

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380110

研究課題名(和文) 軟体動物前鰓類におけるレチノイン酸受容体(RAR)の性状及び生理機能解析

研究課題名(英文) Characterization and function analysis of retinoic acid receptor (RAR) in prosobranch gastropods

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：イボニシから脊椎動物のRARとアミノ酸配列の相同性が比較的高いRAR様配列(イボニシRAR)が単離された。All-trans レチノイン酸(ATRA)添加時のウエスタンブロットにより、イボニシRARタンパクは発現したが、転写活性は誘導されなかった。イボニシRARとヒトRAR のリガンド結合部位を融合させATRA, 9-cis レチノイン酸, 13-cis レチノイン酸, All-trans レチノール添加時でもイボニシRARの転写活性は誘導されず、イボニシRARのDNA結合部位をヒトRAR リガンド結合部位と融合させると転写活性が誘導された。イボニシRARとRXRは相互作用すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We isolated a retinoic acid receptor (RAR)-like cDNA (TcRAR) in the rock shell, *Thais clavigera*, and examined the transcriptional activity of the TcRAR protein by using all-trans retinoic acid (ATRA). However, no ligand-dependent transactivation was observed by this protein. We also examined the transcriptional activity of the TcRAR-ligand binding domain fused with the GAL4-DNA binding domain by using retinoic acids, retinol, and organotin compounds and again saw no noteworthy transcriptional induction by these chemicals. Use of a mammalian two-hybrid assay to assess the interaction of the TcRAR protein with the TcRXR isoforms suggested TcRAR might form a heterodimer with the RXR isoforms. The transcriptional activity of domain-swapped TcRAR chimeric proteins (the A/B domain of TcRAR combined with the D&#8211;F domain of human RAR ) was also examined and found to be ATRA-dependent. These results suggest TcRAR is not activated by retinoic acids, but can form a heterodimer with TcRXR isoforms.

研究分野：海洋生態毒性学

キーワード：軟体動物 前鰓類 レチノイン酸受容体(RAR) レチノイドX受容体(RXR) イボニシ

## 1. 研究開始当初の背景

前鰓類のインボセックスは、船底防汚塗料などに使用されてきた有機スズ(トリブチルスズ(TBT)及びトリフェニルスズ(TPT))化合物により、ごく低濃度であっても特異的に惹起され、重症の場合には産卵障害を経て産卵不能に至ることから、個体群が減少したという種も報告されてきた。その誘導メカニズムについては、アロマターゼ阻害に伴うアンドロゲン上昇などの5種類の仮説が提出されてきたが、報告者らは追試の結果、そのいずれをも支持できないと報告するとともに、そもそも、軟体動物が脊椎動物と同様のステロイドを性ホルモンとして有するとの仮説に生物学的矛盾があること(ステロイド産生細胞が見出されず、ステロイド代謝酵素の存在も曖昧で、機能的なステロイド受容体が遺伝子レベルで見ても見出されないこと)を総説論文や著書(Horiguchi, T. *Environ. Sci.* **13**(2): 77-87, 2006.; Horiguchi, T. In: *Ecotoxicology of Antifouling Biocides* (Arai, T, Harino, H, Ohji, M, Langston, WJ eds., Springer, Tokyo, Japan, 437p.), pp.111-124, 2009.)などで主張してきた。また、前鰓類のインボセックスは、有機スズによる核内受容体の一種・レチノイドX受容体(RXR)の活性化を通じて誘導されることを、これまでの報告者らによる科研費研究(基盤(A) H21-H23年度、基盤(C) H19-H20年度、基盤(B) H17-H18年度)などを通じた *in vitro* 及び *in vivo* での実験研究(Horiguchi, T. et al. *Aquat. Toxicol.*, **84**: 379-388, 2007.; Horiguchi, T. et al. *Cell Biol. Toxicol.* **24**: 553-562, 2008.; Horiguchi, T. et al. *Analytical & Bioanalytical Chemistry* **396**: 597-607, 2010. など)によって明らかにしてきた。これにより、最近では、欧米の研究者の間にも前鰓類のインボセックス誘導メカニズムとしてのRXR活性化説に対する支持が広がってきている。とはいえ、

RXRを介したインボセックス誘導メカニズムの全貌を明らかにするためには、RXR以外の核内受容体の種類と機能、RXRの二量体形成様式(ホモ二量体かヘテロ二量体か)、生体内リガンドや標的遺伝子、ペニスや輸精管の分化・増殖/成長・形態形成に関わる各種因子など基礎的な生物学的知見を含めて、明らかにすべき課題がなお複数残されている。

一方、報告者らは最近、哺乳類においてRXRと二量体を形成することが知られているレチノイン酸受容体(RAR)の遺伝子を、イボニシから単離することに成功した。ナメクジウオやホヤ類を除く無脊椎動物からRARが単離された例はほとんどなく、無脊椎動物においては、イボニシなどの前鰓類を含め、RARの性状や生理機能がほとんど明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、軟体動物の前鰓類におけるレチノイン酸受容体(RAR)の性状及び生理機能の解析を進め、インボセックス誘導メカニズムへの関与の有無だけでなく、生理・生化学的な基礎知見の獲得と蓄積を図ることを目的とした。

すなわち、研究期間(平成24年度~平成26年度)のうちに以下の項目について *in vitro* 及び *in vivo* での実験研究と解析的研究を進め、明らかにすることを目標とした。

- (1) RARの転写活性及びRXRとの相互作用(イボニシ)
- (2) RAR及びRXR転写活性の種差(イボニシ、ヨーロッパチヂミボラ、パイ)
- (3) その他の核内受容体の探索(イボニシ)

## 3. 研究の方法

イボニシ(新腹足目アクキガイ科)から単離されたRARのアミノ酸配列と脊椎動物のRARとの相同性解析を行うとともに、

ミドリザル腎臓由来細胞 (COS-1) もしくはヒト肝臓由来細胞 (HepG2) にイボニシ RAR を導入し、レポータージーンアッセイ法により転写活性を測定した。また、イボニシ RAR 遺伝子の DNA 結合部位とヒト RAR 遺伝子のリガンド結合部位とを融合した場合の転写活性も調べた。

イボニシの RAR と RXR isoform( isoform 1 及び 2 (Urushitani, H., Katsu, Y., Ohta, Y., Shiraishi, H., Iguchi, T., Horiguchi, T.: Cloning and characterization of retinoid X receptor (RXR) isoforms in the rock shell, *Thais clavigera*. *Aquat. Toxicol.* **103**: 101-111, 2011.)) との相互作用の有無については、イボニシ RAR のリガンド結合部位と RXRs のリガンド結合部位を用いて、ツーハイブリッドアッセイ法により行った。また、イボニシ RAR とイボニシ RXRs が共存する場合の転写活性の測定も行った。

イボニシとは系統分類上、科が異なるバイ (新腹足目エゾバイ科) を用いて、イボニシと同様に、RAR の単離を行った。バイから単離された RAR のアミノ酸配列について、イボニシ及び脊椎動物の RAR との相同性解析を行った。次いで、上述の方法で、バイ RAR の転写活性を測定した。その結果をイボニシ RAR の転写活性と比較し、種差について論じた。

バイ RXR についても同様に転写活性を調べ、イボニシの結果と比較し、種差について検討した。

#### 4. 研究成果

イボニシ腎臓及びペニスより抽出した RNA から RAR 様配列(イボニシ RAR)を単離した。この遺伝子のアミノ酸配列の比較より、今回得られた配列は脊椎動物の RAR と相同性が比較的高いことが分かった。この配列を用い、ミドリザルの腎臓由来の細胞に導入し、All-trans レチノイン酸(ATRA) 添加時のウエスタンブロットによるタンパ

ク発現の確認と転写活性の測定を行った。イボニシ RAR タンパクの発現は確認できたが、転写活性の誘導は認められなかった。そこで導入細胞をヒト肝臓由来の細胞に変更し、イボニシ RAR とヒト RAR

を用い、二種類のレチノイン酸応答配列を用いた時の転写活性の測定を行った。

ヒト RAR を用いた場合、転写活性の誘導が認められたが、イボニシ RAR を用いた場合では誘導は認められなかった。この転写活性の非誘導の原因を探るため、イボニシ RAR 及びヒト RAR のリガンド結合部位を GAL4 DNA 結合部位と融合させ、転写活性の測定を行った。ヒト RAR リガンド結合部位を用いたアッセイでは ATRA, 9-cis レチノイン酸, 13-cis レチノイン酸, All-trans レチノール添加時に転写活性の誘導が認められたが、イボニシ RAR では何れの化学物質添加時でも誘導は認められなかった。次にイボニシ RAR の DNA 結合部位をヒト RAR リガンド結合部位と融合させ、転写活性の測定を行ったところ、転写活性の誘導が認められた。さらに、イボニシ RAR とイボニシ RXR との相互作用の有無を調べるため、Two Hybrid Assay 法を行った結果、RAR は RXR が存在する場合に転写活性が誘導されたことより、イボニシ RAR と RXR との相互作用があると考えられた。以上の結果より、今回得られたイボニシの RAR 様配列は、ほ乳類で知られている生体内リガンドである ATRA による転写活性誘導は起こらないものの、レチノイン酸応答配列は認識する可能性があることや、RXR と相互作用のあると考えられることより、未知のリガンドを標的とするオーファン型の受容体であることが示唆された。これらの結果をまとめ、*Aquatic Toxicology* 誌に論文として公表した (*Aquatic Toxicology*, 2013, 142-3: 403-13)。

一方、有機スズ化合物によるインポセツ

クス誘導について、作用する有機スズの化学種に種差が示唆されている。そこで、イボニシ、ヨーロッパチヂミボラ及びバイの3種類の前鰓類の RXR を用いて、転写活性の比較を進めた。イボニシ RXR には少なくとも2種類の isoform が存在するが、これらの isoform はいずれの種でも同様に存在することが分かった。得られたこれらの配列を用い、レポータージーンアッセイ法により16種類の有機スズ化合物(メチルスズ4種、エチルスズ3種、ブチルスズ4種、トリプロピルスズ、トリシクロヘキシルスズ、及びフェニルスズ3種)による転写活性の誘導の測定を、様々な濃度( $10^{-6}$  ~  $10^{-12}$ M 程度)で行ったところ、何れの種の RXR でもトリブチルスズ、テトラブチルスズ、トリフェニルスズ、トリプロピルスズ、トリシクロヘキシルスズにより有意な転写活性の誘導が認められた。また、この結果を基に、上記の isoform における有機スズ化合物による反応性の差異を調べるため、複数の応答配列を用いて RXR の isoform 毎の転写活性を測定し、有機スズ化合物の化学種による転写活性の種差及び、isoform の転写調節機構における役割を評価・比較した。以上の結果をとりまとめ、学術雑誌に投稿する予定である。

RXR 遺伝子と協調的に働きうる遺伝子として、レチノイン酸受容体(RAR)や甲状腺ホルモン受容体(TR)、PPAR、FXR、LXR と言った様々な受容体が存在することが脊椎動物・無脊椎動物で知られている。現在までに、ほ乳類 RAR と同性的のある遺伝子を単離し、機能同定を行ってきた。これまでに、昆虫や甲殻類において TBT がエクジソン受容体の活性などに影響を及ぼすなどの報告がなされている。また、エクジソン受容体は RXR 受容体や USP 受容体のヘテロパートナーであることが知られているが、現在までに軟体動物においてエクジソ

ンの役割は明らかとなっておらず、不明な部分が多い。そこで、更なる RXR 遺伝子の機能的パートナーを探るため、昆虫類や甲殻類において脱皮や生殖腺の発達・成熟などに重要な働きを調節するエクダイソン受容体(EcR)と類似した遺伝子をイボニシ貝より単離した。これを用いて全長配列のクローニング及び行うと共に、機能同定を行った。

#### 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 6 件)

Morishita, F., Furukawa, Y., Kodani, Y., Minakata, H., Horiguchi, T., Matsushima, O.: Molecular cloning of precursors for TEP-1 and TEP-2: the GGNG peptide-related peptides of a prosobranch gastropod, *Thais clavigera*. *Peptides*, in press, 2015. [査読あり]

Horiguchi, T., Ohta, Y., Hamada, F., Urushitani, H., Cho, H.S., Shiraishi, H.: Development of reproductive organs in the ivory shell *Babylonia japonica*: observations from wild populations and laboratory-reared juveniles. *Mar. Environ. Res.*, **93**: 4-14, 2014 (DOI: 10.1016/j.marenvres.2013.07.003). [査読あり]

Urushitani, H., Katsu, Y., Ohta, Y., Shiraishi, H., Iguchi, T., Horiguchi, T.: Cloning and characterization of the retinoic acid receptor-like protein in the rock shell, *Thais clavigera*. *Aquatic Toxicology*, **142-143**: 403-413, 2013 (DOI information: 10.1016/j.aquatox.2013.09.008). [査読あり]

Rhee, J.S., Kim, B.M., Horiguchi, T., Lee, Y.M., Lee, J.S.: Immune gene mining by pyrosequencing the rockshell, *Thais clavigera*. *Fish & Shellfish Immunol.*, **32**:

700-710, 2012. (doi:10.1016/j.fsi.2012.

01.017). [査読あり]

Horiguchi, T., Ohta, Y., Urushitani, H., Lee, J.H., Park, J.C., Cho, H.S., Shiraishi, H.: Vas deferens and penis development in the imposex-exhibiting female rock shell, *Thais clavigera*. *Mar. Environ. Res.*, **76**: 71-79, 2012 (DOI: 10.1016/j.marenvres.2011.10.001). [査読あり]

Horiguchi, T., Lee, J.H., Park, J.C., Cho, H.S., Shiraishi, H., Morita, M.: Specific accumulation of organotin compounds in tissues of the rock shell, *Thais clavigera*. *Mar. Environ. Res.*, **76**: 56-62, 2012 (DOI: 10.1016/j.marenvres.2011.09.002). [査読あり]

[学会発表](計 8 件)

Urushitani H., Katsu Y., Kagechika H., Sousa A.C., Baaroso C.M., Ohta Y., Shiraishi H., Iguchi T., Horiguchi T.: Characterization and comparison of transcriptional activities of the retinoid X receptors by various organotin compounds in three prosobranch gastropods. SETAC Europe 24<sup>th</sup> Annual Meeting, Basel (Switzerland), p.371, May 2014 (発表年月日: 2014年5月15日).

Horiguchi T., Yoshii H., Mizuno S., Ohara T., Shiraishi H.: Intertidal biota and the rock shell populations after accidents of Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plants. SETAC Europe 24<sup>th</sup> Annual Meeting, Basel (Switzerland), p.151, May 2014 (発表年月日: 2014年5月12日).

漆谷博志, 勝義直, 太田康彦, 白石寛明, 井口泰泉, 堀口敏宏: 軟体動物前鰓類 RXR の転写活性誘導における有機スズ化合物の影響, 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京, 同発表会要旨集, p.153, 2013 (発表年月日: 2013年12月12日).

漆谷博志, 勝義直, 太田康彦, 白石寛明,

井口泰泉, 堀口敏宏: 軟体動物前鰓類 RXR を用いた有機スズ化合物による転写活性誘導差異, 環境ホルモン学会第 15 回研究発表会, 東京, 同講演要旨集, p.115, 2012 (発表年月日: 2012年12月11日).

Horiguchi T., Ohta Y., Hamada F., Urushitani H., Cho H.S., Shiraishi H.: Comparison of vas deferens and penis developmental between the rock shell, *Thais clavigera* (Muricidae) and the ivory shell, *Babylonia japonica* (Buccinidae). 1st Marine NanoEcotox Workshop (5<sup>th</sup> BILATERAL SEMINAR ITALY-JAPAN), Palermo (Italy), p.18, November 2012 (発表年月日: 2012年11月28日).

Horiguchi T., Kodama K., Matsushima N., Ihara S., Takase M., Ohta Y., Yoshii H., Mizuno S., Kamiyama K., Maki H., Tanaka A., Karube Z., Shiraishi H., Ohara T.: Surveys on environmental pollution and possible adverse effects by radionuclides in wildlife, after severe accidents of Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plants, Japan. 1st Marine NanoEcotox Workshop (5<sup>th</sup> BILATERAL SEMINAR ITALY-JAPAN), Palermo (Italy), p.17, November 2012 (発表年月日: 2012年11月27日).

Horiguchi T., Kamohara S., Yamada S., Waku M., Sone R., Iwata Y., Ishida M., Ichikawa T., Suzuki T., Shiraishi H.: Impact assessment of hypoxia to the early life history of Japanese shortnecked clam, *Ruditapes philippinarum*. 1st Marine NanoEcotox Workshop (5<sup>th</sup> BILATERAL SEMINAR ITALY-JAPAN), Palermo (Italy), p.11, November 2012 (発表年月日: 2012年11月27日).

Horiguchi T., Ohta Y., Hamada F.,

Urushitani H., Cho,H.S., Shiraishi H.:  
Comparison of vas deferens and penis  
development between the rock shell, *Thais  
clavigera* (Muricidae) and the ivory shell,  
*Babylonia japonica* (Buccinidae). 6<sup>th</sup>  
SETAC World Congress (SETAC Europe  
22<sup>nd</sup> Annual Meeting), Berlin (Germany),  
pp.178-179, May 2012 ( 発表年月日：  
2012年5月21日 ).

〔図書〕(計 1 件)

Horiguchi, T.: Chapter 1 Ecotoxicological  
impacts of organotins: an overview In:  
e-book Biochemical and Biological Effects  
of Organotins. (Pagliarani, A. , Trombetti,  
F., Ventrella, V., eds., Bentham Science  
Publishers, UAE) (eISBN: 978-1-60805-  
265-3; doi: 10.2174/9781608052653  
1120101), pp.3-24, 2012.  
([http://www.benthamdirect.org/pages/  
content.php?9781608052653](http://www.benthamdirect.org/pages/content.php?9781608052653)).

〔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： 3 0 2 6 0 1 8 6

(2)研究分担者

太田 康彦 (OHTA, Yasuhiko)  
鳥取大学・農学部・教授  
研究者番号： 6 0 0 6 9 0 7 8

森下 文浩 (MORISHITA, Fumihiko)  
広島大学・理学(系)研究科(研究院)・  
助教  
研究者番号： 2 0 2 1 0 1 6 4

(3)連携研究者

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