

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06222

研究課題名(和文)アオコ由来マイクロシスチンLRの新奇な上皮間葉転換誘導能の生理的意味の解明

研究課題名(英文)Physiological significance of the novel ability of microcystin LR from blue-green algae to induce epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

小松 正治 (Komatsu, Masaharu)

鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・教授

研究者番号：30325815

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)：Microcystin-LR曝露後の剥離・浮遊細胞を回収し、E-カドヘリンの発現変動を解析した結果、遺伝子、タンパク質ともに発現量が顕著に減少した。剥離・浮遊後に再接着した細胞はMicrocystin-LR以外に、NodularinおよびOkadaic acidに対しても耐性を示し、3ヶ月間継代培養すると細胞内のMicrocystin-LRは検出されず、Microcystin-LRに対する感受性が親細胞のHEK293-OATP1B3と同等に戻った。また、生薬イワジシャの成分ActeosideはOATP1B3を介したMicrocystin-LRの細胞内への取り込みを阻害し、細胞毒性を減弱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近い将来に水道法の改正等によりMicrocystin-LRが「要検討項目」から少なくとも「水質管理目標設定項目」に引き上げられることが望まれ、結果的に我が国の健康水準がより上昇することが期待される。さらにMicrocystin-LR、Nodularin、およびOkadaic acid中毒、ならびに疫学的因果関係が不明の肝臓障害の発生予防や対症療法の確立に貢献し、水圏生命科学領域における「食と健康」・「水と健康」研究を通じて世界中の人類の公衆衛生の向上に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：After exposure to microcystin-LR, detached and floating cells were collected and analyzed for changes in E-cadherin expression, which showed a marked decrease in expression of both genes and proteins. The cells that reattached after detachment and suspension were resistant to nodularin and okadaic acid as well as microcystin-LR, and after 3 months of passaging, microcystin-LR was not detected in the cells, indicating that the sensitivity to microcystin-LR is similar to that of parental cells.

In addition, Acteoside, a component of the crude drug Iwajisha, inhibited the cellular uptake of Microcystin-LR via OATP1B3 and attenuated its cytotoxicity.

研究分野：水圏生物毒性学

キーワード：Microcystin-LR Acteoside 上皮・間葉転換 OATP1B3 生薬イワジシャ

1. 研究開始当初の背景

昨今の超高齢社会において、食品成分や環境因子の健康の保持・増進への貢献が注目されている。しかし、これらのリスク&ベネフィットの関係性を把握するべきである。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、特に夏場のシアノバクテリアの大発生であるアオコへの対処は、安全な水の供給における重要課題である。古くは琵琶湖や霞ヶ浦、そして諏訪湖など、近年では諫早湾の淡水化においてアオコの発生が問題となっている。また、小型の池や湖においても野生生物への影響、水辺のレジャーでのアオコとの接触・誤飲、ならびにアオコが発生したダム湖の原水問題等が挙げられる。アオコを形成する *Microcystis* 属などの特定のシアノバクテリアが産生する Microcystin-LR は、動物の肝臓に選択的に毒性を発揮し、標的分子のタンパク質脱リン酸化酵素 PP1 および PP2A に不可逆的に結合し活性阻害することにより、急性の肝不全を誘発する(第1の機能)。1996年にブラジルにおいて Microcystin-LR およびその同族体の Microcystin 類が混入した透析液により 50名の腎臓透析患者が犠牲になった中毒事故のように、Microcystin-LR により「水の安全性」が脅かされている。我が国においても疫学的因果関係は証明されていないものの、アオコに起因すると推測される中毒事故が発生した記録が存在する。我が国の水道法に基づいた浄水過程(沈殿、濾過、塩素消毒)では Microcystin-LR の分解・除去は必ずしも完全でなく、Microcystin-LR 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使用せず、また浄水過程において活性炭やオゾン処理等の高度処理を組み入れる等、自治体レベルで中毒防止策を講じているのが現状である。Microcystin-LR は、その測定法の確立が不十分である点およびヒトへの影響が不明瞭である点から、水道法の水質基準において要検討項目として研究を奨励されている化合物である。近年は、Microcystin-LR が有す肝細胞増殖活性に起因する肝臓がんの発がんプロモーター活性(第2機能)についても注目されてきており、水道水中の基準値の見直しも議論され始めている。我々の研究グループは、最近、Microcystin-LR の第3機能を見出した。この第3機能は、上皮・間葉転換(EMT)様/間葉・上皮転換(MET)様の形質転換誘導能であるが、一般的に EMT/MET は、1) 胚発生時の原腸陥入、2) 外傷の修復・治癒、および、3) 悪性腫瘍の浸潤・転移に関与していることが知られている。

我々の研究グループは、Microcystin-LR の毒性発現ならびに解毒機構を解析するツールとして Microcystin-LR の毒性発現における責任分子である OATP1B1 および OATP1B3 を強制発現させ、作製・樹立した培養細胞を有している。これらの培養細胞を用いて Microcystin-LR が有す新奇な機能性として EMT 様/MET 様誘導能を示唆するアノキス抵抗性の誘導能を発見した。今後、その分子機序の詳細や Microcystin-LR の解毒機構が解明されることが期待される。また、従来は臓器特異性を示さないと考えられてきた Okadaic acid が、OATP1B3 の輸送基質であることを明らかにし、原因不明の肝障害・肝がんの発生を引き起こす可能性を示した。さらに、Microcystin-LR と構造の類似点の多い Nodularin にも Microcystin-LR と同様のアノキス抵抗性細胞への形質転換誘導能を見出した。本研究により共に水圏生物に由来するタンパク質脱リン酸化酵素 PP1 および PP2A 阻害剤である Microcystin-LR、Okadaic acid、および Nodularin 摂取に起因する中毒に対する化学予防法ならびに化学療法の礎を築くための研究基盤が確立できると考える。

2. 研究の目的

Microcystin-LR の第3機能は、EMT 様/MET 様の形質転換誘導能であるが、一般的に EMT/MET は、1) 胚発生時の原腸陥入、2) 外傷の修復・治癒、および、3) 悪性腫瘍の浸潤・転移に関与していることが知られている。アオコの発生している環境水または Microcystin-LR を曝露した環境水中で棲息している魚類受精卵の胚発生への影響も視野に入れながら、本研究では、Microcystin-LR が肝がんの発がんプロモーターである点を鑑み、悪性腫瘍の浸潤・転移に関与する可能性をイメージし、ケミカルバイオロジー的観点から計画したものである。

太古の地球に酸素を作り出し、好気性生物の出現や進化をもたらし、また現存植物の葉緑体の起源と考えられているシアノバクテリアと我々人間との関わりについて、本研究が改めて情報整理する機会になることを期待する。

本研究で得られる成果を基に、近い将来に水道法の改正等により Microcystin-LR が「要検討項目」から少なくとも「水質管理目標設定項目」に引き上げられることが望まれ、結果的に我が国の健康水準がより上昇することが期待される。さらに Microcystin-LR、Nodularin、および Okadaic acid 中毒、ならびに疫学的因果関係が不明の肝臓障害の発生予防や対症療法の確立に貢献し、水圏生命科学領域における「食と健康」・「水と健康」研究を通じて世界中の人類の公衆衛生の向上に寄与することが期待される。

3. 研究の方法

(1) Microcystin-LR の肝細胞への選択的な取り込み責任分子の一つ OATP1B3 を強制発現させた HEK293-OATP1B3 細胞に MTT アッセイにおける半数致死濃度の 2 倍濃度の Microcystin-LR を 48 時間曝露後に培養フラスコの底面から剥離・浮遊した細胞 (HEK293-OATP1B3-preFL 細胞) を回収し、細胞間接着に重要な E カドヘリンの遺伝子およびタンパク質の発現変動について Real-time PCR およびイムノブロットングで解析した。

(2) Microcystin-LR の細胞毒性を抑制することを当研究室で見出した Acteoside の作用機序を解析した。

(3) 形質転換細胞は Microcystin-LR に対して耐性を示すことが判明しているため、その他の化合物に対する耐性スペクトルを MTT アッセイで解析した。

(4) これまでに、第 2 世代の細胞まで作製可能であることを確認している。そこで、第 2 世代細胞の性状解析、ならびに第 2 世代細胞から第 3 世代細胞を作製可能か否かについて検討する。

4. 研究成果

(1) の解析の結果、Microcystin-LR 未処理の HEK293-OATP1B3 細胞に比べて Microcystin-LR 曝露後の HEK293-OATP1B3-preFL 細胞において E カドヘリンの発現量が遺伝子、タンパク質ともに顕著に低下していた。この結果は、Microcystin-LR 曝露後に剥離・浮遊した細胞が再接着して増殖した HEK293-OATP1B3-FL 細胞で得られた結果と同じ結果が得られた。

(2) の解析の結果、Acteoside は OATP1B3 を介した Microcystin-LR の細胞内への取り込みを非拮抗的に阻害することが明らかになった (図 1)。さらに Acteoside は Microcystin-LR の未同定の 22 kDa の細胞内タンパク質との相互作用を阻害することにより Microcystin-LR の細胞毒性を減弱することが明らかになった。また、Acteoside は、Microcystin-LR の他にも Nodularin および Okadaic acid の細胞毒性を減弱することが明らかになった (図 2)。また、Acteoside は単独曝露においても ERK のリン酸化を誘導し、生存シグナルを活性化することが明らかになった。

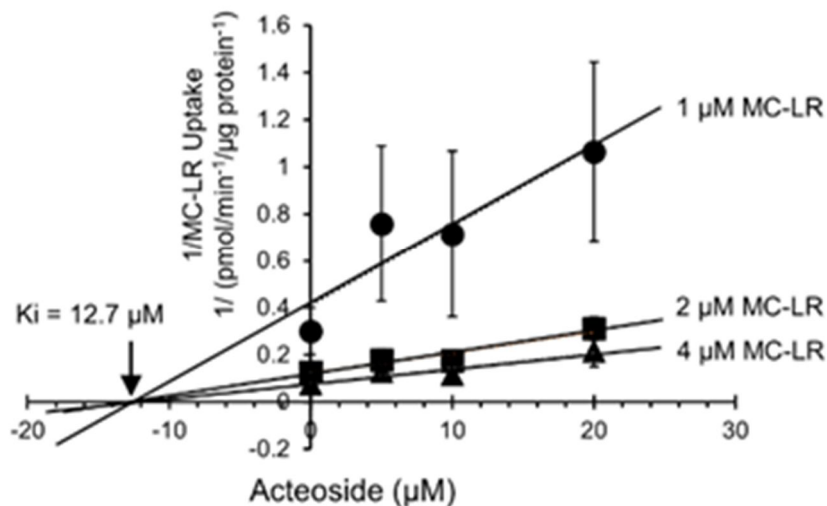


図 1 . Acteoside による Microcystin-LR の細胞内取り込みの非拮抗阻害

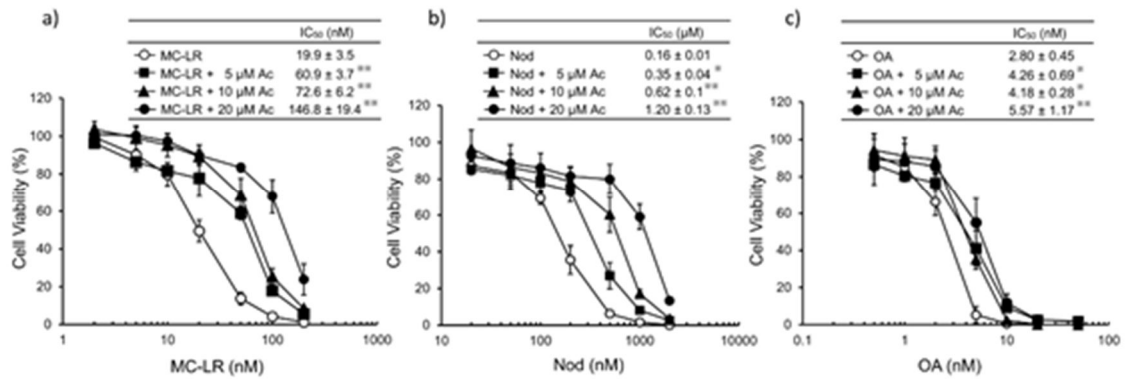


図2. Acteoside による Microcystin-LR(a) , Nodularin(b) , および Okadaic acid(c) の細胞毒性の抑制

(3) の解析の結果, OATP1B3 の輸送基質の毒性化合物に対する感受性を解析した結果, HEK293-OATP1B3-AD および HEK293-OATP1B3-FL 細胞は, 共に Microcystin-LR ばかりでなく Nodularin および Okadaic acid に対して耐性を獲得していたが, Cisplatin に対して耐性は示さなかった。

(4) の解析の結果, HEK293-OATP1B3-FL 細胞は, 作製から継代培養を続け, 3 ヶ月経過すると細胞内の Microcystin-LR は検出限界以下まで減少し, Microcystin-LR に対する感受性が親細胞の HEK293-OATP1B3 細胞と同程度にまで戻った。作製から 1 ヶ月後の HEK293-OATP1B3-FL 細胞に Microcystin-LR を曝露し, 第2世代の HEK293-OATP1B3-FL2 細胞が作製可能であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oishi Kazuki, Miyazaki Mina, Takase Ryo, Chigwechokha Petros Kingstone, Komatsu Masaharu, Shiozaki Kazuhiro	4. 巻 46
2. 論文標題 Regulation of triglyceride metabolism in medaka (<i>Oryzias latipes</i>) hepatocytes by Neu3a sialidase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fish Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 563 ~ 574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10695-019-00730-6	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
1. 著者名 林征一、小松正治、内匠正太	4. 巻 74
2. 論文標題 ニホンウナギ産卵回遊中の代謝に関する考察ーピリルピン結合型UnaGの産卵回遊における生理的意義ー	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物の科学 遺伝	6. 最初と最後の頁 353-367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Asami Ikeda, Mayu Komamizu, Akito Hayashi, Chiharu Yamasaki, Kenji Okada, Momoko Kawabe, Masaharu Komatsu, Kazuhiro Shiozaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Neu1 deficiency induces abnormal emotional behavior in zebrafish.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 NO:13477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92778-9	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 -
1. 著者名 Oishi, K., Morise, M., Vo, KL., Tran, TN., Sahashi, D., Ueda-Wakamatsu, R., Nishimura, W., Komatsu, M., Shiozaki, K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Host lactosylceramide enhances <i>Edwardsiella tarda</i> infection.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 e13365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cmi.13365	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 -

1. 著者名 Honda, A., Hayasaka, O., Mio, K., Fujimura, K., Kotani, T., Komatsu, M., Shiozaki, K	4. 巻 185
2. 論文標題 The involvement of Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) Neu4 sialidase in neural differentiation during early ontogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 105-116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biochi.2021.03.008	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 -

1. 著者名 Kawabe M, Hayashi A, Komatsu M, Inui A, Shiozaki K.	4. 巻 87
2. 論文標題 Ninjinyoeito improves anxiety behavior in neuropeptide Y deficient zebrafish.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropeptides	6. 最初と最後の頁 102136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.npep.2021.102136.	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 -

1. 著者名 Shiozaki K, Kawabe M, Karasuyama K, Kurachi T, Hayashi A, Ataka K, Iwai H, Takeno H, Hayasaka O, Kotani T, Komatsu M, Inui A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Neuropeptide Y deficiency induces anxiety-like behaviours in zebrafish (<i>Danio rerio</i>).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 5913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62699-0	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 -

1. 著者名 Honda A, Chigwechokha PK, Takase R, Hayasaka O, Fujimura K, Kotani T, Komatsu M, Shiozaki K.	4. 巻 742
2. 論文標題 Novel Nile tilapia Neu1 sialidases: Molecular cloning and biochemical characterization of the sialidases Neu1a and Neu1b.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 144538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2020.144538.	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 -

1. 著者名 Okada K, Takase R, Hamaoka Y, Honda A, Ikeda A, Hokazono Y, Maeda Y, Hayasaka O, Kotani T, Komatsu M, Shiozaki K.	4. 巻 477
2. 論文標題 Establishment and characterization of Neu1-knockout zebrafish and its abnormal clinical phenotypes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem J.	6. 最初と最後の頁 2841-2857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20200348.	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 -

1. 著者名 Kazuki Oishi, Mina Miyazaki, Ryo Takase, Petros Kingstone Chigwechokha, Masaharu Komatsu and Kazuhiro Shiozaki	4. 巻 46
2. 論文標題 Regulation of triglyceride metabolism in medaka (<i>Oryzias latipes</i>) hepatocytes by Neu3a sialidase.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fish Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 563-574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10695-019-00730-6.	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 -

1. 著者名 Vo, KL., Tsuzuki, T., Kamada-Futagami, Y., Chigwechokha KP., Honda, A., Oishi, K., Komatsu, M., Shiozaki, K.	4. 巻 476
2. 論文標題 Desialylation by <i>Edwardsiella tarda</i> is the initial step in the regulation of its invasiveness.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem. J.	6. 最初と最後の頁 3183-3196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20190367.	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小松正治、内匠正太
2. 発表標題 アオコ毒マイクロシステンLRの新奇機能性の発見
3. 学会等名 第47回日本毒性学会年会 シンポジウム「海産毒リビジテッド2.0」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀬戸祥太、内匠正太、塩崎一弘、安樂和彦、小松正治
2. 発表標題 細胞の酸化ストレス抵抗性を賦与するウナギ緑色蛍光タンパク質eeIGFP
3. 学会等名 第42回日本中毒学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富岡 優, 嶋 祐介, 濱口真理奈, 塩崎一弘, 内匠正太, 小松正治
2. 発表標題 アオコ毒microcystin-LRの上皮間葉転換様作用
3. 学会等名 令和元年度 日本水産学会九州支部会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富岡 優, 藤田理子, 山本歩加, 塩崎一弘, 古川龍彦, 内匠正太, 小松正治
2. 発表標題 Microcystin-LRが誘導するEMT様形質転換細胞の細胞内シグナリングの解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松正治
2. 発表標題 微細藻類と人間の健康との関わり
3. 学会等名 令和元年度 かがしま県民大学連携講座「からだの健康・病気と遺伝子」(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鹿児島大学水産学部 食品生命科学分野 ケミカルバイオロジー研究室
<https://marinechemicalbiology.jimdofree.com/>
鹿児島大学 研究一直線
<https://www.kagoshima-u.ac.jp/researcher/2018/05/post-19.html>
鹿児島大学水産学部 立ち寄ってみよう！楽しい研究室
https://www.fish.kagoshima-u.ac.jp/topinfomember/fls_komatsu/

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
研究協力者	内匠 正太 (Takumi Shota)	鹿児島大学・水産学部・准教授 (17701)	

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
---------	---------