

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 6月 7日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780174

研究課題名（和文） 養殖魚の有害化学物質の残留・排出における MDR の役割

研究課題名（英文） The role of MDR in the elimination of xenobiotics in farmed fish

研究代表者

二見 邦彦（KUNIHICO FUTAMI）

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・助教

研究者番号：00513459

研究成果の概要（和文）：有機塩素系農薬エンドスルファンにより曝露されたティラピア MDR 遺伝子の発現を解析し、エンドスルフানের体内動態との関連を調べた。その結果、肝臓における MDR の発現が、曝露後にタンパク質レベルで経時的に亢進されることが明らかとなったが、体内エンドスルファン濃度との相関は認められなかった。そこで、ティラピア MDR およびその制御因子 PXR の全長 cDNA をクローニングしたところ、いずれも多くの変異がみられ、これらがエンドスルフানের体内動態の個体差に影響している可能性が考えられた。また、両者の発現パターンは大きく異なっていたことから、有害化学物質曝露によるティラピア MDR の転写は、哺乳類とは異なるメカニズムで制御されている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In mammals, drug transporters such as MDR play important roles for elimination of various xenobiotics across extra-cellular membranes. However, the knowledge about the gene expression and function of MDR in farmed fish are relatively modest. Here, we examined the expression of MDR protein in liver of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* treated with the endosulfan, an organochloride pesticide. The protein level of tilapia MDR was increased in a time-dependent manner by feeding with endosulfan. However, there was poor correlation between MDR level and endosulfan residues. We also isolated the full-length cDNAs of MDR and its regulator, PXR from tilapia. A lot of polymorphisms and species difference were found in both MDR and PXR gene. Phylogenetic analysis indicated that, unlike mammal, fish MDR has not differentiated into MDR1 and MDR3. Although tilapia PXR and P-gp mRNAs were detected in various tissues, the differential expression patterns were observed by real-time PCR. These results may imply that the transcription of tilapia MDR is regulated by different mechanism from that of mammalian MDR1/3.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学，水産学一般

キーワード：MDR, PXR, 薬物代謝, 肝臓, エンドスルファン, 農薬, ティラピア

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、科学技術の進歩や国際化の進展に伴い、輸入食品を始め様々な食品が広域的に流通するなど食品を取り巻く環境が変化している。また、外食や中食の増加によって、食品が製造・加工、流通、販売と多くの段階を経て消費者に届くようになり、生産者・事業者と消費者との信頼関係が希薄化してきている。そのような中、食品から基準値以上の有害化学物質が検出される事件が多発し、安全な食への関心が世界中で高まっている。これに伴い、我が国では、食品中への農薬類およびそれらの代謝物の残留は、平成18年5月からポジティブリスト制により規制され、水産用医薬品だけでなく、最大残留基準値を超える農薬類を含有する水産物の流通が禁止となった。

しかしながらここ数年、輸入ウナギでニトロフラン系合成抗菌剤の代謝物であるAOZやマラカイトグリーンなどの有害化学物質の検出事例が多数報告された。水産物全体の違反事例の中でも、禁止されているAOZやマラカイトグリーンの残留が見つかったケースは非常に多く、現在でも不正使用が後を絶たない。このような違反事例が発見されるたびに報道され、国民の養殖魚に対する不安を招いている。また、一部の国産ウナギからも、AOZの親化合物であるフラゾリドンを使用していないにもかかわらず検出された例が報告されている。これらの汚染原因については、稚魚を介した汚染、大雨などによる農地やゴルフ場からの河川への流出（ドリフト）、飼・餌料の汚染による経口的な蓄積などが疑われているが、現時点では必ずしも明らかではなく、そもそもこれらの薬物の残留メカニズムに関する研究自体も少ないのが現状である。

(2) これまでに、養殖ウナギにおけるAOZの残留に関する研究を行い、ウナギの体内のAOZの半減期は25日と極めて長く、2 ppmのフラゾリドンで薬浴した場合には、1 ppbの基準値を下回るまで5ヶ月以上も要することを明らかにした(Krongpong, et al. Fish. Sci. 2008; 79: 119-127)。その一方で、ティラピアの体内のAOZの半減期はわずか5日であり、2 ppmのフラゾリドンで薬浴した場合には、1 ppbの基準値を下回るまでに要する時間は42日であった。マラカイトグリーンについても同様の結果が得られ、魚種によって有害化学物質の排出速度が著しく異なることが明らかとなった。しかしながら、排出速度に魚種差が生じる理由は現在までに明らかとなっていない。

(3) 化学物質の曝露と魚類の薬物代謝酵素

の mRNA 発現に関する研究が数多く行われていることに着目し、予備的な実験として、フラゾリドンやマラチオンなどの農薬で曝露されたウナギおよびティラピアの薬物代謝酵素群の遺伝子発現量をリアルタイムPCRで調べた。その結果、ティラピアでは、CYP3A、GST、MDRなどの遺伝子発現がウナギより高い傾向を示し、特にMDRは一過性ではあるが顕著な発現上昇を示した(図1)。

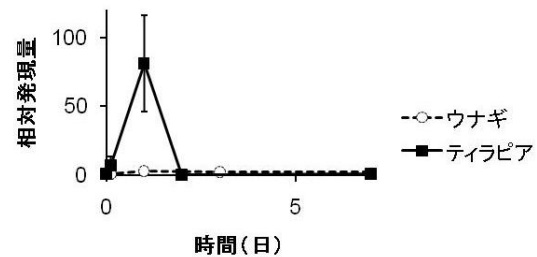


図1 フラゾリドン曝露後のMDR mRNAの発現変動。データは平均値±標準偏差で表示(n=3)。縦軸は、0時間を1としたときの相対値。

MDR (Multi Drug Resistance) は、生体における様々な異物の排出に関わる輸送体タンパク質であることから、ティラピアにおいて体内の有害化学物質が速やかに排出されるのにMDRが重要な役割を果たしていることが推測された。

しかし魚類では、実験用マウスのような純系が少ないため、遺伝子の発現量や薬物代謝動態には個体差が大きく、また水温など周囲の環境の違いなども影響するため、必ずしも常に安定した結果が得られるとは言い切れない。さらに、これらの遺伝子やタンパク質の発現量の変化は、将来的には魚体内の有害化学物質の残留をモニタリングする上でのバイオマーカーともなりうるが、定量性が求められる残留モニタリング法への応用を念頭に置く場合、このことはクリアしなければならない課題となる。有用性の高いバイオマーカーとして求められる条件は、単に相関が認められることだけではなく、その科学的裏付けであり、そのマーカーの充進のメカニズムを明らかにしなければならない。言い換えれば、統計学的に有意な発現上昇が認められても因果関係がわからなければ、それらはサロゲートマーカー（代理となる指標）に過ぎず、モニタリングに有用なバイオマーカーとして実用化させることは困難である。今後、生産者の意図しない有害化学物質の残留を防止するためのリスク管理を行うためにも、有害化学物質の薬物動態とその残留・排出メカニズムを科学的に明らかにすることが重要である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ティラピアにおける有害化学物質の残留・排出メカニズムを明らかにするために、薬物排出に関わる輸送体である薬物トランスポーターMDRに着目し、有機塩素系農薬エンドスルファンを中心とした有害化学物質がどのようにしてティラピアMDRの発現を制御するのかについて解析した。

3. 研究の方法

(1) 曝露農薬としてエンドスルファン- α (ベンゼエピン) を使用し、飼料に対して50 ppmとなるよう添加した。曝露濃度は、予備実験より決定し、体内に残留する可能性のある高濃度に設定した。溶媒には100%エタノールを用い、農薬を溶解した後、試料に添加して瞬時にボルテックスをし、均一に混合して空気乾燥させた。なお、コントロール区にはエタノールのみを添加し、同様の手順で飼料の調製を行った。

1週間の馴致後、総魚体重の1.5%相当の飼料を1日1回、3日間連続給餌した。すべての個体が満遍なく摂餌できるよう少しずつ給餌し、残餌がないことを確認してサンプリングを行った。

(2) 90 \pm 10 gのティラピア24匹の肝臓をプールし、遊離肝細胞を分離した。遊離肝細胞の分離・培養は、林(魚類の組織培養—ウナギ・コイ肝細胞の培養。「ラボマニュアル マリンバイオテクノロジー」裳華房、東京、1991; 44-57)に準じて行った。培養にはWilliams' Medium Eを用いた。

(3) 肝臓からの総タンパク質の抽出およびMDRのウェスタンブロットは、Cooper et al. (In: Ostrander (ed). Techniques in Aquatic Toxicology. CRC Press, Boca Raton, FL, 1996; 307-325)に従って行った。一次抗体にはMonoclonal Antibody to P-glycoprotein (C219)を用い、ECL Plus (GE Healthcare)により蛍光での検出を行った。

また、体内エンドスルファン濃度は、ガスクロマトグラフィーにより測定した。

(4) TRIzol Reagent (Invitrogen社)を用いてTotal RNAを抽出した。得られたRNAをTURBO DNA-free Kit (Ambion社)によりDNase処理し、High Capacity RNA to cDNA Kit (Applied biosystem社)により第1鎖cDNAを合成した。このcDNAを鋳型として、Fast SYBR Green Master MixおよびStepOneリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)を用いてリアルタイムPCRを行った。データの解析は比較 C_t 法にて行った。

(5) すでにGenBankで公開されているティラピアMDR (Accession No.: EU878755) およびPXR (Accession No.: AB498797)の部分塩基配列をもとにプライマーを設計し、5'および3' RACE法により、MDRおよびPXRの全長cDNAをクローニングした。方法は、Futami et al. (Gene 2001; 269: 113-119)に準じて行った。得られた演繹アミノ酸配列の解析には、BLASTおよびMEGA 5を用いた。

(6) MDR遺伝子の5'上流領域をクローニングするために、inverse PCRを行った。まず、フェノール/クロロホルム法により、ティラピアの尾鰭からゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAを制限酵素PstIで切断したのち、T4 DNAライゲースを用いて環状DNAを形成した。これを鋳型として、(5)でクローニングしたcDNAの配列をもとに外側に向かって合成が進むプライマーを設計してPCRを行った。得られたPCR産物をプラスミドベクターにサブクローニングし、塩基配列を決定した。

4. 研究成果

(1) 有機塩素系農薬エンドスルファンの曝露によるティラピアMDR遺伝子の発現誘導をmRNAレベルおよびタンパク質レベルの両方から解析し、薬物動態との関連を調べた。その結果、エンドスルファンの曝露により、肝臓におけるMDRの発現がタンパク質レベルで経時的に亢進された(図2)。しかし、残留エンドスルファンやその代謝物であるエンドスルファンスルフェートの体内濃度とは相関は認められず(図3)、また、mRNAレベルでの顕著な発現亢進も見られなかった(data not shown)。

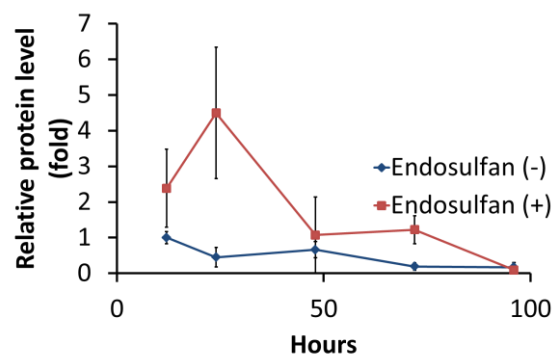


図2 エンドスルファン曝露後のMDRタンパク質の発現変動。データは平均値 \pm 標準偏差で表示(n=5)。縦軸は、0時間を1としたときの相対値。

(2) 哺乳類では、MDRは薬物受容体PXRにより転写が調節される。そこで、ティラピアMDR遺伝子の転写制御機構を解明するための基礎的知見を得るため、MDRおよびPXRの全長cDNAをクローニングした(DDBJ accession

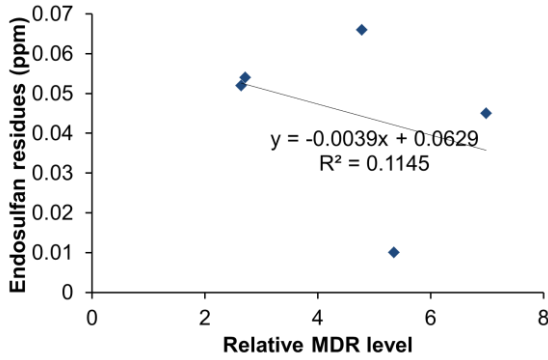


図3 曝露24時間後のMDRタンパク質発現量と体内エンドスルファン濃度の相関 (n=5)。

no. : AB699095, AB699096)。本研究期間中に公開されたティラピアゲノムやその他の生物種との比較を行ったところ、ティラピアMDRの全体およびPXRのリガンド結合ドメインには種差や多型が多くみられた(図4)。このことから、これらの変異がエンドスルファンの体内動態の個体差に影響している可能性が考えられた。

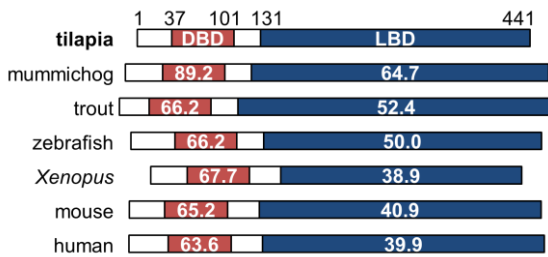


図4 脊椎動物PXRタンパク質の構造および機能ドメインの比較。黒数字はアミノ酸、白抜き数字は同一性(%)を示す。DBD: DNA結合ドメイン, LBD: リガンド結合ドメイン。

また、分子系統解析の結果、魚類のMDRは1種類であり、ヒトに見られるMDR1とMDR3には分化していないことも明らかとなった(図5)。

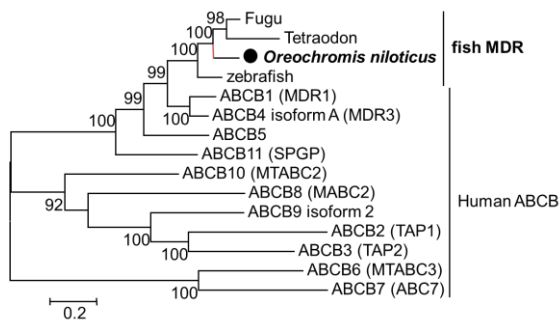


図5 近隣結合法によるABCトランスポー

ターサブファミリー(ABCB)の分子系統樹。枝の長さは遺伝距離を、数字はブーツストラップ値を示す。

リアルタイムPCRにより各組織におけるMDRおよびPXR遺伝子の発現を調べたところ、両者の発現パターンは大きく異なっていた(図6)。このことから、ティラピアMDRの転写は、PXR以外の薬物受容体もしくは転写因子によっても制御されている可能性が示唆された。

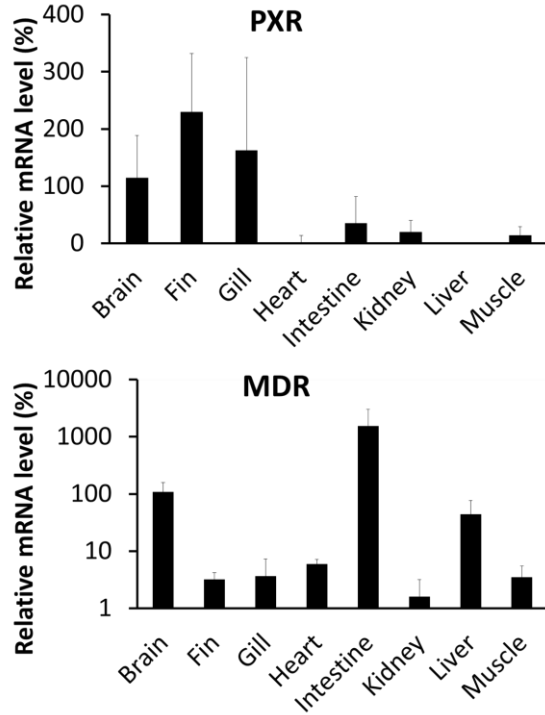


図6 PXRおよびMDR mRNAの組織分布。データは平均値±標準偏差で表示(n=4)。縦軸は、脳を100としたときの相対値。

(3) MDR遺伝子の転写制御機構を明らかにするためにはプロモーターを含む5'上流領域のクローニングが不可欠であるが、ティラピアMDR遺伝子のプロモーター領域は明らかとなっていない。そこで、inverse PCRおよび公開されているティラピアゲノムとの比較からMDR遺伝子の5'上流領域約5 kbのクローニングを行った。その結果、5'上流領域約5 kbの中には、PXRの認識配列であるER-6やDR-3と一致する配列は見当たらなかった。このことから、ティラピアMDRの発現は、PXR以外の薬物受容体により制御されている可能性が示唆され、図6の結果を支持するものであった。しかしながら、マウスのMdr1aにおいては、ER-6およびDR-3配列が、転写開始点から10 kb以上上流にあることが知られているため、今後、さらに上流の領域をクローニングする必要がある。

(4) ヒト培養細胞においては、エンドスルファンが PXR を介して標的遺伝子 CYP3A4 の発現を調整することがすでに知られている (Coumoul et al. Biochem Pharmacol. 2002; 64(10): 1513-1519)。ティラピアにおいても、エンドスルファンが PXR を介して標的遺伝子の発現を調整しているかどうかを明らかにするために、MDR を含む薬物代謝関連遺伝子の発現変動を網羅的に解析した。なお、環境要因や個体差による影響を軽減するため、曝露試験にはティラピアの遊離肝細胞を用いた。

その結果、MDR の他に、CYP1A, CYP1B, CYP3A, GST θ 1, および UGT の 5 遺伝子の発現が 50 ppm のエンドスルファン曝露により一過性に亢進した。哺乳類においては、これらの遺伝子の発現はいずれも薬物受容体 AhR または PXR に制御されていることが明らかとなっている。したがって、ティラピアにおいては、エンドスルファンの排出には AhR および PXR の両方の経路が関与している可能性が考えられる。このことは、MDR タンパク質の発現量が体内エンドスルファン濃度と相関を示さなかった図 3 の原因を説明できるものと思われる。

(5) 魚体内の有害化学物質の残留をモニタリングする上で MDR をバイオマーカーとして用いる場合、MDR 単独でのモニタリングでは偽陰性を招く恐れがある。AhR および PXR の標的遺伝子を加えた複数のマーカーで評価する必要があると考えられる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kunihiko Futami, Yasuko Kaneko, Mintra Seel-audom, Erika Wahyu Dewanti, Akina Hashimoto, Takayuki Katagiri, Makoto Endo and Masashi Maita, Cloning and expression analysis of P-glycoprotein (P-gp) and pregnane X receptor (PXR) in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, JSPS-NRCT Asian Core Program Joint Seminar 2012, Cha-Am, Thailand, 2012 年 3 月
- ② Mintra Seel-audom, Kunihiko Futami, Takayuki Katagiri, Moakoto Endo, Masashi Maita, Study on the sensitivity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to dietary leucomalachite green exposure (ロイ

コマラカイトグリーン含飼料のティラピアに及ぼす影響), 平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 長崎大学文教キャンパス, 2011 年 9 月

[その他]
塩基配列等

- ① *Oreochromis niloticus* P-gp mRNA for P-glycoprotein, complete cds, DDBJ accession no.: AB699096
- ② *Oreochromis niloticus* pxr mRNA for pregnane X receptor, complete cds, DDBJ accession no.: AB699095

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二見 邦彦 (FUTAMI KUNIHICO)

研究者番号 : 00513459

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :