

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651044

研究課題名(和文) 重油汚染海水で生まれた魚の脊柱彎曲の機構解明と新規解毒タンパク質によるレスキュー

研究課題名(英文) Mechanism of the spinal deformity of fish born in heavy oil polluted seawater, and rescue with the new detoxification protein

研究代表者

早川 和一 (Hayakawa, Kazuichi)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：40115267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：重油汚染による魚の奇形発生の機構を調べるために、様々なバイオアッセイ系を用いて解析した。その結果、毒物の本体は、水酸化した多環芳香族炭化水素類であり、メダカの胚発生において致死作用があり、ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性に影響を与えた。さらに解毒タンパク質の候補になり得る物質を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Using bioassay systems with fishes, we examined the mechanism of spinal deformity of fish by the heavy oil pollution. As a result, hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons (OHPAH) provided causing death in early embryogenesis of the medaka, and OHPAH influenced the cell activities in fish scales. We suggested that the main substances of poison causing deformity of the fish are OHPAHs. Furthermore, we found the material which could become a candidate of the detoxification protein.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：生物影響 骨代謝 胚発生 解毒タンパク質

1. 研究開始当初の背景

1997年、我々は日本海でのナホトカ号 C 重油流出事故に遭遇し、汚染海岸の惨状を目の当たりにした。2010年4月20日、米国メキシコ湾沖の原油試掘井で事故が発生し、毎日数千 kL 以上の原油が流出し続けたニュースは記憶に新しい。また2011年3月11日の東日本大震災の大津波により、港湾内の重油貯蔵施設が破壊され相当量の重油が流出し、港湾内の汚染底質も巻き上がったと思われるがその汚染実態は明らかでない。このように、原油採掘や海・陸上輸送量が増加するにともなって事故による大規模環境汚染の危険性が高まっている。原油は多環芳香族炭化水素 (PAH) 等、種々の有害化学物質を含有し、海洋生態系に及ぼす悪影響が危惧されている。我々は、PAH には発がん性/変異原性を有するものがあることから、ナホトカ号事故後2年余りにわたって汚染海岸の生態系を継続調査したが、魚やカニ等に癌は見つからなかった (Hayakawa et al., Water Res., 2006)。一方、正常海水に汚染海水 2.5% を混合してヒラメの卵を飼育したところ、生まれた稚魚の 65% に脊柱彎曲が見つかったが、その機序は解明されないままであった。しかし、漁業資源保護の観点から、流出油の魚に及ぼす影響の解明は極めて重要である。こうした化学物質の魚に対する毒性研究には、化学物質の研究者と魚類生理学の研究者との協力が不可欠であり、平成 21 年度から早川 (PAH 類の挙動と毒性に関する専門家) と鈴木 (魚類の Ca 代謝の専門家) の共同研究が始まった。我々は、既に *in vitro* (酵母 two-hybrid 及び魚ウロコ) の系において、PAH の代謝物である PAH 水酸化体 (PAHOH) の方がエストロゲン様/抗エストロゲン作用が強いことを報告している (Hayakawa et al., J. Health Sci., 2007)。エストロゲンは、骨代謝にも影響するので、PAH が骨代謝に影響を及ぼしている可能性が高く、成果が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、奇形の機構を解析するために、まず、魚卵 (胚) にマイクロインジェクションを行い、初期発生に対する影響を評価する。さらに魚に PAH を投与して、胆汁中の分析を行い、代謝産物の骨に対する影響を調べて、代謝産物が毒性の本体であることを証明する。

次にキンギョのウロコの再生 (骨形成) に対する影響を評価して、実際に解毒タンパク質との結合実験を行う。

3. 研究の方法

平成 24 年度の計画：成体には解毒機構 (解毒タンパク質) が存在しており、成体に PAH を投与しても脊柱彎曲は起こりにくい。そこで魚卵 (胚) にマイクロインジェクションを行い、奇形の発生率を観察する。また魚に PAH を投与して、胆汁中の分析を行い、さら

に代謝産物の骨に対する影響を解析する。

実験 1 魚の初期発生に対する PAH の影響 役割分担 (大嶋：発生の観察)

PAH をメダカの胚に投与して、脊柱彎曲がどのステージに生じるかを観察する。大嶋はトリプチルズズをメダカの胚にマイクロインジェクションすることにより脊柱彎曲が生じることを証明している (Hano et al., 2005)。この技術を応用する。

実験 2 魚類の PAH の代謝産物測定のための評価系の開発 役割分担 (早川：測定系の開発及び測定)

キンギョに PAH 類を投与して、胆汁中の PAH の代謝産物を分析する。早川は、これまで HPLC-蛍光検出計を用いた PAHOH 類の測定に熟練しており、技術的に問題はない (Chetiyankornkul et al., Anal. Bioanal. Chem., 2006 他)。

実験 3 魚類の PAH の骨芽細胞及び破骨細胞に対する影響評価 役割分担 (鈴木：ウロコの *in vitro* 評価系による解析)

ウロコは、骨のモデルとして有効であり、様々なホルモンに対する影響を解析可能である。そこで、キンギョのウロコを用いて、代謝産物を測定する。ウロコの培養及び骨芽・破骨細胞の活性測定は、鈴木が既に確立している (Suzuki et al., J. Pineal Res., 2008; Suzuki et al., Bone, 2011)。この系を用いて、PAH の破骨細胞及び骨芽細胞に対する影響する。

平成 25 年度の計画：キンギョのウロコの再生 (骨形成) に対する作用を行うと共に解毒タンパク質との結合実験 (*in vitro*) を行う。

実験 1 キンギョのウロコの再生 (骨形成) に関する実験 役割分担 (鈴木・早川)

麻酔下でキンギョからウロコを抜き、そのキンギョの腹腔内に Benz[a]anthracene (BaA) をそれぞれ 0.1 ng/g body weight の割合で 3 日おきに投与し、25℃ でキンギョを飼育した。ウロコ再生段階で一番細胞活性が盛んな時期である 12 日目に再生ウロコを採取した。採取した未再生のウロコの面積を 100 とした時の割合を調べた。さらに魚のウロコのアッセイ系を用いて、PAH の作用機序 (遺伝子発現解析) を行う。

実験 2 解毒タンパク質による毒性の抑制作用の解析 (*in vitro*)

役割分担 (大嶋：解毒タンパク質の解析)

解毒タンパク質と PAH の代謝産物 (PAHOH) との結合実験を行う。既に得られている解毒タンパク質の遺伝子組換え体 (rTBT-bp2、rPSTBP2) を用いて、PAHOH との結合試験を行う。TBT-bp2、PSTBP2 組換え体と蛍光プローブとの蛍光測定は Daniel

ら (Daniel A. Breustedt et al., 2005) の方法に従って実施する。既に 11-(5-(dimethylamino)-1-naphthalene-sulfonylamino) undecanoic acid (DAUDA) との結合性試験は終了している。(Satone et al., 2011) 4 M 解毒タンパク質 (TBT-bp2, PSTBP2) 組換え体溶液に対し、蛍光プローブとして終濃度 5 M の DAUDA を加えた後、0.5 mM PAHOH 溶液を 1 μ L ずつ滴下して DAUDA を脱着させ、蛍光強度の変化を測定して、PAHOH の結合性を測定する。

4. 研究成果

平成 24 年度の研究成果

PAH およびその水酸化体として BaA と 4-Hydroxybenz[a]anthracene (4-OHBaA) を用いて、メダカの胚発生の影響を評価した。その結果、BaA あるいは 4-OHBaA をメダカ胚に投与すると、投与後 1 日目に多くの胚で発生停止が見られ、LC50 は BaA で 0.12 nM、4-OHBaA で 0.027 nM であり、PAH 類は胚発生初期に対する影響が大きいことが示された。さらに親化合物 (BaA) は水酸化されるとその毒性が 4.4 倍強まることがわかった。

BaA をキンギョの腹腔内に投与 (5 μ g / g BW) し、12、24、48 及び 72 時間後に胆汁を採取して、胆汁を分析した。なお、採取した胆汁中の PAH 類はグルクロン酸抱体あるいは硫酸抱体として存在しており、それぞれに対応する酵素で加水分解した後、HPLC による分離が可能となる。そこで 1-Hydroxypyrene グルクロニドを β -グルクロニダーゼ・アリルスルファターゼを用いて分解して、その回収率を求めた。回収率は、2 時間インキュベーションしたものが、最も高い回収率 (67.34%) であったので、このタイムコースで胆汁を分析した。その結果、胆汁中に 4-OHBaA が検出され、12 から 48 時間と時間の経過に伴って濃度が上昇し、72 時間では少し低下した。

魚ウロコ (再生ウロコ) の評価システムを用いて 4-OHBaA の骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を解析した結果、4-OHBaA は 6 時間で骨芽細胞、破骨細胞ともに活性が上昇し、破骨細胞では 0.1 nM の濃度まで変化を感知することができた。一方 4-OHBaA の親化合物である BaA は 6 時間より遅れて、12 時間で破骨細胞活性の上昇が起こった。したがって、BaA が魚のウロコの中で代謝され、水酸化体となり、毒性を示している可能性が高い。

平成 25 年度の研究成果

魚のウロコに関する実験：日本海重油汚染事故に伴う海洋中の BaP 濃度が約 0.01 nM であったこと、またアイナメの可食組織の BaP 濃度が 0.13 ng/g であったことを参考として、キンギョの体内濃度が 0.1 ng/g body

weight (BW) となるように低濃度の BaA を投与して、ウロコの再生 (骨形成) に対する作用を調べた。その結果、12 日目の再生ウロコは対照群と比較して、ウロコの再生が抑制される傾向を示した。さらに、骨芽細胞の活性には影響はなかったが、破骨細胞の活性が有意に上昇していることが判明した。次に、*in vitro* で破骨細胞のマーカーをリアルタイム PCR で解析した結果、破骨細胞のマーカーである TRAP mRNA の発現が上昇していることもわかった。したがって、BaA は骨吸収を促進することにより、ウロコの骨形成を抑制していることがわかった。

解毒タンパク質の研究: DAUDA 結合試験のために解毒タンパク質の遺伝子組換え体 (TBT-bp2, PSTBP1) の再精製を行った。次に 5 mM DAUDA を含む 4 μ M 遺伝子組換え体 (rTBT-bp2 もしくは rPSTBP2) に対し、BaA およびその水酸化体 (OHBaA) 溶液を順次滴下して濃度を段階的に上げながら蛍光強度を測定した。その結果蛍光強度は減少しなかった。DAUDA は脱離すると蛍光が消失することから、BaA および OHBaA は DAUDA より解毒タンパク質に対して結合力が弱いと考えられた。BaA および OHBaA は DAUDA より結合力は弱い解毒タンパク質と結合する可能性が考えられる。よって限外ろ過法を用いて再度結合試験を行う予定である。

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 11 件)

Yachiguchi, K., Matsumoto, N., Haga, Y., Suzuki, M., Matsumura, C., Tsurukawa, M., Okuno, T., Nakano, T., Kawabe, K., Kitamura, K., Toriba, A., Hayakawa, K., Chowdhury, V.S., Endo, M., Chiba, A., Sekiguchi, T., Nakano, M., Tabuchi, Y., Kondo, T., Wada, S., Mishima, H., Hattori, A., Suzuki, N., Polychlorinated biphenyl (118) activates osteoclasts and induces bone resorption in goldfish. *Env. Sci. Poll. Res.*, **21** (10), 6365-6372 (2014). 査読有
DOI 10.1007/s11356-012-1347-5

Suzuki, N., Maruyama, Y., Nakano, M., Hattori, A., Honda, M., Shimasaki, Y., Sekiguchi, T., Hishima, H., Wada, S., Srivastav, A.K., Hayakawa, K., Oshima, Y., Increased Prostaglandin E₂ has a positive correlation with plasma calcium during goldfish reproduction. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **59** (1), 97-101 (2014). 査読有
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/english/journal/>

鈴木元気、牧野史弥、早川和一、東出幸真、達 克幸、坂井恵一、のと海洋ふれあいセンターが観測した沿岸水の pH 低下について

て、のと海洋ふれあいセンター研究報告、**19**, 1-6 (2014). 査読有
<http://notomarine.jp/rep-list.htm>
Kitamura, K., Tanahira, K., Inari, M., Satoh, Y., Hayakawa, K., Tabuchi, Y., Ogai, K., Nishiuchi, T., Kondo, T., Mikuni-Takagaki, Y., Chen, W., Hattori, A., Suzuki, N., Zebrafish scales respond differently to in vitro dynamic and static acceleration: Analysis of interaction between osteoblasts and osteoclasts. *Comp. Biochem. Physiol., Part A*, **166**, 74-80 (2013). 査読有
DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.04.023
Bekki, K., Toriba, A., Tang, N., Kameda, T., Hayakawa, K., Biological Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Derivatives. *J. UOEH*, **35** (1), 17-24 (2013). 査読有
DOI:10.7888/juoeh.35.17
Yano, S., Kitamura, K., Satoh, Y., Nakano, M., Hattori, A., Sekiguchi, T., Ikegame, M., Nakashima, H., Omori, K., Hayakawa, K., Chiba, A., Sasayama, Y., Ejiri, S., Mikuni-Takagaki, Y., Mishima, H., Funahashi, H., Sakamoto, T., Suzuki, N., Static and dynamic hypergravity responses of osteoblasts and osteoclasts in medaka scales. *Zoological Sci.*, **30** (3), 217-223 (2013). 査読有
DOI: 10.2108/zsj.30.217
Kakikawa, M., Yamamoto, T., Chowdhury, V. S., Satoh, Y., Kitamura, K., Sekiguchi, T., Funahashi, H., Omori, K., Endo, M., Yano, S., Yamada, S., Hayakawa, K., Chiba, A., Srivastav, A. K., Ijiri, K., Seki, A., Hattori, A., Suzuki, N., Determination of calcium sensing receptor in the scales of goldfish and induction of its mRNA expression by acceleration loading. *Biol. Sci. Space*, **26**, 26-31 (2012). 査読有
Doi:10.2187/bss.26.26
鈴木信雄, 舟橋久幸, 耿 啓達, 柿川真紀子, 山田外史, 廣田憲之, 北村敬一郎, 清水宣明, 早川和一, 三島弘幸, 岩坂正和, 上野照剛, 大森克徳, 矢野幸子, 池亀美華, 田淵圭章, 和田重人, 近藤 隆, 服部淳彦, 魚類のウロコを用いた評価系の開発と骨代謝研究への応用, *まぐね/Magune Jpn.*, **7** (4), 174-178 (2012). 査読有
http://www.magnetics.jp/journal/mag_2012/0704.html
Omori, K., Wada, S., Maruyama, Y., Hattori, A., Kitamura, K., Sato, S., Nara, M., Funahashi, H., Yachiguchi, K., Hayakawa, K., Endo, M., Kusakari, R., Yano, S., Srivastav, A. K., Kusui, T., Ejiri, S., Chen, W., Tabuchi, Y., Furusawa, Y., Kondo, T., Sasayama, Y., Nishiuchi, T., Nakano, M., Sakamoto, T., Suzuki, N., Prostaglandin E₂ increases both osteoblastic and osteoclastic activity in the

scales and participates in calcium metabolism in goldfish. *Zoological Sci.*, **29** (8), 499-504 (2012). 査読有
DOI: 10.2108/zsj.29.499
Hosozumi, C., Toriba, A., Chuesaard, T., Kameda, T., Tang, N., Hayakawa, K., Analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatography B*, **893-894**, 173-176 (2012). 査読有
DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.02.043
Suzuki, N., Sekiguchi, T., Satake, H., Kato, K., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Danks, J.A., Martin, T.J., Hattori, A., Nakano, M., Kakikawa, M., Yamada, S., Ogoshi, M., Hyodo, S., Yamaguchi, Y., Chowdhury, V.S., Hayakawa, K., Funahashi, H., Sakamoto, T., Sasayama, Y., Cloning of two members of the calcitonin-family receptors from stingray, *Dasyatis akajei*: Possible physiological roles of the calcitonin family in osmoregulation. *Gene*, **499**, 326-331 (2012). 査読有
DOI:10.1016/j.gene.2012.03.042

[学会発表](計9件)

袴田真理子, 唐 寧, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一, 能登半島における過去8年間の多環芳香族炭化水素類及び粒子状物質の大気内変動, 日本薬学会第134年会, 2014. 3. 27-30, 熊本大学.
袴田真理子, 鈴木元気, 牧野史弥, 立松路也, 唐 寧, 鳥羽 陽, 青木一真, 早川和一, 立山室堂の積雪層の陰イオンと多環芳香族炭化水素類の分析, 第30回イオンクロマトグラフィー討論会, 2013. 11. 28-29, 株式会社豊田中央研究所.
表 俊樹, 川部季美, 北村敬一郎, 服部淳彦, 田淵圭章, 近藤 隆, 鳥羽 陽, 早川和一, 鈴木信雄, 多環芳香族炭化水素類の魚類の骨代謝に対する作用. 第38回日本比較内分泌学会大会, 2013. 10. 24-26, 宮崎市民プラザ.
谷内口孝治, 関口俊男, 羽賀雄紀, 松村千里, 鶴川正寛, 中野 武, 北村敬一郎, 鳥羽 陽, 早川和一, 近藤 隆, 田淵圭章, 和田重人, 遠藤雅人, 服部淳彦, 鈴木信雄, ポリ塩化ビフェニル(PCB118)は魚の骨代謝を攪乱する. 第84回日本動物学会, 2013. 9. 26-28, 岡山大学.
Chondo, Y., Nassar, H. F., Yoshida, Y., Li, Y., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K., Determination of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry, 2013. 2013. 8. 22-24, Fukuoka, Kyushu University.
Hakamata, M., Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Noto Peninsula, Japan from 2004. China-Japan-Korea

Symposium on Analytical Chemistry, 2013. 2013. 8. 22-24, Fukuoka, Kyushu University.
Suzuki, N., Development and application of a fish scale in vitro assay system. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, 2013. 5. 28-6. 1, Kobe convention center & Kobe portopia hotel.

黒田美翔、舟橋久幸、鬼木弘明、宇都理佳、筒井和義、鈴木信雄、服部淳彦、キンギョの再生ウロコにおける隆起線形成リズム、第37回日本比較内分泌学会大会、2012. 11. 30-12. 1、福井。

Yachiguchi, K., Matsumoto, N., Haga, Y., Suzuki, M., Matsumura, C., Tsurukawa, M., Okuno, T., Nakano, T., Kawabe, K., Kitamura, K., Toriba, A., Hayakawa, K., Hattori, A., Suzuki, N., Polychlorinated biphenyl disrupts bone metabolism in goldfish. 7th International PCB Workshop, 2012. 5. 27- 31, Palais des Congrès of Arcachon.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

早川 和一 (HAYAKAWA, Kazuichi)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号：4 0 1 1 5 2 6 7

(2) 研究分担者

鈴木 信雄 (SUZUKI, Nobuo)
金沢大学・環日本海域環境研究センター・准教授
研究者番号：6 0 2 4 2 4 7 6

(3) 研究分担者

大嶋 雄治 (OSHIMA, Yuji)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：7 0 1 7 6 8 7 4