

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2010

課題番号：20580221

研究課題名(和文)

魚類の低分子結合性タンパク質ーリポカリンの大量発現と静菌活性に関する研究

研究課題名(英文)

A study on fish lipocalin protein which bind to low molecular lipophilic compound

研究代表者

大嶋 雄治 (YUJI OSHIMA)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：70176874

研究成果の概要(和文)：

トリブチルスズ(TBT)が魚類の血液に高濃度で蓄積する原因物質である TBT 結合タンパク質(TBT-bps; TBT-bp1 及び 2)をヒラメ(*Paralichthys olivaceus*)より発見した。本研究では、TBT-bp1 および-bp2 組換え体(rTBT-bp1, 2)をカイコ血中に発現させ大量精製した。得られた TBT-bp2 にリポカリン蛍光プローブ(DAUDA)と TBT-bp2 を結合させた後 TBT を滴下した結果、蛍光強度が34%まで減少したことから TBT に対する rTBT-bp2 の結合能が証明された。しかし、脂肪酸類は rTBT-bp2 に対する結合は認められなかった。また魚病細菌 *Edwardsiella tarda* の増殖阻害を検討し、静菌活性が予見される結果を得た。

研究成果の概要(英文)：

Tributyltin (TBT) is well-known as a strong endocrine disruptor and has been detected at high concentrations in the blood of fishes living in coastal areas. In our previous studies, we identified TBT-binding proteins (TBT-bp1 and 2) bound to TBT in the blood of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and determined that TBT-bps were have a function that would bind to TBT and then be excreted into the mucus. TBT-bps are a member of the lipocalin family of proteins which bind to small hydrophobic molecules. In this study, we expressed a recombinant TBT-bp1 and -bp2 (rTBT-bp1, 2) in a baculovirus expression system and purified the protein from the hemolymph of silkworm larvae injected with recombinant baculovirus. From the results of binding assay of rTBT-bp 2 to some chemicals, TBT-bp2 show affinity to TBT but not to lauric acid, palmitic acid and tearic acid. Furthermore, rTBT-bp1 may inhibit the growth of fish diseases bacteria *Edwardsiella tarda*, suggesting bacteriostasis activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：静菌、生体防御、低分子結合性、リポカリン

1. 研究開始当初の背景

申請者は、内分泌かく乱物質であるトリブチルスズ (TBT) と結合する新奇タンパク質 TBTbps をヒラメ血清より発見した (Shimasaki, 2002; Oba, 2007)。TBTbps は主に肝臓で産生され、血液中では総タンパク質の約 1% を占め、腸管内膜、腎臓、卵に局在している。また、体表粘液に存在していることから、特に生体防御に対して重要な役割を持つと予想された。ヒラメ TBTbps は TBT との結合性、アミノ酸配列、モチーフ配列、エクソン-イントロン構造、予想 2 次および 3 次構造から、疎水性低分子と結合し輸送する性質を持つリポカリンタンパク質だと推定された (Shimasaki, 2002; Oba, 2007)。また Ortholog 解析からリポカリンは魚類に広く存在すると予想された。遺伝子構造解析の結果、フグ毒結合タンパク質をコードする遺伝子は TBTbps 遺伝子が直列に 2 回繰り返した構造であり、両者ともリポカリンに属すると示唆された。リポカリンの異物結合性の広さを示した。

2. 研究の目的

Tributyltin(TBT)は船底防汚剤として 1960 年代から大量に使用されたが、水生生物に対する強い毒性と巻貝メスのオス化等の内分泌かく乱作用を持つことから、2001 年より国際的に使用が禁止された。しかしながら、TBT は今なお水環境中から検出され続けており、特に魚類では血中に高濃度で蓄積している。Shimasaki ら(2002)は、ヒラメ血中より TBT と結合し蓄積させるタンパク質(TBT-bps)を発見・同定した。本タンパク質は、リポカリンスーパーファミリーに属し、主に疎水性低分子と結合し運搬する機能を持つと推定されている。ヒト涙液中のリポカリンでは脂肪

酸と結合することが報告されている (Oktay ら、1999)が、TBT-bps の生体内リガンドは明らかでない。そこで、本研究では、カイコを用いた発現系を用いて TBT-bp2 組換え体 (rTBT-bp2)を分取精製し、TBT と脂肪酸類への結合性を検討した。

また、ヒト好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリンは、炎症時に活性化した好中球から分泌され静菌活性を示すことが報告されている。本タンパク質は、細菌が増殖に必要な鉄を取り込むために分泌するシデロフォアと結合して、鉄吸収を阻害することで細菌の増殖を抑えると考えられている。そこで、TBT-bps の機能解析を目的として、TBT-bp1 遺伝子組換え体を、カイコガで発現させて分取精製し、魚病細菌に対する TBT-bp1 の静菌活性を検討した。

3. 研究の方法

(1) TBT-bp1 および TBT-bp2 組換え体 (rTBT-bp1, 2)を大量に得るために、まず、ヒラメ TBT-bp1 および-bp 2 遺伝子を転移したバキュロウイルスプラスミドを作成し、培養細胞でバキュロウイルスを増殖させた。増殖したバキュロウイルスを回収し、カイコの 5 齢幼虫に感染させ、カイコの体液中で TBT-bp1 および-bp2 を大量発現させた。感染 4 日後に体液を回収し、アフィニティークロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。

(2) 魚病細菌として *Edwardsiella tarda* を 10%, 50%トリプトソイブイオン培地 (M9 最小培地希釈) 10 ml に 10 μ l 植菌し、一晩前培養を行った。本前培養液 100 μ l、および rTBT-bp1(90 μ g/ml in 50 mM phosphate buffer pH 7.0, 300 mM NaCl)溶液 400 μ l を 48 穴プレートに加えて 25°Cで、0, 12, 24, 36, 48, 60, 72

時間後に 600 nm の吸光度を計測し、*E. tarda* の増殖を調べた。

(3) 得られた TBT-bp2 (4 mM in 50 mM リン酸ナトリウム、300 mM NaCl) 500 mL に蛍光プローブ 500 mM (11-(5-(dimethylamino)-1-naphthalene-sulfonylamino) undecanoic acid (DAUDA)) in ethanol を $1 \mu\text{l}$ ずつ加え、蛍光強度(励起 345 nm、蛍光 490 nm)を測定し DAUDA との結合を調べた。さらに、4 mM TBT-bp2 に DAUDA(3 mM)を結合させた後、競合基質(500 mM TBT、lauric acid、palmitic acid、stearic acid in ethanol)を終濃度 3 mM となるまで滴下し、蛍光強度の変化を調べた。

4. 研究成果

- (1) カイコガより rTBT-bp1 および-bp2 を大量に分取精製することに成功した。
- (2) 得られた rTBT-bp1 を用いて、*E. tarda* の増殖に及ぼす影響を調べた結果、10%トリプトソイヨン区で吸光値がコントロールの 68%と有意に低下しその増殖が阻害されていた。よって TBT-bp1 が静菌活性を持つ可能性があることが示唆された。

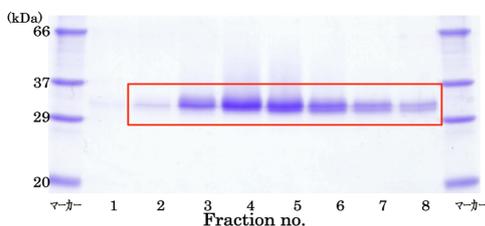


図 1 精製された rTBT-bp2 の SDS-PAGE

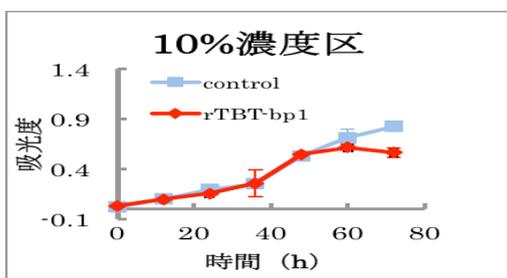


図 2-1 TBT-bp1 が *E. tarda* の増殖 (吸光度) に及ぼす影響. 培地: 10%トリプトソイヨン

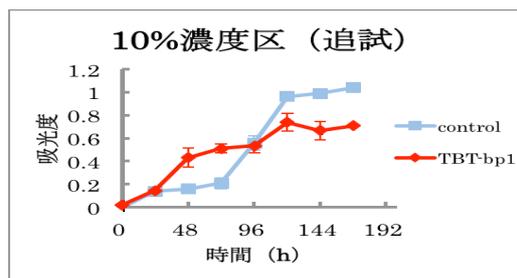


図 2-2 TBT-bp1 が *E. tarda* の増殖 (吸光度) に及ぼす影響. 培地: 10%トリプトソイヨン

- (3) カイコ体内より単離・精製した rTBTbp2 に DAUDA を添加した結果、DAUDA の濃度上昇とともに蛍光強度が増加した。よって rTBT-bp2 に DAUDA が結合することが確認された。また DAUDA を結合させた rTBT-bp2 に TBT を滴下した結果、蛍光強度が 34%まで減少したことから TBT に対する rTBT-bp2 の結合能が証明された。しかし同様に脂肪酸類を滴下したが、蛍光強度の減少は認められず、脂肪酸類は rTBT-bp2 に対して DAUDA より結合性は弱いと考えられた。

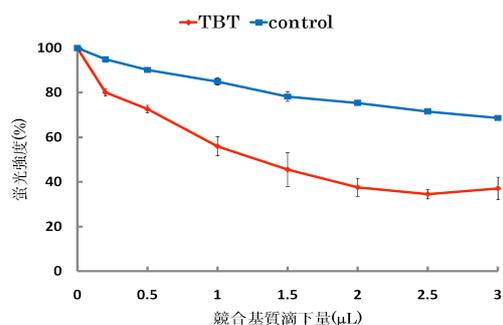


図 3 DAUDA に対する TBT-bp2 の TBT との競合結合試験

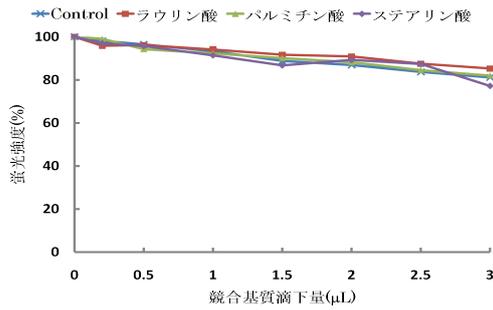


図4 脂肪酸に対する TBT-bp2 の結合試験

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Satone H, Oshima Y, Shimasaki Y, Tawaratsumida T, Oba Y, Takahashi E, Kitano T, Kawabata S, Kakuta Y, Honjo T. 2008. Tributyltin-binding protein type 1 has a distinctive lipocalin-like structure and is involved in the excretion of tributyltin in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquat Toxicol* 90: 292-299.
- ② Oba Y, Yamauchi A, Hashiguchi Y, Satone H, Miki S, Nassef M, Shimasaki Y, Kitano T, Nakao M, Kawabata S, Honjo T, Oshima Y. 2011. Purification and characterization of tributyltin-binding protein of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *Comp Biol phys C*. 153:17-23.
- ③ Satone H, Lee JM, Oba Y, Kusakabe T, Akahoshi E, Miki S, Suzuki N, Sasayama Y, Nassef M, Shimasaki Y, Kawabata S, Honjo T, Oshima Y. 2011. Tributyltin-binding protein type 1, a lipocalin, prevents inhibition of osteoblastic activity by tributyltin in fish scales. *Aquat Toxicol* 103:79-84.
- ④ Nassef M, Tawaratsumida T, Oba Y, Satone H, Nakayama K, Shimasaki Y, Honjo T,

Oshima Y. Induction of tributyltin-binding protein type 2 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, by exposure to tributyltin-d27. *Mar Poll Bull* 62:412-414.

- ⑤ Nassef M, Kato-Unoki Y, Furuta T, Nakayama K, Satone H, Shimasaki Y, Honjo T, Oshima Y. 2011. Molecular Cloning, Sequencing, and Gene Expression Analysis of Tributyltin-Binding Protein Type 1 in Japanese Medaka Fish, *Oryzias latipes*. *Zoological Science* 28:281-285.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Satone H, Lee JM, Oba Y, Kusakabe T, Akahoshi E, Miki S, Suzuki N, Sasayama Y, Nassef M, Shimasaki Y, Kawabata S, Honjo T, Oshima Y Tributyltin-binding protein type 1, a lipocalin, prevents inhibition of osteoblastic activity by tributyltin in fish scales. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. 平成22年 5月22日, Seville Spain
- ② Oshima, Y., Ooba Y., Satone H., Shimasaki, Y., Hashiguchi, Y. Analysis of the tributyltin-binding protein gene of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. 平成22年 5月22日, Seville Spain
- ③ Y Oshima, T. Tawaratsumida, Y Oba, H Satone, Y Shimasaki, Induction of the tributyltin-binding protein 2 of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* by exposure of tributyltin-d27. 6th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, 平成22年 5月31日, 香港 (中華人民共和国)
- ④ Oshima Y, Satone H, Yumi Oba Y, Lee JM, Kusakabe T, Kawabata S, Shimasaki Y, Suzuki N, and Sasayama Y. The detoxification and excretion function of tributyltin binding protein in Japanese

flounder *Paralichthyes olivaceus*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry Asia Pacific 2010, 平成22年 6月4日, 広州 (中華人民共和国)

- ⑤大嶋雄治 魚類リポカリンは異物(トリブチルスズやフグ毒)と結合し体表粘液から排泄する機能を持つ. 環境ホルモン学会 平成22年12月16日, 東京
- ⑥ Hina Satone, Jae Man Lee, Takahiro Kusakabe, Yumi Oba, Yohei Shimasaki, Yuji Oshima. Expression of tributyltin-binding protein type 1 in silkworms using by a baculovirus gene expression system. 14th International Symposium on Toxicity Assessment. 平成21年8月30日. Metz, France

6. 研究組織

(1)研究代表者

大嶋雄治 (YUJI OSHIMA)

九州大学大学院・農学研究院・教授

研究者番号 : 70176874