

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月22日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22310020

研究課題名（和文） 微細藻類が生産する核内受容体活性化物質の水生動物への影響

 研究課題名（英文） Effects of nuclear receptor-activating compounds produced  
By microalgae on aquatic animal

研究代表者 彼谷 邦光（KAYA KUNIMITSU）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：40124341

研究成果の概要（和文）：富栄養化した淡水湖沼に発生するアオコ（cyanobacterial waterblooms）に核内受容体の一種であるレチノイン酸受容体（Retinoic Acid Receptor, RAR）に結合してアゴニスト（Agonist）として働く物質が存在することを見出し、その物質を単離し、その構造を明らかにした。本物質は 7-Hydroxy retinoic acid で、Retinoic acid の新奇アナログであった。本物質は通常4種の異性体の平衡関係にあった。UV-A の照射に対しては all-trans retinoic acid (ATRA) よりははるかに安定であった。また、活性は ATRA の約半分程度であった。UV-A に安定な 7-hydroxy retinoic acid はアオコ発生水域で魚類や両生類の RAR に作用し、アオコ発生水域で観察されるカエルや魚の奇形を誘発する一因の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：A novel analogue of retinoic acid, 7-hydroxy retinoic acid, was found in waterbloom-forming cyanobacteria. The analogue had an agonistic activity against retinoic acid receptor (RAR) as a kind of nuclear receptors. The novel analogue was isolated from mass-cultured *Spirulina* sp.(TU-3). The analogue was found in all-tested strains of cyanobacteria. The analogue exist a mixture of four isomers by *cis-trans* isomerization including keto-enol tautomerism. The agonistic activity of the analogue against RAR was a half of all-*trans* retinoic acid (ATRA). The analogue was far-stable under UV-A compared with ATRA. The stability of 7-hydroxy retinoic acid under UV-A suggest that amphibians and fishes living in waterblooms occurring waters may be exposure, and give teratogenic effects.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
平成23年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
平成24年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価

キーワード：7-hydroxy retinoic acid, RAR agonistic activity, Cyanobacteria, Teratogen

 1. 研究開始当初の背景  
 富栄養化した水域で大量発生する微細藻類

が水生動物細胞のレチノイド系やステロイド系の核内受容体を活性化する物質（リガン

ド)を多量に産生していることを見出した。核内受容体はクラス II 遺伝子群を制御する DNA 結合性転写制御因子であるが、他の転写制御因子と異なり、その転写促進はリガンドの結合に依存する。ほとんどの動物細胞に存在する核内受容体はホルモンやビタミンなどの低分子のリガンドと結合し、分化、発生、形態形成、代謝、ホメオスタシスなどの重要な生命現象を調節していると考えられている。これまでにヒトの細胞で 4 種類の受容体の存在が明らかにされているが、対応するリガンドが明らかにされている受容体はステロイド受容体、レチノイド受容体、甲状腺ホルモン受容体などであるが、多くは対応するリガンドが未知の受容体である。これらの受容体に外因性のリガンドが結合し、アゴニストまたはアンタゴニストとして働くことにより、生体機能に大きく影響すると考えられている。これまでの研究では、両生類、爬虫類、魚類など核内受容体が塩素系農薬やフェノール化合物などの水質汚染物質の影響を受け易いことを明らかにしてきた (Shiraishi, *et al.* *Chemosphere* 52, 33-42, 2003)。これまで外因性のリガンドとして人工化学物質に注意が払われ、規制も行われてきたが、わが国およびオーストラリアの富栄養化した水域では人工化学物質による汚染がほとんどないにもかかわらず依然として外因性リガンドによる ER(estrogen receptor) や RAR(*trans*-retinoic acid receptor)の活性化が著しいことが、ヒトおよびメダカの核内受容体を導入した酵母 Two-hybrid assay システムを用いた調査で明らかにされた。これらの活性は富栄養化した水域で大量発生する藍藻類や緑藻類のクロロフィル a 量と相関することから、微細藻類の代謝物質であると推定された(未発表)。富栄養化水域で大量発生する微細藻類は悪臭や水質の有毒化の原因となっているが、同時に生態系に急激な遷移をもたらしている。この生態系の急激な遷移の原因として溶存酸素の低下などが唱えられているが、主因は不明である。微細藻類の代謝物が水生動物のいくつかの核内受容体を活性化するという結果は、これまで断片的な知見しか得られていない水界生態系の急激な遷移の原因解明の突破口になる可能性を示唆している。さらに、隔離水界実験で藍藻とミジンコのバイオマスが逆相関を示すことも明らかにされている (Kaya, K. *et al.* *Environ.Toxicol.*20, 170-179, 2005)。しかしながら、微細藻類の核内受容体を活性化する物質の構造やそれらの水生動物や水界生態系への影響については未踏の領域であり、より精緻な基礎研究が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では微細藻類の生産する核内受容体

活性化物質の化学構造の解明とそれらの水生動物への影響を明らかにし、生態系遷移のメカニズム解明の糸口とすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

初年度は基礎となる微細藻類の種による核内受容体を活性化する物質(微細藻類由来リガンド)の違いを明らかにし、これらのリガンドの化学構造解析を目指した調査研究を行った。

### 藍藻および緑藻培養株の核内受容体リガンドのスクリーニング

ヒトの ER と RAR、メダカの ER の遺伝子を組み込んだ酵母 two-hybrid assay 系はすでに構築しているが、H22 年度は魚類(ゼブラフィッシュ)、TR、RXR を組み込んだ酵母を作成依頼し、酵母 two-hybrid assay 系を構築した。国立環境研究所微生物系統保存施設の培養株をスクリーニングした。

### 微細藻類の培養と富栄養化水域に発生する微細藻類の採集

国立環境研究所の微生物系統保存施設の緑藻・藍藻類を中心に培養株を培養し、リガンド産生微細藻類をスクリーニングした。リガンド活性は酵母 two-hybrid assay 系を用いて調べた。スクリーニング用として初年度は 50~80 株を培養した。リガンドを産生している株を大量培養した。培養した藻類は凍結乾燥後、リガンドの単離・精製・構造解析用とした。また、富栄養化水域に発生する藍藻類、緑藻類を採集し、リガンド活性を測定した。微細藻類の分類・同定は国立環境研究所の微生物系統保存施設に依頼した。

核内受容体活性化物質の化学構造の同定 RAR 活性化物質を産生することが確認されているスピルリナ (*Spirulina* sp.) を大量培養し、酵母 two-hybrid assay 系及び LC-MS でモニターしながら種々の受容体活性物質を分画精製する。精製された活性物質の化学構造を高分解能 LC-QTOFMS および誘導体化した資料の GC/MS から解析した。

### UV-A 安定性試験

7-hydroxy retinoic acid の異性体混合物または ATRA を pH 3.3, 7.4 および 11.1 の水溶液に DMSO を用いて溶解し、窒素ガスで酸素を除去した後、UV-A を 1.0  $\mu$ W/cm<sup>2</sup> に 60min 照射した。照射終了後、ただちに RAR アゴニスト活性を yeast two-hybrid assay で測定した。

核内受容体活性化物質の水生動物への影響 All-*trans* retinoic acid (ATRA) は dimethyl formamide (DMF) に溶解して、0.1% の DMF のみを対照として、5 濃度 (100, 320, 1,000, 3,200, 10,000 ng/L) の曝露試験を

行った。曝露期間は受精後 4 時間から 144 時間 (6 日間) まで行い、24 時間ごとに孵化、生死及び発達異常の有無を観察した。なお、観察時以外は遮光して試験は行った。

#### 4. 研究成果

無菌的に大量培養した国立環境研究所の藍藻類の NIES 株の核内受容体活性を調べた。Table 1 に示したように全ての株から RAR 活性が検出された。

Table 1 Nuclear Receptors Activities of Cyanobacteria

Cyanobacteria	Nuclear Receptor Activity			
	RAR (mg/kg as ATRA)	ER (mg/kg as E2)	AhR (mg/kg as b-NF)	CAR (mg/kg as p-t-OP)
Spirulina subsalsa NIES-27	1,500	0	580	16
Spirulina Platensis NIES-46	660	0	850	22
Spirulina sp. (on the market)	3,400	0	76	-
Oscillatoria limnetica NIES-36	3,000	0	740	22
Microcystis aeruginosa NIES-1222	6,000	0	0	8
Planktothrix agardhii NIES-204	3,600	280	290	27
Planktothrix rubescens NIES-610	2,000	0	2,000	10
Phormidium tenue NIES-512	1,100	0	1,100	31
Cylindrospermopsis raciborskii AWT 205	5,000	130	660	27
Nostoc sp. DUN 901	2,600	0	0	7
Raphidiopsis sp. TEG-1	20,000	0	160	18

RAR, Retinoic Acid Receptor, ER, Estrogen Receptor, AhR, Aryl hydrocarbon Receptor, CAR, Constitutive Androstane Receptor  
 ATRA, all trans retinoic acid; E2, 17 $\beta$ -estradiol; b-NF,  $\beta$ -naphthoflavone; p-t-OP, p-tocetylphenol

RAR 活性化物質を単離し、化学構造を明らかにするために、Spirulina を大量培養した凍結乾燥藻体からメタノールを用いて RAR 活性化物質抽出した。RAR 活性化物質は yeast two-hybrid 法でモニターしながら、フロリジルカラムおよびシリカゲルカラムを用いて分画した。RAR 活性化画分の精製・単離には逆相系の HPLC を用いた。25% のリン酸緩衝液 (pH 3.0, 50mM) を含むメタノールを移動相

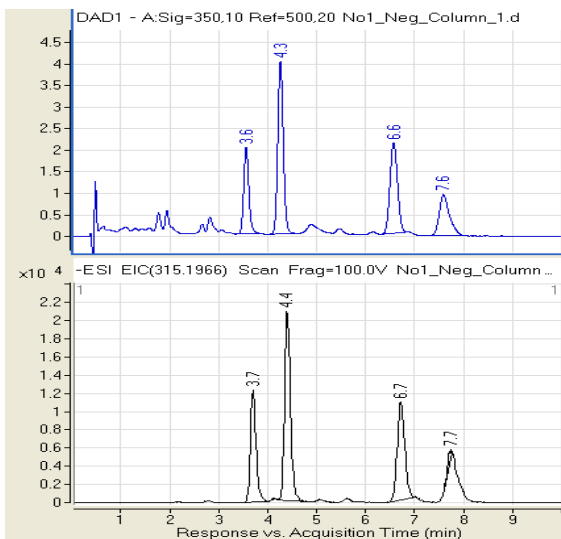


Fig.1 .LC chromatograms of the RAR-activating fraction. Upper: detection by diode array detector (DAD); Lower: detection by electron spray ionization (ESI)

とすると、活性物質は保持時間 (RT) 15 min-25 min の間に 4 つのピークとして溶出した。単離した各ピークを再度同一条件の HPLC で分析すると、各ピークはそれぞれ 4 つのピークに別れた。このことは 4 つのピークは互いに平衡関係にあることを示すものと考えられた。RAR 活性化物質を LC-MS/MS で分析したところ、3.7, 4.4, 6.7 および 7.7min にピークが観察された (Fig.1)。これらのピークの (M-1)<sup>+</sup> および (M+1)<sup>+</sup> の精密質量を測定したところ、4 つのピークの (M-1)<sup>+</sup> および (M+1)<sup>+</sup> は Table 2 に示したごとく 315.1962 - 315.2013 の間および 317.2105-317.2109 の間にあり、4 つピークは同一の元素組成からなる物質であることが明らかとなった。本物質の精密質量 M は 316.2038 と求められ、この値から C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub> の組成式が導かれた (Table 2)。

Table 2. The exact masses and molecular formulae of the 4 peaks in the RAR-activating fraction

Compound	I	II	III	IV
Rt (min)	3.7	4.4	6.7	7.7
m/z of [M-H] <sup>-</sup>	315.1973	315.1962	315.1998	315.2013
m/z of [M+H] <sup>+</sup>	317.2109	317.2108	317.2107	317.2105
Calcd m/z for M	316.2038			
Molecular formula	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>			

また、これらのピークの  $\lambda$  max はいずれも 350nm 近傍にあり、共役ジエン構造を示唆した。RAR 活性化の本体であるレチノイン酸 (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>) は L-MS/MS における RT は 11.2 min であり、 $\lambda$  max も 350nm 付近にある。以上のことから、RAR 活性化物質はレチノイン酸のアナログである可能性が考えられた。RAR 活性化物質の構造を解析するために、MS フラグメントを生成させ、all-trans レチノイン酸のフラグメントとを比較した。

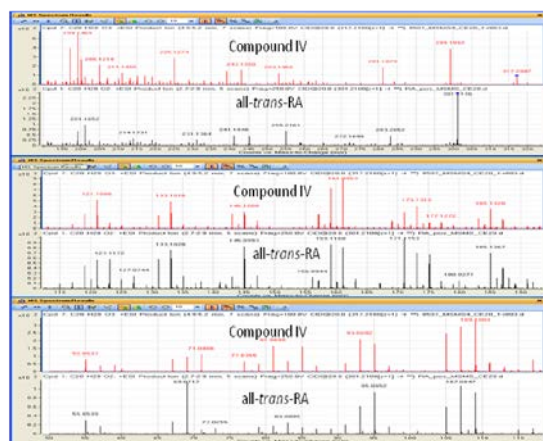


Fig.2 MS-Fragments of peak 4 (compound IV, RT 7.7 min) and all-trans retinoic acid (ATRA)

ピーク 1 から 4 (compound I-IV) までのフラグメントの m/z および各 m/z のピーク高とベ

ースピーク高との比は完全に一致していた。Fig.2 にピーク IV (Compound IV) と ATRA のフラグメントの比較を示した。フラグメントの精密 m/z 値から、各フラグメントの組成式を求め、ATRA のフラグメントの組成式との比較から、本 RAR 活性化物質は retinoic acid の 7-位に水酸基が付いた 7-hydroxy retinoic acid と推定された。確認のために、RAR 活性化物質を水素化ホウ素ナトリウム(NaBH<sub>4</sub>)を用いて水素添加し、Hydroxy 基をアセチルに、カルモキシル基をメチルエステルにした誘導体を調製し、GC/MS (EI) を用いて水酸基の位置が 7-位であることを確認した。以上の結果から、RAR 活性化物質は 7-Hydroxy retinoic acid であることを同定した。本化合物は Retinoic acid の新奇アナログであった。

液体クロマトグラムの 4 つのピークの極大波長、分子吸光係数を ESI negative イオン化による m/z 315 における組成を基準に求めた (Table 3)。

Table 3. Estimation of molecular extinction coefficients ( $\epsilon$ ) of Compound I, II, III, and IV.

Compound	I	II	III	IV
$\lambda_{max}$ (nm)	347	353	356	346
(A) Comp.% by DAD at $\lambda_{max}$	22.1	44.3	23.0	10.6
(B) Comp.% by MS (ESI, neg)	24.6	42.3	21.5	11.6
(A) / (B)	0.90	1.05	1.07	0.91
Calcd. mol. extinc. coeff. ( $\epsilon$ )	36,000	41,900	42,800	36,400

The  $\lambda_{max}$  and  $\epsilon$  of the mixture of Compound I, II, III and IV were 351nm and 40,000, respectively. Composition % by PAD was obtained from the area at

*cis*, *trans* と  $\lambda_{max}$  の関係および *cis* と *trans* 体における 7-Hydroxy retinoic acid の炭素鎖の長さとの逆相カラムにおける溶出順序の知見からピーク I-IV(Compound I-IV)はFig.3 関係にあるものと推定された。

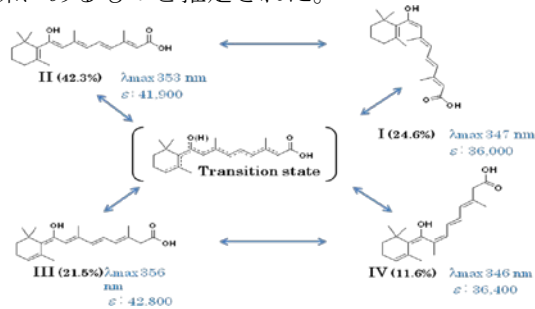


Fig.3 Possible relation of Compound I,II, III and IV. The relation was obtained from keto-enol tautomerism, *cis-trans* isomerization and the elution order by an end-capping ODS column Numbers in the figure are corresponded to Compound I, II, III, and IV.

ATRA は UV-A に対して極めて不安定な分子であるが、7-Hydroxy retinoic acid は ATRA に比較して安定であった。

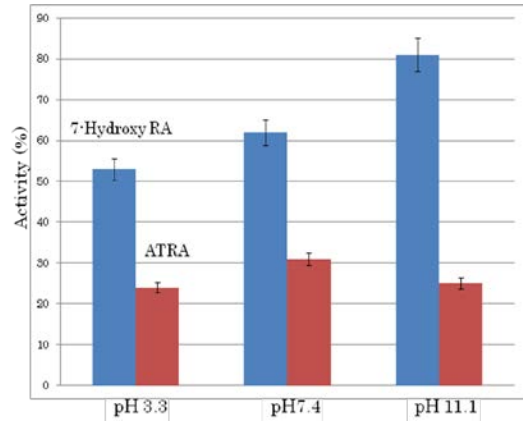


Fig.4 Photo-stability of the mixture of 7-hydroxy RA isomers and all-trans RA (ATRA) irradiated with fluorescent light.

The mixture of 7-hydroxy RA isomers (220 nmol, 70ng/ml) and ATRA (200 nmol, 60 ng/ml) in various pH buffers were irradiated with fluorescent (UV-A, 1.0 mW/cm<sup>2</sup>) for 60 min at 25 °C. After irradiation, RAR agonistic activities were immediately determined. SD bars (n=3) are indicated in the Figure. Activity (%) = activity after irradiation/ initial activity  $\times$  100

これらの UV-A 照射下における安定性の結果は異性体間の平衡と関係があると思われた。湖沼におけるアオコ発生環境においても ATRA より安定であり、その影響も大きいものと推測された。

本研究では 7-hydroxy retinoic acid の部分合成に成功しているが全合成はまだ完成していないので、催奇形性について正確な情報を得ることができないので、ATRA を用いて催奇形性検出の検討を行った。RAR の本来の生体内リガンドである ATRA は過剰曝露により、催奇形性があることが知られていることから、藍藻類の 7-hydroxyretinoic acid による水界生態系生物への催奇形性を調べる試験法の構築を行った。RAR の本来の生体内リガンドである ATRA は過剰曝露により、催奇形性があることが知られていることから、藍藻類の 7-hydroxyretinoic acid による水界生態系生物への催奇形性を調べる試験法の構築を行った。毒性試験用魚類の中で比較的受精から孵化までの時間の短いゼブラフィシの魚類胚・仔魚期毒性試験法による ATRA 曝露による催奇形性を検証した。

ATRA は DMF に溶解して、0.1%の DMF のみを対照として、5 濃度 (100, 320, 1,000, 3,200, 10,000 ng/L) の曝露試験を行った。曝露期間は受精後 4 時間から 144 時間 (6 日間) まで行い、24 時間ごとに孵化、生死及び発達異常の有無を観察した。なお、観察時以外は遮光



して試験は行った。

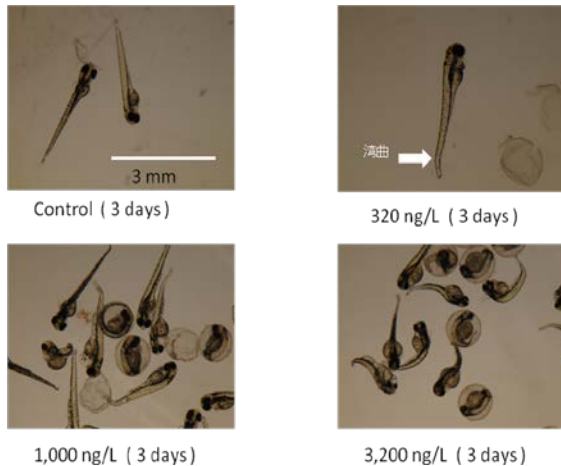


Fig.5. Teratogenic Test of ATRA using Zebra Fish  
Embryos of zebra fish were exposure in ATRA-containing water under dark condition at 20°C. After hatch, newborn fish were checked abnormality

6 日後の孵化率は、対照区、100 ng/L 区、320 ng/L 区は 100%であり、1,000 ng/L 区で 98%、3,200 ng/L で 76%、10,000 ng/L では 0%であった。未発達や矮小などの眼球の外観異常(a)、臍囊と体幹の未分離、浮腫などの腹部の外観異常(b)、湾曲、縮れなど尾部の外観異常(c)の三点を発達異常の指標(奇形)とした場合、320ng/L 区では、15%に(c)の尾部の外観異常が認められ、1,000ng/L 区では 57%に(b)の腹部の外観異常と(c)が観察された。また、3,200ng/L 区では、全ての個体から(a)、(b)、(c)の外観異常が観察された。本試験法により、催奇形性を有する ATRA は比較的低濃度である 320ng/L の 6 日間曝露観察でも外観異常(奇形)を引き起こすことから、環境中での藍藻類の 7-hydroxyretinoic acid は 300ng/L 以上の濃度が水中に遊離される可能性が指摘されていることから生態系生物の奇形への影響が懸念される。

本研究の内容は 2012 年 5 月 30 日号の Science News (Washington,DC)で富栄養化湖沼でみられる両生類の奇形に関連して紹介された。

#### 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 1 件)

1)A novel retinoic acid analogue, 7-hydroxy retinoic acid, isolated from cyanobacteria. Kaya K, Shiraishi F, Uchida H and Sano T, Biochim. Biophys. Acta (査読有り) 1810, 414-419 (2011)  
doi:10.1016/j.bbagen.2010.11.009

[学会発表] (計 2 件)

1)A photostable retinoic acid analogue, 7-hydroxy retinoic acid isolated from *Spirulina* and other cyanobacteria Kaya K, Shiraishi F, Sano T, 8<sup>th</sup> Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology. 2012年7月11日, Adelaide, Australia

2)Is 7-hydroxy retinoic acid of cyanobacteria an aquatic ecotoxin? Kaya K, Shiraishi F, and Sano T, 9<sup>th</sup> International Conference on Toxic Cyanobacteria. 2012年8月12日, Johannesburg, South Africa

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

彼谷 邦光 (KAYA KUNIMITSU)

(筑波大学・生命環境系・教授)

研究者番号：4012341

##### (2) 研究分担者

白石 不二雄 (SHIRAISHI FUJIO)

(国立環境研究所・環境リスク研究センター・フェロー)

研究者番号：30113476

佐野 友春 (SANO TOHARU)

(国立環境研究所・環境計測研究センター・主任研究員)

研究者番号：10178808