

## 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6月11日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21248026

研究課題名（和文） 有機スズによる腹足類のインポセックス誘導：レチノイドX受容体関与説の高度化

研究課題名（英文） Induction mechanism of imposex caused by organotin compounds in gastropods: elucidation of involvement of the retinoid X receptor

研究代表者

堀口 敏宏 (HORIGUCHI TOSHIHIRO)

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・室長

研究者番号：30260186

研究成果の概要（和文）：イボニシ (*Thais clavigera*) を中心に、RXR に関する生物学的特徴と、ペニス及び輸精管の分化・成長・形態形成との関係を解析した。イボニシ RXR には2つのアイソフォームが存在し、両者で転写活性が異なること、並びに 9-*cis* レチノイン酸 (9cRA)、トリブチルスズ(TBT)及びトリフェニルスズ(TPT)により転写活性の誘導がみられることなどを明らかにした。イボニシとバイ (*Babylonia japonica*) における生殖腺の分化及び生殖輸管の発達を組織学的に調べ、明らかにした。イボニシの神経ペプチドに関する基礎知見を得た。イボニシとバイにおける脊椎動物様ステロイドの検出を試みるとともに、ステロイド受容体が見出されないこと、アロマトーゼ阻害剤とテストステロンでインポセックスの発症・増進が見られないことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We isolated two isoforms of RXR cDNAs, RXR isoform 1 (*TcRXR-1*) and RXR isoform 2 (*TcRXR-2*), in the rock shell *Thais clavigera*. The deduced amino acid sequences of *TcRXR-1* and *TcRXR-2* are highly homologous with those of other gastropods. These *TcRXR* isoforms displayed 9cRA-dependent activation of transcription in a reporter gene assay using COS-1 cells. The transcriptional activity of *TcRXR-2*, the product of which has five additional amino acids in the T-box of the C domain, was significantly lower than that of *TcRXR-1*. Decreases of the transcriptional activity by *TcRXR-1* were observed when more than equal amount of *TcRXR-2* was existed in a co-transfection assay. Meanwhile, the characteristics of the development of male genitalia (penis and vas deferens) in imposex-exhibiting female *T. clavigera*, were histologically examined using specimens from a wild population and tributyltin (TBT)-exposed females in the laboratory. A variety of vas deferens morphogenesis patterns were observed in wild female *T. clavigera*, and the characteristics were summarised. The immature vas deferens at an initial stage, however, was only observed beneath or behind the penis, and no vas deferens was observed close to the vaginal opening (i.e., vulva) of the capsule gland in TBT-exposed females, which was different from the characteristics of vas deferens formation observed in wild females. Taking into consideration both the observed results from wild female specimens and from TBT-exposed females in the laboratory, the vas deferens sequence (VDS) index for *T. clavigera* was proposed as VDS 1-6.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2010年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2011年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
総計	28,200,000	8,460,000	36,660,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学、水産学一般

キーワード：インボセックス・有機スズ・レチノイド X 受容体・神経ペプチド・ステロイド

### 1. 研究開始当初の背景

ごく低濃度の有機スズ（トリブチルスズ (TBT)及びトリフェニルスズ(TPT)）化合物によって腹足類（特に、前鰓類）に特異的に惹起されるインボセックスは、有機スズによる海洋汚染が原因で世界中の腹足類が被った“被害”として広く知られてきた。一方、インボセックスは生物学的にきわめて興味深い現象であり、研究開始当初（2009年）までに、世界の研究者から有機スズによる腹足類のインボセックス誘導機構について4つの仮説が提起されてきた。しかしながら、研究代表者らがイボニシを用いてこれまでに得た知見から、インボセックス現象の誘導及び増進には核内受容体の一種・レチノイド X 受容体(RXR)が深く関与している可能性がきわめて高いことが明らかとなり、研究代表者らは2004年に第5の仮説・RXR活性化説を提起した(Nishikawa J. et al., *Environ. Sci & Technol.* **38**: 6271-6276, 2004)。それゆえ、RXRを中心に据えて、より詳細なインボセックス誘導機構の解析が必要であった。これは、腹足類、とりわけ前鰓類の性分化や生殖器官形成などに関するRXRを介したメカニズムの解明に有用であるとともに、前鰓類における性ホルモンが何であるかなどの基礎生物学の知見の充実にも貢献すると期待された。

一方、既存のインボセックス誘導機構仮説（アンドロゲンや神経ペプチドが関与するとしてアロマターゼ阻害説、APGWamide 関与説など）は、野外での観察結果や室内実験の結果にいくつもの矛盾を有しているにも拘らず、前鰓類の種差ゆえであると欧米では主張され続けており、それらの妥当性の検証も必要であった。

### 2. 研究の目的

本研究では前鰓類におけるRXRを介したインボセックスの誘導、すなわち、ペニスと輸精管の分化、形成及び発達に関する詳細な機構解析を中心としつつ、神経ペプチドとステロイドのインボセックス誘導機構への関与についての検証も進めることとした。

### 3. 研究の方法

分子生物学、生化学、病理組織学、免疫組織化学、分析化学の手法を用いて、*in vitro* 及び *in vivo* 実験を行った。

### 4. 研究成果

イボニシ (*Thais clavigera*) RXR に関する

生物学的特徴と、ペニス及び輸精管の分化・成長・形態形成との関係を解析する一環として、RXR サブタイプ及びその他の核内受容体の探索を行った結果、イボニシ RXR には2つのアイソフォームが存在することを明らかにした (図1)。

```
TcRXR-1 1 MDRSDMDTLENNPFGSGMFGMGMGVPMGGMGGPHGPKFDIISTLMPFSTHGFPSY
TcRXR-2 1 MDRSDMDTLENNPFGSGMFGMGMGVPMGGMGGPHGPKFDIISTLMPFSTHGFPSY
TcRXR 1 -----MGRQVACQVAMHMGVPMGGMGGPHGPKFDIISTLMPFSTHGFPSY

61 PLYGMPGMPSTQSPGGNMTSPQMSPTSLGSPMTMCLSPDTTSSPQMPSGLSKH
61 PLYGMPGMPSTQSPGGNMTSPQMSPTSLGSPMTMCLSPDTTSSPQMPSGLSKH

121 ICAICGRASGKHVYVSCBGCCKFFERTVRKDLTYACRDNENCMIDKQRNRCQCYRM
121 ICAICGRASGKHVYVSCBGCCKFFERTVRKDLTYACRDNENCMIDKQRNRCQCYRM

181 KCLAQGMKRE-----AVQERQRVKEKGGVEBESFGANGMPVEQLLEAIAVEPKIDT
181 KCLAQGMKREACLESSAVQERQRVKEKGGVEBESFGANGMPVEQLLEAIAVEPKIDT

241 YIDAQKEFVTHIQAAADKQLFTLVDWAKRIHPFVELFLEDQVILLRAGNELLIGFHSR
236 YIDAQKEFVTHIQAAADKQLFTLVDWAKRIHPFVELFLEDQVILLRAGNELLIGFHSR

301 STQVTDGILLATGLVHRSSAQAQGVGTIFDRVLVELVAKRMRMMDKTELCLRAIVLF
296 STQVTDGILLATGLVHRSSAQAQGVGTIFDRVLVELVAKRMRMMDKTELCLRAIVLF

361 NFDARGLQVQVEQLRERKVIASLEECYKQVDFRQGFADKLLLRPLARSLIGLCKLEHL
356 NFDARGLQVQVEQLRERKVIASLEECYKQVDFRQGFADKLLLRPLARSLIGLCKLEHL

421 FFFKLIQGTFLDTFLMMLRSPSPAT
416 FFFKLIQGTFLDTFLMMLRSPSPAT
```

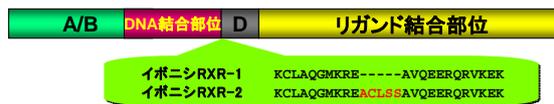


図1 イボニシ レチノイド X 受容体(TcRXR)のアミノ酸配列の比較

これらの配列を用いてレポータージーンアッセイを行った結果、9-*cis* レチノイン酸 (9cRA)、TBT 及び TPT により転写活性の誘導がみられた (図2)。また、ほ乳類のRXRを用いた研究より、生体内に存在しRXRのリガンドとなり得る物質として、ドコサヘキサエン酸(DHA)が知られているが、今回の系でDHAを用いた場合ではほとんど転写活性が見られなかった(但し、高濃度のDHA(10<sup>-6</sup>M)では細胞毒性のため、転写活性は測定不能)。

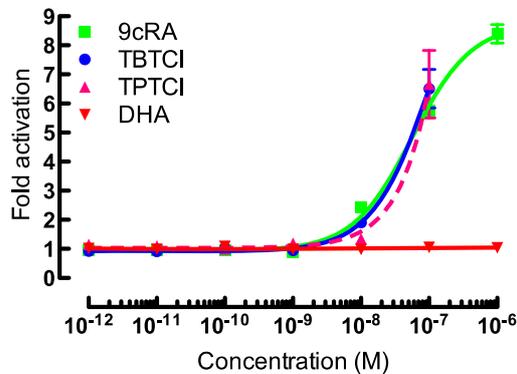


図2 イボニシ RXR (TcRXR-1) によるレポータージーンアッセイ

また、イボニシ RXR を用いたレポーター遺伝子アッセイの結果、ヒト RXR 特異的アゴニストにより転写活性の誘導が認められた。また、イボニシ RXR レポーター遺伝子アッセイで 9cRA、TBT 及び TPT により誘導される転写活性をヒト RXR 特異的アゴニストが阻害することが確かめられた。

一方、ヒト RXR アゴニスト物質の筋肉注射試験及びアゴニスト物質の流水式連続曝露試験を行い、それぞれがイボニシのインボセックス誘導及び増進に及ぼす影響を調べた。影響の再現性確認のための再実験も行った。

また、これまでにわれわれが作製したイボニシ RXR の特異抗体を用いて、immuno-blotting 法によりペニス組織での RXR タンパクの発現解析も行った。その結果、抗体価が高く、イボニシ RXR を特異的に検出することを確認した。また、イボニシ組織を用いた western blotting 及び免疫染色法により、組織中の RXR タンパクも認識されることを明らかにした。

前鰓類の RXR 遺伝子の機能同定に関して、イボニシ以外の前鰓類としてヨーロッパチヂミボラ (*Nucella lapillus*) 及びバイ (*Babylonia japonica*) を用いて RXR のクローニングを行った。その結果、いずれの種においても、イボニシで報告されたのと同様のアイソフォームが存在することが確認された。これらの RXR 遺伝子を用いてレポーター遺伝子アッセイ法により機能検討を行った結果、いずれの RXR 遺伝子を用いたアッセイにおいても 9cRA 存在下で転写活性が認められた。また、有機スズ化合物のうち、TBT や TPT などを用いた転写活性誘導実験においても、イボニシ RXR を用いた場合と同様の転写活性誘導が認められた。

実験室水槽内でのバイ親貝の産卵により得られたバイ浮遊幼生及び着底初期稚貝と、種苗生産されたバイ稚貝を 24 ヶ月間実験室水槽で飼育しながら経時的に取り上げて生殖腺の分化並びに生殖輸管の発達過程を組織学的に調べた。その結果、生殖腺の分化は、雌雄ともに、14 ヶ月齢までは不明瞭であったが、16 ヶ月齢以降で進行した。一方、14 ヶ月齢の雄では、ペニスは観察されなかったものの未熟な輸精管が観察された。ペニス形成は、16 ヶ月齢以降、ほぼ全ての雄で認められたが、輸精管は未完成であった。これに対し、雌の膈、交尾囊及び卵囊腺は 14 ヶ月齢で発達し、卵白腺及び貯精囊は 16 ヶ月齢で発達することが明らかとなった。これにより、バイにおいては生殖腺の分化及び発達に先んじて生殖輸管の形成と発達が進むことが明らかとなり、軟体動物前鰓類の性分化の機構は脊椎動物のそれとは異なることが示唆された。

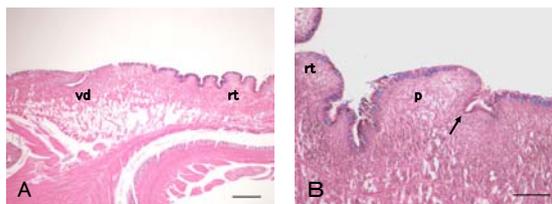


図3 TBT 曝露を受けた雌イボニシにおけるペニスと輸精管の形成初期段階の組織像

また、イボニシの野外採集個体並びに TBT 曝露個体を用いた組織学的検討により、インボセックスにおけるペニスと輸精管の発達機序を調べた。その結果、野外採集個体では、約 6 ヶ月齢と見られる個体（殻高 6~7mm）で雌雄ともにペニスと輸精管が観察された。バイと異なり、雄の生殖輸管の発達もインボセックス発症もより低年齢（月齢）で生じると推察された。一方、野外採集個体のインボセックス症状（ペニスと輸精管の発達程度）はバラエティに富み、初期段階においてペニス形成と輸精管形成のいずれが先行するか、不明瞭であった。なお、重症個体においては、ペニス外部形態のさまざまな奇形や輸精管周辺組織における結節（瘤状組織）形成、卵囊腺の開裂が、卵巣における精子形成とともに見られた。一方、TBT 流水曝露試験によるインボセックス発症個体では、未熟な輸精管は右触覚後部のペニス後方もしくは下部にのみ観察され（図3）、卵囊腺側（陰門周辺）には観察されなかった。これにより、イボニシ雌におけるインボセックス発症過程では、ヨーロッパチヂミボラと異なり、右触覚後部におけるペニス形成が輸精管形成に若干先行するか、それとほぼ同時に表皮が陥入して輸精管形成が始まると推察された。以上の結果を基に、イボニシ雌のインボセックス発症に関する輸精管順位(VDS)を提起した(図4)。

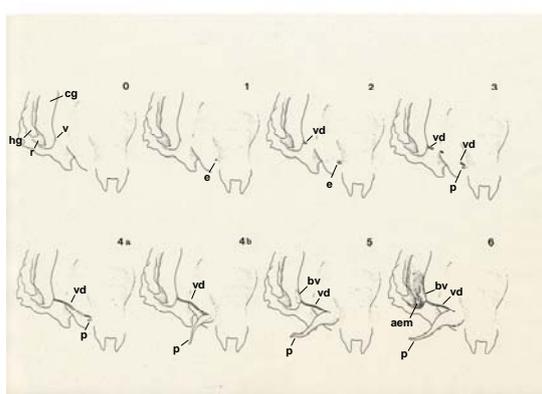


図4 イボニシのインボセックス発症段階に関する輸精管順位 (VDS)

他方、イボニシ体内各組織における有機スズ化合物の詳細な分布を調べた結果、生殖器官等だけでなく、頭部神経節への高蓄積も観



②堀口敏宏, インポセックス研究の変遷とRXR 仮説の展開, 環境ホルモン学会第13回研究発表会, 2010年12月16日, 東京大学山上会館(東京都),

③Horiguchi, T., Ohta, Y., Urushitani, H., Iguchi, T., Nishikawa, J., Shiraishi, F., Shimizu, M., Morita, M., Shiraishi, H., Analysis of the retinoid X receptor(RXR)-mediated mechanism of imposex induced by organotins in gastropods, Physical and Chemical Impacts on Marine Organisms –For Conservation of Biodiversity and Sustainability-, 2010年10月25日, 愛知県立大学(愛知県),

④Horiguchi, T., Ohta, Y., Cho, H.S., Shiraishi, H., Developmental process of vas deferens and penis in the imposex-exhibiting female rock shell, *Thais clavigera*, SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Europe 20<sup>th</sup> Annual Meeting, 2010年5月24日, Palacio de Congresos y Exposiciones – FIBES (Spain),

⑤Cho, H.S., Park, J.C., Choi, M.K., Choi, H.G., Horiguchi, T., Recent trends of imposex and organotins content in the rock shell, *Thais clavigera* from Korean coast, 第18回環境化学討論会, 2009年6月10日, つくば国際会議場(茨城県)

[図書] (計6件)

①Horiguchi, T. (Pagliarani, A., Trombetti, F., Ventrella, V., eds.), Bentham Science Publishers, UAE, e-book Biochemical and Biological Effects of Organotins (eISBN: 978-1-60805-265-3; doi: 10.2174/97816080526531120101), 2012, 204,

②堀口敏宏(編集代表 吉岡斉), 原書房, 東京, [新通史]日本の科学技術(全4巻+別巻1), 第4巻 第8部 生命・環境・安全・防災, 2011, 642,

③Horiguchi, T. (Arai, T., Harino, H., Ohji, M., Langston, W.J., eds.), Springer, Tokyo, Japan, Ecotoxicology of Antifouling Biocides, 2009, 437

[その他]

ホームページ等

[http://db-in.nies.go.jp/research/rsdb\\_out/vdetail.php?id=100079](http://db-in.nies.go.jp/research/rsdb_out/vdetail.php?id=100079)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀口 敏宏 (HORIGUCHI TOSHIHIRO)

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク  
研究センター・室長

研究者番号: 30260186

### (2) 研究分担者

太田 康彦 (OTA YASUHIKO)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号: 60069078

井口 泰泉 (IGUCHI TAISEN)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構・  
岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号: 90128588

森下 文浩 (MORISHITA FUMIHIRO)

広島大学・理学研究科・助教

研究者番号: 20210164

### (3) 連携研究者

該当なし