

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00560

研究課題名(和文) 巻貝類において発現する核内受容体の機能解析および環境化学物質に対する応答性評価

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of anti-fouling effects organotin compounds focused on nuclear receptors

研究代表者

廣森 洋平 (Hiromori, Youhei)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手

研究者番号：60515956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：エイ、ウミヤツメ、クロアシカサガイからPPAR をクローニングし、その性状解析を行った。クロアシカサガイPPAR はRosiglitazone、トリブチルスズ(TBT)、トリフェニルスズ(TPT)いずれの化合物に対しても反応しなかった。一方で、エイ、ウミヤツメPPAR においては、Rosiglitazoneのアゴニスト活性はヒトPPAR よりも弱かったのに対し、TBT、TPTのアゴニスト活性はヒトPPAR と同等以上であった。これらの結果から、水生生物において有機スズ化合物のPPAR を介した作用は、チアゾリジン化合物よりも強く表れる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We cloned a short fragment of the PPAR gamma LBD from *Leucoraja erinacea*, *Petromyzon marinus* and *Patella depressa* (LePPAR, PmPPAR and PdPPAR) and investigated the ligand activity of Rosiglitazone, TBT and TPT on the LePPAR, PmPPAR and PdPPAR. Treatment with rosiglitazone, TBT and TPT had no effects on the PdPPAR. Although the agonist activity of Rosiglitazone for LePPAR and PmPPAR is lower than that for human PPAR, the agonist activity of TBT and TPT for LePPAR and PmPPAR is higher than that for human PPAR. The results suggest that the effects of TBT and TPT via PPAR in aquatic species were higher than that in human.

研究分野：分子毒性学

キーワード：有機スズ化合物 PPAR

## 1. 研究開始当初の背景

船底防汚剤などとして用いられてきたトリブチルスズ(TBT)およびトリフェニルスズ(TPT)などの有機スズ化合物は、一部の巻貝類の雌に雄性生殖器官を発生させるインポセックスと呼ばれる内分泌攪乱作用を示す。当時、内分泌攪乱作用の標的分子としては、専らエストロゲン受容体(ER)、アンドロゲン受容体(AR)および甲状腺ホルモン受容体(TR)に焦点が絞られていたが、有機スズ化合物はいずれの受容体にも作用しないことから、核内受容体以外の標的分子を介して作用するものと考えられてきた。このような背景のもと応募者らは、TBT、TPTなど有機スズ化合物が核内受容体であるレチノイドX受容体(RXR)および peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )の強力な2重アゴニストとして機能することを明らかにした(Chem Biol Interact, 180:238-244, 2009, Mol Pharmacol, 67, 766-774, 2005, J. Clin Endocrinol Metab, 87, 2830-2837, 2002)。また我々および西川らのグループは、インポセックスが誘導される巻貝類のイボニシ(Thais clavigera)やヨーロッパチヂミボラ(Nucella lapillus)には、脊椎動物と同様に9-cisレチノイン酸(9cRA)や有機スズ化合物に反応するRXRが存在し、さらに有機スズ化合物によるこれら巻貝類のインポセックスにはRXRが関与していることを見いだした(Environ Sci Technol, 38:6271, 2004, Aquat Toxicol, 85, 57-66, 2007)。

その一方で、イボニシではTBT、TPTの両方でインポセックスが誘導されるのに対し、ヨーロッパチヂミボラにおいてはTBTでインポセックスが誘導されるがTPTでは誘導されないことが以前から知られている。この結果は、同じ巻貝類でも有機スズ化合物に対する反応性が異なる事を示している。さらに応募者は、TPTがヨーロッパチヂミボラのRXRに対してもTBTと同じ程度の結合性を有することを見いだした。有機スズ化合物による巻貝類のインポセックスは、RXRを介した作用によるものという結論で決着した感があるが、応募者らの結果は有機スズ化合物による巻貝類のインポセックスの誘導にはRXR以外の要因が関与している可能性を強く示唆している。

## 2. 研究の目的

応募者らは巻貝類の雌を雄化する内分泌攪乱作用を持つ有機スズ化合物が、核内受容体であるRXRおよびPPAR $\gamma$ のアゴニストとして機能することを見だし、巻貝類に対する内分泌攪乱作用にRXRが関与している事を明らかにした。しかし、巻貝類に対する内分泌攪乱作用には、RXRのみで説明できない部分があり、他の因子が関与している可能性が示唆されている。したがって、巻貝類における有機スズ化合物の作用メカニズム解明には、

PPAR $\gamma$ などのRXR以外の核内受容体の機能についても解析する必要があると考えられる。そこで本研究では、水生生物における核内受容体の機能解析を行うと共に、環境化学物質に対するこれらの反応性についても検討することで、環境化学物質の水生生物に対する生体影響を予測するための分子基盤を構築する。

## 3. 研究の方法

対象生物種をエイの一種(Leucoraja erinacea)、ウミヤツメ(Petromyzon marinus)、クロアシカサガイ(Patella depressa)とし、これらの動物種からそれぞれPPAR $\gamma$  ligand binding domain (PPAR $\gamma$  LBD)をクローニングし、ヒトPPAR $\gamma$  LBD配列と比較を行った。

解明したPPAR $\gamma$ 配列を基に酵母の転写因子であるGAL4のDNA binding domain (DBD)とPPAR $\gamma$  LBDを融合したキメラタンパクを発現するプラスミドを作成し、これとルシフェラーゼ遺伝子上流にGAL4反応配列を連結したレポーター遺伝子を発現するプラスミドを培養細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイをRosiglitazone、TBTおよびTPTの各動物種のPPAR $\gamma$ アゴニスト活性を評価した。

さらに、PPAR $\gamma$ の遺伝子配列を元に組み換え蛋白質を作成し、 $[^3\text{H}]$ 標識Rosiglitazoneおよび $[^{14}\text{C}]$ 標識TPTを用いたリガンド結合実験により、Rosiglitazone、TBTおよびTPTの各動物種のPPAR $\gamma$ に対する親和性について検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) エイ、ウミヤツメ、クロアシカサガイ PPAR $\gamma$ LBD 配列

得られた各動物種のPPAR $\gamma$  LBD配列とヒトPPAR $\gamma$  LBD (204-477)と比較を行った。その結果、エイは79.9%と比較的高い相同性を有していた。一方で、ウミヤツメは60.5%とエイに比べて低く、クロアシカサガイは27.6%と他の2種に比べてかなり低い相同性であった。

これまでに我々は、ヒトPPAR $\gamma$ と有機スズ化合物との結合にヒトPPAR $\gamma$ の285番目のシステインの硫黄原子と有機スズ化合物のスズ原子との相互作用が必須である事を明らかにしているため(Sci Rep, 5, 8520, 2015)、エイ、ウミヤツメ、クロアシカサガイ PPAR $\gamma$ にもそれに相当する部位が存在するか比較を行った。その結果、エイおよびウミヤツメにおいてはヒトPPAR $\gamma$ の285番目に相当する部分がヒトと同じシステインであったが、クロアシカサガイはチロシンであった。

また、我々はヒトPPAR $\gamma$ に対してはTBTよりもTPTの方が、アゴニスト活性が高いことを明らかにしており、これにはヒトPPAR $\gamma$ の363番目のフェニルアラニンとTPTのフェニル基との間に形成される相互作用が重要である事も明らかにしている。それに対してエ

イ、ウミヤツメにおいてはその部分がイソロイシン、クロアシカサガイではロイシンといずれの生物種もヒト PPAR $\gamma$ とは異なっていた。

(2) エイ、ウミヤツメ、クロアシカサガイ PPAR $\gamma$ アゴニスト活性評価

各動物種の PPAR $\gamma$  LBD 配列を基に GAL4 DBD と PPAR $\gamma$  LBD の融合タンパクを発現するプラスミドを作成し、これを用いて各動物種 PPAR $\gamma$ における TBT、TPT および Rosiglitazone のアゴニスト活性を評価した。

その結果、エイ (LePPAR $\gamma$ )、ウミヤツメ (PmPPAR $\gamma$ ) においては、TBT、TPT、Rosiglitazone いずれの化合物においても Luciferase 活性の上昇が認められたが、クロアシカサガイ (PdPPAR $\gamma$ ) においては、いずれの化合物においても活性の変化は認められなかった (図 1)。

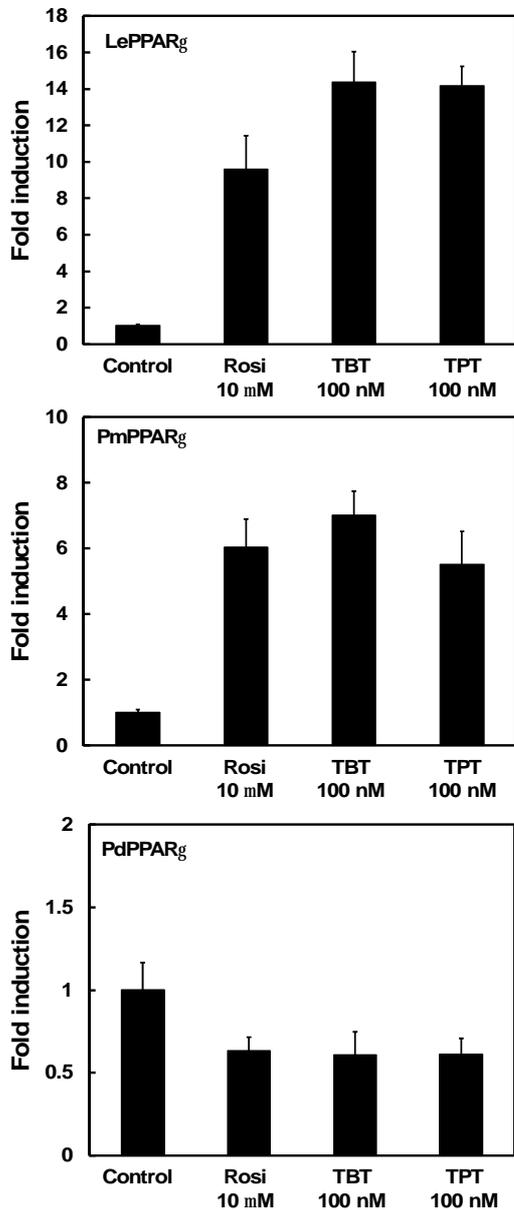


図 1 Rosiglitazone、TBT および TPT のエイ、ウミヤツメ、クロアシカサガイ PPAR $\gamma$ アゴニスト活性

スト活性

続いて、エイおよびウミヤツメに関してはさらに詳細な検討を行った。その結果、エイ PPAR $\gamma$ では、Rosi は 1  $\mu$ M、TBT は 10 nM 以上、TPT は 30 nM 以上で反応が認められた (図 2)。またウミヤツメ PPAR $\gamma$ では、Rosi は 1  $\mu$ M、TBT は 3 nM 以上、TPT は 3 nM 以上で反応が認められた (図 3)。

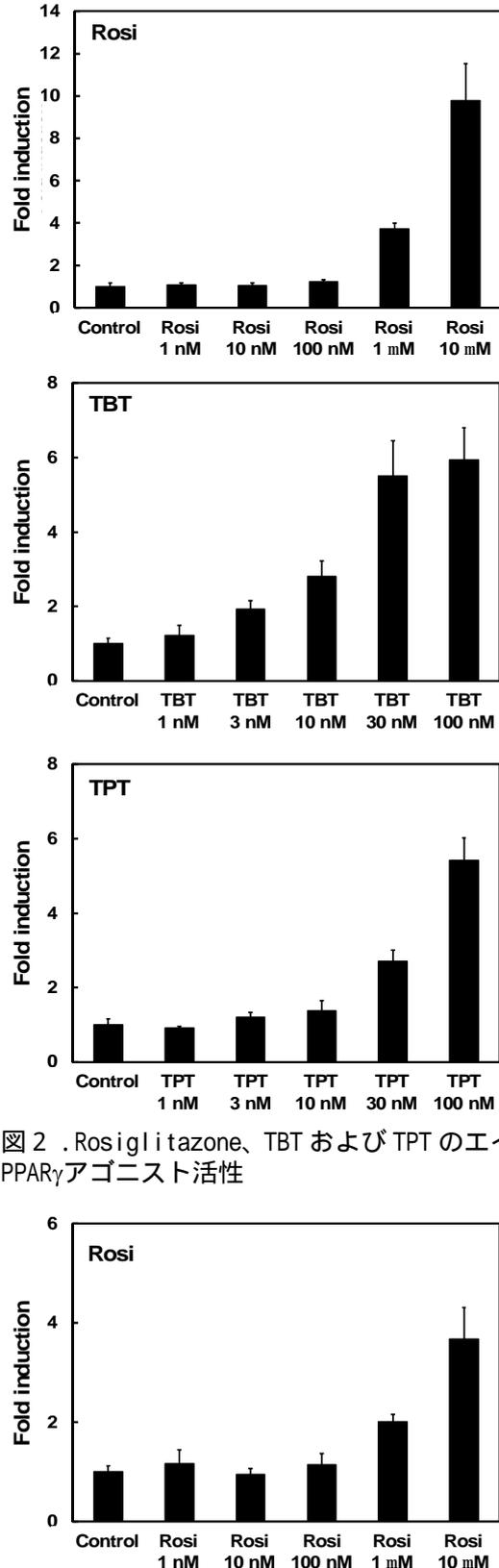


図 2 Rosiglitazone、TBT および TPT のエイ PPAR $\gamma$ アゴニスト活性

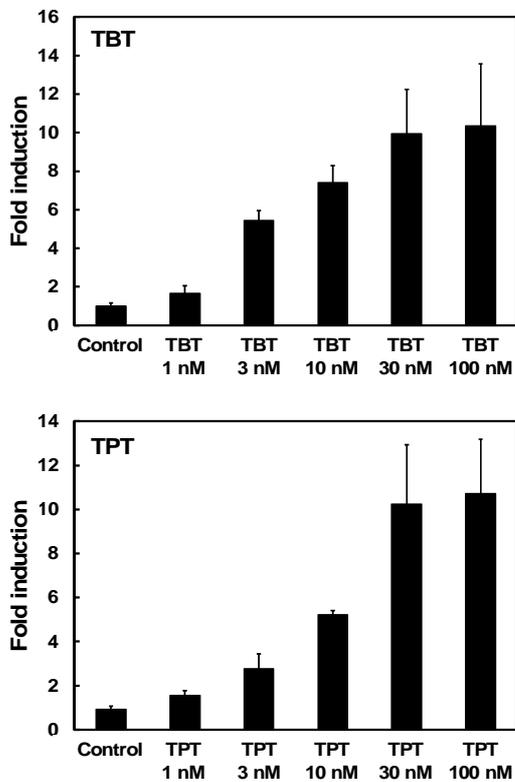


図3 .Rosiglitazone、TBTおよびTPTのウミヤツメ PPAR $\gamma$ アゴニスト活性

### (3) エイ PPAR $\gamma$ に対する Rosiglitazone、TBT および TPT の親和性

エイ PPAR $\gamma$ に対して Rosiglitazone、TBT、TPT がアゴニスト活性を示すことが確認されたため、RI 標識リガンドを用いて、これらの化合物のエイ PPAR $\gamma$ に対する親和性について検討を行った。

まず、 $[^3\text{H}]$ 標識 Rosiglitazone を用いて検討を行ったが、特異的な結合を検出することが出来なかった。そこで、 $[^{14}\text{C}]$ 標識 TPT を用いた検討に切り替えた。その結果、非標識 TBT および非標識 TPT は $[^{14}\text{C}]$ 標識 TPT のエイ PPAR $\gamma$ への結合を濃度依存的に阻害した。しかし、非標識 Rosiglitazone は TPT の結合を阻害しなかった (図4)。

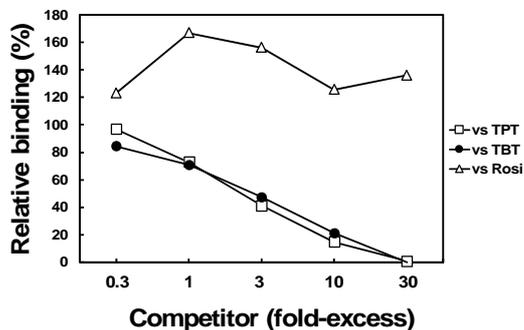


図4 .  $[^{14}\text{C}]$ 標識 TPT およびエイ PPAR $\gamma$ を用いたリガンド競合阻害実験

### (4) まとめ

本研究では、エイ、ウミヤツメ、クロアシカサガイ PPAR $\gamma$ に着目して研究を行った。各動物種の PPAR $\gamma$  LBD アミノ酸配列をヒト PPAR $\gamma$  LBD と比較したところ、脊椎動物であるエイ、ウミヤツメにおいては約 80%、60% の相同性を有していたが、無脊椎動物であるクロアシカサガイに関しては 27.6% とかなり相同性が低い結果となった。前述の通り、TBT および TPT は RXR のアゴニストとしても機能するが、ヒト RXR LBD と貝類の RXR LBD はおよそ 80% と高く、広い生物種間で配列が良く保存されているが、PPAR $\gamma$ は RXR ほど生物種間でアミノ酸配列は保存されていないことが明らかになった。

この結果を反映して、レポーターアッセイによるアゴニスト活性評価において、クロアシカサガイ PPAR $\gamma$ は Rosiglitazone、TBT、TPT のどの化合物に対してもアゴニスト活性を示さなかった。RXR においては、ヒト、貝類共に 9cRA や有機スズ化合物がアゴニストとして機能することが確認されており、この点においても PPAR $\gamma$ は RXR とは対照的な結果となった。

一方で、エイ、ウミヤツメ PPAR $\gamma$ においては、Rosiglitazone、TBT、TPT いずれの化合物においてもアゴニスト活性を有するという結果となった。得られた結果をヒト PPAR $\gamma$ の結果と比較してみると、Rosiglitazone はヒト PPAR $\gamma$ に対しては 100 nM でアゴニスト活性を示したのに対して (Chem Biol Interact, 180:238-244, 2009)、エイ、ウミヤツメ PPAR $\gamma$ では 1  $\mu\text{M}$  以上とヒト PPAR $\gamma$ の場合よりも高い濃度でないとアゴニスト活性を示さなかった。ヒト PPAR $\gamma$ では TBT が 100 nM、TPT が 1 nM 以上でアゴニスト活性を有することが確認されている。それに対して、エイ、ウミヤツメ PPAR $\gamma$ では、TBT が 10 nM、3 nM 以上とヒト PPAR $\gamma$ よりも低濃度でアゴニスト活性を有するという結果が得られた。また、ヒト PPAR $\gamma$ においては TBT よりも TPT の方が、アゴニスト活性が強い結果が得られているが、エイ PPAR $\gamma$ では TBT の方がアゴニスト活性が強く、ウミヤツメ PPAR $\gamma$ では TBT と TPT でアゴニスト活性が同程度という結果となった。

前述の通り、我々は、TPT が結合した PPAR $\gamma$ の X 線結晶構造の結果から、ヒト PPAR $\gamma$ と有機スズ化合物との結合にヒト PPAR $\gamma$ の 285 番目のシステインの硫黄原子と有機スズ化合物のスズ原子との相互作用が必須である事を明らかにしている (Sci Rep, 5, 8520, 2015)。エイ、ウミヤツメ PPAR $\gamma$ においてもこの部分はヒトと同じシステインであり、このことから、エイ、ウミヤツメにおいてもこの部分とスズ原子との相互作用がアゴニスト活性を発揮することに寄与していると考えられる。また、ヒト PPAR $\gamma$ の 363 番目のフェニルアラニンと TPT のフェニル基との間に形成される相互作用が重要である事も明らか

にしている。それに対してエイ、ウミヤツメにおいてはその部分がイソロイシン、クロアシカサガイではロイシンとなっていたが、レポーターアッセイの結果もそれを反映した結果となった。エイ、ウミヤツメ PPAR $\gamma$ における Rosiglitazone のアゴニスト活性はヒト PPAR $\gamma$ と比較して弱い原因としては、PPAR $\gamma$ と Rosiglitazone との結合に重要な部分のアミノ酸残基が異なっている可能性が考えられる。しかし、今回の検討では、リガンド結合実験により Rosiglitazone とエイ PPAR $\gamma$ との特異的な結合を検出することが出来なかったため、今後さらなる検討が必要と考えられる。

以上の結果から、エイ、ウミヤツメ PPAR $\gamma$ において TBT、TPT がアゴニスト活性を有することが確認されたことから、水生生物においても有機スズ化合物が PPAR $\gamma$ を介して、何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。また、エイ、ウミヤツメ PPAR $\gamma$ においては Rosiglitazone のアゴニスト活性がヒト PPAR $\gamma$ よりも弱かったのに対し、TBT、TPT のアゴニスト活性はヒト PPAR $\gamma$ と同等以上であったことから、有機スズ化合物が PPAR $\gamma$ のアゴニストとなりうる動物種の範囲は Rosiglitazone よりも広範囲に及ぶ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 11 件)

- 1) Harada S, Hiromori Y, Nakamura S, Kawahara K, Fukakusa S, Maruno T, Noda M, Uchiyama S, Fukui K, Nishikawa J, Nagase H, Kobayashi Y, Yoshida T, Ohkubo T, Nakanishi T: Structural basis for PPAR $\gamma$  transactivation by endocrine-disrupting organotin compounds. *Sci Rep.*, 5, 8520. doi: 10.1038/srep08520 (2015)
- 2) Zhang H, Zhang Z, Nakanishi T, Wan Y, Hiromori Y, Nagase H, Hu J: Structure-dependent activity of phthalate esters and phthalate monoesters binding to human constitutive androstane receptor. *Chem Res Toxicol.*, 28, 1196-1204. doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00028 (2015)
- 3) Hiromori Y, Aoki A, Nishikawa J, Nagase H, Nakanishi T: Transactivation of the human retinoid X receptor by organotins: use of site-directed mutagenesis to identify critical amino acid residues for organotin-induced transactivation. *Metallomics.*, 7, 1180-1188. doi: 10.1039/c5mt00086f. (2015)
- 4) Hiromori Y, Yui H, Nishikawa J, Nagase H, Nakanishi T: Organotin compounds cause structure-dependent induction of progesterone in human choriocarcinoma Jar cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 155, 190-198 (2016)
- 5) Al-Soudy AS, Nakanishi T, Mizuno S, Hasegawa Y, Shawki HH, Katoh MC, Basha WA, Ibrahim AE, El-Shemy HA, Iseki H, Yoshiki A, Hiromori Y, Nagase H, Takahashi S, Oishi H, Sugiyama F, Germline recombination in a novel Cre transgenic line, Pr13b1-Cre mouse, *Genesis* 54, 389-397 (2016)
- 6) Hiromori Y, Ido A, Aoki A, Kimura T, Nagase H, Nakanishi T: Ligand activity of group 15 compounds possessing triphenyl substituent for the RXR and PPAR $\gamma$  nuclear receptors, *Biol. Pharm. Bull.* 39, 1596-1603 (2016)
- 7) Zhang Z, Hu Y, Guo J, Yu T, Sun L, Xiao X, Zhu D, Nakanishi T, Hiromori Y, Li J, Fan X, Wan Y, Cheng S, Li J, Guo X, Hu J: Fluorene-9-bisphenol is anti-oestrogenic and may cause adverse pregnancy outcomes in mice. *Nat. Commun.* 8, 14585. doi: 10.1038/ncomms14585. (2017)
- 8) Hu W, Gao F, Zhang H, Hiromori Y, Arakawa S, Nagase H, Nakanishi T, Hu J: Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and Disruption of Progesterone Synthesis of 2-Ethylhexyl Diphenyl Phosphate in Human Placental Choriocarcinoma Cells: Comparison with Triphenyl Phosphate. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4061-4068. doi: 10.1021/acs.est.7b00872. (2017)
- 9) Ido A, Hiromori Y, Meng L, Usuda H, Nagase H, Yang M, Hu J, Nakanishi T: Occurrence of fibrates and their metabolites in source and drinking water in Shanghai and Zhejiang, China. *Sci. Rep.* 7, 45931. doi: 10.1038/srep45931. (2017)
- 10) Shiraishi E, Ido A, Hiromori Y, Tanaka K, Kimura T, Nagase H, Nakanishi T: Utility of murine dendritic cell line DC2.4 for in vitro assay of skin-sensitization potential. *Fundam. Toxicol. Sci.* 4, 121-126. (2017)
- 11) Nishioka Y, Tamai K, Onda M, Hiromori Y, Kimura T, Hu J, Nagase H, Nakanishi T: Potential Interference of Oil Vehicles on Genital Tubercle Development during the Fetal Period

in ICR Mice, Biol. Pharm. Bull. 41, 266-271. (2018)

〔学会発表〕(計 15 件)

- 1) 中西 剛、廣森洋平、原田秀作、中村昇太、西川淳一、吉田卓也、永瀬久光：有機スズ化合物とヒト PPAR $\gamma$  の結合様式の解明，第 26 回日本微量元素学会学術集会 (2015 年 7 月、札幌市)
- 2) 廣森洋平、原田秀作、中村昇太、吉田卓也、西川淳一、中西 剛、永瀬久光、X 線結晶構造解析による有機スズ化合物とヒト PPAR $\gamma$  の結合様式の解明、メタルバイオサイエンス研究会 2015 (2015 年 8 月、名古屋市)
- 3) 廣森洋平、青木 明、西川淳一、中西 剛、永瀬久光、有機スズ化合物およびレチノイドの RXR 転写活性化における必須アミノ酸部位の検討、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2015 (2015 年 11 月、名古屋市)
- 4) 荒川脩平、廣森洋平、安田賢人、中西 剛、永瀬久光：胎盤内分泌系機能に対するプロボリスの影響およびその分子機構に関する検討、フォーラム 2016：衛生薬学・環境トキシコロジー (2016 年 9 月、東京都)
- 5) 秋元 凌、廣森洋平、中西 剛、永瀬久光：ムラサキイガイ retinoid X receptor の同定と性状解析、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2016 (2016 年 10 月、岐阜市)
- 6) 荒川脩平、廣森洋平、安田賢人、中西 剛、永瀬久光：胎盤内分泌系機能に対するプロボリスの影響およびその分子機構に関する検討、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2016 (2016 年 10 月、岐阜市)
- 7) 荒川脩平、廣森洋平、安田賢人、井戸章子、中西 剛、永瀬久光：胎盤内分泌系機能に対するプロボリスの影響およびその分子機構に関する検討、第 7 回岐阜薬科大学機能性健康食品 (蜂産品) 研究講演会 (2016 年 12 月、岐阜市)
- 8) 宮城隆之、廣森洋平、秋元 凌、永瀬久光、中西 剛、ムラサキイガイ (Mytilus galloprovincialis) retinoid X receptor の同定及び性状解析、2017 年度日本付着生物学会総会・研究集会 (2017 年 3 月、東京)
- 9) 宮城隆之、秋元 凌、廣森洋平、中西 剛、永瀬久光、ムラサキイガイ Retinoid X receptor の同定と性状解析、第 44 回日本毒性学会学術年会 (2017 年 7 月、横浜)
- 10) 廣森洋平、有機リン系難燃剤の PPAR $\gamma$  を介したヒト胎盤プロゲステロン産生促進作用、衛生薬学・環境トキシコロジー第 4 回フォーラム 2017 若手研究者の会 (2017 年 8 月、仙台)

- 11) 宮城隆之、秋元 凌、廣森洋平、中西 剛、永瀬久光、ムラサキイガイ (Mytilus galloprovincialis) RXR (retinoid X receptor) の同定及び性状解析、フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー (2017 年 9 月、仙台)
- 12) 宮城隆之、秋元 凌、廣森洋平、中西 剛、永瀬久光、ムラサキイガイ (Mytilus galloprovincialis) retinoid X receptor の有機スズ化合物応答性に関する検討、メタルバイオサイエンス研究会 2017 (2017 年 10 月、岡山)
- 13) 荒川脩平、廣森洋平、安田賢人、井戸章子、中西 剛、永瀬久光、プロボリス成分の核内受容体を介した胎盤内分泌機能修飾に関する検討、第 8 回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会 (2017 年 11 月、岐阜)
- 14) 廣森洋平、Wenxin Hu、Fumei Gao、Hong Zhang、荒川脩平、原田均、永瀬久光、中西 剛、Jianying Hu、有機リン系難燃剤の PPAR $\gamma$  を介したヒト胎盤プロゲステロン産生促進作用、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2017 (2017 年 11 月、鈴鹿)
- 15) 廣森洋平、Wenxin Hu、Fumei Gao、Hong Zhang、荒川脩平、原田均、永瀬久光、中西 剛、Jianying Hu、有機リン系難燃剤のヒト胎盤の内分泌機能に対する影響、日本薬学会第 138 年会 (2018 年 3 月、金沢)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

廣森 洋平 (HIROMORI, Youhei)  
鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手  
研究者番号：60515956

### (2) 研究分担者

永瀬 久光 (NAGASE, Hisamitsu)  
岐阜薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：40141395

中西 剛 (NAKANISHI, Tsuyoshi)  
岐阜薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：50303988