

研究成果報告書

事業名（補助金名）： 基盤的研究開発育成事業(若手研究補助金)
研究開発テーマ名： トド・アザラシ類の脂肪細胞に対する脂溶性汚染物質の影響
研究代表者名： 星野 広志【北海道大学創成科学共同研究機構／教務補助員】

[1. 研究の背景と目的]

オホーツク海は、流氷により海の基礎生産が支えられて多様な生物が生息する北海道の漁業活動を支える重要な海域である。しかし、近年、当海域には沿岸諸国で使用されたポリ塩化ビフェニル類やDDT類などの様々な脂溶性汚染物質が流入していることが報告されている。そして、当海域の高次栄養段階に位置する海棲哺乳類のゴマアザラシ *Phoca largha* では、体内的有機塩素系化合物により甲状腺ホルモン濃度の低下や、ステロイド代謝酵素の誘導が起きていることが明らかになっている。また、申請者らの研究によってオホーツク海に生息するトド *Eumetopias jubatus* が、西部ベーリング海、アラスカおよび南東アラスカのトドよりも汚染程度が高いことが示唆されている (Barron et al., 2003, Hoshino et al., 2006, 図1)。これらのこととは、オホーツク海の汚染が生態系の高次段階に位置する海棲哺乳類に影響を与えるレベルまで進行していることを示している。このことから、オホーツク海に生息する海棲哺乳類に対する脂溶性汚染物質による毒性影響を明らかにすることは北海道の水産業を支えるオホーツク海生態系を保全する上で重要課題と言える。

さらに、海棲哺乳類において主要な汚染物質の蓄積器官である脂肪組織は、近年のヒトや実験動物における研究から、ホルモンやサイトカインなどを分泌する内分泌器官としての役割を持つことが明らかになりました。しかし、これまでの海棲哺乳類に対する毒性影響研究は免疫系や生殖機能に限られている。これらのことから、脂肪組織が汚染物質の標的器官となっており、汚染物質が脂肪組織の発達や機能に影響を与えることで、繁殖傷害や免疫抑制などを起こす要因となっている可能性がある(図2)。

本研究では、オホーツク海の汚染が生態系の高次栄養段階生物に与える影響を解明するため、海棲哺乳類に対する脂溶性汚染物質による脂肪組織に対する新規の毒性影響を明らかにすることを目的とする。

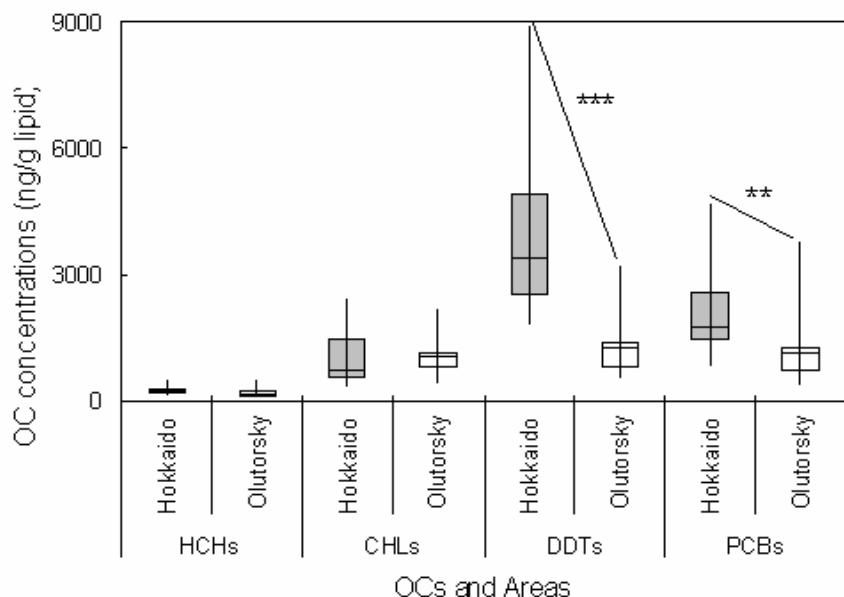


図 1 北海道(Hokkaido)とベーリング海(Olutorsky)との有機塩素系化合物濃度の比較 (Hoshino et al., 2006) HCHs:ヘキサシクロロヘキサン類, CHLs:クロルデン類, DDTs:DDT類, PCBs:ポリ塩化ビフェニル類。

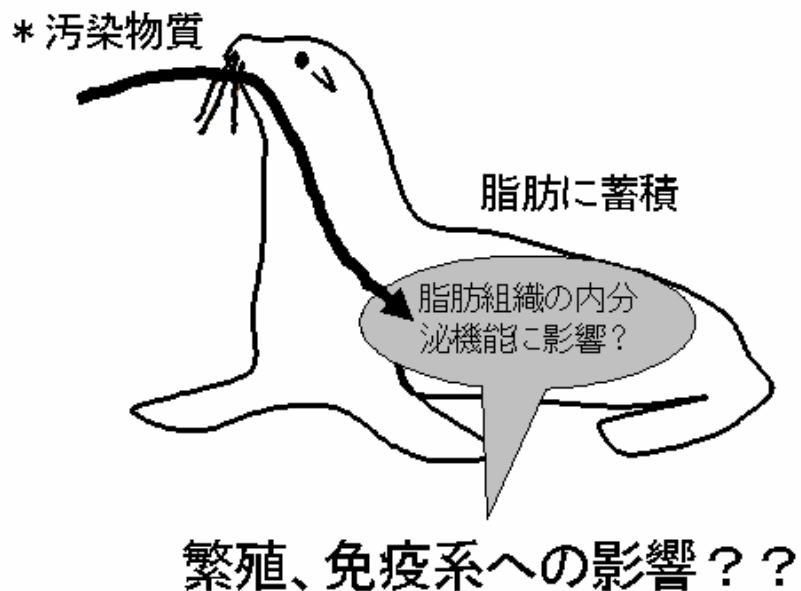


図2 本研究の作業仮説

[2. 内容・方法]

1) 材料の収集

2005年1月の羅臼沖で有害駆除により捕獲された雌のトド1頭、および2005年4月に石狩市沖で混獲された雌のゴマアザラシ1頭より、脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織は、発現遺伝子解析用に一部を液体窒素保存し、残りは抗生物質入りのリン酸塩緩衝液に浸して実験室に搬送した。

2) 細胞の分離と維持

コラゲナーゼ処理と遠心分離により、脂肪組織から細胞を分離した。コラーゲンコート済みディッシュに撒き、10% 牛新生仔血清、抗生物質を含んだ Dulbecco's modified Essential Medium/Hanks Balanced solution F12(基本培地)で培養した。増えた細胞については、凍結し液体窒素ガス中で保存した。

細胞の成熟脂肪細胞への分化誘導は、誘導培地で48時間培養した後、成熟培地で6日間培養して行った。

2) 脂肪細胞の分化と機能に関する遺伝子のクローニング

脂肪細胞の分化に関するペルオキシソーム増殖剤応答型受容体ガンマ 2 (PPAR γ 2)、細胞への脂肪酸の取り込みを行う脂肪酸結合タンパク質 (FABP)、および成熟した脂肪細胞が分泌するアディポネクチン (ADIPO) について遺伝子のクローニングをトド脂肪組織を用いて試みた(図3)。まず、液体窒素凍結した組織を破碎し、そこから RNA 抽出試薬を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を逆転写反応に供した後に PCR 反応 (RT-PCR) を行い、3' 末端から 400-1000 塩基までを増幅した。さらに、PCR 産物を大腸菌に導入して増幅した後、塩基配列の解析を行った。

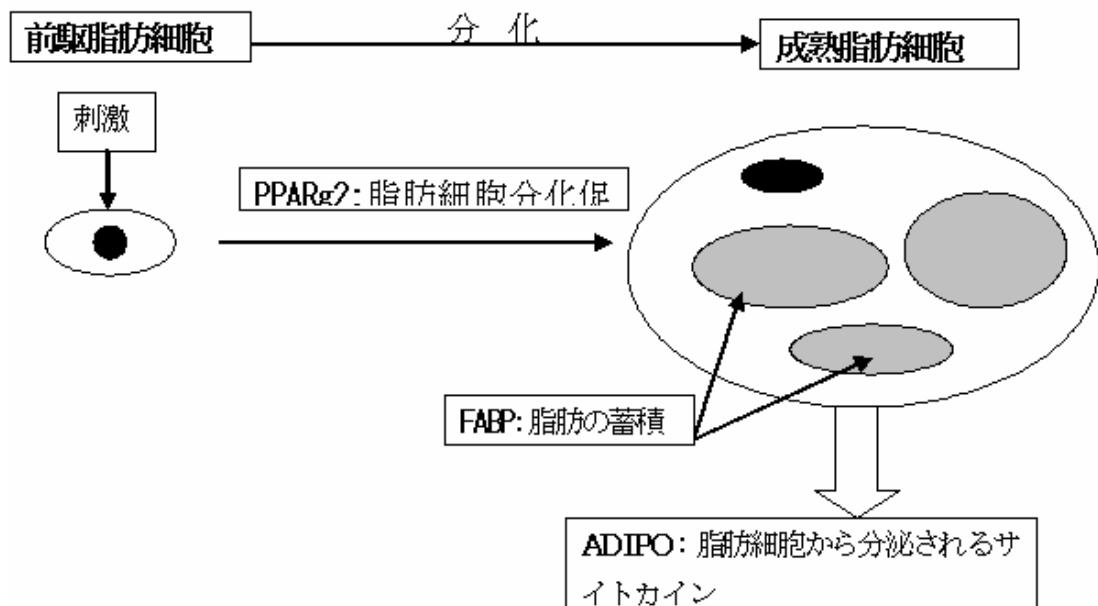


図 3 脂肪細胞の分化と内分泌に関する遺伝子

2) *p, p'*-DDT の脂肪細胞に対する曝露試験

p, p'-DDT の曝露試験は以下に示したようなスケジュールで行った(図 4)。細胞は分化誘導しやすいゴマファザラシ由来のものを用いた。細胞曝露した *p, p'*-DDT 濃度は、野生個体の平均蓄積濃度である 0.24 ppm と、実際より遙かに高濃度である 3 ppm とした。6 ウェルプレートに細胞を撒きコンフルエントになるまで細胞を培養した後、*p, p'*-DDT 添加の分化誘導培地に換えて細胞の分化を 2 日間誘導した。その後、さらに 2 日間 *p, p'*-DDT 添加の成熟培地で培養した後、7 日間 *p, p'*-DDT 無添加の成熟培地で培養してから RNA を細胞から抽出した。細胞から抽出した RNA は逆転写反応、PCR 反応を行い PPAR γ 2、FABP および ADIPO の遺伝子発現量について調べた。RT-PCR では、ベータアクチン(β -Act) 遺伝子を内部標準として用いた。

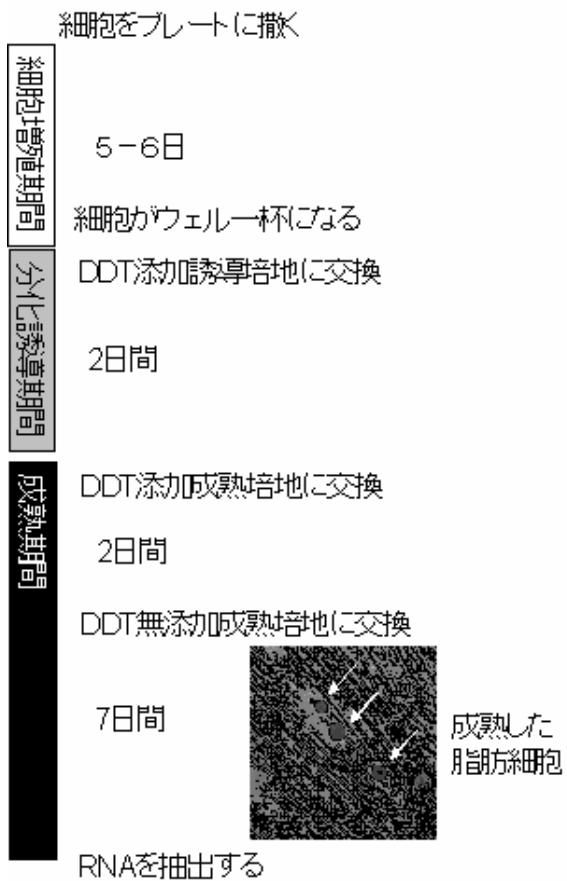


図 4 p, p' -DDT 曝露実験のスケジュール

[3. 結果・成果]

[3-1. ペルオキシソーム増殖剤応答型受容体ガンマ2(PPAR γ 2)、脂肪酸結合タンパク質(FABP)、およびアディポネクチン(ADIP0)のクローニング]

1) トド PPAR γ 2 のクローニング結果

PPAR γ 2については、5'側から917塩基までの配列を解析することが出来た。PPAR γ 2の機能的な部位についてアミノ酸配列をイヌおよびヒトと比較すると、DNA結合部位は、ヒトおよびイヌとアミノ酸配列は同じであった。また、リガンド結合部位についても塩基配列解析が不十分な一部を除きヒトおよびイヌと同じアミノ酸配列であった。

5'側の塩基配列

```
TTATGGGTGAAACTCTGGGAGATTCTCTTATTGACCCAGAAAGCGATTCTTGCTGATACACTGTCTGCAA
GCACCTCACAAGAAATTACCATGGTTGACACCGAGATGCCATTGGCCCACCAACTCGGAATCAGCTCCG
TGGATCTCTGTATGGATGATCACTCCCATTCTTGACATCAAGCCCTCACCACTGTGGATTCTCCAG
CATTTCCACTCCACACTATGAAGACATTCCATTGCGAGACCGGACCCACTGGTTGCCGATTATAAGTATGAC
CTGAAGCTCCAAGAGTACCAAAGTGCAATCAAAGTGGAGCCTGCATCCCCGCCTTATTATTCTGAAAAGACT
CAGCTGTACAATAAGCCTCATGAAGAGCCTCAACTCCCTCATGGCAATTGAATGCCAGTCTGGAGAT
AAAGCTTCTGGGTTCCACTATGGAGTTCATGCTTGTGAAGGATGCAAGGGTTCTCCGGAGGACAATCAG
ATTGAAGCTCATTTATGATAGGTGTGACCTTAAGTGTGCGGATCCACAAAAAAAGTAGAAATAATGTCAGTAC
TGTGCGATTTCAGAAATGCCCTGCTGTGGGGATGTCTCACAAATGCCATCAGGTTGGCGGATGCCACAGGC
CGAGAAGGAGAAGCTGTTGGCGGAGATCTCCAGTGATATCGACCAGCTGAACCCAGAGTCGGCTGATCTC
```

CGGGCCCTGGCAAAACATTGTATGACTCATACATAAAAGTCCTCCGCTGANCAAAGCGAAGGCGAGGGC
GATCTTGACAGGAAAGACAACAGACAAATCACCATTTGTTATGACATGAATTCTTAATGATGGGAGAA
GATAAAATCAAGTTCAAACGCATCACCCCTGCAAGAGCCCAGCAAAGAGGTGGC

核酸結合部位(灰色部分)のアミノ酸配列

Dog	QLYNKPHEEPSNSLMA I ECRVCGDKASGFHYGVHACEGCKGFFRT I RKL I YDRCDLNC
Homo	QLYNKPHEEPSNSLMA I ECRVCGDKASGFHYGVHACEGCKGFFRT I RKL I YDRCDLNC
SSL	QLYNKPHEEPSNSLMA I ECRVCGDKASGFHYGVHACEGCKGFFRT I RKL I YDRCDLNC

リガンド結合部位(灰色部分)のアミノ酸配列

Dog	QSKEVAIRIFQGCQFRSVEAVQE I TEYAKS I PGFVNLDLNDQVTLLKYGVHE I I YTMLAS
Homo	QSKEVAIRIFQGCQFRSVEAVQE I TEYAKS I PGFVNLDLNDQVTLLKYGVHE I I YTMLAS
SSL	PSKEVAIRIFQGCQFRSVEAVQE I TEYAKS I PGFVNLDLNDQVTLLKYGVHE I I YTMLAS

Dog	LMNKDGVL I SEGQGFMTREFLKSLRKPFGDFMEPKFEFAVKFNALELD-DSDLAIIFIAVI
Homo	LMNKDGVL I SEGQGFMTREFLKSLRKPFGDFMEPKFEFAVKFNALELD-DSDLAIIFIAVI
SSL	LMNKTGFSYQRAR-I HDKGVSKEPEKALWLYGAQVVAVK--SMHWNQR---LGNINSRH
	**** * . . . : : : . * . * : : . . : : * . : :

Dog	ILSGDRPGLLNVKPIED I QDNLLQALELQLKLNHPESSQLFAKLLQKMTDLRQ I VTEHVQ
Homo	ILSGDRPGLLNVKPIED I QDNLLQALELQLKLNHPESSQLFAKLLQKMTDLRQ I VTEHVQ
SSL	YSXXNRPGLLNVKPIED I QDNLLQALELQLKLNHPESSQLFAKLLQKMTDLRQ I VTEHVQ

2) 脂肪酸結合タンパク質(FABP)のクローニング

FABPについては3'側から487塩基について配列を解析することができた。塩基配列が明らかになった部位は脂肪酸結合部位に当たり、トドの脂肪酸結合部位はイヌと類似していた。

3'側の塩基配列

GGAAAGTGGCTGGCATGGCAAACCCAACATGATCATCAGTGTGAATGGGATGTGATCACCATTAAATCA
GAAAGTACCTTAAAAACTGAGATTCTCTCAAACCTGGGCCAGGAATTGATGAAGTTACTGCAGATGAC
AGAAAAGTCAAGAGCATCATAACGTTAGATGGAGGAGTCCTGGTACAGGTGCAGAAGTGGATGGAAAAT
CAACCACCATAAAAGAGAAAACGAGTGGATGACAAACTGGTGGTGGAAATGTGTCATGAAAGGCGTCACTTCT
ACCAGAATTATGAGAGAGCATAAGTCAAGGGACATGGAGCTGAAGTTGCATCGAACTCTGTTGGCTATA
TTGTCACACATGTATTGTTATTCCTACTAATTAGCAAGCGACTAATTCCCCAACTGATTTATTCAATGT
GGATGTGTTCATTAATAAAACTTTAGATTTAAAAAAAAAAAAAA

アミノ酸配列の比較

SSL	KVAGMAKPNM I SVNGDV I I KSESTFKNTE I SFKLGQEFDEVADDRKVKS I I TLDGGV
Dog	KVAGMAKPNM I SVNGDV I I KSESTFKNTE I SFKLGQEFDEVADDRKVKS I I TLDGGV
Homo	KVAGMAKPNM I SVNGDV I I KSESTFKNTE I SFKLGQEFDEVADDRKVKS I I TLDGGV

SSL	LVQVQKWDGKSTT I KRKRVDDKLVVECMKGVTSTR I YERA
Dog	LVQVQKWDGKSTT I KRKRVDDKLVVEC I MKGVTSTR I YERA

Homo LVHVQKWDGKSTTIKRKREDDKLVECVMKGVTRVYERA

:**:*****:*****:*****

3) アディポネクチンのクローニング

アディポネクチンについては、5' 側 376 塩基、3' 側 356 塩基の配列を解析することができた。得られた塩基配列に基づいて 5' 側のアミノ酸配列を予測し、イヌおよびヒトと比較するとトドのアディポネクチンはイヌのものと類似していることが示唆された。

5' 側部分塩基配列

GCCGTGATGGCAGAGATGGCACCCCTGGCGAAAAGGGTGAGAAAGGAGATCCAGGTCTGGTTCAGCTAA
GGGTGACACTGGTGAAACTGGAGTAAGTGGCTATGTACACCGGTACATTAGTGTGGATTGGAAAGCCGGGTCAG
GAAAGGAGAACCTGGAGAAAGTGCCTATGTACACCGGTACATTAGTGTGGATTGGAAAGCCGGGTCAG
CTGTCCCCAATGTTCCATTGCTTACCAAAATCTTACAATCTGCAAAACCACTATGATGGCACCAGTGG
AAAATTCCACTGCAACATTCTGGGCTGTACTACTTCTCCTACCACATTACAGTCTACTTGAAGGATGTCAAG
GTCACCTCTACAAGAAGACAC

3' 側部分塩基配列

CCAGTCCAGGAGAAGAATGTGGACCAGGCCTCTGGCTCTGTGCTCCTCCATCTGGAAAGTGGCGACCAAG
TCTGGCTCCAGGTGTATGGGATGGAACTCTTATGGCTCTATGCAGATAATGTCCATGACTCTACCTTA
CAGGCTTCCTCTACCATGATACCAACTGATCACAACTAACCTAACAGGAGGCTCCAGGCCAACAAACC
CAAAGCGAAAGAACAGTCCATGGTTTCAGTTAAAGAGATTAGTTTGTATCCGGTTGGAAGAGCTCTG
AACATTATTCAATTCTACTCATTCAAGGTACCTTCAAAAAAAAAAAAAAA

5' 側アミノ酸配列の比較

SSL -----RDGRDG

Dog MLLLRAVLLLLVLPAGQDSVAEGPGVLLPLPKGACPGWMAGIPGHPGHNGTPGRDGRDG

Homo MLLGAVLLLLALPGHDQETTQGPVLLPLPKGACTGWMAGIPGHPGHNGAPGRDGRDG

SSL TPGEKGEKDPGLVGPKGDTGETGVTGVEGPRGFPGIPGRKGEPGESAYVHRSAFSVGLE

Dog TPGEKGEKDAGLVGPKGDTGETGVTGVEGPRGFPGTPCRKGEPGESAYVHRSAFSVGLE

Homo TPGEKGEKDPGLIGPKDGETGVPGAEGPRGFPGIQGRKGEPGEGAYVYRSAFSVGLE

*****. **:****:****. *. *****:*****. ***:*****

SSL SRVTVPNVPIRFTKIFYNLQNHYDGTGKFHCNIPGLYYFSYHITVYLKDVKVSLYKK--

Dog SRITVPNVPIRFTKIFYNLQNHYDGTGKFHCNIPGLYYFSYHITVYLKDVKVSLYKKDK

Homo TYVTIPNMPIRFTKIFYNQQNHYDGSTGKFHCNIPGLYYFAYHITVYMKDVKVSFLKKDK

: : *:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***

SSL -----QEKNVDQASGSVLLHLEVGDQVWLQVYGDGNSYGLYADNVHDSTFTGFLLY

Dog AMLFTYDQYQEKNVDQASGSVLLHLEVGDQVWLQVYGDGDSYGLYADNVNDSTFTGFLLY

Homo AMLFTYDQYQENNVDQASGSVLLHLEVGDQVWLQVYGEGERNGLYADNDNDSTFTGFLLY

:***:*****:*****:*****: *:****:*****:*****

SSL	HDTN
Dog	HDTN
Homo	----

4) クローンニングのまとめ

本研究の結果からトドのペルオキシソーム増殖剤応答型受容体ガンマ2、脂肪酸結合タンパク質、およびアディポネクチンは、どれもイヌに類似していることが示唆された。トドはイヌと同じネコ目に属することから、これらの遺伝子はネコ目各種で広く保存されている可能性が予測された。

また、現在のところ十分に解析が進んでいないPPAR γ 2のリガンド結合部位について、その重要性から早急に解析を進める予定である。

[3-2. p, p' -DDT の脂肪細胞分化に対する影響]

1) 細胞の生残率

p, p' -DDTの細胞毒性を明らかにするため、細胞の生残率について調べた。その結果、細胞の生残率は、0.24 ppm、3 ppmともに p, p' -DDT曝露群(DDT(+))と非曝露群(DDT(-))に有意な差は認められなかった(student-test unpaired comparison, 図5)。このことから、0.24 ppmおよび3 ppm濃度では p, p' -DDTの細胞毒性は顕著な細胞死を引き起こすほどではないことが示された。

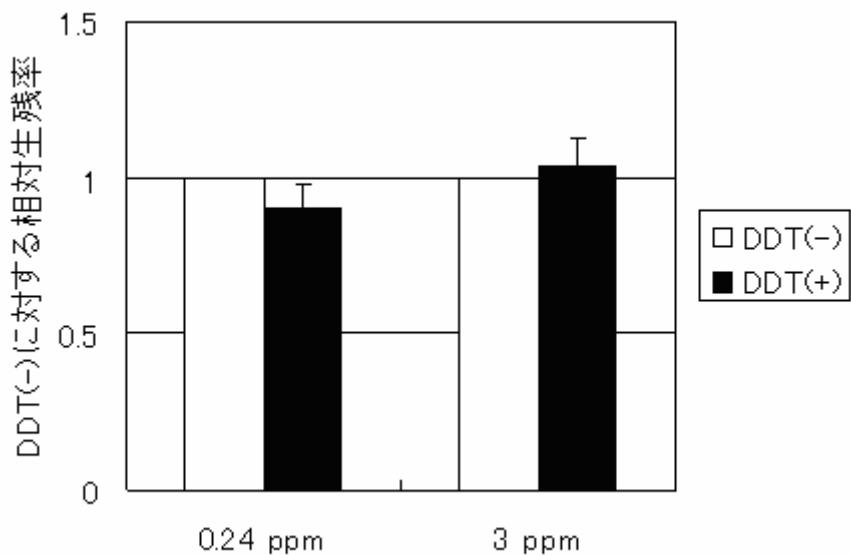


図 5 p, p' -DDT曝露が細胞の生残率に与える影響 (N=8)

2) 発現遺伝子の変動

半定量RT-PCRの結果PPAR γ 2については、DDT(+)群、DDT(-)群ともにほとんど検出が出来なかつたので、FABPおよびアディポネクチンの相対発現量についてDDT(+)群とDDT(-)群を比較した。その結果、FABP、アディポネクチンとともに、DDT(+)群とDDT(-)群に発現量の有意な差は見受けられなかつた(student-test unpaired comparison, 図6, 図7)。これらのことから、 p, p' -DDTの細胞分化期に対する短期曝露が、細胞が分化した後に発現する脂肪細胞の内分泌関連遺伝子(ADIP0)に与える影響は小さいと考えられた。

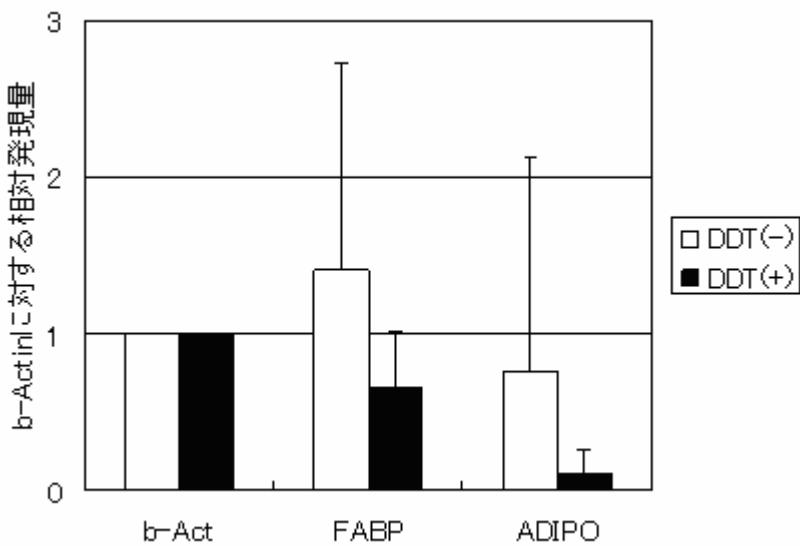


図 6 0.24 ppm *p, p'*-DDT の曝露が細胞の遺伝子発現に与える影響 (N=8)

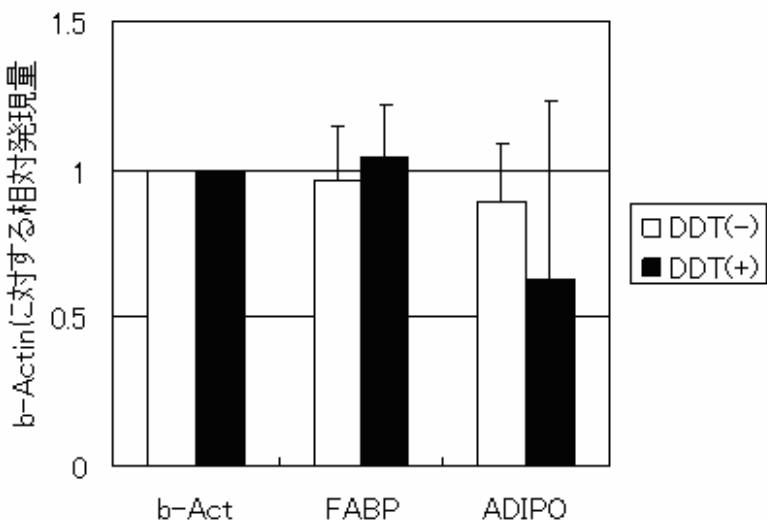


図 7 3 ppm *p, p'*-DDT の曝露が細胞の遺伝子発現に与える影響 (N=8)

3)曝露実験結果のまとめ

本研究からは *p, p'*-DDT を脂肪細胞に細胞分化時に短期間だけ曝露させることでは、*p, p'*-DDT が脂肪細胞の分化と内分泌機能に与える影響を見出すことは出来なかった。また、*p, p'*-DDT は PPAR γ 2 の発現量を増加させ、脂肪細胞の分化を促進することがマウス由来細胞において報告されているが (Moreno-Alvarez & Matsumura, 2002)、本研究では *p, p'*-DDT による PPAR γ 2 の発現量増加と脂肪細胞分化の促進は観察されなかった。これらの要因としては、曝露期間が短かったこと、もしくは *p, p'*-DDT を曝露させてから RNA 抽出までの非曝露期間に、おそらく *p, p'*-DDT の毒性影響が一過性のものであるために、*p, p'*-DDT 曝露が遺伝子発現に与えた影響が消えてしまったことが考えられる。

本研究では、脂肪細胞分化時に遺伝子発現変動が多く見られる分化誘導開始から 4 日間に絞って *p, p'*-DDT 曝露を行ったが (坂上・春日 2004)、今後、*p, p'*-DDT の曝露期間や RNA のサンプリング時期を変えることで、さらに *p, p'*-DDT の脂肪細胞分化に対する影響を検討する必要があると考えられた。

また、PPAR γ 2、FABP、および ADIPO のクローニングから、トド・アザラシ類の脂肪細胞分化において重要な役割を果たす遺伝子はイヌに類似していることが示唆された。このことから、今後、脂肪細胞分化に対する汚染物質の毒性影響解明に、イヌマイクロアレイを適用することも一つの手段だと考えられた。

[4. 今後の展望]

1) 脂肪組織を用いた新規の汚染物質影響評価

これまでの汚染物質の毒性影響研究の多くは、免疫系や生殖器系を対象とする研究であった。近年のヒトや実験動物における研究から、脂肪組織がホルモン、遊離脂肪酸、サイトカインなどを分泌して代謝、免疫および生殖に影響を与える内分泌器官としての役割を持つことが明らかになりつつある。脂肪組織は海棲哺乳類やヒトにおけるダイオキシン類、ポリ塩化ビフェニル類やDDT類などの脂溶性汚染物質の主要な蓄積器官であることから、これら汚染物質の新規標的器官となっている可能性がある。本研究で脂溶性汚染物質が脂肪組織に与える影響を調べることで、これら汚染物質の新規毒性発現機構を発見出来る可能性がある。

さらに、近年の研究から脂肪組織には多分化能を備えた幹細胞が含まれていることが明らかになっている(Zuk *et al.*, 2002, Schwarts, *et al.*, 2002)。このことから、現在用いている脂肪細胞への分化技術を応用することで、汚染物質の幹細胞に対する毒性と細胞分化に対する影響について評価することが可能になると考えられる。

2) 北海道独自の未利用バイオリソースを用いた新たな肥満研究

肥満は今や国民病とも言える病気であり、その治療法確立と対策が早急に求められている。トドやアザラシなどの海棲哺乳類は、防寒や流線型の体型を維持するためにヒトよりも体重における脂肪組織の占める割合が高い動物である。このことから、ヒトと同様に脂肪蓄積による弊害が起きることが予想されるが、これら海棲哺乳動物において脂肪蓄積による疾病は知られていない。このことから、海棲哺乳類には脂肪蓄積による弊害を回避する機構が備わっていると予測され、その機構の解明はヒトにおける肥満治療に寄与する可能性がある。しかし、海棲哺乳類の脂肪組織の機能に関する研究は全く行われていない。

しかも、トドやアザラシなどは漁業被害動物として北海道では社会問題を引き起こしている未利用資源である。そして、これらの動物の標本は有害駆除や魚網への混獲により北海道でのみ入手が可能であり、北海道独自の未利用バイオリソースと言える。

本研究では、トドやアザラシの脂肪組織もアディポネクチンを分泌していることが明らかになったことから、ヒトと同様に肥満などの疾病において重要な役割を果たしていると考えられる。このことから、トドやアザラシ類の脂肪細胞は新たな肥満研究モデルになりうると考えられる。そして、これらの種の脂肪細胞の分化と機能について研究を進め、得られた結果をヒトと比較することでヒトの肥満研究へと貢献できると考えられる。

(参考文献)

- Barron MG, Heintz R, Krahn MM. 2003. Contaminant exposure and effects in pinnipeds: implication for Steller sea lion declines in Alaska. *Sci. Total Environ.* 311;111-133.
- Hoshino H, Fujita S, Goto Y, Isono T, Ishinazaka T, Burkanov VN, Sakurai Y. 2006. Organochlorines in Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) from the western north Pacific. *Trites AW, Atkinson SK, DeMaster DP, Fritz LW, Gelatt TS, Rea LD, and Wynne KM (eds.). Sea lions of the world. Alaska Sea Grant College Program, University of Alaska Fairbanks.* 1-11.
- Moreno-Aliaga MJ, Matsumura F. 2002. Effects of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)-ethane (p,p' -DDT) on 3T3-L1 and 3T3-F442A adipocyte differentiation. *Biochem Pharmacol*, 63;997-1007.
- 坂上浩, 春日雅人. 2004. 脂肪細胞分化の転写調節. *細胞工学*. 23;144-149.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian, P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, BenHaim P, Hedrick MH 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cell. *Molecular Biology of the Cell*, 13; 4279-4295.