

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32658

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659303

研究課題名(和文)有機リン殺虫剤による精子毒性機構の解明：プロテオームおよびメタボローム解析

研究課題名(英文)A Potential Target for Organophosphate Insecticides Leading to Spermatotoxicity

研究代表者

富澤 元博(TOMIZAWA, Motohiro)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：20621808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、防疫用有機リン(OP)殺虫剤の直接(散布作業者)および間接的な曝露(消毒後の屋内施設の利用者など)による健康影響についての評価研究が行われている。その中で、OP殺虫剤による精子毒性に関する研究が多数報告されているが、その毒性発現機序については未だ解明されていない。本研究では、OP型ケミカルプローブを用いて、OP殺虫剤が潜在的に作用し得る雄性生殖器内の標的部位として脂肪酸アミド加水分解酵素(FAAH)を同定した。さらにFAAHのOP剤による機能阻害により、FAAHの内因性基質アナンダミドのレベルが上昇することで精子の運動能低下や奇形率上昇が起こるといふ新しい仮説を提唱するに至った。

研究成果の概要(英文)：Organophosphate (OP) insecticides also act on the diverse serine hydrolase targets, thereby revealing unexpected toxic effects including male reproductive toxicity. The present investigation detects a target molecule for OP-induced spermatotoxicity. The activity-based protein profiling (ABPP) approach with a phosphonofluoridate fluorescent probe pinpointed the OP target in the rodent testicular membrane proteome, i.e., OP phosphorylates the fatty acid amide hydrolase (FAAH), which plays pivotal roles in spermatogenesis and sperm motility acquisition. Subsequently, rodents were treated with vehicle or OP compounds (10 days or 9 weeks), and FAAH activity in testis or epididymis cauda was reduced by the treatments. ABPP analysis revealed that FAAH was selectively inhibited among the OP-treated testicular proteome. The FAAH substrate anandamide levels were elevated by the OP treatments. Accordingly, FAAH is a potential target for OP-elicited spermatotoxicity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境保健

1. 研究開始当初の背景

有機リン系(OP)殺虫剤は、衛生的な環境と安定した食糧生産の維持のために汎用されている。OP殺虫剤は生体内においてCYP450による酸化脱硫反応を経て、活性型リン酸エステル体となる。その結果、活性型OPが神経シナプスのアセチルコリンエステラーゼの活性中心にあるセリン水酸基をリン酸化修飾し、共有結合を形成することにより本酵素機能を非可逆的に阻害し、コリン作動性の神経中毒症状を引き起こす。一方、アセチルコリンエステラーゼ以外にOP化合物によりブロックされる2次ターゲットの存在が注目されており、その候補として多様なセリン加水分解酵素群が挙げられる。特に、OPの主な作用域は神経系であることから、マウス脳における2次ターゲットが探索され、特に2種類の内因性カンナビノイドアゴニスト脂質(2-arachidonoylglycerolおよびanandamide)の代謝酵素(monoacylglycerol lipase, MAGLおよびfatty acid amide hydrolase, FAAH)機能がOP化合物により阻害されることで、これらのカンナビノイド濃度が上昇し、カンナビノイド受容体1型が活性化され続け、マウスにカタレプシーを誘起すると報告された。

生殖は脂質と非常に関連が深い。例えば、雄性生殖器の脂質組成は全身臓器の中でも特に高度不飽和脂肪酸がリッチであり、精子の膜はドコサヘキサエン酸やドコサペンタエン酸等に富み、これらが精子の膜の流動性を高め、精子鞭毛に活発な運動性を与える。精子形成 成熟 活性化 受精の一連のプロセスでそれぞれに特有な脂質代謝酵素が関与し、どのステップに異常が生じても受精に至らない。最近、精巣で作られた精子は、2種の分泌性ホスホリパーゼ分子種により精巣上体での機能的成熟と雌性生殖器内での活性化の2段階の制御を受け、卵子との受精が可能になるとの報告がなされた。他方、我々は、殺虫剤散布作業者に有意な精子運動性の低下が見られること、またOP剤を投与したラットでも、精子運動性の低下や精子奇形率の上昇が見られることを報告している。以上のことを総

合すると、OP殺虫剤曝露による精子毒性は、OP活性体が雄生殖器内の特異的なリパーゼ類(または複数のターゲット)をブロックし、脂質代謝系を攪乱させることで起こるという仮説が成り立つ。したがって、OP殺虫剤による雄生殖器内脂質代謝系のケミカルロックアウト法により、OP殺虫剤を散布する作業者の生殖影響を予測し、精子毒性予防に適切な提言ができ、さらに得られた知見は精子無力症や無精子症等の男性不妊の疾患メカニズム解明と治療薬開発に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

衛生害虫駆除と作物保護に汎用される有機リン(OP)殺虫剤は、代謝活性化され、神経系のアセチルコリンエステラーゼの活性中心にあるセリン水酸基をリン酸化修飾することで酵素機能を阻害し、コリン作動性の神経中毒症状を誘起する。他方、OP活性体が作用する2次標的として、リパーゼを含む多様なセリン加水分解酵素群が挙げられる。我々は、OP剤投与ラットでは精子運動性低下や精子奇形率上昇が見られることを報告している。一般に生殖は脂質と関連が深いことから、我々は、OP剤による精子毒性が生殖器内脂質代謝系の攪乱によるものとの仮説を立てた。そこで本研究では、OPケミカルプローブと反応しうる雄生殖器のセリン加水分解酵素プロテオームから精子毒性に関わる未知の標的を同定し、会合する脂質メタボロームの増減を網羅的に解析することで、精子毒性メカニズムを解明したい。

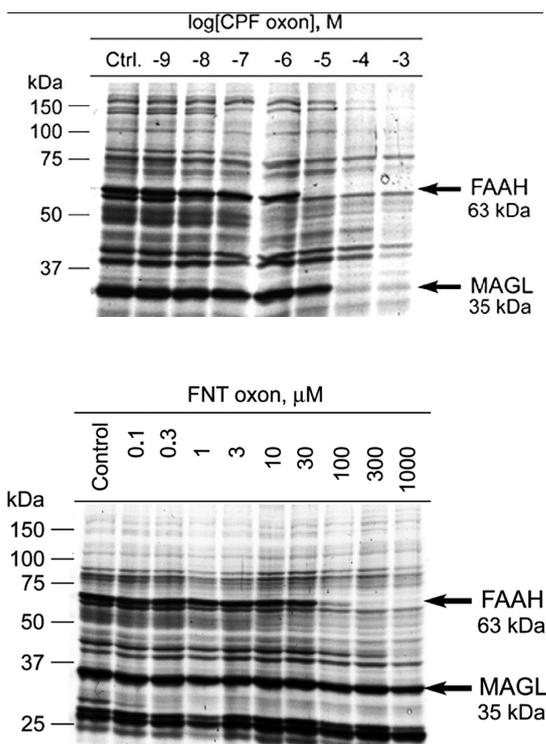
3. 研究の方法

本研究は以下の3つの主要ステップで遂行された。第一に、マウス雄生殖器プロテオームと反応可能な活性型の各種OP剤をFP-TAMRAプローブとの拮抗作用を利用して *in vitro* でスクリーニングした。第二に、雄マウスにOP殺虫剤(クロルピリフォスおよびフェントロチオン)を10日間経口投与し、その後摘出した精巣および精巣上体尾部由来のプロテオームを調製して

FP-TAMRA プローブと反応させた。OP 剤投与群と非投与群プロテオームの FP-TAMRA 標識パターンの比較から特異的ターゲットを絞り込んだ。そして絞り込んだ標的タンパク質の活性を測定して阻害の有無を確認した。第三に、OP 剤(フェニトロチオン)をラットに9週間投与し、摘出した雄生殖器官から精子を得、精子の奇形率や運動能を測定した。さらに精巣の脂質メタボロームを抽出し、網羅的 LC/MS 解析により、標的酵素の基質と生産物の増減を中心に脂質メタボロームを解析した。

4. 研究成果

(1) 精巣内の OP 化合物が作用し得る潜在的ターゲットの同定。FP-TAMRA プローブによる精巣由来プロテオームの標識化を行い、この実験系に阻害剤として数種の OP 殺虫剤の活性体を入れて競合させ、OP 剤が特異的に作用したタンパク質を見出した。図は代表的な OP 化合物であるクロルピリフォスおよびフェニトロチオンのオキシソンの結果を示している(図1, 2)。



両 OP 化合物共に 63 k Da のタンパク質である

FAAH が特異的に作用しており、さらにクロルピリフォスオキシソンでは、FAAH に加え、35 kDa の MAGL にも作用することがわかった。また、これらのタンパク質は、ウエスタンブロットにより、それぞれ FAAH と MAGL であると確認した。そこで、精巣由来 FAAH と MAGL の酵素活性アッセイ系への OP 化合物のインビトロ阻害実験を行い、両者への OP 化合物の阻害効力を評価した(表 1)。

OP compound	IC ₅₀ ±SD, μM (n=3)	
	FAAH	MAGL
chlorpyrifos oxon	0.22±0.02	0.12±0.01
fenitrothion oxon	5.6±0.3	65±13
dichlorvos	4.1±0.7	51±17
paraoxon	5.3±0.8	21±4.4
diiazinon oxon	40±4.1	110±8.1

これらの結果から、OP 化合物は FAAH に親和性が高いことがわかった。

(2) OP 殺虫剤の亜急性投与による雄性生殖器官内の FAAH 活性の変化。代表的 OP 殺虫剤としてクロルピリフォス(35-50mg/kg/day)およびフェニトロチオン(50-100mg/kg/day)(表を10日間4週齢マウスに投与し、精巣内ならびに精巣上体尾部の FAAH および MAGL 活性を測定した(表3, 4)。

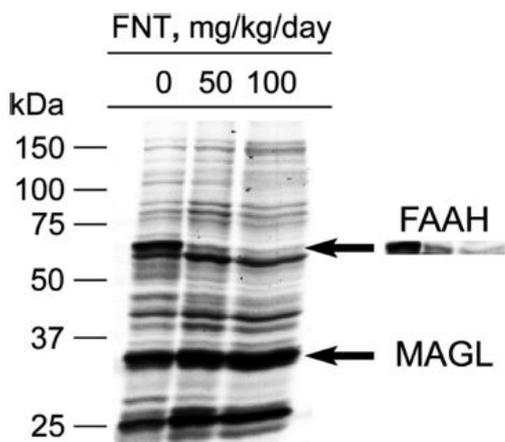
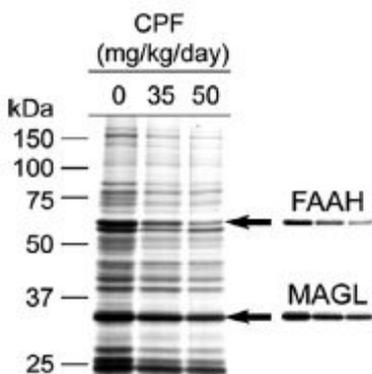
Table 2 Effects of subacute CPF exposure (10 days via oral route) on FAAH and MAGL activities in mouse testis and epididymis cauda

Treatment	Activity (pmol/mg/min) (±SD, n = 5-9)			
	FAAH		MAGL	
	Testis	Epididymis cauda	Testis	Epididymis cauda
Vehicle	180 ± 18 (100%)	54 ± 5.8 (100%)	800 ± 20 (100%)	400 ± 18 (100%)
Low	98 ± 45** (54%)	44 ± 10** (81%)	660 ± 120* (83%)	390 ± 12 (98%)
High	95 ± 22** (52%)	39 ± 4.2** (71%)	690 ± 57** (86%)	400 ± 25 (100%)

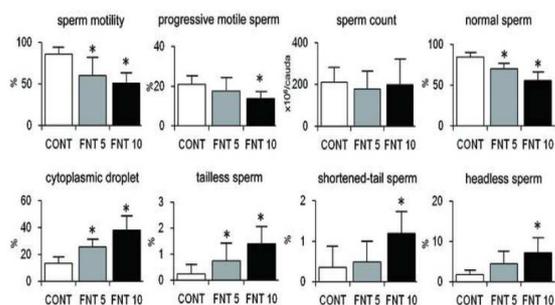
Table 1. Effects of Subacute FNT Exposure (10 Days via Oral Route) on Endocannabinoid Hydrolyzing Enzymes FAAH and MAGL in Mouse Testis and Epididymis Cauda^{af}

treatment	activity, pmol/mg/min (±SD, n = 6-7)			
	FAAH		MAGL	
	testis	epididymis cauda	testis	epididymis cauda
vehicle	150 ± 18 (100%)	46 ± 10 (100%)	710 ± 26 (100%)	400 ± 20 (100%)
low	76 ± 16** (50%)	36 ± 6.9** (78%)	670 ± 27 (94%)	390 ± 36 (98%)
high	67 ± 32** (44%)	29 ± 11** (63%)	680 ± 25 (96%)	380 ± 15 (95%)

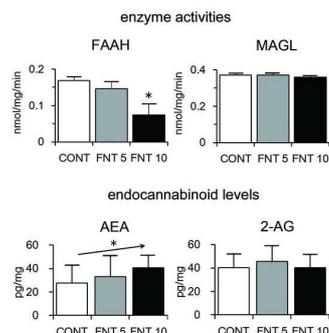
上述の表に示した通り、精巣および精巣上体尾部では FAAH 活性が有意に低下、クロルピリフォス投与では MAGL 活性の低下もみられた。また、同時に両 OP 剤投与による精巣プロテオームへの影響を検討したところ、やはり FAAH が OP 剤投与により影響を受けていることがわかった (図3、4)。



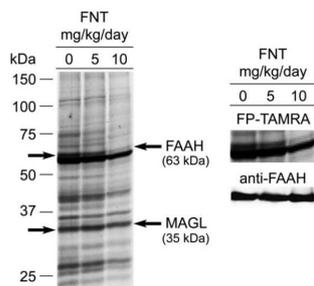
(3)最後に、安全性の高いOP殺虫剤フェントロチオンを雄ラットに5および10mg/kg/day(週に4日間投与)で9週間にわたり曝露し、精巣上体尾部から得た精子の運動性や形態観察などを行った(図5)。



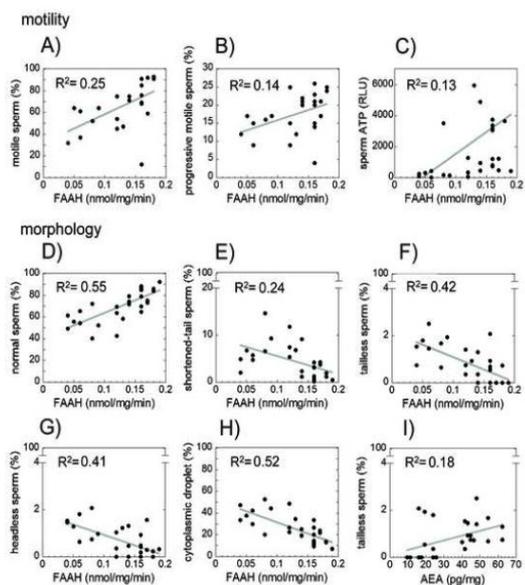
その結果、薬剤の用量依存的に精子奇形率が上昇し、運動能は低下するなどの有意な変化が認められた。さらに精巣内の FAAH 活性も有意に低下し、FAAH の内因性基質であるアナンダミドのレベルも薬剤の用量依存的に上昇傾向にあった (図6)。



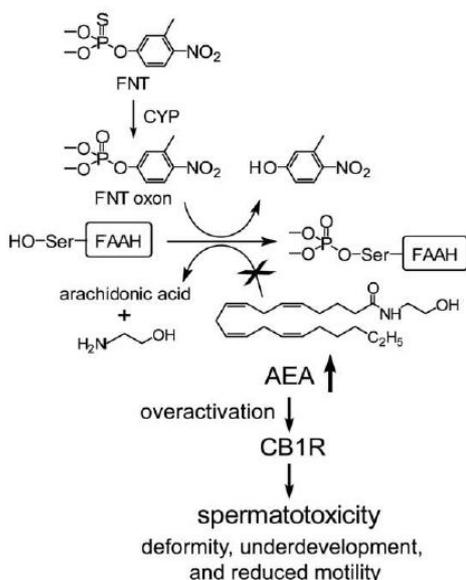
また、精巣プロテオームへの影響も検討したところ、FAAH が選択的に阻害されていることがわかった (図7)。



さらに、OP 剤投与により変化した FAAH の活性と各種精子のパラメーターとが一定の相関関係にあることを認めた (図8)。



したがって、OP 殺虫剤による精子毒性発現メカニズムとして、OP 剤が雄性生殖にならびに精子の内因性カンナビノイド加水分解酵素の一つである FAAH をリン酸化阻害し、これによりその基質であるアナンダミドのレベルが上昇するという新しい仮説を提唱した(図9)。



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 3 件)

Suzuki, H.; Ito, Y.; Noro, Y.; Koketsu, M.; Kamijima, M.; Tomizawa, M.
Organophosphate agents induce plasma hypertriglyceridemia in mouse via single or dual inhibition of the endocannabinoid hydrolyzing enzyme(s). Toxicology Letters 225, 153-157 (2014). (査読有)

Noro, Y.; Tomizawa, M.; Ito, Y.; Suzuki, H.; Abe, K.; Kamijima, M. Anticholinesterase insecticide action at the murine male reproductive system. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 23, 5434-5436 (2013) (査読有)

Suzuki, H.; Tomizawa, M.; Ito, Y.; Abe, K.; Noro, Y.; Kamijima, M. A potential target for organophosphate insecticide leading to spermatotoxicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61, 9961-9965 (2013). (査読有)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

富澤 元博 (TOMIZAWA, Motohiro)
東京農業大学応用生物科学部・教授
研究者番号：20621808

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

上島 通浩 (KAMIJIMA, Michihiro)
名古屋市立大学大学院医学研究科・教授
研究者番号：80281070

伊藤 由紀 (ITO, Yuki)
名古屋市立大学大学院医学研究科・講師
研究者番号：80452129