

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：23701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659055

研究課題名(和文)防汚剤の汚損付着生物に対する付着防止機構の解明～付着生物核内受容体の性状解析～

研究課題名(英文)Characterization of nuclear receptors in sessile organisms

研究代表者

中西 剛 (NAKANISHI, Tsuyoshi)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50303988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：汚損付着生物として知られているシロスジフジツボおよびムラサキイガイのretinoid X receptor (RXR)のDNA結合領域(DBD)配列およびリガンド結合領域(LBD)配列の解明に成功した。ムラサキイガイRXR LBDではヒトと約80%の相同性が確認されたが、シロスジフジツボRXR LBDでは約60%程度の相同性しか有していなかった。リガンド応答性については、9-cisレチノイン酸に対してムラサキイガイRXRで反応が認められたが、有機スズに対してはどちらのRXRも反応しなかった。以上より、汚損付着生物のRXRはリガンド応答性が脊椎動物のものとは異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, we found that marine anti-biofouling organotin acts as powerful agonists for retinoid X receptor (RXR) in vertebrates and snails. So, we hypothesize that organotin's anti-biofouling effect may be involved in RXR signaling pathway. Here, we identified and characterized RXR from two typical sessile organisms, *Mytilus galloprovincialis* (MG) and *Balanus albicostatus* (BA). We cloned middle fragments of RXR from their tissues. The predicted RXR fragment proteins are characterized by the overall domain structure of a typical nuclear receptor. Amino acid alignments indicate that the ligand-binding domain (LBD) of MG and BA share about 80% and 60% sequence similarity with human RXR α , respectively. Consistent with this, RXR in MG can activate the transcription of reporter genes in response to stimulation by 9-cis retinoic acid, but not that in BA. Our findings suggest that structural and functional features of RXR may be much different among sessile organisms.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：環境毒性学 有機スズ 核内受容体 付着生物

1. 研究開始当初の背景

フジツボ類、イガイ類などの付着生物は、船舶や発電所の取水口に付着することで、船体抵抗の増加による燃費の増大や発電の際の冷却水取り込み、場合によっては発電機器自体にも悪影響を及ぼす。これらの付着生物による経済的損失は 4000 億円程度に上ると言われている。また多くのイガイ類や一部のフジツボ類は外来生物種であり、大量繁殖による在来の沿岸・内湾生態系への侵略問題もはらんでいる。このように付着生物は、海洋環境や海洋における経済活動にとっては汚損動物として取り扱われることが多いことから、その対策として付着面への付着を防止する防汚剤が用いられている。しかし防汚剤は代表的な海洋汚染物質の一つであり、その元来の効果から海洋生物に対する二次的な影響が懸念されてきた。このような背景のもと、トリブチルスズ (TBT) やトリフェニルスズ (TPT) などの有機スズは、生物付着防止に非常に有効であったことから 1970 年代以降は防汚剤の主流を占めていたが、近年、有機スズの難分解性に伴う環境蓄積性と、内分泌かく乱化学物質問題の顕在化によって取り上げられた一部の巻貝類に対するインポセックスが問題となり、国際海事機構の決議により 2008 年に全廃された。一方で、海洋無脊椎動物の中には、有機スズによってインポセックスのような異常を受ける動物種と受けない動物種が存在するが、付着防止作用に関してはほとんどの付着動物に対して良好な効果を示す。このことは、有機スズの付着防止作用がインポセックス誘導作用とは異なった作用機構を介している可能性を示唆している。そこで我々は、有機スズの汚損付着生物に対する付着防止作用 (主作用) と、海洋無脊椎動物の形態形成や繁殖能に与える作用 (副作用) を分離することで、海洋生物の生育環境に優しい防汚剤の新たな開発戦略を見出せるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

汚損付着生物の防汚剤として用いられてきた有機スズは、非汚損生物である一部の巻貝類の雌を極低濃度で雄化するインポセックスを引き起こすことから、その使用が禁止されている。一方で我々は、我々は TBT や TPT などの有機スズが核内受容体である retinoid X receptor (RXR) と peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ の強力な二重アゴニストとなることを見出した。さらに TBT でインポセックスが誘導される巻貝類においても、脊椎動物のようにリガンド依存的に反応する RXR が存在し、TBT によるインポセックスが RXR を介したものであることを明らかにした。有機スズの鋭敏な防汚作用にも核内受容体が関与している可能性が考えられるが、先述の付着生物における核内受容体の知見は皆無である。有機スズ

の付着防止作用に核内受容体が関わっているなら、汚損生物と非汚損生物の核内受容体の特性の違いを利用することで、対象汚損生物のみを排除できる防汚剤の開発が実現できるかもしれない。そこで本研究では、代表的な汚損付着生物の核内受容体を同定し、その性状解析を行うことで有機スズの防汚作用機構の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) RXR のクローニング

シロスジフジツボおよびムラサキイガイから RNA を抽出し、これを鋳型にして cDNA を合成した。RXR DNA 結合領域 (DBD) 配列の増幅は縮重プライマーを用いた PCR (Environ Sci Technol, 38:6271-6 (2004)) により行った。得られた配列のシーケンス解析を行った後、この配列を元にして 3' RACE 法により RXR LBD 配列の解明を行った。また、得られた配列情報を元に、他生物種の RXR 配列との比較を行った。

(2) リガンド結合実験

得られたシロスジフジツボ RXR LBD 配列を pGEX ベクター (GE ヘルスケアバイオサイエンス) に組み込み、大腸菌内でグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)-シロスジフジツボ RXR LBD 融合タンパクを発現するプラスミドを作成した。これを大腸菌に導入した大腸菌を培養し、融合タンパクを得た。

得られた GST 融合タンパクと [^{14}C]-TPT を 4 で 1 時間インキュベートした後、ハイドロキシアパタイト懸濁液を加え、さらに 30 分インキュベートした。14,500 rpm、5 分遠心後、沈殿を回収し、その放射活性を測定した。

(3) レポーターアッセイ

得られたシロスジフジツボおよびムラサキイガイ RXR LBD 配列を pM ベクター (clontech) に組み込み、ムラサキイガイ RXR のアゴニスト活性評価に使用するプラスミドを作成した。これを GAL4 DBD 認識配列 (UAS) を上流につないだルシフェラーゼレポータープラスミドとともにヒト胎盤細胞株である JEG-3 細胞に導入し、プラスミド導入 24 時間後に被験物質を 100 nM の濃度で処理した。被験物質処理 24 時間後に、ルミノメーターを用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) シロスジフジツボ、ムラサキイガイ RXR 配列の解明

シロスジフジツボおよびムラサキイガイ由来の cDNA を鋳型に縮重プライマーを用い

た PCR を行い、得られた産物のシーケンス解析を行ったところ、いずれも RXR 様の未知配列である事が確認された。

この配列を基に、3'RACE 法を行ったところ、シロスジフジツボにおいては、約 2,000 bp、ムラサキガイにおいては、約 1,000 bp の PCR 産物が得られた。これらの産物についても同様にシーケンス解析を行った結果、RXR 様の配列である事が確認され、これにより、シロスジフジツボ、ムラサキガイともに、RXR DBD 配列の一部および LBD 配列を解明することに成功した。なお、ムラサキガイについては、ヒト RXR の 432 番目に相当する部分がシステインになっているものと、セリンになっているものの 2 種類の配列が得られた。

得られた配列を他生物種の RXR と比較したところ、DBD 配列に関しては、ヒト RXR とムラサキガイ RXR の相同性は約 85 %、ヒト RXR とシロスジフジツボ RXR との相同性は約 75 % となった。一方で、LBD 配列に関しては、ヒト RXR とムラサキガイ RXR の相同性は約 80 %、ヒト RXR とシロスジフジツボ RXR との相同性は約 60 % となり、シロスジフジツボ RXR はヒト RXR とはあまり相同性が高くない結果となった(図 1)。

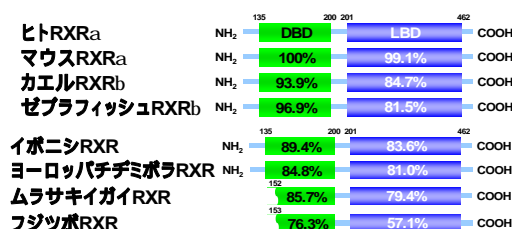


図 1. ムラサキガイ RXR、シロスジフジツボ RXR 配列と他生物種 RXR 配列の比較

さらに、ムラサキガイ RXR LBD、シロスジフジツボ RXR LBD がどの生物に近いかを推定する目的で、系統樹解析を行った。その結果、ムラサキガイは同じ二枚貝類であるカキと同じグループに配置された。このことから、ムラサキガイ RXR は巻貝類など、他の貝 RXR と類似した配列である事が示唆された。一方で、シロスジフジツボはどの生物種ともグループを形成しなかった。この結果は、汚損付着生物の RXR について研究が進んでいないことが一因であると考えられる。また、早い段階で枝分かれしていることから、シロスジフジツボ RXR は原始的な RXR である事が推定された。

(2) リガンド結合実験

解明したシロスジフジツボ RXR 配列を基に、シロスジフジツボ RXR LBD を発現するプラスミドを作成し、リガンド結合実験を行った。

基質には¹⁴C]-TPT を用いた。

検討の結果、¹⁴C]-TPT のシロスジフジツボ RXR LBD への結合は、非標識 TPT 濃度依存的に阻害された。この結果から、TPT はシロスジフジツボ RXR に結合する可能性が示唆された。

(3) シロスジフジツボおよびムラサキガイ RXR のアゴニスト活性評価

解明したシロスジフジツボおよびムラサキガイ RXR 配列を基に、シロスジフジツボ RXR LBD およびムラサキガイ RXR LBD を発現するプラスミドを作成し、それぞれの RXR アゴニスト活性評価を行った。ムラサキガイについては、ヒト RXR の 432 番目に相当する部分がシステイン(mgRXR-C)またはセリン(mgRXR-S)となっている。ヒト RXR の 432 番目のシステインは有機スズ化合物と RXR との結合に重要な部分であるため、mgRXR-C、mgRXR-S の両方について検討を行った。

ムラサキガイ RXR のアゴニスト活性評価を行った結果、mgRXR-C、mgRXR-S ともに脊椎動物 RXR においてアゴニストとなることが知られている 9-cis retinoic acid (9cRA) や合成 RXR アゴニストである LG100268 (LG) 処理によりルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。一方で、TPT 処理では mgRXR-C、mgRXR-S のどちらにおいてもルシフェラーゼ活性の上昇作用は認められなかった。この結果から、ムラサキガイ RXR は脊椎動物や巻貝類と同様に 9cRA がアゴニストとなることが明らかとなった。一方で、TPT は mgRXR-C、mgRXR-S のどちらに対してもアゴニスト活性を示さなかった。このことから、ムラサキガイ RXR は、有機スズ化合物がアゴニストとならない可能性が示唆された。また、ムラサキガイ RXR は巻貝類 RXR と配列は類似しているものの、リガンド応答性は異なると考えられる。

フジツボ RXR についても同様に検討を行った。しかし、9cRA、LG においてアゴニスト活性を示す結果は得られなかった。また、リガンド結合実験において結合する可能性が示唆された TPT もアゴニスト活性を示さなかった。この結果から、フジツボ RXR はリガンド応答性が脊椎動物のものとは大きく異なる可能性が示唆された。

(4) まとめ

ムラサキガイ RXR は他の貝類と類似した配列を有し、脊椎動物 RXR の内因性アゴニストである 9cRA に反応することが明らかとなった。一方で、フジツボ RXR 配列は、他のどの生物種の RXR に対しても 60 % 程度の相同性であり、データベース上に類似した配列を有する動物種は認められなかった。また、9cRA に対する反応性は認められなかった。有機スズ化合物である TPT に対してはどちらの RXR も反応しなかった。以上の結果から、汚損付

着生物のRXRはリガンド応答性が脊椎動物のものとは大きく異なる可能性が示唆された。

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6件)

1. Maki Tokumoto, Tomoaki Ohtsu, Shunji Imai, Akiko Honda, Hisamitsu Nagase, Masahiko Satoh: DNA microarray analysis of hepatic gene expression in mice exposed to cadmium for 30 days. *The Journal of Toxicological Sciences*. 38, 155-157, (2013). (査読有)
DOI:
<http://dx.doi.org/10.2131/jts.38.155>
2. Akiko Ido, Shinji Ishihara, Akira Kume, Tsuyoshi Nakanishi, Yasunari Monguchi, Hironao Sajiki, Hisamitsu Nagase: Practical method for PCB degradation using Pd/C-H₂-Mg system. *Chemosphere*. 90, 57-64 (2013). (査読有)
DOI:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.06.074>
3. Akira Onodera, Miyuki Tani, Toshimi Michigami, Masayo Yamagata, Kyong-Son Min, Keiichi Tanaka, Tsuyoshi Nakanishi, Tomoki Kimura, Norio Itoh: Role of megalin and the soluble form of its ligand RAP in Cd-metallothionein endocytosis and Cd-metallothionein-induced nephrotoxicity *in vivo*. *Toxicology Letters*. 212, 91-96 (2012). (査読有)
DOI:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.05.012>
4. Ryo Kobayashi, Tsuyoshi Nakanishi, Hisamitsu Nagase: Trichloroethylene enhances TCR-CD3-induced proliferation of CD8⁺ rather than CD4⁺T cells. *The Journal of Toxicological Sciences*. 37, 381-387 (2012). (査読有)
DOI:
<http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.381>
5. Kazuko Sawada, Daisuke Inoue, Yuichiro Wada, Kazunari Sei, Tsuyoshi Nakanishi, Michihiko Ike: Detection of retinoic acid receptor agonistic activity and identification of causative compounds in municipal wastewater treatment plants in Japan. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31, 307-315 (2012). (査読

有)

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1002/etc.741>

6. Shinji Ishihara, Akiko Ido, Yasunari Monguchi, Hisamitsu Nagase, Hironao Sajiki: Pd/C-catalyzed dechlorination of polychlorinated biphenyls under hydrogen gas-free conditions. *Journal of Hazardous Materials*. 229-230, 15-19, (2012). (査読有)
DOI:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.005>

[学会発表](計19件)

1. 佐藤友明、中西 剛、永瀬久光: 有機スズ化合物の樹状細胞機能修飾を介した免疫抑制作用について、日本薬学会第134年会(2014年3月30日、熊本)
2. 大塚佑基、青木 明、中西 剛、永瀬久光: TPTの成熟期雌性マウスにおける28日間反復経口投与毒性試験と卵巣機能による毒性発現修飾、日本薬学会第134年会(2014年3月30日、熊本)
3. Tsuyoshi Nakanishi: Structure activity relationships in organotin-induced toxicity via retinoid X receptor signaling pathway. *International Society of Trace Element Research in Humans 2013* (November 19, 2013, Tokyo)(招待講演)
4. 大塚佑基、青木 明、中西 剛、永瀬久光: トリフェニルスズの28日間反復経口投与毒性試験、メタルバイオサイエンス研究会2013(2013年9月26日、静岡)
5. 廣森洋平、中西 剛、永瀬久光: 核内受容体を介した有機スズ化合物の毒性、メタルバイオサイエンス研究会2013(2013年9月26日、静岡)(招待講演)
6. 中西 剛、廣森洋平、山口寿之、永瀬久光: 付着生物の核内受容体と有機スズ化合物の防汚作用との関係に関する研究、日本マリンエンジニアリング学会(JIME)海洋環境研究委員会第3回ワークショップ(2013年9月20日、神戸)
7. 桑山 隼、廣森洋平、西川淳一、中西 剛、永瀬久光: 酵母 two-hybrid 法を用いたヒトおよびマウス PXR アゴニスト活性評価系の構築、フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー(2013年9月14日、福岡)
8. Tsuyoshi Nakanishi, Youhei Hiromori, Jun-ichi Nishikawa, Hisamitsu Nagase: Structure-activity studies on the RXR agonist activity of organotins. *Eurotox 2013* (September 3, 2013, Interlaken)
9. Tomoki kimura, Akira Onodera, Takuomi

- Hosaka, Tsuyoshi Nakanishi, Norio Itoh, Masakazu Isobe: Chromium (VI)-induced Transformation is Enhanced by Zinc Deficiency in BALB/3T3 Clone A31-1-1 Cells. International Congress of Toxicology (July 2, 2013, Seoul)
10. Hiroki Yoshioka, Youhei Hiramori, Akira Aoki, Tomoki Kimura, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Hisamitsu Nagase, Tsuyoshi Nakanishi: Possible aryl hydrocarbon receptor-independent pathway 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced antiproliferative response in human breast cancer MCF-7 cells. International Congress of Toxicology 2013 (July 2, 2013, Seoul)
11. 中西 剛: 化学物質による免疫機能の老化 ~トリフェニルスズの胸腺萎縮機構解明を例に~、日本薬学会第133年会(2013年3月29日、横浜)(招待講演)
12. 廣森洋平、酒井紀行、小林 亮、上代大地、中西 剛、永瀬久光: トリフェニルスズの全身免疫系に対する加齢化促進作用の検討、第3回メタロミクス研究フォーラム(2012年8月30日、東京)
13. 中西 剛: 核内受容体としての有機スズ化合物とその毒性、第39回日本毒性学会学術年会(2012年7月17日、仙台)(招待講演)
14. 廣森洋平、酒井紀行、小林 亮、上代大地、中西 剛、永瀬久光: トリフェニルスズの全身免疫系に対する加齢化促進作用の検討、第39回日本毒性学会学術年会(2012年7月17日、仙台)
15. 小林亮、中西 剛、永瀬久光: トリクロロエチレンによるT細胞増殖亢進作用に関する検討、第39回日本毒性学会学術年会(2012年7月17日、仙台)
16. 青木 明、吉岡弘毅、廣森洋平、木村朋紀、藤井義明、中西 剛、永瀬久光: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinによるaryl hydrocarbon receptor非依存的な経路を介した乳癌細胞増殖抑制作用、第39回日本毒性学会学術年会(2012年7月17日、仙台)
17. 中西 剛: 核内受容体を介した有機スズ化合物の生体影響に関する研究、第23回日本微量元素学会学術集会(2012年7月6日、東京)(招待講演)
18. Tsuyoshi Nakanishi, Youhei Hiramori, Noriyuki Sakai, Ryo Kobayashi, Daichi Jodai, Hisamitsu Nagase: Triphenyltin promotes thymic aging via PPAR γ signaling pathway. Eurotox 2012 (June 19, 2012, Stockholm)
19. 中西 剛: PPAR β/δ リガンドのスクリーニング法、BIO tech 2012 アカデミックフォーラム(2012年4月26日、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]
ホームページ等
http://www.gifu-pu.ac.jp/research/research_eisei.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 剛 (NAKANISHI TSUYOSHI)
岐阜薬大・准教授
研究者番号: 50303988

(2) 研究分担者

永瀬久光 (NAGASE HISAMITSU)
岐阜薬大・教授
研究者番号: 40141395

(3) 連携研究者

廣森洋平 (HIROMORI YOUHEI)
金城学院大学・薬学部・助教
研究者番号: 60515956

山口寿之 (YAMAGUCHI TOSHIYUKI)
神奈川大学・理学部・特任教授
研究者番号: 10101106