

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24年5月28日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580250

研究課題名（和文）：天然化合物を用いたアオコ毒マイクロシスチンの毒性制御

研究課題名（英文）：Chemoprevention for the microcystin-LR poisoning by natural compounds

研究代表者

小松 正治 (KOMATSU MASAHARU)

鹿児島大学・水産学部・准教授

研究者番号：30325815

研究成果の概要（和文）：

マイクロシスチン-LR (MCLR) が示す細胞毒性と細胞増殖活性のバランス制御に p53 が重要な機能を果たしていることを明らかにした。また、柑橘類のフラボノイドの一種ナリンジンが、OATP1B1/1B3 を介した MCLR の細胞内取り込みを阻害することにより、細胞毒性の発現を抑制することを明らかにした。また、アメリカオオアカイカ由来のセラミドアミノエチルホスホン酸および海綿から単離したステリフェリン A に MCLR の細胞毒性を減弱する効果があることを突き止めた。

研究成果の概要（英文）：

This study demonstrates the importance of p53 in the regulation of cell fate after exposure to microcystin-LR. Our results suggest that, under conditions of p53 inactivation (including *p53* mutation), chronic exposure to low doses of microcystin-LR may lead to cell proliferation through activation of Akt signaling. In addition, several compounds including naringin from grapefruit, stelliferin A from sponge, and ceramide aminoethylphosphonate from *Hunboldt* squid possessed the potent attenuation activity to the cytotoxicity of microcystin-LR. Results of this study may contribute to the development of chemoprevention and chemotherapeutic approaches to microcystin-LR poisoning.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：マイクロシスチン LR、p53、肝毒性、発がん、OATP1B1、OATP1B3、化学予防、

1. 研究開始当初の背景

| 藍藻類（主にミクロキステス属）が産生す

る最も代表的で強力な毒物としてマイクロシスチン LR (MCLR) が知られている。MCLR は、オクタノール/水分係数 -2.9 の比較的水溶性の化合物であり、アミノ酸7個からなる環状ペプチド構造をとり、2番目と4番目のアミノ酸がそれぞれロイシン(L)とアルギニン(R)から構成されている。MCLRの主な毒性は、タンパク質脱リン酸化酵素PP1およびPP2Aを特異的に阻害することを介して動物に急性の肝機能不全を誘発することである。腹腔投与でその半数致死量(LD₅₀)値はマウスの体重1kgあたり32.5-100 μ gであり、シアン化カリウムの20倍以上の強い毒性をもつ。また慢性的な曝露により肝臓がんを誘発する発がんプロモーター(IARCグループ2B)でもある。しかし、これまでその肝臓特異的な毒性発現機構には不明な点が多かったが、これまでに我々は、ヒト肝細胞の類洞膜に特異的に発現しているOATP1B1及びOATP1B3が、MCLRの肝細胞特異的な取り込みおよび肝細胞特異的な毒性発現に重要な機能を果たし、部分的に活性化種による酸化ストレスが毒性発現に関与することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

富栄養化しやすい湖沼水を水源とする浄水施設をもつ地域において、藍藻類の大発生であるアオコの除去は安全な水の供給のための重要課題である。現在の我が国の浄水過程(沈殿、急速濾過、塩素消毒)では必ずしも完全にMCLRを分解・除去が可能とは言えないことから、MCLRの水道水への混入を避けるためにアオコが発生した原水は浄水に利用しないように自治体レベルで注意している。また、貝類による生物濃縮を介して起こるヒトの健康被害も危惧されている。そこで我が国において有毒藍藻類あるいは藍藻類由来の有毒化合物の中毒予防対策、並びにその治療法を確立する必要があり、有毒藍藻類がもつ毒性についての知識を得るための詳細な毒性学的実験研究が急務であり、MCLRの毒性発現並びに解毒の分子機序を明らかにし、天然化合物を利用して分子標的を絞った効果的な中毒の化学予防法薬並びに治療法薬の開発をめざす。

3. 研究の方法

これまでにMCLRの肝臓選択毒性の発現にOATP1B1とOATP1B3が絶対的に関わっていることを明らかにしてきた。

本研究では、以下の3種の解析を実施した。

(1) 発がんプロモーションに関わる細胞内シグナリングを細胞の運命の振り分け役で転写調節因子のp53を中心に解析した。すなわち、MCLRの輸送責任分子であるOATP1B3をヒト胎児腎臓由来の細胞株HEK293細胞に強制発現さ

せたHEK293-OATP1B3細胞を実験に供した。MCLRの細胞毒性はMTT法を用いて評価した。各種タンパク質のリン酸化は、イムノブロット法を用いて解析した。

(2) 細胞内の薬物代謝並びに細胞外排出機構の違いにその原因を探った。マイクロシスチンLRは、薬物代謝の第II相反応に属すグルタチオン抱合化を受けることが知られているが、グルタチオン合成における律速反応を司る γ -グルタミルシステイン合成酵素(γ GCS)の阻害剤であるブチオニンスルフォキシミン(BSO)を24時間前処理したHEK293-OATP1B3細胞において、未処理の細胞と比べてマイクロシスチンLRの細胞毒性に全く変化が認められなかった。これは使用する細胞腫による差異であることが示唆される。そこで、薬物代謝の第I相の酵素に着目して、マイクロシスチンLRの解毒機構の解析を試みた。

(3) MCLR中毒の化学予防法の確立をめざし、MCLRの細胞毒性を抑制する天然物由来の化合物スクリーニングを実施した。

本研究の概念を図1に示す。

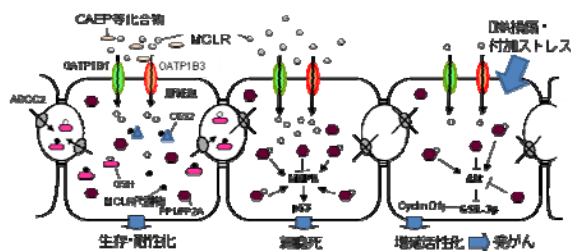


図1. MCLRの細胞毒性の評価系の概念図

4. 研究成果

(1) MCLRの肝p53阻害剤であるpifithrin- α 並びにp53 mRNAをpSuppressor p53 shRNAプラスミドを一過性にトランスフェクトしてノックダウンし、MCLRの細胞毒性を評価した。解析の結果、以下の点が明らかになった。72時間曝露においてアポトーシスを誘発する致死濃度である50nMのMCLRを24時間曝露したHEK293-OATP1B3細胞は、p53が安定化し、その細胞内蓄積量が増大した。

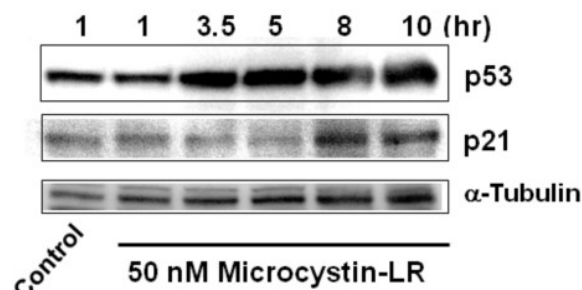


図2. MCLR曝露で誘導されるp21の発現とp53の安定化

そして、p53のリン酸化が亢進して転写因子として活性化し、その転写因子活性により細

胞周期を停止させる機能をもつp21が発現上昇した。また、同時に細胞増殖を活性化する機能をもつAKTがリン酸化し、活性化した。次にp53の活性阻害剤であるpifithrin- α の作用ならびにp53 mRNAの発現をノックダウンした結果、MCLRの細胞毒性が緩和された。

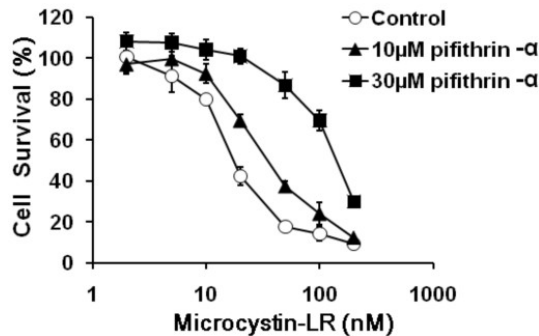


図3. p53阻害剤によるMCLRの細胞毒性の抑制

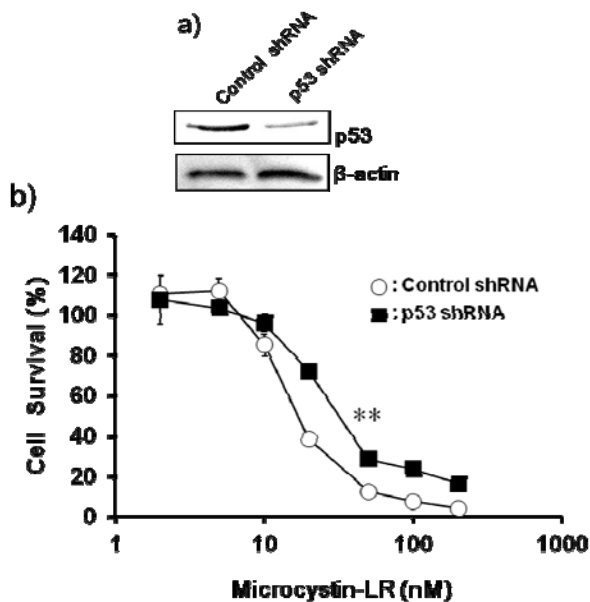


図4. p53 mRNAのノックダウンによるMCLRに対する感受性の低下 (a, b)

以上の結果からMCLR 応答性の細胞死シグナルと生存シグナルのバランス制御にp53が関与していることが明らかになった。

(2) 化合物のエステル結合ならびにアミド結合を切断するカルボキシルエステラーゼ2 (CES2) に着目した。CES2遺伝子を安定に強制発現するHEK293-OATP1B3/CES2細胞を作成し、マイクロシスチンLRに対する感受性をMTTアッセイで解析した結果、CES2を強制発現することによりマイクロシスチンLRに対する感受性が部分的に抑制された。また、マイクロシスチン-アガロースを用いた解析結果から、マイクロシスチンLRがCES2と相互作用している可能性が示唆された。

以上の結果から、マイクロシスチンLRはCES2により弱毒化される可能性が示唆された。

(3) 柑橘類の苦み成分でフラボノイドの一種であるナリンジンは、活性酸素の消去ならびにOATP1B1およびOATP1B3を介したマイクロシスチン-LRの細胞内取り込みを阻害することにより、細胞毒性の発現を抑制することを明らかにした。また、アメリカオオアカカ由来のセラミド誘導体セラミドアミノエチルホスホン酸、奄美大島産のある種の海綿から単離したトリテルペノイドの一種であるステリフェリンAにマイクロシスチン-LRの細胞毒性を減弱する効果があることも突き止めた。

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 8件)

- ① E. Miyahara, M. Nishie, S. Takumi, H. Miyahara, J. Nishi, K. Yoshiie, H. Oda, M. Takeuchi, M. Komatsu, K. Aoyama, M. Horiuchi, and T. Takeuchi. Environmental mutagens may be implicated in emergence of drug-resistant microbes. *FEMS Microbiology Letters*, 317, 109-116, 2011. 査読有り
- ② M. Choudhury, T. Oku, S. Yamada, M. Komatsu, K. Kudoh, T. Itakura, and S. Ando. Isolation and characterization of some novel genes of apolipoprotein A-I family in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Central European Journal of Biology*, 6, 545-557, 2011. 査読有り
- ③ T. Kato, H. Kawaguchi, N. Miyoshi, K. Aoyama, M. Komatsu, M. Horiuchi, H. Yoshida, and T. Takeuchi. Effect of habitual exercise on renal carcinogenesis by ferric nitrilotriacetate. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 2011, 16, 232-238. 査読有り
- ④ S. Takumi, M. Komatsu, T. Furukawa, R. Ikeda, T. Sumizawa, H. Akenaga, Y. Maeda, K. Aoyama, K. Arizono, S. Ando, and T. Takeuchi. p53 plays an important role in cell fate determination after exposure to microcystin-LR. *Environmental Health Perspectives*, 118, 1292-1298, 2010. 査読有り
- ⑤ M. Hirashima, K. Tsuda, T. Hamada, H. Okamura, T. Furukawa, S. Akiyama, Y. Tajitsu, R. Ikeda, M. Komatsu, M. Doe, Y. Morimoto, M. Shiro, R. W. M. van Soest, K. Takemura and T. Iwagawa. Cytotoxic

Isomalabaricane Derivatives and a Monocyclic Triterpene Glycoside from the Sponge *Rhabdastrella globostellata*. *Journal of Natural Products*, 73, 1512-1518, 2010. 査読有り

- ⑥ T. Oku, A. Sugawara, M. Choudhury, M. Komatsu, S. Yamada, and S. Ando. Lipid and fatty acid compositions differentiate between wild and cultured Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Food Chemistry*, 115, 436-440, 2009. 査読有り
- ⑦ M. Choudhury, S. Yamada, M. Komatsu, H. Kishimura, and S. Ando. Homologue of mammalian apolipoprotein A-II in nonmammalian vertebrates. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 41, 370-378, 2009. 査読有り
- ⑧ K. Izumo, M. Horiuchi, M. Komatsu, K. Aoyama, K. Bandow, T. Matsuguchi, M. Takeuchi, T. Takeuchi. Dehydroepiandrosterone increased oxidative stress in a human cell line during differentiation. *Free Radical Research*, 43, 922-931, 2009. 査読有り

[学会発表] (計 24 件)

- ① 竹下一輝, 池田真子, 池田麻美, 小松正治, 山田章二, 塩崎一弘. 新規メダカシアリダーゼolNeu3a、olNeu3bのクローニングと性状解析. 平成23年度日本水産学会九州支部会大会. 平成24年1月28日. 鹿児島市
- ② 塩崎一弘, 前川継徳, 市野隼人, 中村好成, 波江野皆樹, 小松正治, 山田章二. 鹿児島近海に生息するサメ類由来の健康機能性ペプチド探索. 平成23年度日本水産学会九州支部会大会. 平成24年1月28日. 鹿児島市
- ③ 小松正治. 水圏生物毒と公衆衛生. 日本水産学会九州支部会 平成23年度シンポジウム. 平成23年11月26日. 鹿児島市
- ④ 南謙太郎, 古川龍彦, 山本雅達, 西澤由紀彦, 田畑祥, 池田龍二, 小松正治, 秋山伸一. Gemcitabine耐性膵癌細胞CNT1とRRM1の耐性機構への関与. 第70回 日本癌学会学術総会. 平成23年10月4日. 愛知県名古屋市
- ⑤ 栗本隆史, 嶋佑介, 杉山靖正, 塩崎一弘, 内匠正太, 小松正治. オカダ酸の毒性発現における臓器別感受性の差異に関する研究. 平成23年度 日本水産学会秋季大会. 平成23年9月29日. 長崎市
- ⑥ 嶋佑介, 栗本隆史, 杉山靖正, 塩崎一弘, 羽生瑤実, 朴虎東, 内匠正太, 小松正治. 藍藻毒Microcystin-LRの細胞毒性に対す

るNaringinの抑制効果に関する研究. 平成23年度 日本水産学会秋季大会. 平成23年9月29日. 長崎市

- ⑦ 塩崎一弘, 竹下一輝, 池田真子, 小松正治, 山田章二, 山口壹範, 宮城妙子. メダカシアリダーゼNeu3のクローニングおよび性状解析. 第84回日本生化学会大会. 平成23年9月22日. 京都市
- ⑧ 嶋佑介, 塩崎一弘, 杉山靖正, 内匠正太, 古川龍彦, 小松正治. ゼブラフィッシュ胚およびOATP1B1またはOATP1B3発現細胞を用いたマイクロシスチンの毒性評価. 第5回 トランスポーター研究会九州支部会. 平成23年9月17日. 宮崎市
- ⑨ 山本雅達, 南謙太郎, 西澤由紀彦, 池田龍二, 小松正治, 古川龍彦. Gemcitabine耐性でのSLC28, 29とRRM1の役割. 第5回 トランスポーター研究会九州支部会. 平成23年9月17日. 宮崎市
- ⑩ 南謙太郎, 古川龍彦, 山本雅達, 池田龍二, 小松正治, 田畑祥, 秋山伸一. CNT1とRRM1の発現変化がGemcitabine耐性膵癌細胞株の耐性を担っている. 日本がん分子標的治療学会. 平成23年6月24日. 福岡県北九州市
- ⑪ T. Furukawa, K. Minami, M. Yamamoto, R. Ikeda, M. Komatsu. CNT1 and RRM1 are involve in the Gemcitabine resistance mechanism in the pancreatic Gemcitabine. 第33回 日本分子生物学会年会 第83回 日本生化学会大会 合同大会. 平成22年12月9日. 兵庫県神戸市
- ⑫ 内匠正太, 小松正治, 古川龍彦, 橋本満, 有菌幸司, 青山公治, 竹内 亨. カルボキシルエステラーゼ2 によるマイクロシスチンLRの解毒機構の解析. 第82回 日本生化学会大会. 平成22年10月23日. 兵庫県神戸市
- ⑬ 南謙太郎, 古川龍彦, 山本雅達, 池田龍二, 小松正治, 田畑祥, 車暁芳, 新里能成, 秋山伸一. Gemcitabine 耐性膵癌細胞 MGEM6 の CNT1 と RRM1 の発現変化は耐性と関連している. 第69回 日本癌学会学術総会. 平成22年9月23日. 大阪市
- ⑭ 下野泰, 堂免康人, 内匠正太, 青山公治, 小松正治. 赤潮毒プレバトキシンの神経毒性発現に与える細胞外ナトリウムイオン濃度の影響. 平成22年度 日本水産学会秋季大会. 平成22年9月22日. 京都市
- ⑮ 古川龍彦, 南謙太郎, 池田龍二, 小松正治, 山本雅達, 田畑祥, 秋山伸一. ゲムシタピン耐性膵がん細胞での機構の解析. 日本がん分子標的治療学会 第14回学術集会. 平成22年7月8日. 東京都江戸川区

- ⑩ 前田雄太、内匠正太、青山公治、安藤清一、小松正治。下痢性貝毒オカダ酸の肝臓選択毒性の可能性。平成 22 年度日本水産学会春季大会。平成 22 年 3 月 29 日。神奈川県藤沢市
- ⑪ 内匠正太、古川龍彦、安藤清一、有菌幸司、青山公治、竹内亨、小松正治。藍藻毒マイクロシスチン-LR の発がんプロモーター活性の発現機序—1。平成 22 年度日本水産学会春季大会。平成 22 年 3 月 28 日。神奈川県藤沢市
- ⑫ 小松正治、内匠正太、古川龍彦、池田龍二、住澤知之、明永ひとみ、前田雄太、安藤清一、青山公治、竹内亨。藍藻毒マイクロシスチン-LR の発がんプロモーター活性の発現機序—2。平成 22 年度日本水産学会春季大会。平成 22 年 3 月 28 日。神奈川県藤沢市
- ⑬ 内匠正太、安藤清一、古川龍彦、橋本満、有菌幸司、青山公治、竹内亨、小松正治。藍藻毒マイクロシスチン LR のカルボキシシルエステラーゼ 2 による弱毒化。平成 22 年度日本水産学会春季大会。平成 22 年 3 月 27 日。神奈川県藤沢市
- ⑭ 小松正治、近藤史典、有村卓、利光幸恵、前田雄太、石川学、吉川毅、住澤知之、濱田季之、安藤清一。赤潮毒プレバトキシシン中毒に対する対処法の検討。平成 22 年度日本水産学会春季大会。平成 22 年 3 月 27 日。神奈川県藤沢市
- ⑮ 小松正治、内匠正太、古川龍彦、安藤清一、青山公治、竹内亨。マイクロシスチンLRの肝臓選択毒性におけるOATP1B1またはOATP1B3並びにp53の貢献。トランスポーター研究会 第3回九州部会（シンポジウム）。平成 21 年 11 月 21 日。鹿児島市
- ⑯ 前田雄太、小松正治、内匠正太、古川龍彦、安藤清一、青山公治、竹内亨。OATP1B3 を介したオカダ酸の肝毒性の発現。トランスポーター研究会 第3回九州部会（シンポジウム）。平成 21 年 11 月 21 日。鹿児島市
- ⑰ 内匠正太、小松正治、安藤清一、古川龍彦、橋本満、有菌幸司、青山公治、竹内亨。カルボキシシルエステラーゼ 2 によるマイクロシスチン LR の細胞毒性抑制効果。トランスポーター研究会 第3回九州部会（シンポジウム）。平成 21 年 11 月 21 日。鹿児島市
- ⑱ 古川龍彦、池田龍二、小松正治、秋山伸一。Gemcitabine 耐性細胞でのCNT1、RRM1の発現変化。第68回日本癌学会学術総会。平成 21 年 10 月 3 日。神奈川県横浜市

〔図書〕（計 1 件）

- ① M. Komatsu, S. Ando, S. Hayashi, T. Furukawa, S. Takumi, K. Aoyama, and T. Takeuchi. A case study of intact vitellogenin isolated from the plasma of wild silver Japanese eel (*Anguilla japonica*). Jackson E. Rathbond ed. Handbook of Lipoprotein Research. Nova Science Publishers, Inc. 195-205. 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 正治 (KOMATSU MASAHARU)
鹿児島大学・水産学部・准教授
研究者番号：30325815

(2) 研究分担者

安藤 清一 (ANDO SEIICHI)
名寄市立大学・栄養学科・教授
研究者番号：80131986

(3) 連携研究者

古川 龍彦 (FURUKAWA TATSUHIKO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：40219100