

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710082

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュ個体を用いた小胞体ストレス応答解析の環境毒性学への展開

研究課題名(英文)Expansion of the study of the endoplasmic reticulum stress using zebrafish into environmental toxicology

研究代表者

蔣池 勇太(Komoiike, Yuta)

東京女子医科大学・医学部・准講師

研究者番号：70386556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、環境毒性学の立場から、有害化学物質が生体を与える影響とその作用機序の解明を目指しており、特に小胞体の役割に注目している。本研究は、環境汚染物質による個体レベルでの小胞体ストレス応答について、その機序と毒性学的意義を明らかにすることを目的に行った。重要な海洋汚染物質の一つとして知られるTBTおよび小胞体ストレス誘導剤への曝露は、小胞体ストレス応答伝達経路を活性化した。ゼブラフィッシュを用いた研究により、曝露する物質の種類依存的に、異なる小胞体ストレス応答が器官特異的に観察された。また、TBTの神経毒性への小胞体ストレス応答の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of understanding the adverse effects of toxic chemical compounds on organisms and their underlying mechanisms from the environmental toxicological perspectives, we especially focus on the roles of the endoplasmic reticulum (ER). This study was conducted to solve the mechanisms and toxicological meanings of the ER stress response evoked by the exposure to environmental pollutants at an individual level. Exposure of the cells to tributyltin, known as an important marine pollutant, or the ER stress inducers activated the ER stress response transduction pathways. In the study using zebrafish as a model organism, various ER stress responses, differently evoked by the different types of substances, were observed in an organ-specific manner. It was also suggested that the involvement of the ER stress response in the neurotoxicity of TBT.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：環境毒性学 小胞体ストレス応答 ゼブラフィッシュ トリブチルスズ

## 1. 研究開始当初の背景

環境中の有害化学物質による健康被害の問題は、わが国を含む先進諸国では、社会的な環境意識の高まりとともに改善の方向に向かいつつあるが、いまだ根強い問題として残っている。一方で、発展途上国においては、急速な産業発展の負の側面として、現在進行中の問題である。したがって、有害化学物質が人体や生物に与える影響の評価法および対処法の確立は極めて重要である。我々は、環境毒性学の立場から、様々な有害化学物質が生体に与える影響と、その作用機序の解明を目指しており、近年、特に小胞体の役割に注目してきた。

小胞体は、細胞内カルシウムの貯蔵、新生タンパク質の折りたたみや脂質代謝など、様々な生理機能を有している。細胞が低酸素、虚血、栄養飢餓、熱ショックなどのストレスに晒されると、折りたたみ異常タンパク質の小胞体内への蓄積が起こる。これに反応して、細胞では「小胞体ストレス応答」と呼ばれる

タンパク質の翻訳抑制、異常タンパク質を折りたたみ直す小胞体シャペロンの発現誘導、異常タンパク質の分解促進、という一連の反応が起こり、～でストレスから回復できない場合はアポトーシスする。このように、小胞体は環境ストレス応答センサーとしても機能するが、環境毒性学の立場から小胞体および小胞体ストレス応答に着目した研究は少なく、環境汚染有害化学物質への曝露による小胞体ストレス応答の発生機序、シグナル伝達メカニズムやその毒性学的意義については十分な知見がなかった。

ゼブラフィッシュは、飼育が容易、多産で世代交代の周期が早い、卵生で体外発生する、胚が透明で観察が容易などの理由から、主に発生学、遺伝学のモデル動物として利用されてきた。本研究開始時には、それらに加えて、様々な生命科学の分野において盛んに利用されるようになってきていた。しかしながら、環境毒性学の分野では、ゼブラフィッシュの長所を生かした研究は行われていなかった。さらに、小胞体ストレス応答に関しては、ゼブラフィッシュ由来の培養細胞を用いた系での報告はあったものの(Garner et al., 2003)、ゼブラフィッシュ個体をモデル動物として用いた研究は、皆無であった。

## 2. 研究の目的

上記の諸背景を鑑み、ゼブラフィッシュをモデル動物として用い、環境汚染有害化学物質が惹起する個体レベルでの小胞体

ストレス応答について、その機序と毒性学的意義を明らかにすることを目的に我々は研究を行っている。そのために、本研究期間内に

- (1) 小胞体ストレス誘導剤への曝露により、ゼブラフィッシュ個体を用いて小胞体ストレスを検出できるか？
- (2) 小胞体ストレス誘導剤への曝露により、ゼブラフィッシュ個体において小胞体ストレス応答のマーカー遺伝子の発現パターンは変化するか？
- (3) 小胞体ストレス誘導剤への曝露により、ゼブラフィッシュ個体において小胞体ストレス伝達経路は活性化するか？
- (4) 環境汚染有害化学物質への曝露により、ゼブラフィッシュ個体において小胞体ストレスが惹起されるか？
- (5) 環境汚染有害化学物質への曝露により惹起される、ゼブラフィッシュ個体における小胞体ストレスの機序とその毒性学的意義は？

の各項目について検討・解明することを目的として、本研究を計画した。

## 3. 研究の方法

〔2. 研究の目的〕で示した各項目について、それぞれ以下の方法で検討を試みた。

- (1) 小胞体ストレス誘導剤への曝露により、ゼブラフィッシュ個体を用いて小胞体ストレスを検出できるか？

ゼブラフィッシュ胚および幼生に対して、実験的に広く用いられている代表的な小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン(Tm)、サブシガルジン(Tg)を曝露する。曝露開始時期、継続時間、濃度について、様々な組み合わせを試行し、*in situ* TUNEL法を用いて、小胞体ストレス応答の結果として惹起されるアポトーシスを個体レベルで評価する。また、小胞体ストレス伝達経路の解析に必要な抗体のゼブラフィッシュとの交差性について検討する。

- (2) 小胞体ストレス誘導剤への曝露により、ゼブラフィッシュ個体において小胞体ストレス応答のマーカー遺伝子の発現パターンは変化するか？

小胞体シャペロンであり、小胞体ストレスマーカーとして用いられる *hspa5*、*hsp90b1* および小胞体ストレス依存的アポトーシス因子である *chop* の発現量、パターンの変化を *in situ* hybridization (ISH)法により検出する。また、これらの遺伝子産物についても、免疫染色法によって同様に検討する。

(3) 小胞体ストレス誘導剤への曝露により、ゼブラフィッシュ個体において小胞体ストレス伝達経路は活性化するか？

Tm、Tg をゼブラフィッシュ胚および幼生に曝露し、小胞体ストレス伝達経路の活性化を検討する。Eif2ak3-Eif2s1 経路については、Eif2ak3、Eif2s1 タンパク質のリン酸化状態、Atf4b1 タンパク質の発現量、およびそれらの局在パターンを、曝露個体に対する免疫染色、曝露個体から抽出したタンパク質に対するウエスタンブロットティング(WB)により検討する。Ern1-Xbp1 経路については、Ern1 タンパク質のリン酸化状態を同様に、Xbp1 mRNA の特異的なスプライシングを、曝露個体から抽出した RNA に対する PCR により検討する。ATF6 経路については、切断され活性化した 50KDa ATF6 の存在を、曝露個体からタンパク質抽出し WB により検討する。また、ATF6 の細胞内局在の変化を、曝露個体に対する免疫染色およびオルガネラ染色により検討する。

(4) 環境汚染有害化学物質への曝露により、ゼブラフィッシュ個体において小胞体ストレスが惹起されるか？

ゼブラフィッシュ胚および幼生に対して、代表的な環境汚染物質であるカドミウム(CdCl<sub>2</sub>)、無機水銀(HgCl<sub>2</sub>)、トリブチルスズ(TBT)、鉛(PbCl<sub>2</sub>)をそれぞれ曝露し、*hspa5*、*hsp90b1* および *chop* の発現量、パターンの変化を ISH 法により検討する。また、これらの遺伝子産物についても、免疫染色より同様に検討する。

(5) 環境汚染有害化学物質への曝露により惹起される、ゼブラフィッシュ個体における小胞体ストレスの機序とその毒性的意義は？

これまでに行った一連の解析を、(4)で検討した環境汚染有害化学物質のうちで最も強く小胞体ストレス応答を惹起した物質を用いて行う。ゼブラフィッシュ胚および幼生に条件検討しつつ曝露し、上記の実験手法を用いて、小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現解析、小胞体ストレス応答伝達経路の活性化状態の検討を行う。

#### 4. 研究成果

ゼブラフィッシュ胚および幼生に対して、Tm、Tg の曝露開始時期、継続時間、曝露濃度について、様々な組み合わせを試行し、*in situ* TUNEL 法による評価を行ったところ、重篤な発生異常を生じる組み合わせでのみ TUNEL 陽性細胞が検出された。以降の解析のため、*hspa5*、*hsp90b1* および *chop* 遺伝子の発現レベル上昇

と異所的発現が、重篤な発生異常を伴わずに ISH 法により検出される条件を決定した。

また、小胞体ストレス伝達経路の解析に必要な抗体のゼブラフィッシュとの交差性について検討した。検討の迅速化のため、ゼブラフィッシュ成魚の尾鰭棘条由来培養細胞 BRF41 を用いた。Tm、Tg を BRF41 に曝露し、各伝達経路のタンパク質の発現レベルとリン酸化状態を、WB 法により観察した。結果、ゼブラフィッシュ小胞体シャペロンおよび小胞体ストレス伝達経路に関するタンパク質の多くが市販の抗体により検出可能であることを明らかにしたのみならず、培養細胞レベルではあるが、小胞体ストレス伝達経路の活性化の詳細を得た。

さらに、ゼブラフィッシュ胚および BRF41 に、代表的な環境汚染物質であるカドミウム(CdCl<sub>2</sub>)、無機水銀(HgCl<sub>2</sub>)、トリブチルスズ(TBT)、鉛(PbCl<sub>2</sub>)をそれぞれ曝露し、TBT が最も顕著に小胞体ストレスを惹起することを明らかにし、以降、環境汚染化学物質として TBT に注目することとした。

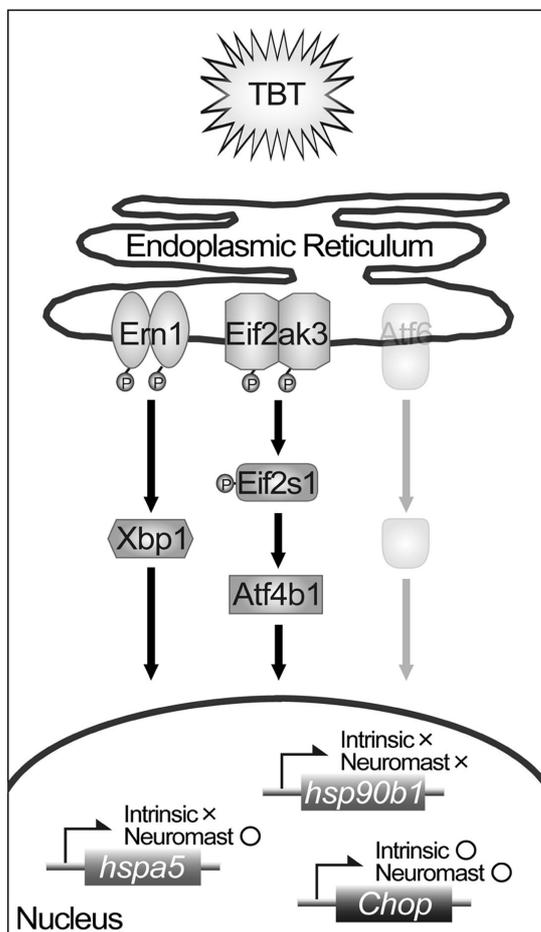
続いて、ゼブラフィッシュ胚に対し、Tm、Tg および TBT の曝露を行い、*hspa5*、*hsp90b1* および *chop* の転写産物の量の変化を ISH 法により検討した。その結果、小胞体ストレス応答は組織特異的に起こり、応答する組織は刺激の種類によって異なることを見出した。特に、TBT 曝露により、魚類の感覚受容器官である感丘で上記遺伝子の発現が亢進していた。*hspa5* は、タンパク質においても免疫染色法により同様の結果を得た。

また、BRF41 を用いて、Tm、Tg および TBT 曝露により惹起される小胞体ストレス伝達経路の活性化の詳細を経時的に観察した。Eif2ak3-Eif2s1 経路については、Eif2ak3 および Eif2s1 タンパク質のリン酸化、Atf4b1 タンパク質の発現亢進が検出され、活性化を確認した。Ern1-Xbp1 経路については、Ern1 タンパク質のリン酸化、Xbp1 mRNA の特異的なスプライシングが検出され、活性化を確認した。しかしながら、ATF6 経路については、ゼブラフィッシュと交差する抗体が販売されておらず、検討できていない。

さらに、ゼブラフィッシュ胚に対する免疫染色法では、GRP78 の発現亢進が免疫染色法により検出される曝露・染色条件を用いても、上記タンパク質のリン酸化型は検出不可能であった。それぞれのリン酸化タンパク質について複数の抗体および染色条件を用いて検討したが、いずれの場合にも検出不可能であった。

これまでの結果のまとめにより明らかとなった以下の3点について、原著論文として報告した。(Komoike and Matsuoka, 2013, *Aquat. Toxicol.*: 5.主な発表論文等〔雑誌論文〕の )

- (1) 重要な海洋汚染化学物質の一つとして知られるTBTおよび代表的な小胞体ストレス誘導剤であるTm、Tgの曝露により、小胞体ストレス応答の3つの経路のうち、Eif2ak3- Eif2s1経路とErn1-Xbp1経路が活性化される(図参照)。
- (2) ゼブラフィッシュ胚において、小胞体ストレス応答は器官特異的に惹起され、応答する器官および発現誘導される小胞体ストレスマーカー遺伝子の種類は、曝露する物質によって異なる。
- (3) TBT の曝露により、魚類の感覚受容器官である感丘で小胞体ストレスマーカーの発現が亢進することから、TBT の神経毒性への小胞体ストレス応答の関与が示唆される(同)。



図：ゼブラフィッシュ胚におけるTBTが惹起する小胞体ストレス応答

## 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)すべて査読あり

Shimajima, K., Shimada, S., Tamasaki, A., Akaboshi, S., Komoike, Y., Saito, A., Furukawa, T., Yamamoto, T.  
Novel compound heterozygous mutations of POLR3A revealed by whole-exome sequencing in a patient with hypomyelination.

*Brain Dev.* **36**, 315-321, 2014  
doi: 10.1016/j.braindev.2013.04.011.

Komoike, Y., Matsuoka, M.

Exposure to tributyltin induces endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in zebrafish.

*Aquat. Toxicol.* **142-143**, 221-229, 2013  
doi: 10.1016/j.aquatox.2013.08.017.

Komoike, Y., Matsuoka, M., Kosaki, K.

Potential teratogenicity of methimazole: Exposure of zebrafish embryos to methimazole causes similar developmental anomalies to human methimazole embryopathy.

*Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* **98**, 222-229, 2013  
doi: 10.1002/bdrb.21057.

Shimajima, K., Inoue, T., Imai, Y., Arai, Y., Komoike, Y., Sugawara, M., Fujita, T., Ideguchi, H., Yasumoto, S., Kanno, H., Hirose, S., Yamamoto, T.

Reduced PLP1 expression in induced pluripotent stem cells derived from a Pelizaeus-Merzbacher disease patient with a partial PLP1 duplication.

*J. Hum. Genet.* **57**, 580-586, 2012  
doi: 10.1038/jhg.2012.71.

Razaque, Md.A.<sup>†</sup>, Komoike, Y.<sup>†</sup>, Nishizawa T., Inai, K., Furutani, M., Higashinakagawa, T., Matsuoka, R.  
(<sup>†</sup>: equal contribution)

Characterization of a novel KRAS mutation identified in Noonan Syndrome.

*Am. J. Med. Genet. A* **158A**, 524-532,

2012  
doi: 10.1002/ajmg.a.34419.

Komoike, Y., Inamura, H., Matsuoka, M.  
Effects of salubrinal on cadmium-  
induced apoptosis in HK-2 human renal  
proximal tubular cells  
*Arch. Toxicol.* **86**, 37-44, 2012  
doi: 10.1007/s00204-011-0742-x.

[学会発表](計10件)

蔭池勇太, 松岡雅人, 小崎健次郎  
メチマゾールの催奇性の検討: メチマゾ  
ール性胎児障害とゼブラフィッシュモデ  
ルの類似性  
第53回日本先天異常学会学術集会  
2013年 大阪

蔭池勇太  
ゼブラフィッシュモデルの毒性学研究へ  
の展開  
第31回関西生殖発生毒性フォーラム  
2013年 大阪 (招待講演)

蔭池勇太, 松岡雅人  
トリブチルスズ曝露ゼブラフィッシュに  
おける小胞体ストレス応答の解析  
第83回日本衛生学会学術総会 2013年  
金沢

蔭池勇太  
ゼブラフィッシュを用いた小胞体スト  
レス応答解析モデルの確立  
第347回東京女子医科大学学会例会  
平成23年度山川寿子研究奨励賞受賞者  
発表 2013年 東京 (招待講演)

蔭池勇太, 松岡雅人  
ゼブラフィッシュを用いた小胞体スト  
レス応答の検討  
第24回日本産業衛生学会産業神経・行動  
学研究会 2012年 東京

蔭池勇太, 松岡雅人  
トリブチルスズが惹起する小胞体スト  
レス応答のゼブラフィッシュを用いた解析  
第7回臨床ストレス応答学会 2012年  
東京

Komoike, Y., Matsuoka, M.  
Cadmium induces ER stress and  
apoptosis in renal proximal tubular

cells: protection by salubrinal  
The 6th International congress of Asia  
society of toxicology. 2012, Sendai,  
Japan

蔭池勇太, 松岡雅人, 小崎健次郎  
ゼブラフィッシュを用いたメチマゾ  
ールの催奇性の検討  
第52回日本先天異常学会学術集会  
2012年 東京

蔭池勇太, 松岡雅人  
ゼブラフィッシュを用いたトリブチルス  
ズの惹起する小胞体ストレス応答の解析  
第82回日本衛生学会学術総会 2012年  
京都

蔭池勇太, 小崎健次郎  
メチマゾール曝露によるゼブラフィッ  
シュの発生異常  
第51回日本先天異常学会学術集会  
2011年 東京

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

[その他]  
ホームページ  
東京女子医科大学 研究業績データベース  
教員情報(蔭池)  
<http://gyoseki.twmu.ac.jp/twmhp/KgApp?kyoinId=ymdigbgoggk&keytype=3&keyword=komoike>  
東京女子医科大学 衛生学公衆衛生学(一)  
<http://www.twmu.ac.jp/Basic/hygiene1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蔭池 勇太(Yuta Komoike)  
東京女子医科大学・医学部・准講師  
研究者番号: 70386556

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし