

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850135

研究課題名(和文)発光レポーター遺伝子による養殖魚の残留農薬モニタリング

研究課題名(英文)Monitoring of pesticide residues in farmed fish by bioluminescent reporter gene assay

研究代表者

二見 邦彦(FUTAMI, Kunihiko)

東京海洋大学・その他部局等・助教

研究者番号：00513459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、発光遺伝子ルシフェラーゼを用いた養殖魚の残留農薬モニタリングシステムの開発を目的とした。ティラピアを各種農薬で曝露し、遺伝子発現解析を行ったところ、CYP1B1遺伝子の発現が経時的に上昇することを見出した。そこで、培養細胞を用いたTwo-hybrid systemにより、CYP1B1の発現を制御するAhRとArntのヘテロ二量体形成能を調べた。その結果、農薬曝露によりAhRとArntのヘテロ二量体形成が促進されることが明らかとなった。これにより、ルシフェラーゼ発光量を指標としてAhRとArntのヘテロ二量体形成能を調べることで、残留農薬をモニタリングできる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pesticides have been prohibited to use for aquaculture, but still detected from farmed fish. Although pesticide residues in fish are monitored by GC/MS or LC/MS, these are not used routinely in most fish farming due to their high cost operation and time requirement for sample preparation.

CYPs and P-gp play important roles in drug metabolism. The transcriptions of CYPs and P-gp are regulated by drug receptors such as AhR and PXR. Here, we investigated whether the cell that contains these molecules in control of a reporter gene is applicable to monitoring of pesticide residues in fish. The heterodimerization between AhR and Arnt was investigated by two-hybrid system on fish cells. AhR forms a heterodimer with Arnt in the presence of pesticides. Moreover, the expression of CYP1B1 in hepatocytes was induced by pesticides. These results suggest that AhR/Arnt heterodimerization becomes reliable cellular reporter for monitoring the pesticide residues in fish.

研究分野：水族病態生理学

キーワード：ルシフェラーゼ Two-hybrid system ティラピア EPC細胞 AhR PXR CYP1B1 ヘテロ二量体

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年のグローバル化に伴い、食品の安全性確保は世界的に重要性が増してきており、我が国では食品中への農薬類およびそれらの代謝物の残留は、平成 18 年 5 月からポジティブリスト制により規制されるようになった。これにより、最大残留基準値を超える農薬類を含有する水産物の流通が禁止され、生産段階での適切なリスクマネジメントがより一層求められるようになった。しかしながらここ数年、一部の養殖魚から、養殖生産の過程で直接使用することはないはずの農薬が検出された例が報告されている。汚染経路と農薬の種類は多岐に渡るため、残留を未然に防ぐことは困難である。

(2) 養殖魚の安全性の確保においては、十分なモニタリングがなされていることを保証するシステムを確立することが緊急の課題である。農薬の残留分析は、LC-MS や GC-MS などの機器分析による一斉分析法が公定法となっているが、その前処理には手間と時間がかかり、残留検査に伴うコストも高額であるため、頻繁にモニタリングを行うことは難しい。また市販の ELISA キットによる測定は、特定の農薬を検出する上では有効であるが、網羅性に限界があるため、何が汚染しているか分からない状況下での測定は困難である。

(3) 薬物代謝酵素遺伝子 CYPs や薬物トランスporter-P-gp の発現は薬物受容体 AhR や PXR により調節されている。我々らはこれまでに、有機リン系農薬マラチオンや有機塩素系農薬エンドスルファンを経口投与したティラピアにおいて、薬物代謝酵素や薬物トランスporterの遺伝子発現をリアルタイム PCR およびウェスタンブロット法で調べた。その結果、薬物排出に関わるトランスporterの一つである P-gp の mRNA およびタンパク質の発現上昇が一過性に認められ、残留農薬をモニタリングする上でのバイオマーカー候補となりうる事が推測された。しかしながら、供試魚に農薬類を投与した場合、個体差や生体の持つ恒常性、あるいは水温の影響などにより、データがばらつき、安定した結果を得ることは困難であった。バイオマーカーを用いたモニタリング手法は、ネガティブフィードバック機構をもつ系などについての対応が難しく、また、魚類においては、薬物受容体を介したシグナル伝達系のネットワーク機構についても、詳細は不明である。したがって、養殖魚の残留農薬類のモニタリングには、従来の手法とは異なるアプローチが要求される。

(4) 受容体の作用機構を利用したレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ)アッセイ系は、複数の遺伝子の転写制御能を *in vitro* で簡便に同時測定できるため、環境毒性学分野における毒性評価や内分泌学分野におけるホ

ルモン活性の測定などに用いられている。ルシフェラーゼアッセイは、リアルタイム PCR のように転写のスナップショットを検出するものではなく、転写の積分値を測定するものであるため、一過性の発現を示す遺伝子にも対応でき、しかも感度が極めて高い。しかしながら、養殖魚における残留農薬のモニタリング法としての利用は皆無である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、薬物受容体の作用機構に着目し、ホタルルシフェラーゼ等の発光遺伝子をレポーターとして用いた、簡便、安価で定量性の高い残留農薬モニタリングシステムを開発することを目的とした。これにより、生産段階でのモニタリングの頻度を向上させることでポジティブリスト制に対応したリスクマネジメントが可能となり、高額な一斉分析による残留検査を行うべきかどうかを判断できるようになる。

3. 研究の方法

(1) 50 mg/L のエンドスルファンを添加した飼料をティラピアに経口投与した。1, 2, 3 日後に肝臓を摘出し、ISOGEN II (ニッポンジーン社)を用いて total RNA を抽出した。これらの RNA をプールし、次世代シーケンサー Illumina HiSeq 2000 を用いた 3'-fragment ライブラリ解析を Eurofins Genomics 社に委託した。

(2) ティラピアの全ゲノムショットガンシーケンスの結果が 2011 年に公開されたことを受け、Ensembl データベース (<http://asia.ensembl.org/index.html?redirect=no>) の検索により CYPs, P-gp, AhR, PXR, Arnt, RXR のオーソログを *in silico* でクローニングした。さらに、近隣結合法および最尤法により、これらの遺伝子の分子系統樹を作成し、アイソフォームの有無と類縁関係を明らかにした。

(3) 振盪法によりティラピア遊離肝細胞を調整した。これに様々な農薬(エンドスルファン、カルバリル、クロロタロニル、クロルピリフォス、マラチオン、メソミル)を曝露し、0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 時間後に total RNA を抽出した。High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific 社)を用いて cDNA を合成し、SYBR Green 法によりリアルタイム PCR を行い、薬物代謝酵素 CYP1B1 および薬物トランスporter-P-gp の遺伝子発現量を定量した。データの解析には、アクチンを内部標準とした比較 Ct 法を用いた。

(4) ティラピア薬物受容体 AhR と PXR, およびそれらのパートナー分子である Arnt と RXR 遺伝子のコード領域を、それぞれ pBIND および pACT ベクター (Promega 社) にサブクロー

ニングし、Two-hybrid system 用のコンストラクトを作製した。さらに、ティラピアゲノムのデータベース検索をもとに P-gp 遺伝子のプロモーター領域約 6 kb を LA-PCR 法により増幅し、ホタルのルシフェラーゼ遺伝子をもつ pGL3-Basic ベクター (Promega 社) にサブクローニングした。なお、このプロモーター領域には、PXR/RXR の結合部位である ER-6 と DR-3 が存在していたため、これらの結合部位に SV40 プロモーターおよびホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーターコンストラクトも合わせて作製した。作製したベクターは、Midiprep 法により大量調整した。

(5) pBIND-薬物受容体および pACT-パートナー分子を pG5luc ベクターとともにリポフェクション法によりファットヘッドミノー上皮由来培養細胞株 EPC にトランスフェクションした。24 時間後に農薬を添加し、さらに 24 時間インキュベートした。その後、ピッカジーンデュアルシーパンジーキット (東洋ビーネット社) を用いてデュアルルシフェラーゼアッセイを行った。なお、本実験で用いた農薬の濃度では細胞毒性がないことを MTT アッセイにより確認した。

4. 研究成果

(1) エンドスルファンを経口投与したティラピア肝臓の total RNA を用いて次世代シーケンサーによる網羅的解析を行った。その結果、いくつかの薬物トランスポーターおよび薬物代謝酵素 CYP1B1 の遺伝子発現の上昇が確認された。なお、階層的クラスタ分析および gene ontology 解析では、生物学的な意味を読み取れるパスウェイは見いだせなかった。

(2) 次世代シーケンサーによる網羅的解析の結果を確認するため、ティラピア遊離肝細胞に様々な農薬を曝露し、リアルタイム PCR により遺伝子の発現解析を行った。その結果、PXR の標的遺伝子である薬物トランスポーター P-gp、および AhR の標的遺伝子である CYP1A1 および CYP1B1 の発現上昇が認められた (図 1)。

(3) Ensembl データベースの検索により、テ

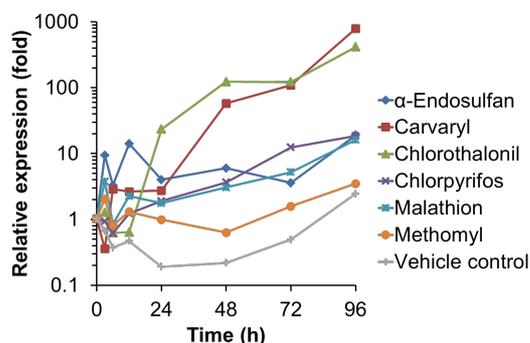


図 1 ティラピア遊離肝細胞への各種農薬添加後の CYP1B1 mRNA 発現の経時的変化

ィラピア CYP 1 B1, P-gp の 5' 上流領域, および AhR, PXR, Arnt, RXR のコード領域を in silico でクローニングした。ALGGEN-PROMO (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) により転写因子結合部位を予測したところ、ティラピア CYP1B1 遺伝子の 5' 上流領域には AhR の結合配列である XRE が、P-gp 遺伝子の 5' 上流領域には PXR の結合配列である DR-3 と ER-6 が複数存在していた。次に、近隣結合法により、AhR, PXR, Arnt, RXR の分子系統樹を作成したところ、ティラピア AhR には 4 つの、Arnt には 2 つのアイソフォームが存在することが明らかとなった (図 2)。このうち AhR1a と AhR1b は哺乳類の AhR と相関性が高かったものの、偽遺伝子の可能性が高いことが指摘されており (文献), また RT-PCR では AhR1a の発現が確認できなかったことから、研究の対象から除外した。

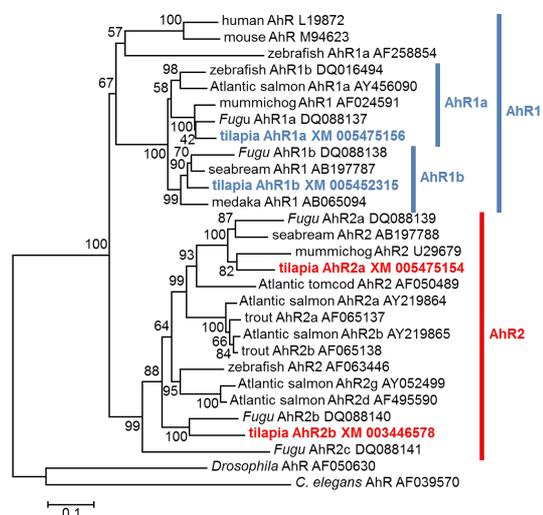


図 2 近隣結合法により作製した AhR の分子系統樹。枝の長さは進化的距離を示す。枝上の数字は、500 回繰り返しに基づくブート・ストラップ値 (%) を示す。

(4) PXR および RXR 発現コンストラクトを、ER-6, DR-3 (PXR/RXR の結合部位) または P-gp プロモーターにホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーターコンストラクトとともに、EPC 細胞に導入した。魚類培養細胞株の中には遺伝子導入効率の低いものが多いが、本研究では複数の遺伝子導入試薬を試み、TransIT-LT1 (Takara Bio 社) を用いることで高い導入効率を得ることができた。この細胞に各種農薬類を曝露したところ、PXR/RXR の P-gp に対する転写活性に変化は認められなかった。また、EPC 細胞を用いた Two-hybrid system においても、農薬曝露による PXR と RXR のヘテロ二量体形成の促進は見られなかった (図 3)。なお、リガンド非存在下でのヘテロ二量体形成が見られたことから、GFP 融合 PXR を発現するコンストラクトを作製し、EPC 細胞にトランスフェクシ

ンした。その結果、PXR が農薬非依存的に核内に移行することが明らかとなり、過剰発現による PXR/RXR の非特異的なヘテロ二量体形成が高いバックグラウンドを生んでいることが示唆された (図 4)。

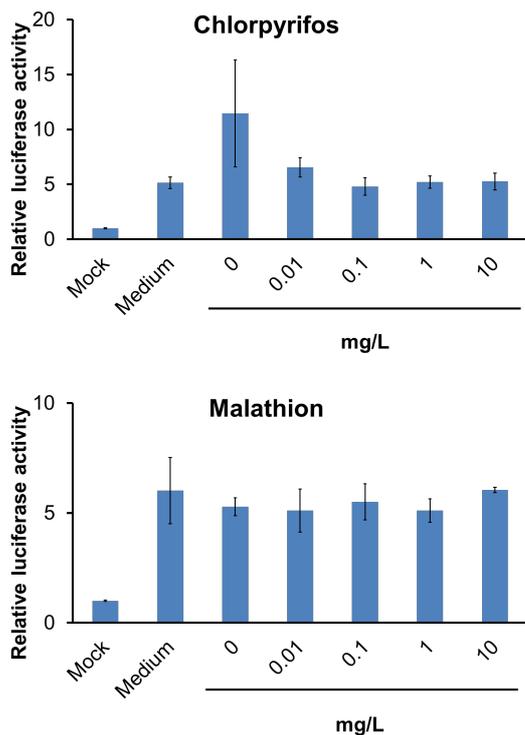


図 3 EPC 細胞を用いた Two-hybrid system による、農薬添加後の PXR と RXR のヘテロ二量体形成能の解析



図 4 GFP 融合 PXR の EPC 細胞内での局在

(5) 研究の焦点を AhR シグナル伝達系に絞り、EPC 細胞を用いた Two-hybrid system により AhR とそのパートナー分子 Arnt のヘテロ二量体形成能を解析した。その結果、高濃度のクロルピリフォスは、AhR と Arnt のヘテロ二量体形成を促進することで CYP1B1 遺伝子の発現を誘導している可能性が明らかとなった (図 5)。しかしながら、低濃度の曝露では AhR と Arnt のヘテロ二量体形成の促進は見られなかった。AhR と Arnt は、リガンド非存在下でもヘテロ二量体も示したことから (図 6)、PXR と同様、過剰発現による AhR の局在の変化が高いバックグラウンドを生んでいると考えられた。

リガンド非存在下での AhR と Arnt のヘテロ二量体形成は、ルシフェラーゼ発光量を指標

として残留農薬をモニタリングする場合、感度の低下につながる恐れがある。哺乳類では、AhR は細胞質中でシャペロンタンパク質である Hsp90, XAP2, p23 と複合体を形成していることが知られているため (文献), これらのタンパク質をコトランスフェクションすることで、バックグラウンドを抑えることが必要となる。

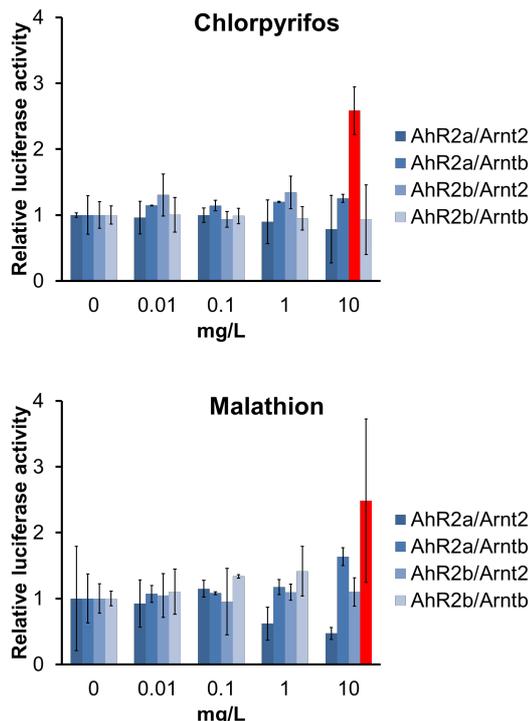


図 5 EPC 細胞を用いた Two-hybrid system による、農薬添加後の AhR と Arnt のヘテロ二量体形成能の解析

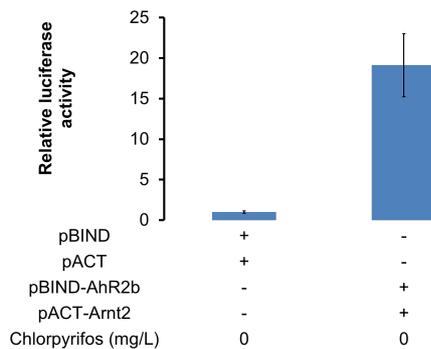


図 6 EPC 細胞を用いた Two-hybrid system による、リガンド非存在下での AhR と Arnt のヘテロ二量体形成能の解析

< 引用文献 >

Goodale BC, La Du JK, Bisson WH, Janszen DB, Waters KM, Tanguay RL. AHR2 mutant reveals functional diversity of aryl hydrocarbon receptors in zebrafish. PLoS One. 2012;7(1):e29346
Carlson DB, Perdew GH. A dynamic role for

the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. J Biochem Mol Toxicol. 2002;16(6):317-325

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)

[学会発表](計5件)

Kunihiko Futami, Kano Matsunaga, Takayuki Katagiri, Makoto Endo and Masashi Maita, Aryl hydrocarbon receptor-mediated gene expression in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to pesticides, NRCT-JSPS Asian Core Program Symposium 2016 Bangkok, 2016年2月12日, バンコク(タイ)

Kunihiko Futami, Drug receptor-mediated gene expression in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to pesticides, AQUATIC PRODUCTS PROCESSING: Cleaner Production Chain for Healthier Food, 2015年12月7日, カントー(ベトナム)

Shojiro Kinoshita, Kano Matsunaga, Takayuki Katagiri, Masashi Maita, Makoto Endo and Kunihiko Futami, Inhibition of transcriptional activity of tilapia PXR and RXR by malachite green, JSPS-NRCT Asian Core Program Symposium 2014 "Development of new bio-technology for aquaculture and risk management of aquaculture products-V", 2014年12月19日, 東京海洋大学(品川)

木下祥二郎・松永花野・片桐孝之・舞田正志・延東真・二見邦彦, マラカイトグリーンによるティラピア PXR/RXR の転写活性の阻害, 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日, パシフィコ横浜(横浜)

木下祥二郎・松永花野・片桐孝之・舞田正志・延東真・二見邦彦, マラカイトグリーンはティラピア PXR と RXR のタンパク質間病学会秋季大会, 2014年9月22日, 九州大学中央図書館視聴覚ホール(福岡)

6. 研究組織

(1)研究代表者

二見 邦彦 (FUTAMI, Kunihiko)
東京海洋大学・学術研究院・助教
研究者番号: 00513459