

令和 3 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：2018～2020

課題番号：18K06737

研究課題名(和文) 核内受容体に着目した有機スズ化合物のフジツボ付着防止作用メカニズムの解明

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によりフジツボにおいてecdysone receptor (EcR)およびretinoid X receptorが発現している事が確認された。また、系統樹解析の結果から、フジツボEcRは他の節足動物EcRと性質が類似している可能性、フジツボRXRは他の節足動物RXRと性質が異なる可能性が示唆された。RI標識リガンドと組み換えタンパクを用いた実験の結果から、フジツボRXRは脊椎動物におけるRXRアゴニストである9-cis retinoic acidには結合しなかった一方で、有機スズ化合物であるトリフェニルスズに結合する事が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

無脊椎動物における核内受容体に関する研究は、脊椎動物に比べると遅れているのが現状である。本研究では、無脊椎動物であるフジツボよりEcRおよびRXRを新たにクローニングする事に成功した。この成果は、無脊椎動物における核内受容体に関する知見を広げるものであると共に、無脊椎動物の生態系に及ぼす環境化学物質の影響を推定する足がかりになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We cloned a protein coding sequence of retinoid X receptor (RXR) and a partial sequence of ecdysone receptor from *Fistulobalanus albicostatus* (EcR), a species of barnacle. In order to extend our knowledge of the evolution of RXR and EcR in balanidae, we performed a phylogenetic analysis for amino acid sequences of RXR and EcR using the maximum likelihood method. The results suggest that the characterization of barnacle EcR resembles that of arthropod EcRs but not barnacle RXR.

To investigate the binding affinity of barnacle RXR to 9-cis retinoic acid (9cRA) and triphenyltin (TPT), we performed the ligand binding assay. Although TPT bound to barnacle RXR, 9cRA failed to bind to barnacle RXR.

研究分野：分子毒性学

キーワード：核内受容体 フジツボ RXR EcR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フジツボ類、イガイ類などの汚損付着生物は、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。付着生物対策のコストは莫大で、世界全体で見ると1年間で15~30億ドルと試算されている(Biofouling, 27:87-98, 2011)。このような付着生物の対策としては、付着を防止する防汚剤が用いられており、中でもトリブチルスズ(TBT)やトリフェニルスズ(TPT)などの有機スズ化合物は優れた防汚効果を有していたことから、1970年代以降における防汚剤の主流を占めていた。しかし防汚剤は代表的な海洋汚染物質の一つであり、有機スズ化合物に関しては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。基本的に防汚剤開発は、付着生物等の生態や分子メカニズムに立脚したのではなく、効果があるものをトライアンドエラーで見出す手法で行われていることから、有機スズ化合物の付着防止機構については全く不明である。しかし今後の防汚剤開発において、この「優れたポジティブコントロール」である有機スズ化合物のメカニズム機構を生かさなない手はない。

一方で我々は、化学物質の内分泌かく乱作用に関する研究を行ってきた過程において、TBT、TPTがnMレベルの濃度域で核内受容体であるRXRおよびperoxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)の二重アゴニストとして機能することを明らかにした。またインポセックスが誘導される巻貝類にも、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応答するRXRが存在していることを見だし、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。有機スズ化合物はヒトに対してインポセックスのような作用を示すことはないが、これらの核内受容体を介して胎盤細胞のステロイドホルモン産生亢進や脂肪細胞分化を促進する。すなわちこれらの事実は、表現型こそ異なるものの、有機スズ化合物がリガンド応答性のRXRやPPAR γ をもつ生物種に対して何らかの鋭敏な作用を示す可能性を示唆している。特にRXRは昆虫類から哺乳類に至るまで幅広い生物種に存在することから、有機スズ化合物が汚損付着生物に対してもRXRを介して何らかの作用を示すのではないかと考えた。またRXRは、同じ核内受容体であるecdysone receptor (EcR)とヘテロ二量体を形成することで昆虫類をはじめ多くの無脊椎動物の変態や器官形成に作用することがよく知られている。代表的な付着生物であるフジツボは、発生後1ヶ月程度でキブリス幼生に変態し、固着に適した場所を探す。適当な場所が見つかり固着物質であるcement proteinを分泌して接着する(図1)。その後、脱皮を経て成体となる事が知られている(J Biol Chem, 275:27360, 2000, Plos one, 8:e64130, 2013)。しかしながら現在のところ、この生活環を制御している分子機構は全く不明である。

2. 研究の目的

我々は、フジツボにおいてもRXR/EcRが変態などの生活環を制御しており、有機スズ化合物がRXRを介してこの制御機構をかく乱することで、付着防止作用を示しているのではないかとこの作業仮説を立てた。本研究は、「優れたポジティブコントロール」である有機スズ化合物の防汚作用メカニズムを解明することによって、そのキーとなる分子標的を明らかにし、当該分子に作用するような化合物を防汚剤の候補とするという、まさに分子標的薬の開発手法を防汚剤開発に取り入れることを目標としている。

3. 研究の方法

1) フジツボの核内受容体遺伝子配列のクローニング

シロスジフジツボからmRNAを抽出し、逆転写酵素によりcDNAを作成し、これを基にフジツボRXR、フジツボEcRのクローニングを試みた。EcRに関してはAsazumaら(Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol., 148, 139-150. 2007)、RXRに関してはNishikawaら(Environ Sci Technol., 38, 6271-6276. 2004)の方法を参考にして縮重プライマーを設計し、これらを用いてPCRを行った。さらに、このPCR産物を鋳型にして、nested PCRを行い、それぞれのDNA binding domain (DBD)に相当する配列の増幅を試みた。さらにnested PCRによって得られた配列を基にRapid Amplification of cDNA Ends (RACE)法を用いて、3'側の未知配列の増幅を試みた。これに引き続き、5'側の未知配列の増幅を試みたが、うまくいかなかったため、タテジマフジツボ(*Amphibalanus Amphitrite*)、サラサフジツボ(*Balanus reticulatus*)、オオアカフジツボ(*Megabalanus volcano*)のRNA-seqデータベース情報(Accession No. PRJNA549550, PRJNA420115, PRJNA356793)からEcR, RXR遺伝子配列を推測し、それを基にプライマーを設計し、PCRで増幅を試みた。

2) フジツボRXR組み換えタンパクを用いたリガンド結合実験

解明したフジツボRXR遺伝子配列をpCold-TFベクター(Takara bio)に組み込むことで、フジツボRXR ligand binding domain (LBD)組み換えタンパクを発現するベクターを作成した。これを大腸菌株BL21に導入し、組み換えタンパクを作成した。RI標識リガンドとして、 $[^3\text{H}]$ 標識9cRAおよび $[^{14}\text{C}]$ 標識TPTを用いて、これらのリガンドとフジツボRXRとの親和性を評価した。

3) フジツボ RXR の転写活性可能評価

2)と同様にフジツボ RXR 遺伝子配列を pM ベクター(Clontech/Takara bio)に組み込むことで、酵母の転写因子である GAL4 DBD とフジツボ RXR 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た。このプラスミドとルシフェラーゼ遺伝子の上流に GAL4 応答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ヒト胎盤細胞株である JEG-3 細胞に導入し、その後、9cRA、TBT、TPT、methyl farsonate で処理し、フジツボ RXR によるリガンド依存的な転写活性可能を評価した。

4 . 研究成果

1) フジツボ EcR、RXR 遺伝子配列

フジツボ RXR に関しては、RNA-seq データベースから遺伝子配列情報を推定し、それを基にプライマーを設計することで、タンパクコード領域に相当する部分(1,206 bp)を得ることが出来た。得られたフジツボ RXR アミノ酸配列を基準にして他生物種の RXR アミノ酸配列と比較を行った。その結果、DBD 部分の相同性は、比較に用いたどの生物種とも 80~90%の相同性を有していた。一方で、LBD 部分に関しては、ヒトやマウス、脊椎動物に類似した配列を有する貝類(ムラサキガイ、イボニシ、カキ)と 50~60%の相同性を有していたが、フジツボと同じ甲殻類であるシオマネキ、ミジンコとも 50~60%の相同性を有するにとどまった。また、フジツボは節足動物に分類されるが、同じ節足動物に分類される昆虫類であるトノサマバッタとの相同性は、55%程度、カイコ、ショウジョウバエとは 35%程度の相同性であった(図1)。

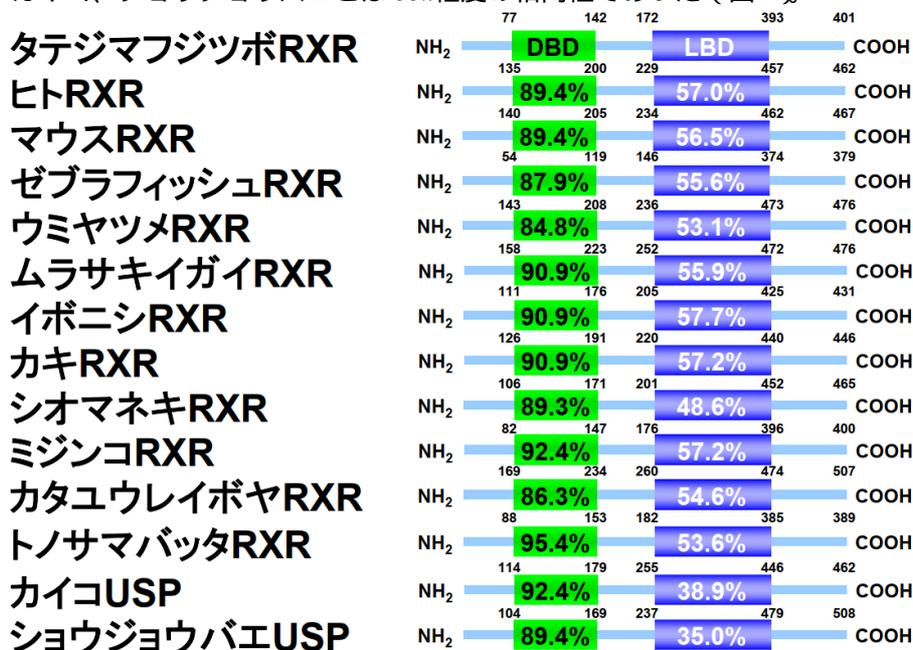


図1. フジツボ RXR と他生物種 RXR アミノ酸配列との比較

同様に、フジツボ EcR についても他生物種との比較を行った。フジツボ EcR に関しては一部推定配列を含むため、ショウジョウバエを基準にし、脊椎動物においては比較対象として liver X receptor (LXR) のアミノ酸配列を用いた。フジツボ EcR DBD とショウジョウバエ EcR DBD 配列を比較したところ、約 87% の高い相同性が確認された。これは脊椎動物、貝類と比較した場合と比べても(60~70%)、高いものであった。一方で、フジツボ EcR LBD とショウジョウバエ EcR LBD との相同性は、45%程度にとどまり、他の甲殻類と比較した場合と比べても(60%程度)低いものであった(図2)。

さらに詳細な解析を行うために、最尤法を用いてフジツボを含む様々な生物種の RXR のアミノ酸配列について系統樹解析を行った。フジツボは節足動物甲殻類に分類されるが、同じ甲殻類である軟甲綱(エビ、カニなど)や鰓脚綱(ミジンコ)などとは少し離れた位置にグループ分けされた。また、同じ節足動物に分類される昆虫綱ともやや離れたグループ分けをされており、フジツボ RXR アミノ酸配列は、節足動物の中でも他の分類とは異なる傾向にある可能性が示唆された(図3)。この結果は、図1のフジツボ RXR アミノ酸配列を比較した際に、LBD 部分の相同性が最大でも 60%程度にとどまったことを裏付ける結果といえる。

同様に EcR アミノ酸配列についても同様に系統樹解析を行った。フジツボ EcR は RXR の場合とは異なり、軟甲綱や鰓脚綱に近いグループ分けになった(図4)。この解析結果から、フジツボ EcR の性質は軟甲綱や鰓脚綱 EcR と類似したものになる可能性が示唆された。

ショウジョウバエEcR
 ネットアイシマカEcR
 カイコEcR
 トノサマバッタEcR
 シオマネキEcR
 ミジンコEcR
 タテジマフジツボEcR
 ナスビカサガイEcR
 ムラサキイガイEcR
 カキEcR
 エイLXR
 カタユウレイボヤEcR
 マウスLXRa
 ヒトLXRa

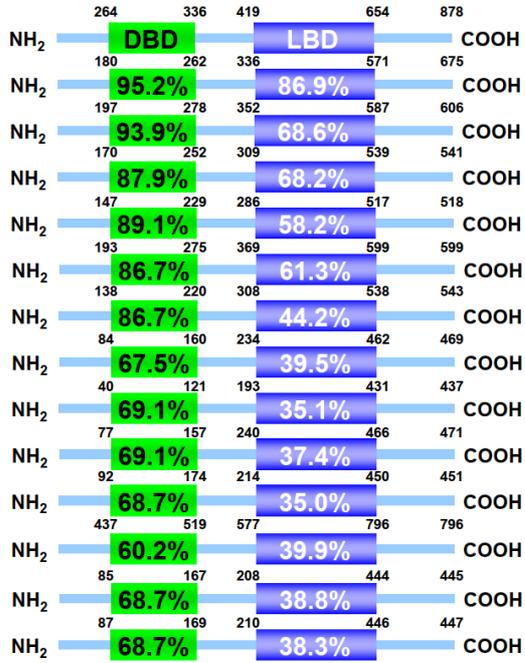


図 2. フジツボ EcR と他生物種 EcR アミノ酸配列との比較

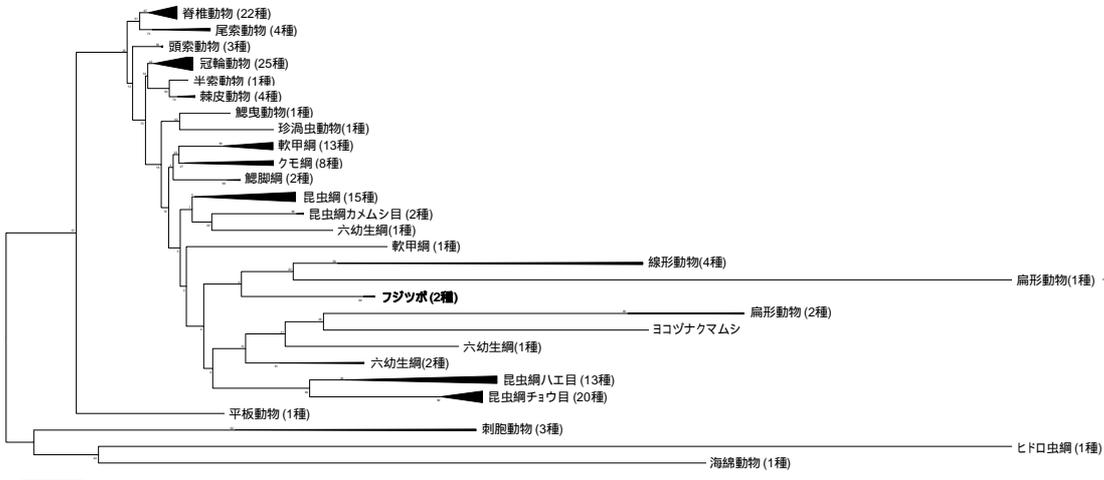


図 3. フジツボを含む様々な RXR アミノ酸配列の系統樹解析

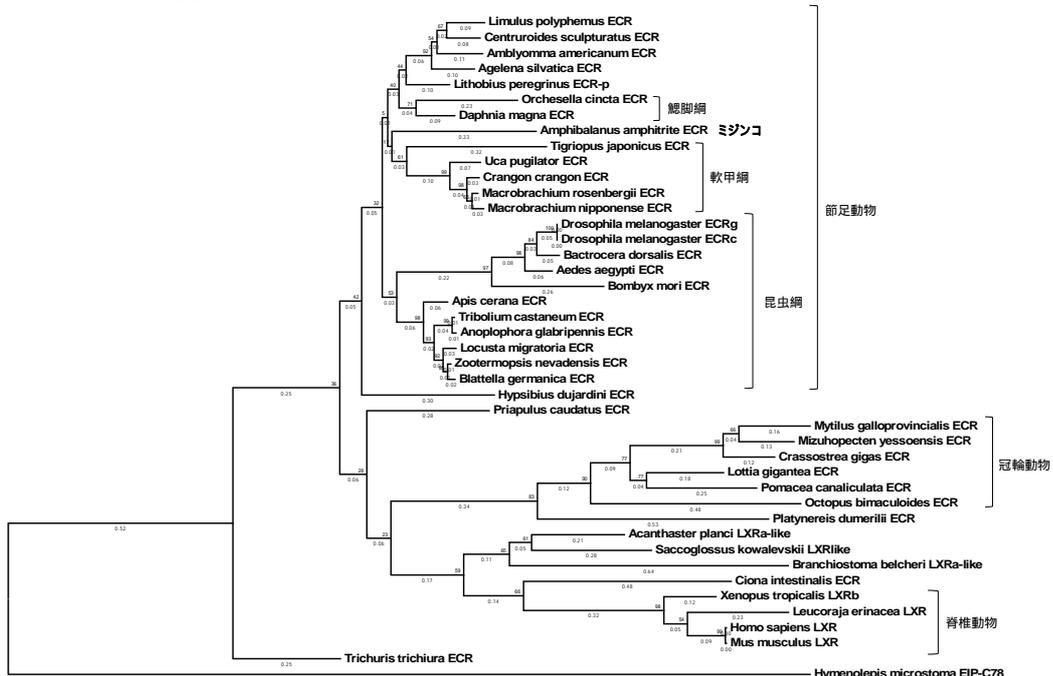


図 4. フジツボを含む様々な EcR アミノ酸配列の系統樹解析

2) RI 標識リガンドに対するフジツボ RXR の親和性

フジツボ RXR LBD 組み換えタンパクを発現するプラスミドを構築し、これを大腸菌に導入することで、組み換えタンパクを得た。まず、RI 標識リガンドとして ^3H 標識 9cRA を用い、哺乳動物 RXR がリガンドとする 9cRA がフジツボ RXR にも結合するか検討を行った。その結果、 ^3H 標識 9cRA がフジツボ RXR に結合することで確認される放射活性の上昇が確認できず、フジツボ RXR に 9cRA は結合しない可能性が示唆された。

一方で、 ^{14}C 標識 TPT を用いて検討を行ったところ、 ^3H 標識 9cRA の場合とは異なり、放射活性の上昇が確認された。そこで、どの程度の親和性があるか検討するために、非標識 TPT と競合阻害させる検討を行った。なお、検討はメダカ RXR と平行して行った。その結果、フジツボ RXR、メダカ RXR 共に、添加する非標識 TPT の濃度が高くなるほど検出される放射活性が低下することが確認された(図 5)。この結果から、TPT がフジツボ RXR に結合する可能性が示唆された。

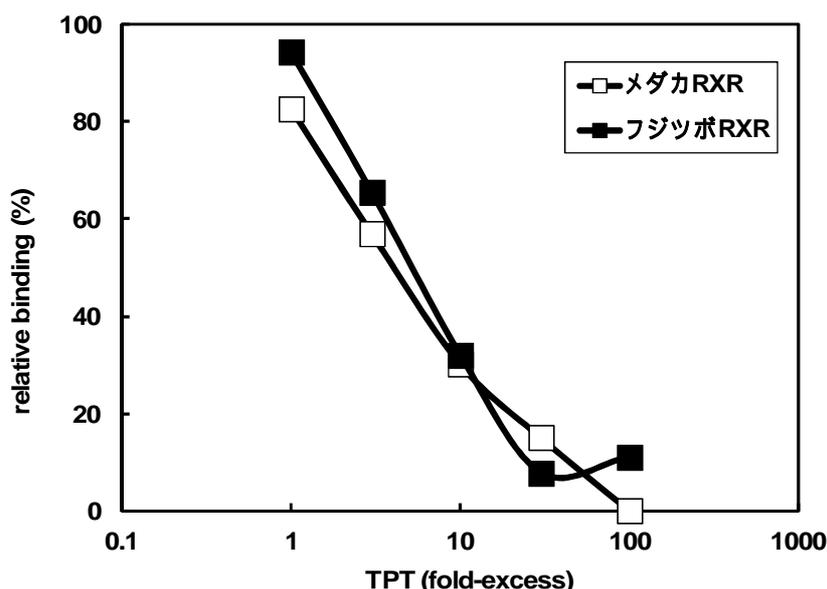


図 4. フジツボ、メダカ RXR に対する ^{14}C 標識 TPT の親和性

3) フジツボ RXR のリガンド依存的な転写活性化能評価

2)での検討結果から、TPT がフジツボ RXR に結合する可能性が示唆されたことから、TPT がフジツボ RXR のアゴニストとして機能するか検討する目的で、レポーターアッセイによる転写活性化能の評価を試みた。JEG-3 細胞に評価に必要なプラスミドを導入した後、9cRA、TBT、TPT、RXR のホモログである ultraspiracle (USP) のアゴニストである methyl farsonate を添加し、その 24 時間後にルシフェラーゼ活性の測定を行った。しかし、どの化合物を加えた場合もルシフェラーゼ活性の上昇は認められなかった。続いて、用いるプラスミドをフジツボ RXR LBD のみを組み込んだものから、RXR 全長を組み込んだものに変更して検討を行ったが、プラスミド量の調節を行った場合でも、化合物処理によるルシフェラーゼ活性の上昇は認められなかった。

4) まとめ

フジツボ cDNA から EcR および RXR に相当する配列が得られたことから、フジツボにおいても EcR および RXR が発現している事が確認された。また、系統樹解析の結果から、フジツボ EcR のアミノ酸配列は他の節足動物と類似している部分が多い一方で、フジツボ RXR のアミノ酸配列は他の節足動物と類似している部分が少ないという傾向が認められた。この結果から、フジツボ EcR は他の節足動物と似た性質を持つ可能性があり、その一方で、フジツボ RXR は他の節足動物と異なる性質を持つ可能性があると考えられる。

続いて、得られた配列情報を基に組み換えタンパクを発現するプラスミドを作成し、組み換えタンパクを得た。これと RI 標識リガンドを用いて、9cRA および TPT のフジツボ RXR に対する親和性について評価を行った。その結果、9cRA はフジツボ RXR に結合しない一方で、TPT はフジツボ RXR に結合する事が確認された。

さらに、JEG-3 細胞を用いてフジツボ RXR のリガンド依存的な転写活性化能の評価を試みた。その結果、結合することが確認できた TPT においてもアゴニスト活性を有することを確認できなかった。評価がうまくいかなかった要因として、フジツボ RXR が脊椎動物の RXR とあまり相同性が高くないことが考えられる。今後は、JEG-3 細胞の代わりに昆虫由来の細胞株を用いて、どのような化合物がリガンドとなるのか、RXR だけでなく、EcR についてもさらに検討を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fonseca ESS, Hiromori Y, Kaite Y, Ruivo R, Franco JN, Nakanishi T, Santos MM, Castro LFC.	4. 巻 10
2. 論文標題 An Orthologue of the Retinoic Acid Receptor (RAR) Is Present in the Ecdysozoa Phylum Priapulida.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes (Basel)	6. 最初と最後の頁 E985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes10120985.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshida I, Ishida K, Yoshikawa H, Kitamura S, Hiromori Y, Nishioka Y, Ido A, Kimura T, Nishikawa JI, Hu J, Nagase H, Nakanishi T.	4. 巻 385
2. 論文標題 In vivo profiling of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced estrogenic/anti-estrogenic effects in female estrogen-responsive reporter transgenic mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Hazard Mater.	6. 最初と最後の頁 121526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhazmat.2019.121526.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hu W, Jia Y, Kang Q, Peng H, Ma H, Zhang S, Hiromori Y, Kimura T, Nakanishi T, Zheng L, Qiu Y, Zhang Z, Wan Y, Hu J.	4. 巻 127
2. 論文標題 Screening of House Dust from Chinese Homes for Chemicals with Liver X Receptors Binding Activities and Characterization of Atherosclerotic Activity Using an in Vitro Macrophage Cell Line and ApoE ^{-/-} Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environ Health Perspect	6. 最初と最後の頁 117003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1289/EHP5039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Capitao Ana M. F., Lopes-Marques Monica S., Ishii Yoichiro, Ruivo Raquel, Fonseca Elza S. S., Piscoa Ines, Jorge Rodolfo P., Barbosa Melanie A. G., Hiromori Youhei, Miyagi Takayuki, Nakanishi Tsuyoshi, Santos Miguel M., Castro L. Filipe C.	4. 巻 52
2. 論文標題 Evolutionary Exploitation of Vertebrate Peroxisome Proliferator-Activated Receptor by Organotins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 13951 ~ 13959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.8b04399	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣森洋平
2. 発表標題 核内受容体に着目した環境化学物質の毒性メカニズム解明
3. 学会等名 フォーラム2018 衛生薬学・環境トキシコロジー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣森洋平, Elza Fonseca, 買手康文, Raquel Ruivo, Jo?o N. Franco, Miguel M. Santos, L. Filipe C. Castro, 中西剛
2. 発表標題 エラヒキムシ(Priapulus caudatus) レチノイン酸受容体(RAR)の性状解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 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,
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井陽一郎, 廣森洋平, 宮城 隆之, 永瀬 久光, L. Filipe C. Castro, 中西 剛
2. 発表標題 軟骨魚類Leucoraja erinacea におけるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) の性状解析
3. 学会等名 フォーラム2018 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井陽一郎, 廣森洋平, 宮城 隆之, 永瀬 久光, L. Filipe C. Castro, 中西 剛
2. 発表標題 軟骨魚類ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) の同定とその性状解析
3. 学会等名 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2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井陽一郎, 廣森洋平, 宮城 隆之, 永瀬 久光, L. Filipe C. Castro, 中西 剛,
2. 発表標題 軟骨魚類ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) の有機スズ類応答性の検討,
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮城隆之, 廣森洋平, 秋元凌, 永瀬久光, 中西剛
2. 発表標題 ムラサキイガイ (<i>Mytilis galloprovincialis</i>) Retinoid X receptorの発現部位同定および有機スズ応答性の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鈴鹿医療科学大学ホームページ
https://www.suzuka-u.ac.jp/wp-content/uploads/2018/06/pp_hiromori.pdf
 鈴鹿医療科学大学ホームページ
https://www.suzuka-u.ac.jp/wp-content/uploads/2018/06/pp_hiromori.pdf

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井戸 章子 (Ido Akiko) (00336629)	岐阜薬科大学・薬学部・助教 (23701)	
研究分担者	中西 剛 (Nakanishi Tsuyoshi) (50303988)	岐阜薬科大学・薬学部・教授 (23701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関