

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16217

研究課題名(和文) レチノイン酸受容体アゴニストによる水環境汚染の実態解明

研究課題名(英文) Detection of retinoic acid receptor agonists in river water in Japan

研究代表者

澤田 和子 (sawada, kazuko)

北里大学・医療衛生学部・特別研究員

研究者番号：00772485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒトおよびメダカの受容体を用いたRAR結合ベースでのレチノイン酸受容体アゴニストによる水環境汚染の実態把握および各種レチノイドにおけるRARアゴニスト活性を評価した。相模川水系の調査において常に活性の高かった中津川水系を対象として、採取した試料について、酵母two-hybrid法によるアゴニスト活性およびLC/MSを用いたレチノイン酸類の測定を実施した。さらに、HPLCを用いて分画し、各画分のアゴニスト活性を測定した。また、各種レチノイドに対して、ヒトおよびメダカのRAR受容体へのアゴニスト活性の用量反応性を評価した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the occurrence of the agonists on human and medaka RAR in river water environments in Japan. To clarify the temporal variation of RAR agonist contamination in Nakatsu River, investigations of the RAR agonistic activity were carried out on 4 distinct date from May 2016 to February 2017 by the yeast two-hybrid assay targeting human and medaka RAR. To characterize the RAR agonists, samples collected from several sampling stations during different periods were fractionated by reverse-phase HPLC. To identify the causative compounds, the concentrations of RAs and 4-oxo-RAs in the samples were analyzed by LC/MS. To evaluate affinities for human and medaka RAR, RAR agonistic activities of several retinoids were measured by the yeast two-hybrid assay. The atRA equivalency factors of several retinoids were estimated by comparing their EC50 values with that of atRA.

研究分野：環境工学

キーワード：レチノイン酸 レチノイン酸受容体 アゴニスト 河川水 酵母two-hybrid法

1. 研究開始当初の背景

レチノイン酸(RA)受容体(RAR)は核内受容体の一つであり、ビタミンAの代謝物である all-trans RA(atRA)や 9-cis RA(9cRA)の結合を介して脊椎動物の資格や形態形成、発生、細胞分化など、多様な機能の制御を司っている。一方で、シグナル伝達系の過剰な発現は、骨格形成異常や眼球異常などの催奇形性作用をもたらすことが知られており、外来のアゴニストによるシグナル伝達系の攪乱は、様々な脊椎動物に対して重篤な健康影響をもたらす可能性がある。近年、北米、中国やオーストラリアの水環境中において、このようなRARアゴニストによる汚染が確認されている(Gardiner *et al.*, 2003; Zhen *et al.*, 2009; Allinson *et al.*, 2011; Inoue *et al.*, 2010; Sawada *et al.*, 2012)。

そこで、日本の水環境中におけるRARアゴニスト汚染に関する調査を実施した結果、顕著な汚染が生じていることが確認され(Inoue *et al.*, 2010; Sawada *et al.*, 2012)、下水処理系における主要なRARアゴニストはRA類およびその酸化代謝物である4-oxo-RA類であることを明らかにした(Sawada *et al.*, 2012)。また、河川環境における主要なRARアゴニストは下水系とは異なる原因物質であり、複数存在することも見出された(Inoue *et al.*, 2010)。

2. 研究の目的

RARへの結合によりレチノイドシグナル伝達系を攪乱して生体影響を引き起こす可能性を有するRARアゴニストによる水環境の汚染実態を明らかにしてきた。これまでに実施した調査によって、ヒトの受容体に対するアゴニスト作用を示し得る化学物質による汚染の実態は明らかにされつつある。しかし、水環境の汚染によって直接的な影響を受けやすい水生生物の受容体を用いたアゴニスト作用については明らかとなっておらず、ヒトよりも水生生物の受容体の方が影響を受けやすいと考えられる。本研究では、RARアゴニストによるヒトおよび水生生物に対する健康被害の可能性を適正に評価するために、ヒトおよびメダカを受容体に対してアゴニスト作用を示し得る化学物質の実態を明確にし、原因物質を推定することを目的とした。

3. 研究の方法

これまでに相模川水系において実施した調査から、常に顕著なアゴニスト活性を示す中津川を対象水域として(Fig. 1)、2016年5月から2017年2月に表層水試料を採取した。各採取試料は、浮遊物を除去後、メタノール(MeOH)と超純水でコンディショニングした Oasis HLB カートリッジを用いた固相抽出に供した。カートリッジに捕捉された化学物質は、MeOHで溶出した後、窒素気流下で濃縮・乾固し、ジメチルスルホキシド(DMSO)またはMeOHに転溶した。酵母 two-hybrid 法を用

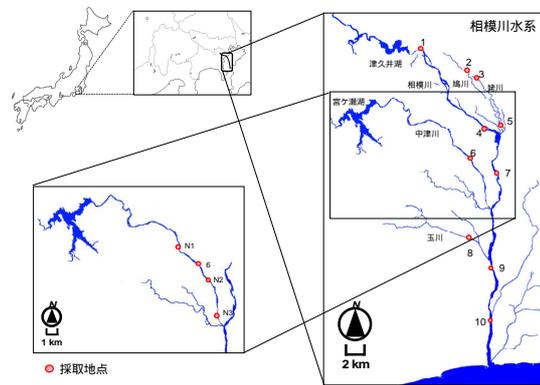


Fig. 1 中津川水系における試料採取地点

いて、DMSOに転溶した試料を用いて、ヒトおよびメダカのRARに対するアゴニスト活性を測定した。また、内因性リガンドであるatRAの最大活性値に対する相対活性値(%)を算出し、それぞれに対する当量値(atRA-EQ)を求めた。さらに、LC/MSを用いて、試料中のRA類および4-oxo-RA類を測定した。また、MeOHに転溶した試料は、HPLCに供し、2分間隔で分画した試料のアゴニスト活性を測定し、RARアゴニストの分離・精製を試みた。

さらに、酵母 two-hybrid 法を用いて、ヒトおよびメダカのRARに対する各種レチノイドのアゴニスト活性の用量反応性を評価し、半影響濃度(EC50)値およびatRA等価係数を算出した。

4. 研究成果

中津川水系におけるRARアゴニスト活性の季節変動を調査するために、4地点で定期的に試料を採取した。100倍濃縮の試料において、ヒトRAR(hRAR)に対する相対活性値は、17.7-77.4%となり、16試料中全ての試料で有意なアゴニスト活性が検出された($p < 0.05$)。有意な活性が検出された試料においてatRA-EQ値を算出した結果、1.1-16.7 ng-atRA/Lと推定された(Fig. 2)。他方、メダカRAR(mRAR)に対する相対活性値は、10.1-67.2%となり、16試料中全ての試料で有意なアゴニスト活性が検出された($p < 0.05$)。有意な活性が検出された試料においてatRA-EQ値を算出した結果、0.2-6.8 ng-atRA/Lと推定された(Fig. 3)。ほぼ全ての試料において、mRARよりhRARの受容体に対するアゴニスト活性が高かったことから、河川水中に存在するRARアゴニストはmRARよりもhRARに対して高い結合性を示すことが示唆された。これらの試料について、LC/MSを用いてRA類および4-oxo-RA類の測定を実施した。その結果、全ての試料において、RA類(atRA、9cRA、13-cis RA(13cRA))および4-oxo-RA類(4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA)は定量下限値未満(それぞれ2.0 ng/L、10 ng/L、10 ng/L、1.0 ng/Lおよび2.0 ng/L)であった。

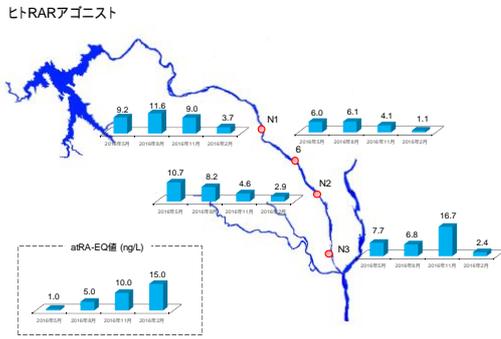


Fig. 2 ヒトRARアゴニスト活性から算出されたatRA-EQ値

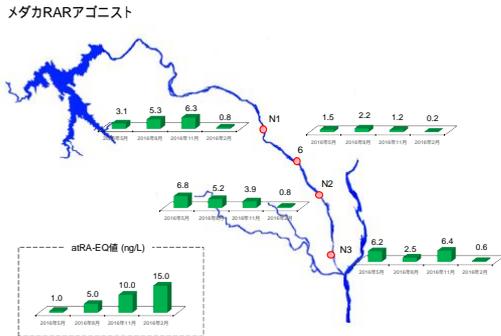


Fig. 3 メダカRARアゴニスト活性から算出されたatRA-EQ値

RAR アゴニストを分離・精製するため、相模川水系において顕著な活性を示す地点および中津川水系の全ての試料について、HPLC に供して2分間隔で分画した。各分画試料の RAR アゴニスト活性を測定した結果を Fig. 4 および Fig. 5 に示す。時季や場所によらず、保持時間 22-24 分、24-26 分、26-28 分または 28-30 分の複数の画分において顕著な活性が検出された。全ての試料において、メダカよりヒトの受容体の方が高いアゴニスト活性を示した。

以上の結果から、調査水域において、ヒトおよびメダカの受容体に結合し得る化学物質は場所や時季によらず常に存在しており、原因物質は受容体によらず共通し、複数存在していることが明らかとなった。

次に、各種レチノイドにおける RAR アゴニスト活性を評価するため、酵母 two-hybrid 法を用いて、ヒトおよびメダカの RAR に対する RA 類(atRA、9cRA、13cRA)、それらの酸化代謝物である 4-oxo-RA 類(4-oxo-atRA、4-oxo-9cRA、4-oxo-13cRA) および 4-hydroxy-RA 類 (4-hydroxy-atRA、4-hydroxy-13cRA)、RA 類の前駆物質である all-*trans* retinol(atROL)、all-*trans* retinal(atRAL) の用量反応性を測定した。その結果を用いて、EC50 値を算出し、RAR の内因性リガンドである atRA の EC50 値との比較により、atRA 等価係数を算出した(Table 1)。その結果、atRA より高い結合性を示したのは、ヒトおよびメダカの受容体共に 4-oxo-atRA および 4-oxo-9cRA であった。

HPLC で用いた分画条件における RA 類および 4-oxo-RA 類の保持時間は、それぞれ 34-38 分、26-28 分であった。活性画分と共通する保持時間の 4-oxo-RA 類の定量下限値を

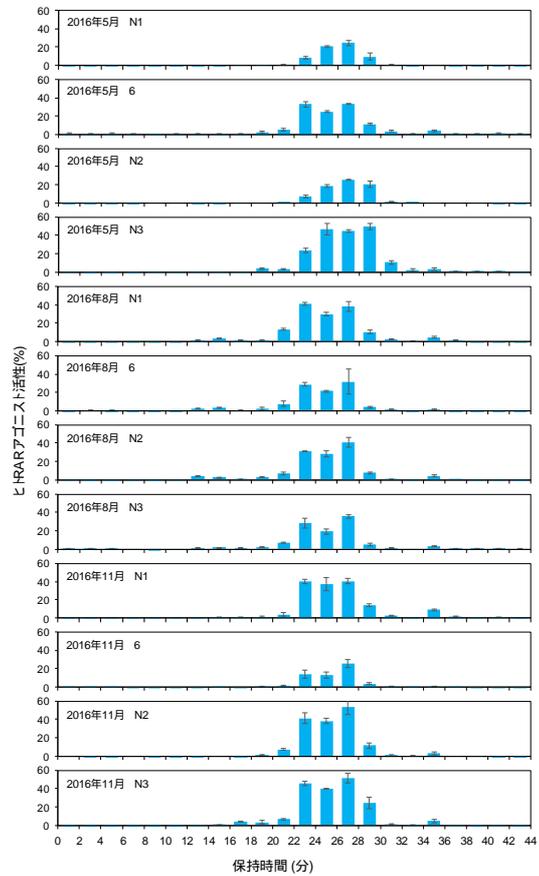


Fig. 4 ヒトRARアゴニストの活性画分

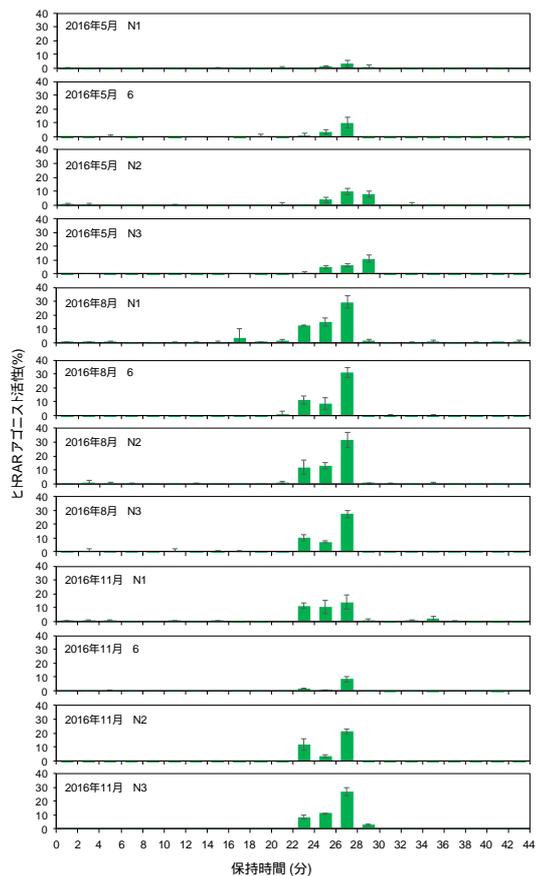


Fig. 5 メダカRARアゴニストの活性画分

総和すると、ヒト RAR は 3.5 ng-atRA/L、メダカ RAR は 2.5 ng-atRA/L となった。ヒト

Table 1 ヒトまたはメダカRARに対する各種レチノイドのEC50値およびatRA等価係数

	hRAR		mRAR	
	EC50値 (mol/L)	atRA等価係数	EC50値 (mol/L)	atRA等価係数
atRA	1.57×10^{-9} *	1 *	1.37×10^{-9}	1
9cRA	1.40×10^{-9}	0.11	2.67×10^{-8}	0.051
13cRA	2.39×10^{-7} *	0.0067 *	1.96×10^{-8}	0.070
4-oxo-atRA	5.77×10^{-10} *	2.7 *	7.28×10^{-10}	1.9
4-oxo-9cRA	1.23×10^{-9}	1.3	1.08×10^{-9}	1.3
4-oxo-13cRA	4.22×10^{-9} *	0.38 *	4.58×10^{-9}	0.30
4-hydroxy-atRA	5.33×10^{-9}	0.29	未測定	未算出
4-hydroxy-13cRA	4.16×10^{-8}	0.038	4.58×10^{-9}	0.020
atROL	7.69×10^{-7}	0.0020	9.43×10^{-8}	0.00015
atRAL	5.65×10^{-9}	0.28	1.97×10^{-7}	0.0071

* ヒトRARに対するatRA、13cRA、4-oxo-atRAおよびヒト4-oxo-13cRAのEC50値およびatRA等価係数はSawada et al., 2012の値

RARでは2017年2月の地点6、N2、N3を除くすべての地点、メダカRARでは16試料中9試料において、定量下限値を総和したatRA-EQ値より高い値となった。これらの結果から、主要なRARアゴニストの原因物質は、濃度測定の対象とした5物質以外の物質であることが示唆された。

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 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

Sawada, K., Inoue, D., Nakanishi, T., Ike, M. and Sei, K. Detection of Human and Medaka Retinoic Acid Receptor Agonistic Activities in River Water in Japan, SETAC North America 38th Annual Meeting, Minneapolis, MN, USA, November 12-16, 2017

澤田和子、井上大介、中西剛、池道彦、清和成 河川水中におけるレチノイン酸受容体汚染の実態調査 (日本水処理生物学会第54回大会、大阪大学吹田キャンパス、2017年11月)

澤田和子、井上大介、中西剛、池道彦、清和成 ヒトおよびメダカの受容体を用いた河川水中のレチノイン酸受容体アゴニスト汚染の実態調査 (第51回日本水環境学会年会、熊本大学黒髪キャンパス、2017年3月)

〔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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

澤田 和子 (SAWADA, Kazuko)

北里大学・医療衛生学部・研究員

研究者番号：00772485

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし