

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：57403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21204

研究課題名(和文)海産生物に対する臭素化ダイオキシンの毒性リスク評価

研究課題名(英文) Effects of a naturally occurring dioxin, 1,3,7-Tribromodibenzo-p-dioxin on the mysid transcriptome

研究代表者

平野 将司 (Hirano, Masashi)

熊本高等専門学校・生物化学システム工学科・准教授

研究者番号：20554471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、海産無脊椎動物に対する臭素化ダイオキシン類(PBDDs)の毒性リスクを評価するため、海産生物から検出される低臭素化ダイオキシンの1,3,7-TriBDD、有機塩素化合物のTCDDおよびKanechlor-500、工業用化学物質であるビスフェノールAを海産甲殻類アミ類に暴露し、トランスクリプトーム解析した。その結果、1,3,7-TriBDDは有機塩素系化合物とは異なる毒性パスウェイを示す結果を得た。また、筋収縮に關与する遺伝子の抑制が濃度依存的に認められたことから、行動異常などを引き起こす可能性が予測され、臭素化ダイオキシンの海産生物への毒性に関する基礎情報を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Some of polybrominated dibenzo-p-dioxin congeners (PBDDs) including di-/triBDDs are ubiquitously detected in marine sediments and organisms. To understand the response to the PBDD exposure, we conducted RNA-seq analysis of the transcriptome in mysids treated with vehicle or 1,3,7-TriBDD. For comparison, the transcriptomes in mysids treated with TCDD, Kanechlor-500 (KC-500), and bisphenol A were also analyzed. The gene expression patterns showed that the transcriptome response to 1,3,7-TriBDD was different from those to chlorinated analogues, TCDD and KC-500. Heat map and K-mean cluster analyses revealed that myosin-related genes were markedly down-regulated by 1,3,7-TriBDD exposure, implying that 1,3,7-TriBDD might influence the behavior of mysid. These results suggest that PBDDs may have a potential to elicit adverse effects in the mysid through a distinct mechanism from other chemicals.

研究分野：環境生物化学

キーワード：臭素化ダイオキシン トランスクリプトーム 甲殻類 海産無脊椎動物 環境化学物質 生態毒性

1. 研究開始当初の背景

近年、ダイオキシン類の塩素が臭素に置換した臭素化ダイオキシン類 (polybrominated dibenzo-*p*-dioxins/dibenzofurans, PBDD/Fs) が沿岸域において広域的に存在することが示唆されている。バルト海沿岸域の魚介類を用いた PBDDs モニタリング調査では、人為起源とは明らかに異なる高濃度の低臭素化ダイオキシンが検出されており、最近の知見から、こうした低臭素化ダイオキシンは、海綿、紅藻、また関連バクテリアによって生合成される経路が明らかにされつつあり、天然起源の化合物とされている (Haglund et al., 2007. Environ. Sci. Technol.)。これら低臭素化ダイオキシン類は、特に二枚貝や甲殻類において高濃度で検出されていることから、海産生物への影響が懸念されるものの、毒性リスクまた発現機序については不明である。

PBDDs の毒性評価については、塩素化ダイオキシン類の毒性範囲とオーバーラップする結果が示されているが、評価された異性体はごく一部に限られている (Van den Berg et al., 2013. Toxicol. Sci.)。加えて、水圏生物への毒性影響に関する研究は、脊椎動物を対象としたものが多く、無脊椎動物に関する知見は少ない。

2. 研究の目的

本研究では、天然起源 PBDDs を蓄積する海産無脊椎動物を対象として、沿岸環境における PBDDs 毒性リスクを評価することを目的とした。具体的には、甲殻類を対象として海産生物で検出される低臭素化ダイオキシンの 1,3,7-tribromodibenzo-*p*-dioxin (1,3,7-TriBDD) に着目し、オミクス解析による有害性評価を中心に行った。

3. 研究の方法

(1) 環境汚染物質の暴露試験

実験には海産甲殻類アミ *Americamysis bahia* を用いた。ふ化 24 時間以内の幼生を飼育温度 25 ± 1 °C、明暗周期 16 h : 8 h の条件下で 7 日間飼育し、ふ化後 7 日齢を各曝露区 150 個体ずつ供試した。試験液の塩濃度は 25 ‰ に設定し、人工海水のみの対照区及び 0.1 %ジメチルスルフォキシド含有の溶媒対照区を設けた。暴露試験は、過去の甲殻類に対する毒性値を基に、1,3,7-TriBDD、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)、kanechlor-500 (KC-500) および bisphenol A (BPA) をそれぞれ初期濃度 25、3.2、50 及び 500 µg/L に設定し 48 時間曝露を行なった。また、1,3,7-TriBDD については、さらに 6.3、12.5、25 および 50 µg/L に設定した曝露を行なった。

(2) RNA-seq 解析

暴露個体から全 RNA を抽出し、mRNA 精製後、Ion Total RNA-seq kit を用いてシーケンシングライブラリーを作製した。断片化し、

emulsion PCR 後、Ion PGM で塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、CLC Genomics Workbench を用いて *de novo* アセンブリを行い、contig 配列を作成した。発現量解析は、RPKM 値を基に行った。

(3) バイオインフォマティクス解析

遺伝子発現解析の結果、発現変動がみられた遺伝子 (DEGs) について、バイオインフォマティクス解析を行った。パスウェイ解析、Gene Ontology 解析は DAVID、ネットワーク構築には ClueGO を用いた。

4. 研究成果

(1) 環境汚染物質による遺伝子発現の比較

本研究では、PBDDs 毒性リスクを評価するため、海産生物で検出される 1,3,7-TriBDD に着目し、次世代シーケンシングを用いた RNA-seq 解析から遺伝子発現プロファイルを調べた。1,3,7-TriBDD 暴露したアミで解析されたリード数は 255,661 で、平均リード長は 126 塩基であった。CLC Genomics Workbench による *de novo* アセンブリの結果、3,390 contig を得た。その他の環境汚染物質を暴露した個体についても同様の結果が得られた。そこで、発現変動した遺伝子について発現パターンをクラスター分析、また主成分分析したところ、1,3,7-TriBDD は有機塩素化合物とは異なる毒性プロファイルを示した (図 1)。また、BPA は 1,3,7-TriBDD、有機塩素化合物とも遺伝子発現プロファイルが異なっていた。

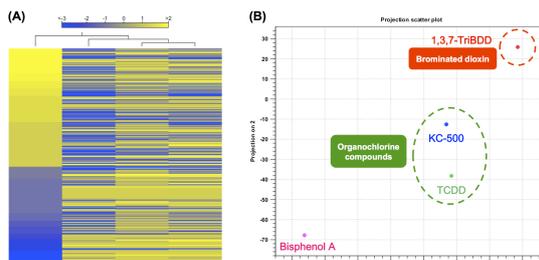


図 1 環境汚染物質を暴露したアミ類における遺伝子発現プロファイル

さらに、各化学物質による発現変動遺伝子を K-mean クラスタリングで 3 つのクラスター (変動なし・誘導・抑制) に分け、1,3,7-TriBDD によって発現抑制した遺伝子群に着目したところ、ミオシン重鎖の発現抑制が顕著であった。

(2) 1,3,7-TriBDD 濃度依存的応答

1,3,7-TriBDD は有機塩素系化合物や BPA とは異なる毒性プロファイルを示す結果を得たことから、次に濃度依存的な応答について調べるとともに、1,3,7-TriBDD 応答遺伝子群についてネットワーク解析による毒性発現機序を調査した。

まず、1,3,7-TriBDD 初期設定濃度を 4 濃度区設定し、暴露試験を実施した。これらを RNA-seq 解析に供し、遺伝子発現解析を行っ

たところ、6.3、12.5、25 および 50 $\mu\text{g/L}$ 曝露区においてそれぞれ 640、698、913 および 894 遺伝子の発現変動が得られた (図 2A)。低濃度曝露群では誘導された遺伝子数が多い結果を得たが、高濃度曝露群では抑制される遺伝子群が多くみられた。各曝露群で得られた DEGs のヒートマップを作成したところ、特にミオシン関連遺伝子群について顕著に濃度依存的な発現抑制が認められた (図 2B)。

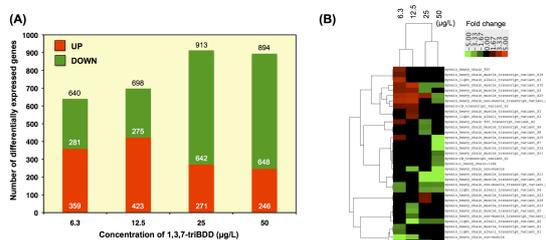


図 2 1,3,7-TriBDD に対する濃度依存的な遺伝子発現応答

次に、DEGs についてネットワーク解析を実施した。海産アミ類のデータベースは整備されていないため、ショウジョウバエのタンパク質間相互作用 (PPI) ネットワーク情報を基に ClueGO によって構築した。得られたモジュールについて Gene Ontology、パスウェイベースで情報を抽出したところ、シグナルトランスダクション、転写因子結合、TCA サイクル、ミオシン結合への影響が認められた (図 3)。

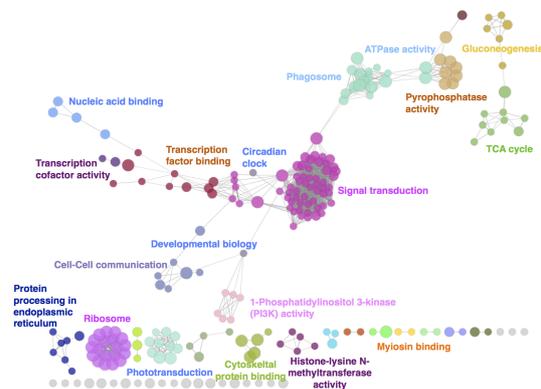


図 3 1,3,7-TriBDD 応答遺伝子群の生物学的ネットワーク

以上の結果から、低臭素化ダイオキシンの 1,3,7-TriBDD は有機塩素系化合物とは異なる毒性発現を示す結果を得た。また、筋収縮に関与する遺伝子の抑制が濃度依存的に認められたことから、行動異常などを引き起こす可能性が予測され、臭素化ダイオキシンの海産生物への毒性に関する基礎情報を得ることができた。

今後は、転写に関わる遺伝子群の発現変動がみられたことから、細胞内シグナルへの影響について詳細な解析を実施するとともに、他の臭素化ダイオキシン異性体の毒性を調べる予定である。

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)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① 内田雅也*, 平野将司*, 石橋弘志, 富永伸明, 有菌幸司 (2017) 海産甲殻類アミに対する 4-ノニルフェノール異性体の急性・亜慢性毒性影響. 環境毒性学会誌, 20, 59-68. 査読有. (*, Equally contributed)
- ② Hirakawa, S., Miyawaki, T., Hori, T., Kajiwara, J., Katsuki, S., Hirano, M., Yoshinouchi, Y., Iwata, H., Mitoma, C., Furue, M. (2017) Accumulation properties of polychlorinated biphenyl congeners in Yusho patients and prediction of their cytochrome P450-dependent metabolism by in silico analysis. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 査読有.
doi: 10.1007/s11356-017-9498-z
- ③ Nguyen, H.T., Tsuchiya, M.C., Yoo, J., Iida, M., Agusa, T., Hirano, M., Kim, E.Y., Miyazaki, T., Nose, M., Iwata, H. (2017) Strain differences in the proteome of dioxin-sensitive and dioxin-resistant mice treated with 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-*p*-dioxin. Arch. Toxicol., 91(4), 1763-1782. 査読有.
doi: 10.1007/s00204-016-1834-4
- ④ Uchida, M.*, Hirano, M.*, Ishibashi, H., Kobayashi, J., Kagami, Y., Koyanagi, A., Kusano, T., Koga, M., Arizono K. (2016) Transcriptional response of mysid crustacean, *Americamysis bahia*, is affected by subchronic exposure to nonylphenol. Ecotoxicology and Environmental Safety. 360-365. 査読有. (*, Equally contributed)
doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.07.037
- ⑤ Iida, M., Fujii, S., Uchida, M., Nakamura, H., Kagami, Y., Agusa, T., Hirano, M., Bak, S.M., Kim, E.Y., Iwata, H. (2016) Identification of aryl hydrocarbon receptor signaling pathways altered in TCDD-treated red seabream embryos by transcriptome analysis. Aquat. Toxicol., 177, 156-170. 査読有.
doi: 10.1016/j.aquatox.2016.05.014
- ⑥ Hwang JH, Park JY, Park HJ, Bak SM, Hirano M, Iwata H, Park YS, Kim EY. (2016) Ecological factors drive natural selection pressure of avian aryl hydrocarbon receptor 1 genotypes. Scientific Reports, 27526. 査読有.
doi: 10.1038/srep27526

- ⑦ Kim, I.S., Hwang, J.H., Hirano, M., Iwata, H., Kim, E.Y. (2016) In vitro and in silico evaluation of transactivation potencies of avian AHR1 and AHR2 by endogenous ligands: implications for the physiological role of avian AHR2. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.*, 187, 1-9. 査読有.
doi: 10.1016/j.cbpc.2016.03.011
- ⑧ Yoo, J., Hirano, M., Mizukawa, H., Nomiyama, K., Agusa, T., Kim, E.Y., Tanabe, S., Iwata, H. (2015) *In vitro* and *in silico* analyses for predicting hepatic cytochrome P450-dependent metabolic potencies of polychlorinated biphenyls in the Baikal seal. *Environ. Sci. Technol.*, 49(24), 14588-14596. 査読有.
doi: 10.1021/acs.est.5b03890

[学会発表] (計 2 件)

- ① Hirano, M., Uchida, M., Kusano, T., Arizono, A., Iwata, H. Effect of a naturally synthesized dioxin, 1,3,7-tribromodibenzo-*p*-dioxin on the mysid transcriptome. 19th Pollutant Responses in Marine Organisms, 2017.
- ② Hirano, M., Ohno, Y., Iwata, H. In silico and in vitro screening of the effects of PPCPs on mysid ecdysteroid receptor signaling. 19th Pollutant Responses in Marine Organisms, 2017.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 将司 (HIRANO, Masashi)
熊本高等専門学校・生物化学システム工学
科・准教授
研究者番号 : 20554471