, T., Shiraishi, F. & Horiguchi, T. *Environ. Sci. Technol.*, **38**: 6271–6276, 2004.)。この RXR 関与説 (Nishikawa *et al. Environ. Sci. Technol.*, **38**: 6271–6276, 2004.) は、前鰓類のインボセックスに学問的興味・関心を抱いてきた世界中の研究者の誰もが予想しなかったメカニズムであるとともに、インボセックスの誘導機構を巡る上記の4つの仮説の矛盾点を克服した内容であり、*in vitro* 実験と *in vivo* 実験の結果が整合する点できわめて有力な仮説である。研究代表者らは、RXR 関与説 (Nishikawa *et al. Environ. Sci. Technol.*, **38**: 6271–6276, 2004.) を発展させるため、本研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究では、RXR関与説 (Nishikawa *et al. Environ. Sci. Technol.*, **38**: 6271–6276, 2004.) をさらに発展させることを目的として、(1) 有機スズ汚染が軽微な海域 (対照地点) で採集されたイボニシ (アクキガイ科) における RXR遺伝子及びタンパク発現の経月変化、並びに生殖器、付属生殖器及び生殖巣の発達と退行に関する季節変化との関係、(2) TBT曝露に伴うペニス形成部位の形態観察及び遺伝子発現の経時観察、(3) ペニスの成長や退縮に関わる遺伝子の探索、(4) イボニシ以外の種におけるRXRの組織内分布の検討並びにイボニシとの比較、(5) 全生活環での飼育技術が確立されているバイにおける生殖輸管形成機序の観察、(6) ヨーロッパチヂミボラ (アクキガイ科) 及びヨーロッパアラムシロガイ (オリイレヨフバイ科) に対する9-*cis* レチノイン酸 (9CRA) の筋肉注射試験、をそれぞれ実施した。

3. 研究の方法

(1)有機スズ汚染が軽微な海域 (対照地点) で採集されたイボニシ (アクキガイ科) における RXR 遺伝子及びタンパク発現の経月変化、並びに生殖器、付属生殖器及び生殖巣の発達と退行に関する季節変化との関係

有機スズ汚染が比較的軽微な茨城・平磯で2006年4月～2007年3月まで毎月イボニシを採集し、雄のペニス長、精巣重量及び頭部神経節重量を測定し、相対ペニス長(RP)、精巣重量指数(GSI)、相対頭部神経節重量(RG)を算出して季節変動を調べた。また組織標本を作製し、HE染色及びRXR抗体を用いた免疫染色を施した。4個体分のペニス、精巣及び頭部神経節の各組織を composite sample として、それぞれ5検体(20個体分)についてRXR遺伝子発現量(RXR gene)を定量的RT-PCR法を用いて測定した。

(2) TBT曝露に伴うペニス形成部位の形態観察及び遺伝子発現の経時観察

TBT曝露に伴うイボニシのペニス形成部位の形態観察及び遺伝子発現の経時観察、及びイボニシにおけるペニスの成長や退縮に関わる遺伝子の探索を試みるため、佐渡産イボニシに対するTBTの筋肉注射試験を実施し、1,2及び4週間後に取り上げて処理した。

(3) ペニスの成長や退縮に関わる遺伝子の探索

(2)の標本に加えて、(1)で述べた茨城・平磯 (対照地点) においてペニスの伸長と退縮が著しい夏季に採集されたイボニシ試料を用いて、ディファレンシャル・ディスプレイ法による解析を行い、ペニスの成長及び退縮に関わると考えられる遺伝子の探索を行った。

(4) イボニシ以外の種におけるRXRの組織内分布の検討並びにイボニシとの比較

イボニシ以外の種(レイシガイ、ヨーロッパチヂミボラ、バイ及びヨーロッパアラムシロガイ)のペニス、精巣、卵巣、消化腺及び頭部神経節を常法で固定し、HE染色とRXR抗体による免疫染色を施して光学顕微鏡で検鏡した。

(5) 全生活環での飼育技術が確立されているバイにおける生殖輸管形成機序の観察

全生活環での飼育技術が確立されているバイにおける生殖輸管形成機序の観察を2007年級群について行った。すなわち、鳥取県水産試験場並びに(財)鳥取県栽培漁業協会のご好意・ご協力により、種苗生産されてい

るバイ稚貝について、孵化後、半年毎に標本の提供を受け、供試した。成長の追跡とともに性分化過程を病理組織学的に解析した。

(6) ヨーロッパチヂミボラ (アクキガイ科) 及びヨーロッパアラムシロガイ (オリイレヨフバイ科) に対する 9-*cis* レチノイン酸 (9CRA) の筋肉注射試験

ポルトガル・アベイロ大学との共同研究として、ヨーロッパ産前鰓類 2 種 (ヨーロッパチヂミボラ及びヨーロッパアラムシロガイ) を入手し、麻酔後、9CRA の筋肉注射試験を実施した。なお、陽性対照は TBT とした。

4. 研究成果

(1) 有機スズ汚染が軽微な海域 (対照地点) で採集されたイボニシ (アクキガイ科) における RXR 遺伝子及びタンパク発現の経月変化、並びに生殖器、付属生殖器官及び生殖巣の発達と退行に関する季節変化との関係

雄の RP は 4~7 月に増大したが、8 月に 3 分の 1 程度に急減し、9~10 月に回復して、以後、概ね横ばいに推移した。一方、GSI は 4~6 月まで増大したが、7 月から減少に転じて 9 月に最低水準となり、12~3 月に徐々に回復した。HE 染色した組織標本でも、ほぼ同様の組織の発達と退行が観察された。平磯のイボニシは 7~8 月に交尾・受精し、産卵すると考えられた。RG では明瞭な経月変化が観察されなかった。一方、ペニスの RXR gene は 4~8 月に上昇し、9 月に横ばいとなり、10 月に再上昇して、以後、3 月まで漸減した。精巣及び頭部神経節の RXR gene はペニスにおけるその 1/10~1/5 程度であり、経月変化は不明瞭であった。

(2) TBT 曝露に伴うペニス形成部位の形態観察及び遺伝子発現の経時観察

佐渡産イボニシに対する TBT の筋肉注射試験後、1, 2 及び 4 週間毎に取り上げて、TBT 曝露に伴うイボニシのペニス形成部位の形態観察及び遺伝子発現の経時観察を行った。雌では右触覚後部のペニス形成部位から陰門に至る部位を 4 分割、雄ではペニスから摂護腺に至る同部位を 4 分割して採材し、ペニス及び輸精管の分化・成長過程における RXR 遺伝子発現の経時変化を追跡し、解析した。イボニシにおけるペニスの成長や退縮に関わる遺伝子の探索も試みた。

(3) ペニスの成長や退縮に関わる遺伝子の探索

(2) の標本に加えて、(1) で述べた茨城・平磯 (対照地点) においてペニスの伸長と退縮が著しい夏季に採集されたイボニシ試料を用いて、ディファレンシャル・ディスプレイ法により RXR 以外の他の核内受容体、RXR 標的遺伝子、下流に存在すると見られるペニス成長因子などに関する解析を行った結果、いくつかの遺伝子断片が得られた。解析をさらに進め、いくつかの遺伝子が見出された場合、ジーンバンク登録遺伝子との照合を試みる。

(4) イボニシ以外の種における RXR の組織内分布の検討並びにイボニシとの比較

イボニシ以外の種 (レイシガイ、ヨーロッパチヂミボラ、バイ及びヨーロッパアラムシロガイ) のペニス、精巣、卵巣、消化腺及び頭部神経節に HE 染色と RXR 抗体による免疫染色を施し検鏡した結果、程度の差はあったが、いずれの種もイボニシと同様に RXR 抗体で染色された。RXR は前鰓類の種に広く分布し、共通の機能を有していると考えられた。今後、輸精管の形成機序との関係や種差などについてさらに検討を進める必要がある。

(5) 全生活環での飼育技術が確立されているバイにおける生殖輸管形成機序の観察

鳥取県水産試験場並びに (財) 鳥取県栽培漁業協会のご好意・ご協力により提供されたバイ種苗の 2007 年級群を、孵化後、半年毎に継続して採材し、成長の追跡と性分化過程の解析を進めた結果、イボニシと異なり、生後 2 年程度まで生殖腺並びに輸管系の発達が不明瞭であることがわかった。すなわち、バイでは生殖器官の分化がかなり遅いことが明らかとなった。

(6) ヨーロッパチヂミボラ (アクキガイ科) 及びヨーロッパアラムシロガイ (オリイレヨフバイ科) に対する 9-*cis* レチノイン酸 (9CRA) の筋肉注射試験

ポルトガル・アベイロ大学との共同研究として、ヨーロッパ産前鰓類 2 種 (ヨーロッパチヂミボラ及びヨーロッパアラムシロガイ) に対する 9CRA の効果を筋肉注射試験により検討した結果、両種ともに陽性と見られる結果を得た。今後、試験結果の再現性ととともに 9CRA の用量依存性などを再確認する必要がある。

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 6 件)

- ① Horiguchi, T., Ohta, Y., Nishikawa, T., Shiraishi, F., Shiraishi, H., Morita, M. (2008) Exposure to 9-*cis* retinoic acid induces penis and vas deferens development in the female rock shell, *Thais clavigera*. Cell Biol. Toxicol., 24: 553-562.
- ② Rhee, J.S., Raisuddin, S., Hwang, D.S., Horiguchi, T., Cho, H.S., Lee, J.S. (2008) A Mu-class glutathione S-transferase (GSTM) from the rock shell *Thais clavigera*. Comp. Biochem. Physiol., Part C, 148: 195-203.
- ③ 堀口敏宏 (2008) 有機スズによる巻貝類のインポセックス誘導メカニズム レチノイドX受容体関与説の提唱. 化学と生物, 46: 370-373.
- ④ Horiguchi, T., Nishikawa, T., Ohta, Y., Shiraishi, H., Morita, M. (2007) Retinoid X receptor gene expression and protein content in tissues of the rock shell *Thais clavigera*. Aquatic Toxicology, 84: 379-388.
- ⑤ Iguchi, T., Katsu, Y., Horiguchi, T., Watanabe, H., Blumberg, B., Ohta, Y. (2007) Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of imposex in gastropods and adipogenesis in vertebrates. Molecular and Cell Toxicology, 3:1-10.
- ⑥ 堀口敏宏 (2007) 腹足類の内分泌系とインポセックスの発症機構. Biomedical Research on Trace Elements, 18: 231-240.

[学会発表] (計 15 件)

- ① Cho, H.S., Park, J.C., Choi, M.K., Choi, H.G., Horiguchi, T.: Annual trend of imposex and organotins content in the Rock shell, *Thais clavigera* from the coast of Korea, 環境ホルモン学会第 11 回研究発表会, 東京, 同講演要旨集, p.164, 2008.
- ② 堀口敏宏: 海産腹足類と有機スズ化合物: 生殖生理と内分泌攪乱の作用機序, 日本比較免疫学会第 20 回学術集会講演要旨, 東京, p.29, 2008.
- ③ 堀口敏宏・Sousa, A.・太田康彦・趙顯書・Barroso, C.M.・白石寛明: 本邦産及び欧州産腹足類 (アクキガイ科、エゾバイ科及びオリイレヨフバイ科) 数種に対する RXR 抗体の免疫組織化学染色, 環境ホルモン学会第 10 回研究発表会, 埼玉, 同講演要旨集, p.129, 2007.
- ④ 堀口敏宏・西川智浩・太田康彦・白石寛明: 茨城・平磯におけるイボニシの RXR 遺伝子発現及び性成熟関連形質の経月変

化, 環境ホルモン学会第 10 回研究発表会, 埼玉, 同講演要旨集, p.70, 2007.

- ⑤ Horiguchi, T., Cho, H.S., Imai, T., Hamada, F., Ohta, Y., Iguchi, T., Morishita, F., Matsushima, O., Nagao, T., Nishikawa, J., Shiraishi, F., Shimizu, M., Yamazaki, S., Morita, M., Shiraishi, H.: Endocrine disruption caused by organotins in gastropods: from a molecular mechanism to population-level effects, Physical and Chemical Impacts on Marine Organisms -Seeking Sustainability and Postgenomics-, Nagoya(Japan), pp.13-14, November 2008.
- ⑦ Horiguchi, T.: Endocrine disruption caused by organotin compounds in gastropod molluscs: from a molecular mechanism to population-level effects, Gaps in Pollution Sciences, Copenhagen (Denmark), Abstract Book, p.13, November 2008.
- ⑦ Horiguchi, T.: Endocrine disruption caused by organotin compounds in gastropod molluscs: from a molecular mechanism to population-level effects, 1st International Conference on Environmental Health Science, Seoul (Korea), p.52, October 2008.
- ⑧ Horiguchi, T., Shiraishi, H., Ohta, Y., Shiraishi, F., Cho, H.S., Morita, M.: Induction mechanism of imposex caused by organotin compounds in gastropods: evidence concludes involvement of the retinoid X receptor, 5th World Fisheries Congress, Yokohama (Japan), Program and Abstracts, p.442, October 2008.
- ⑨ Horiguchi, T., Colville, A., Hamilton, L., Shiraishi, F., Nakajima, D., Kamata, R., Lim, R., Shiraishi, H.: Imposex and organotin concentrations in *Thais orbita* and *Morula marginalba* around Sydney, Australia, 5th SETAC World Congress, Sydney (Australia), August 2008.
- ⑩ Horiguchi, T., Sousa, A., Ohta, Y., Cho, H.S., Miguez, C., Shiraishi, H.: Localization of RXR in penis and other tissues of several gastropod species (Muricidae, Buccinidae and Nassariidae) from Japan and Portugal, SETAC Europe 18th Annual Meeting, Warsaw (Poland), p.150, May 2008.
- ⑪ Horiguchi, T., Nishikawa, T., Ohta, Y., Shiraishi, H.: Monthly changes of RXR gene expression and sexual characteristics in male rock shells (*Thais clavigera*) in Hiraiso, Japan, SETAC Europe 18th Annual Meeting, Warsaw (Poland), p.150, May 2008.

- ⑫ Horiguchi, T.: Endocrine disruption caused by organotin compounds in gastropod molluscs: from a molecular mechanism to population-level effects, International Symposium on the Environmental Risks of Chemicals, Saitama (Japan), p.32-33, December 2007.
- ⑬ Horiguchi, T., Shiraishi, H., Nishikawa, T., Ohta, Y., Shiraishi, F., Cho, H., Nishikawa, J., Morita, M.: Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotin compounds in female gastropods, DIOXIN 2007 International Symposium, Tokyo, p135, September 2007.
- ⑭ Cho, H.S., Lee, J.H., Cho, C.R., Choi, H.G., Choi, M.G., Horiguchi, T.: Long term trends of imposex in the rock shell, *Thais clavigera* and organotin pollutions in the coast of Korea, SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Europe 17th Annual Meeting, Porto (Portugal), p.224, May 2007.
- ⑮ Horiguchi, T., Shiraishi, H., Nishikawa, T., Ohta, Y., Shiraishi, F., Cho, H.S., Nishikawa, J., Morita, M.: Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in female gastropods, SETAC(Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Europe 17th Annual Meeting, Porto (Portugal), p.31, May 2007.

[図書] (計 4 件)

- ① Horiguchi, T.: Chapter 7, Mechanism of imposex induced by organotins in gastropods. Ecotoxicology of Antifouling Biocides (Arai T et al. eds., Springer, Tokyo, Japan, 437p.), pp.111-124, 2009.
- ② Horiguchi, T.: Chapter 8, The endocrine-disrupting effect of organotin compounds for aquatic organisms. Ecotoxicology of Antifouling Biocides (Arai T et al. eds., Springer, Tokyo, Japan, 437p.), pp.125-146, 2009.
- ③ 堀口敏宏: 2・2・1 巻貝のインポセックス発生状況から見た汚染実態の変遷およびアワビ類における有機スズの影響. 有機スズと環境科学-進展する研究の成果-(山田 久編, 恒星社厚生閣, 314p.), pp.112-139, 2007.
- ④ 堀口敏宏: 3・1・3 巻貝類のインポセックス発症機構. 有機スズと環境科学-進展する研究の成果-(山田 久編, 恒星社厚生閣,

314p.), pp.210-217, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀口 敏宏 (HORIGUCHI TOSHIHIRO)
独立行政法人国立環境研究所・環境リスク
研究センター・主席研究員
研究者番号：30260186

(2) 研究分担者

白石 寛明 (SHIRAIISHI HIROAKI)
独立行政法人国立環境研究所・環境リスク
研究センター・センター長
研究者番号：10124348
太田 康彦 (OTA YASUHIKO)
国立大学法人鳥取大学・農学部・教授
研究者番号：60069078

(3) 連携研究者

該当なし