

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12260

研究課題名(和文) 環境化学物質の生態系への影響推測に資する無脊椎動物核内受容体の進化的解析

研究課題名(英文) Evolutionary analysis of the nuclear receptors in invertebrates to infer ecological effects of environmental chemicals.

研究代表者

廣森 洋平 (Hiromori, Youhei)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教

研究者番号：60515956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ムラサキガイレチノイドX受容体(RXR)遺伝子をクローニングし、465番目のアミノ酸がシステインとなっているもの(mgRXRc)、およびセリンとなっているもの(mgRXRs)の2種類の存在を確認した。この部分はヒトRXRalphaの432番目に相当し、有機スズ類とヒトRXRalphaの結合に必須である箇所である。それぞれのリガンド応答性について検討を行ったところ、mgRXRcは有機スズ類に結合する一方で、mgRXRsは有機スズ類が結合しないことを見いだした。また、ムラサキガイRXRが脊椎動物の核内受容体と同様に遺伝子発現制御に関与している可能性がある可能性を示唆する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、有機スズ類がムラサキガイに対して核内受容体を介して何らかの影響を及ぼす可能性を示唆するものである。また、ムラサキガイレチノイドX受容体には遺伝子多型が存在し、個体によって有機スズ類に対する感受性が異なる可能性があることを見いだした。この遺伝子多型と有機スズ類の曝露との関連性についてはさらなる研究が必要と考えられる。これらの成果は、環境化学物質が無脊椎動物に及ぼすリスクを推定する一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We cloned the RXR gene from The Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). We identified two types of RXR genes: one in which the 465 residue was a cysteine (mgRXRc) and the other in which it was a serine (mgRXRs). The residue corresponds to the 432 residue of human RXRalpha, which is essential for the binding of organotins to human RXRalpha. We investigated the ligand-responsiveness of the two proteins and found that mgRXRc bound to organotins, whereas mgRXRs did not. In addition, we investigated whether the mgRXR was involved in the regulation of gene expression. The data suggested that the mgRXR was involved in the regulation of gene expression in the same as vertebrate nuclear receptors.

研究分野：分子毒性学

キーワード：核内受容体 レチノイドX受容体 有機スズ類 システイン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

核内受容体はリガンド依存的な転写因子であり、生体の様々な機能の制御に関与していることから医薬品開発の標的となる一方で、環境化学物質の作用点になりうる。レチノイド X 受容体(RXR)はビタミン A の代謝物である 9-*cis* retinoic acid (9cRA)をリガンドとする核内受容体であり、他の核内受容体とヘテロ二量体を形成し機能する特徴を持つ。RXR を欠損したマウスは胎生致死であることから、生体機能制御に必要な不可欠な因子であると考えられる。また、RXR は原始的な生物においても発現することが確認されている。しかし、現在まで無脊椎動物の RXR に関する研究はほとんど進んでいない。このような状況の中で我々は、巻貝類において有機スズ化合物が RXR を介して生殖器異常を引き起こす事を見いだしている。このように、種の存続に関わる影響を生じる可能性があることから、環境化学物質が各生物種において核内受容体を介して生体にどのような影響を及ぼすか明らかにすることは急務であるといえる。

### 2. 研究の目的

環境化学物質による核内受容体の機能かく乱の結果、種の存続に関わる影響が生じることが知られている。また、生態系への影響を考慮する上で脊椎動物よりも多くの生物種が含まれる無脊椎動物の存在は無視できない。そこで本研究では、レチノイド X 受容体(RXR)に注目し、その性状・機能を解明することで、RXR を介して生体に及ぼす環境化学物質のリスク評価を行うに資する知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ムラサキイガイ RXR 遺伝子配列のクローニング

ムラサキイガイから mRNA を抽出し、逆転写酵素により cDNA を作成し、これを基にムラサキイガイ RXR のクローニングを試みた。ムラサキイガイのゲノムデータベース情報(Accession No. PRJNA1019491, PRJNA1074668, PRJNA996031)から RXR 遺伝子配列を推測し、それを基にプライマーを設計した上で、PCR で増幅を試みた。

#### (2) ムラサキイガイ RXR 組み換えタンパクを用いたリガンド結合実験

解明したムラサキイガイ RXR 遺伝子配列を pCold-TF ベクター(Takara bio)に組み込むことで、ムラサキイガイ RXR ligand binding domain (LBD) 組み換えタンパクを発現するベクターを作成した。これを大腸菌株 BL21 に導入し、組み換えタンパクを作成した。RI 標識リガンドとして、<sup>3</sup>H]標識 9cRA および<sup>14</sup>C]標識 TPT を用いて、これらのリガンドとムラサキイガイ RXR との親和性を評価した。

#### (3) ムラサキイガイ RXR の転写活性化能評価

(2)と同様にムラサキイガイ RXR 遺伝子配列を pM ベクター(Clontech/Takara bio)に組み込むことで、酵母の転写因子である GAL4 DBD とムラサキイガイ RXR LBD を融合したキメラタンパクを発現するプラスミドを作成した。このプラスミドとルシフェラーゼ遺伝子の上流に GAL4 応答配列を連結したレポーター遺伝子が発現するプラスミドをヒト胎盤細胞株である JEG-3 細胞に導入し、その後、9cRA、bexarotene (Bex)、TBT、TPT、で処理し、ムラサキイガイ RXR によるリガンド依存的な転写活性化能を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) ムラサキイガイ RXR の SNP (遺伝子多型) に関する解析

クローニングしたムラサキイガイ RXR の遺伝子配列を確認したところ、465 番目のアミノ酸残基に相当する部分がシステイン(TGC)であるものとセリン(AGC)であるものの 2 種類が確認された。この部分はヒト RXR $\alpha$  の 432 番目に相当する部分(システイン)であるが、我々は、この部分が有機スズ類と RXR との結合に必要な部分である事を見いだしている(*Sci Rep.*, 5: 8520, 2015)。したがって、システインである場合(mgRXRc)とセリンである場合(mgRXRs)とで有機スズに対する反応性が大きく異なることが予想されたため、両者についてリガンド応答性および結合親和性について検討を行った。

レポーターアッセイを用いて、mgRXRc および mgRXRs のリガンド応答性について検討を行ったところ、9cRA に関しては mgRXRc、mgRXRs とともにルシフェラーゼ活性の上昇が確認された。この結果から、9cRA に対する応答性は mgRXRc と mgRXRs との間で大きな違いは認められないことが確認された。合成 RXR アゴニストについても同様に検討を行ったが、こちらも反応性に大きな違いは認められなかった。一方で、有機スズ類について検討を行ったところ、TBT、TPT とともに、mgRXRc ではルシフェラーゼ活性の上昇が認められたものの、mgRXRs ではルシフェラーゼ活性の変化は認められなかった。

続いてリガンド結合実験を行い、mgRXRc および mgRXRs と各化合物との親和性について検討を行った。9cRA および Bex は mgRXRc および mgRXRs の両方に結合することが確認された。

一方、TBT および TPT は mgRXRc に結合したが、mgRXR には結合しなかった。

## (2) ムラサキイガイ RXR による遺伝子発現制御に関する検討

有機スズ類がムラサキイガイを始めとする汚損付着生物に対して付着阻害作用を示すメカニズムに関しては明らかになっていないが、有機スズ類がムラサキイガイ RXR を介して付着に関連する遺伝子を制御することで、付着阻害作用を示している可能性が考えられる。そこで、ムラサキイガイゲノムデータベースから、付着関連分子と考えられる遺伝子のタンパクコード領域の上流約 1000 bp 中に核内受容体が結合する可能性が高い領域が存在するか NUBIScan (<https://www.nubiscan.unibas.ch/>) を用いて推定を行った。推定の結果から、可能性が高い領域を含む遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、この配列を、ホタルルシフェラーゼを発現するプラスミドに組み込み、この付着関連分子を発現する遺伝子の転写制御に mgRXR が関与するか否かについてレポーターアッセイを用いて検討を行った。

レポーターアッセイの検討では、mgRXRc を用いた。検討の結果、(1)の検討でアゴニスト活性が確認された 9cRA、Bex、TBT、TPT いずれにおいてもホタルルシフェラーゼ活性の上昇が確認された。

## (3) まとめ

mgRXRc および mgRXRs を用いた検討の結果から、ムラサキイガイ RXR においてもヒト RXRa と同様に特定のシステイン残基の存在が重要である可能性が示唆された。その一方で、ムラサキイガイには該当部分がセリン残基となっている RXR を有する個体が存在する可能性が考えられ、個体によって有機スズ類に対する感受性が異なる可能性が示唆された。

また、ムラサキイガイの付着関連分子の遺伝子プロモーター領域の解析結果から、mgRXR が実際に遺伝子発現制御に関与している可能性が示唆された。しかし、mgRXR が脊椎動物と同様に二量体を形成する形で機能するのか、どのような核内受容体と二量体を形成するかについて検討ができていないため、今後は、mgRXR と相互作用する因子に関する検討を進める。また、本検討は細胞を用いた検討であるため、本知見が個体レベルではどのような形で影響が現れるかについても検討を進めていきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ishida K, Matsumaru D, Shimizu S, Hiromori Y, Nagase H, Nakanishi T.	4. 巻 45
2. 論文標題 Evaluation of the Estrogenic Action Potential of Royal Jelly by Genomic Signaling Pathway in Vitro and in Vivo.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biol. Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 1510-1517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishida K, Furukawa M, Kunitani M, Yamagiwa R, Hiromori Y, Matsumaru D, Hu J, Nagase H, Nakanishi T.	4. 巻 445
2. 論文標題 Novel, highly sensitive, in vivo screening method detects estrogenic activity at low doses of bisphenol A	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Hazard Mater.	6. 最初と最後の頁 130461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhazmat.2022.130461	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Capitao AMF, Lopes-Marques M, Pascoa I, Sainath SB, Hiromori Y, Matsumaru D, Nakanishi T, Ruivo R, Santos MM, Castro LFC.	4. 巻 797
2. 論文標題 An ancestral nuclear receptor couple, PPAR-RXR, is exploited by organotins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Total. Environ.	6. 最初と最後の頁 149044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scitotenv.2021.149044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Dungkokkruad P, Tomita S, Hiromori Y, Ishida K, Matsumaru D, Mekada K, Nagase H, Tanaka K, Nakanishi T.	4. 巻 46
2. 論文標題 Alginate-coated activated charcoal enhances fecal excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice, with fewer side effects than uncoated one.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Toxicol. Sci.	6. 最初と最後の頁 379-389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.46.379.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Jia Y, Zhang H, Hu W, Wang L, Kang Q, Liu J, Nakanishi T, Hiromori Y, Kimura T, Tao S, Hu J.	4. 巻 426
2. 論文標題 Discovery of contaminants with antagonistic activity against retinoic acid receptor in house dust.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Hazard. Mater.	6. 最初と最後の頁 127847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhazmat.2021.127847.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shiraishi E, Ishida K, Matsumaru D, Ido A, Hiromori Y, Nagase H, Nakanishi T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Evaluation of the Skin-Sensitizing Potential of Brazilian Green Propolis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 13538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222413538.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto K, Matsumaru D, Ishida K, Endo S, Hiromori Y, Nakanishi T.	4. 巻 395
2. 論文標題 Binding profiles of human and mouse complement component 8 to trisubstituted organometallic compounds.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chem. Biol, Interact.	6. 最初と最後の頁 110998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbi.2024.110998	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 筒井 良一, 廣森 洋平, 水谷 奏女, 石田 慶士, 松丸 大輔, 永瀬 久光, 濱田 稔, 菊田 武司, 野方 靖行, 中西 剛
2. 発表標題 ムラサキイガイ Retinoid X receptor の単一アミノ酸変異がその機能に及ぼす影響と変異割合の調査
3. 学会等名 フォーラム2022 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣森 洋平, Ana MF. Capitaio, Monica S. Lopes-Marques, 石井 陽一郎, Raquel Ruivo, Elza SS. Fonseca, Ines? P?scoa, Rodolfo P. Jorge, M?lanie AG. Barbosa, 宮城 隆之, Miguel M. Santos, L. Filipe C. Castro, 中西 剛
2. 発表標題 水生脊椎動物PPAR の有機スズ類応答性に関する検討
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Youhei Hiromori
2. 発表標題 Investigation of the mechanism for the toxicity of organotins by focusing on nuclear receptors.
3. 学会等名 The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>鈴鹿医療科学大学ホームページ  <a href="https://www.suzuka-u.ac.jp/wp-content/uploads/2022/07/pp_hiromori.pdf">https://www.suzuka-u.ac.jp/wp-content/uploads/2022/07/pp_hiromori.pdf</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中西 剛  (Nakanishi Tsuyoshi)  (50303988)	岐阜薬科大学・薬学部・教授    (23701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松丸 大輔  (Matsumaru Daisuke)  (50624152)	岐阜薬科大学・薬学部・准教授    (23701)	
研究分担者	目加田 京子  (Mekada Kyoko)  (40898235)	岐阜薬科大学・薬学部・会計年度任用職員    (23701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関