

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

星野 広志 [北海道大学創成科学共同研究機構／教務補助員]

背景・目的

オホーツク海では、近年、沿岸諸国からのDDTなどの脂溶性汚染物質の流入が報告されている。そして、当海域の高次栄養段階生物であるアザラシ類やトドでは、汚染物質により体内に生化学的な変化が起きていることや、他海域よりもDDT汚染の程度が高いことが示唆されている。そして、汚染物質の蓄積部位である脂肪は内分泌器官としての役割をもつことから、汚染物質の新規標的器官であることが予測される。

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、トド・アザラシ類において脂溶性汚染物質による脂肪組織に対する毒性影響を明らかにすることを目的とする。

内容・方法

1) 材料の収集

2005年の冬から春に羅臼沖と石狩沖で捕獲されたトドおよびゴマフアザラシより、脂肪組織を採取した。

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。分離した細胞はディッシュに撒き、10%牛新生仔血清、抗生物質を含んだ培地で培養した。細胞の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。

3) 脂肪細胞の分化と機能に関する遺伝子のクローニング

トド脂肪組織から抽出したRNAを逆転写反応に供した後、PCR反応を行い、ペルオキソーム増殖剤応答型受容体 gamma 2 (PPARg2)、脂肪酸結合タンパク質 (FABP)、およびアディポネクチン (ADIPO) のcDNAを部分的に増幅した。その後、塩基配列を解析した。

4) DDTの脂肪細胞に対する曝露試験

ゴマフアザラシの細胞に、細胞分化の誘導開始から4日間0.24ppmまたは3ppm *p,p'*-DDTを曝露させた。誘導開始から9日に細胞からRNAを抽出し、PPARg2、FABPおよびADIPOの遺伝子発現量について調べた。

結果・成果

(3-1) トド由来のPPARg2、FABPおよびADIPOのクローニング

トドPPARg2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。PPARg2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結合部位アミノ酸配列はヒトおよびイヌのアミノ酸配列と同じであった。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。

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出来た。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。また、ADIPO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出来た。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ADIPOもイヌのものと類似していることが示唆された。

以上のように本研究の結果からトドのPPARg2、FABP、およびADIPO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PPARg2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ことを予定である。

(3-2) *p,p'*-DDTの脂肪細胞分化に対する影響

まず、*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、細胞の生残率については、0.24ppm、3ppmともに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。

次に半定量RT-PCR法を用いて発現遺伝子の変化について調べたところ、PPARg2については、DDT(+)群、DDT(-)群とともにほとんど検出が出来なかつたが、FABPおよびADIPOの相対発現量についてDDT(+)群とDDT(-)群との比較が可能であった。その結果、FABP、ADIPO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。

以上のように本研究からは*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、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つた。また、*p,p'*-DDTはPPARg2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、本研究では*p,p'*-DDTによるPPARg2の発現量増加と脂肪細胞分化の促進も観察されなかつた。

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、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。

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

海棲哺乳類における汚染物質の主要蓄積器官である脂肪組織は、内分泌器官として働くだけでなく、多分化能を備えた幹細胞を含んでいる。このことから、脂肪組織を用いて汚染物質の幹細胞とその細胞分化に対する影響を解明できると考えられる。

2) 北海道独自のバイオリソースによる新肥満研究

トドやアザラシは北海道でのみ入手可能な未利用バイオリソースである。これらの種は、体脂肪率が高いことから、これら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る。このことから、トドやアザラシの脂肪細胞を肥満モデルに用いることで、ヒトにおける肥満研究に寄与すると考えられる。