

ExTEND2005 に基づく平成 20 年度基盤的研究課題、野生生物の生物学的知見研究課題及びフィージビリティースタディー研究課題について

平成 19 年度に採択された基盤的研究 8 課題、野生生物の生物学的知見研究 2 課題及びフィージビリティースタディー 6 課題の合計 16 課題の平成 19 年度研究成果について ExTEND2005 基盤的研究企画評価検討会及び ExTEND2005 野生生物の生物学的知見研究検討会による合同検討会に設置した評価会議(平成 20 年 5 月 27 日開催、非公開)において評価を行い、研究の継続または終了、予算規模、ExTEND2005 において実施している他の枠組みへの移動等についての検討を行った。その結果、16 課題のうち、平成 20 年度の基盤的研究として 6 課題、野生生物の生物学的知見研究として 3 課題及びフィージビリティースタディーとして 4 課題を採択した。

また、平成 20 年度も来年度以降の新規研究課題候補として、フィージビリティースタディーを公募することとした。

なお、採択課題の平成 20 年度成果については、「合同成果発表会」を平成 20 年度末に公開で開催し、評価を行うこととした。

1. 平成 20 年度基盤的研究採択課題

平成 20 年度については下記 6 課題について採択した。調査内容については、ExTEND2005 基盤的研究企画評価検討会及び ExTEND2005 野生生物の生物学的知見研究検討会による合同検討会での協議の上、決定した。

- 課題 1. (基盤 1) 哺乳類を用いた毒性実験の結果に影響を及ぼす実験動物の遺伝的要因解析
- 課題 2. (基盤 2) 胎児期におけるエストロゲンシグナルの gain of function とその性分化の可塑性
- 課題 3. (基盤 3) 胎仔期、新生仔期の食餌による環境化学物質代謝・排泄機能への影響調査
- 課題 4. (基盤 4) 核内ホルモン受容体による転写調節における環境化学物質の作用機構
- 課題 5. (基盤 5) 野生生物のリスク評価を目指した核内受容体リガンドの網羅的解析法の開発
- 課題 6. (基盤 6) メダカの生殖内分泌系に及ぼす化学物質の内分泌かく乱作用の作用メカニズムに関する研究

(1) 基盤的研究課題(基盤1)：哺乳類を用いた毒性実験の結果に影響を及ぼす実験動物の遺伝的要因解析

①研究者：(財)残留農薬研究所：青山博昭(代表研究者)、佐藤旭、理化学研究所バイオリソースセンター：吉木淳、目加田和之、農業生物資源研究所：後藤英夫、須藤淳一

②研究概要：生殖・発生毒性試験を含む通常の毒性試験では、ヒトの集団が遺伝的に均一ではないことを考慮して、ある程度の遺伝的多型性を保持するアウトブリードストックの実験動物（いわゆるクローズドコロニー系統の動物）が用いられる。これらの動物集団は、マウスであれラットであれ、ゲノム全体の10～15%の遺伝子座（およそ3,000～4,500遺伝子座）に遺伝子多型が存在すると考えられている。このため、動物生産業者から供給された外見が正常な動物の中にも何らかの先天異常を引き起こす劣性遺伝子をヘテロに持つ個体が一定の頻度で含まれており、内分泌かく乱作用が懸念される化合物が次世代の動物に及ぼす影響を調べる生殖・発生毒性試験を実施する過程で、化合物の投与とは無関係であるにもかかわらず、投与した化合物により誘発されたものと誤解されるような先天異常がしばしば児動物に現れる。また、アウトブリード動物を用いた毒性実験では、同じ化合物を同じ量投与したにもかかわらず、その化合物に対する反応にしばしば大きな個体差がみられることも経験的に知られており、様々な化合物に対する感受性を支配する遺伝子座に多型が存在することが強く示唆される。しかし、マウスを用いた研究では約33%で、ラットを用いた研究では実にその約85%でアウトブリード動物が用いられながら（Chia et al., 2005）、これらの動物には遺伝的要因に基づく個体差が存在する可能性を考慮した上で結果が解釈されている場合はむしろ稀であり、我々が知る限り、動物集団に潜在する遺伝学的問題を系統的かつ詳細に解析した研究も過去にはほとんど例がない。本研究は、内分泌かく乱作用を含む様々な生殖・発生毒性を調べるための毒性実験に使用されるアウトブリード系統の動物集団に保持される様々な劣性突然変異や遺伝子多型に着目し、動物実験の結果を解釈する上で支障となるような（暴露した物質の投与に起因すると誤解される恐れのある）突然変異遺伝子や性ホルモンに対する感受性を修飾する遺伝子多型を可能な限り同定すると共にこれらの変異や多型を遺伝子レベルで診断する技術を確立して、毒性実験に使用される実験動物の遺伝学的基盤を整備することを目的とする。

③平成20年度研究計画：前年度の研究で、近交系マウスであるC3H/HeN、C57BL/6J及び129S2/SvPasの3系統間には、エストロゲン及びアンドロゲンに対する反応性に明らかな差があることを表現型のレベルで確認した。本年度は、これらの実験から得られたゲノムDNAや系統間交配から得られるF2個体のゲノムDNAを材料としてマッピングを進めると共に、標的器官より採取したmRNAを用いた遺伝子発現解析を実施して、感受性を支配する原因遺伝子（群）の同定に努める。また、原因遺伝子（または連鎖マーカー遺伝子）が同定できた場合は、生体から採取した微量のDNAサンプルを用いて個体の遺伝子型が判定する技術を確立して、毒性試験の結果を正確に評価する基盤を整備する。

(2) 基盤的研究課題(基盤2)：胎児期におけるエストロゲンシグナルの gain of function とその性分化の可塑性

①研究者：岐阜薬科大学：中西剛(代表研究者)、吉田一郎

②研究概要：本研究は、哺乳動物の胎児期におけるエストロゲン受容体 (ER) を介したシグナルが、性分化や出生後の発育等に如何なる影響を与えるのかを解明し、さらにエストロゲン様化学物質の胎児期曝露によって引き起こされる発生毒性に、どの程度ERを介したシグナルが関わっているのかを解明することを最終目標としている。これまでに我々は、母体への影響を最小限に留め、胎児に対する直接的なエストロゲン曝露の影響を検討できるモデル動物として、マウス胎盤にヒトアロマターゼとenhanced green fluorescent proteinの融合タンパク質 (AromEGFP) を発現するAromEGFP-TGマウスを用い、雌雄の仔マウスの体重変動、肛門生殖結節間距離 (AGD)、生殖器重量、雄の精子数、雌の膈開口日、初回発情期到来日及び性周期の変化について検討を行ってきた。

その一方で、マウスの胎児血中には α -フェトプロテイン (AFP) が存在しており、過剰に供給されたエストロゲンの組織への移行を阻害することが報告されている。昨年度は、これまでに胎児期エストロゲン曝露の影響として報告されている上記の項目について検討を行ったが、特にAromEGFP-TG仔マウスにおいて影響は認められなかった。しかしながらこの結果は、胎盤で産生されたエストロゲンがAFPに中和されてしまったからなのか、エストロゲンシグナルがこれらの項目には元々影響を与えないためであるのかは不明なままである。そこでAromEGFP-TGマウスの胎児に過剰供給されたエストロゲンが十分に胎児組織中のERに作用しているのかを検討するために、レポーター遺伝子の上位にエストロゲン応答配列 (ERE) を連結したコンストラクトを導入したレポーターTGマウス (ERE-MycLUC-TGマウス) を作成してその解決を試みる。

③平成20年度研究計画：これまでの研究で、胎盤特異的にアロマターゼを発現するAromEGFP-TGマウスを作成し、このマウスが胎児にのみ高濃度のエストロゲンを曝露できるモデルとなることを確認した。またエストロゲン応答配列にレポーター遺伝子を連結した遺伝子を持つERE-Luc TGマウスも作成した。本年度は、得られたERE-Luc TGマウスのcharacterizationを行う目的で、Adlutマウスにエストラジオールを投与した際、どの組織でレポーター遺伝子が発現するかを検討する。またエストロゲン様化学物質を投与したときについても同様の検討を行い、反応性を比較検討することでラインの選別を行う。レポーター遺伝子の発現の検出が可能なラインが得られたら、これをAromEGFP-TGマウスを掛け合わせ、胎児期のどの時期にどの組織でERの転写がONになるかを確認する。また可能であれば、妊娠ERE-Luc TGマウスにエストロゲン様化学物質を投与したときについても同様の検討を行い、AromEGFP-TGマウスを掛け合わせた場合との反応性の違い等を検討することで、天然のエストロゲンと外因性のものとの作用機構の違いを追求する。

(3) 基盤的研究課題(基盤3): 胎仔期、新生仔期の食餌による環境化学物質代謝・排泄機能への影響調査

①研究者: 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科: 太田茂(代表研究者)、古武弥一郎、杉原数美、日本薬科大学 健康薬学科: 北村繁幸

②研究概要: 本研究は、現在化学物質の内分泌かく乱作用で注目されている胎児期、新生児期での影響を調べる上で考慮しなければならない代謝活性化及びこの時期における薬物代謝酵素変動と食餌に関する調査を目的とするものである。化学物質による内分泌かく乱作用でもっとも懸念されているのが胎児期、新生児期における影響である。昨年度までの研究により、ラット胎仔期、新生仔期の薬物代謝酵素(cytochromeP450:CYP)活性が極めて低く、成長に伴い上昇すること、また精製飼料で飼育したラットでは、CYP分子種により活性上昇があまり認められず、食餌成分により誘導される分子種が存在することを明らかにした。胎児期、新生児期に摂取する食事の偏りが内分泌かく乱作用物質の影響に関与することなどを提示できると考えている。

③平成20年度研究計画: これまでの研究により、環境化学物質の代謝に関与する薬物代謝酵素 cytochromeP450(CYP)が、新生仔期の食餌成分により大きく変動することを明らかにした。今年度は食餌成分の薬物代謝第二相酵素類やトランスポーター類への影響、環境化学物質との相互作用について調べる。Wistar系ラット及びC57BL/6Jマウスを妊娠時より、通常飼料(オリエンタル酵母社MF)あるいは精製飼料(AIN93G)で飼育し、離乳後も同一飼料を与える。生後、定期的に肝及び小腸の薬物代謝酵素類及びトランスポーター類の発現量を酵素活性、リアルタイムRT-PCR及びwestern blotで測定し比較検討する。さらに、異なる飼料で飼育したラット、マウスを用い、フタル酸エステル類や農薬類など環境化学物質曝露による影響の違いも調べる。

(4) 基盤的研究課題(基盤4)：核内ホルモン受容体による転写調節における環境化学物質の作用機構

①研究者：群馬大学大学院 医学系研究科：鯉淵典之(代表研究者)、岩崎俊晴、下川哲昭

②研究概要：甲状腺ホルモン受容体を中心とした核内受容体への低用量の環境化学物質による作用をレポーターアッセイ等のインビトロ実験系を用いて解析してきた。特に、昨年度は臭素化化合物を中心に解析をおこなった。また、インビトロで共役因子－核内受容体－DNA結合におよぼす環境化学物質の影響を調べる迅速スクリーニング系を確立した。本研究により、従来毒性が確認されていなかった物質の毒性が判明するとともに、環境化学物質の新たな作用機構が解明される。特に臭素化化合物の作用機構については情報が限られており、本研究により新たに重要な知見が得られる可能性が高い。

③平成20年度研究計画：

1) 本教室で開発した高感度のレポーターアッセイと Liquid Fluorescent DNA Pull Down Assay 法を用いて臭素化芳香族化合物を中心とする環境化学物質の核内ホルモン受容体への作用を網羅的に解析する。

2) 作用が生じた物質について、pull down や mammalian two hybrid 法などを用いて受容体内での作用部位と作用機構の解析を行う。また、顕微測光装置を用いて細胞内での受容体や共役因子の動態や結合を解析する。FRET によるイメージング手法の確立を目指す。

3) 2) に引き続き実際の神経細胞での作用機構を調べるため、小脳プルキンエ細胞初代培養細胞を用いて環境化学物質による形態変化を調べる。

4) さらに、ラットやマウス(遺伝子改変動物を含む) 個体を用いて、母体への環境化学物質投与による発達期小脳におけるホルモン受容体の標的遺伝子発現変化を解析する。

(5) 基盤的研究課題(基盤5)：野生生物のリスク評価を目指した核内受容体リガンドの網羅的解析法の開発

①研究者：愛媛大学 沿岸環境科学研究センター：岩田久人(代表研究者)、金恩英

②研究概要：鳥類や水棲哺乳動物を含む野生生物の個体数減少の一要因として、化学物質による環境汚染の関与が指摘されているが、多くの種について適切なリスク評価は依然として実施されていない。リスク評価が困難な理由として、現在使用されている化学物質が多種多様であり、安全性試験に時間がかかることが挙げられる。また、すでに数種のモデル動物で明らかのように、化学物質に対する毒性発症の感受性はモデル動物種・系統間でさえも大きく異なり、このことは野生生物種にも該当すると予想される。化学物質の潜在的なリスクを評価するため、核内レセプター（受容体）を介する生体反応に着目した。核内レセプターの機能は通常は内因性物質（ステロイド・甲状腺ホルモン・レチノイドなど）によって制御されているが、PCB、内分泌かく乱作用が疑われる物質などの化学物質によって活性化（もしくは不活化）されると、代謝酵素であるチトクロームP450 (CYP) やトランスポーター等の遺伝子発現レベルを変調させる。つまり、核内レセプターは体内生理環境のホメオスタシスに関与しており、核内レセプターを起点とする情報伝達機構は化学物質によってかく乱されるのである。化学物質による核内レセプターを介した情報伝達機構のかく乱について、比較生物学的に検討することを考えた。生物種特異的な毒性影響について評価するためには、毒性発現に関与する遺伝子産物の遺伝情報や機能を、系統的・生態学的に重要な生物種間で比較検討することが不可欠である。野生生物の核内レセプターを潜在的に活性化・不活化する化学物質を調査すること、また核内レセプターを指標とした敏感種・鈍感種を探索して感受性を決定する分子機構について解明することを計画した。

③平成20年度研究計画

1) ニワトリ、カワウ、クロアシアホウドリ及びハシブトガラスの AHR cDNA クローンを適当な細胞に導入した *in vitro* AHR レポーター遺伝子発現系を用い、生物種そして AHR アイソフォーム毎にダイオキシン類同族・異性体の用量応答反応を測定する。

2) マウス及びアザラシの核内受容体の cDNA から蛋白質を人工的に合成して、それをセンサーチップ上に固定し、表面プラズモン共鳴センサーグラムを用いて環境汚染物質-核内受容体の結合・解離過程について測定する。

3) 上記で得られた、環境汚染物質と各生物種由来受容体の結合能及び転写活性化能のLOELやEC₅₀・K_d値といった物理化学的パラメーターと野生個体群の環境汚染物質蓄積濃度を比較し、受容体が介在する影響に関する環境汚染物質の潜在的リスクについて評価する。

(6) 基盤的研究課題(基盤6) : メダカの生殖内分泌系に及ぼす化学物質の内分泌かく乱作用の作用メカニズムに関する研究

①研究者:自然科学研究機構 基礎生物学研究所:長濱嘉孝(代表研究者)、Bindhu Paul-Prasanth

②研究概要:発生初期の脊椎動物の生殖腺は化学物質の暴露に対して高い感受性を示す。その顕著な例としてあげられるのが、発生初期の魚類や両生類が内分泌かく乱作用を有する化学物質に暴露されたときに起こる不可逆的な機能的性転換である。本研究では、化学物質に暴露されることによって起こる性転換(個体レベルの変化)がどのような分子、細胞メカニズムによるものであるのかをメダカを用いて解析する。最近、メダカ生殖腺由来の遺伝子のみを貼り付けた高感度マイクロアレイ系を構築した。このアレイ系は化学物質がもつ内分泌かく乱作用や毒性を検索するためにも非常に有効であると考えられる。すでに、この新規マイクロアレイを用いて、メダカの正常性分化時のXX/XY生殖腺での遺伝子発現パターンを解析することによりいくつかの性特異的遺伝子が同定できているので、これらは遺伝子マーカーとして本研究の遂行には非常に有益である。そこでまず、このマイクロアレイ系を用いて、エストラジオール-17 β 、メチルテストステロン等で処理した稚魚の雌雄生殖腺における遺伝子発現パターンを解析する。さらに、処理魚の生殖腺で特徴的に発現変動する遺伝子を同定して、その遺伝子の発現細胞や経時的発現パターンをRT-PCRや*in situ* hybridizationなどにより詳しく調べる。このような正常時及び性ステロイドホルモン処理時における遺伝子発現パターンに関する基礎的知見は化学物質の影響を正確に評価する上で非常に重要である。次いで、同じアレイ系を用いて、環境中でも検出され、魚類に対する内分泌かく乱作用によると考えられる有害性(受精率の低下)が示されているジエチルスチルベストロール(DES)や4-nonylphenol等の化学物質を処理された稚魚の生殖腺における遺伝子発現パターンを解析する。稚魚について行う上記の研究を成魚を用いても実施する(本研究の後半期)。このような解析を通して、個々の化学物質や性ホルモンの影響や作用の分子、細胞メカニズムを明らかにすることができるばかりでなく、それぞれの化学物質間における作用メカニズムの違いをも明確にできるものと期待される。最終的には、各種化学物質の影響に関する分子、細胞レベルでの解析結果と有害性との関連について評価する。

③平成20年度研究計画:内分泌かく乱作用を示す種々の化学物質が、メダカの稚魚や成魚の生殖腺や脳に及ぼす影響と作用メカニズムをマイクロアレイ、ディフュゼンシャルハイブリダイゼーション、*in situ* hybridizationなどの分子、細胞生物学的アプローチを駆使して解析する。特に、それぞれの化学物質処理に反応して変動する遺伝子発現パターンをプロファイリングすることにより、生殖腺と脳の性転換カスケードを分類化する。また、すでに代表研究者らによって作製済みのGFP標識トランスジェニック系統も併用することにより、化学物質暴露の影響を可視化することも本研究の特徴である。なお、実験に供する個体の遺伝的性はメダカの性決定遺伝子*DMY*の有無によって判定する。平成20年度は、前年度に引続き、ジエチルスチルベストロール(DES)に絞って解析を進める予定であるが、生殖腺での遺伝子発現に及ぼす影響に加えて、脳及び脳下垂体における種々遺伝子の発現に及ぼすDES処理の影響についてもreal time PCR、*in situ* hybridization、GFP標識トランスジェニック系統などを用いて詳細に検討する。

2. 平成 20 年度野生生物の生物学的知見研究採択課題

平成 20 年度については下記 3 課題について採択した。調査内容については、ExTEND2005 基盤的研究企画評価検討会及び ExTEND2005 野生生物の生物学的知見研究検討会による合同検討会での協議の上、決定した。

課題 1. (野生 1) 野生メダカの性分化異常に関わる基礎的情報の収集と解析

課題 2. (野生 2) 東京湾における生態系かく乱の実態解明とその要因解析

課題 3. (野生 3) アカトンボ減少傾向の把握とその原因究明

(1) 野生生物の生物学的知見研究課題(野生1)：野生メダカの性分化異常に関わる基礎的情報の収集と解析

①研究者：新潟大学大学院 自然科学系：濱口哲(代表研究者)、酒泉満

②研究概要：メダカは、ほ乳類以外の脊椎動物で唯一性決定遺伝子が同定されている生き物である。各地から野生メダカを採集して、性決定遺伝子*DMY*の存否を指標に当該個体の遺伝的性(XXかXY)を調べ、個体の性との異同について検討を行ってきた。これまでに、野生メダカ約9,000個体を調べた結果、おおよそ1%程度、遺伝的性と個体の性が一致しない個体(性転換個体)が存在することを見いだした。それらの性転換個体について、順次それが遺伝的原因によるものか、あるいは後天的要因によるものかの検討を行っているが、これまでに遺伝解析が終了しているXY雌の全てと、幾つかの地点でのXX雄個体の性転換は、遺伝的要因による事が判明している。XY雌個体の遺伝的要因が、*DMY*そのもの突然変異か、*DMY*以外の関連遺伝子の突然変異によるのかについて検討を行っているが、これまでに得られた結果では、全ての例が*DMY*の変異によるものであること、但し、*DMY*の変異によっては雌雄両方のXY個体が現れ、各個体が雌になるか雄になるかには、さらに常染色体上の別の遺伝子が関与している可能性があることも判明している。また、XX雄個体についても、その性転換に関与している遺伝子の探索を進めているところである。さらに最近、発生過程で高温条件におかれたメダカで雌から雄への性転換個体(XX雄)が見られることを見だし、その出現率に近交系間で系統差があることを報告している。

本研究では、多くの地点からのメダカについて、遺伝的性と個体の性の異同を調べるとともに、得られた不一致個体について遺伝解析を行い、その原因が遺伝的要因によるのか、後天的要因かを検討する。また、過去に不一致個体が認められた水系から数カ所を選び、継続的調査を行う。不一致個体出現の経年的な状況把握を行い、性転換を引き起こす遺伝的要因が個体群の中でどのように推移するのかについての知見を得て、性転換に関わる多様な遺伝子の対立遺伝子の集団中での挙動について基礎的情報を収集する。また、後天的要因として、性ステロイドに加えて温度の影響の可能性を検討する目的で、温度性転換現象について性転換機構の検討を行うとともに、近交系間の系統差の原因遺伝子の探索を行う。また、並行して、野生メダカの温度性転換感受性について、水温など気候条件を異にする地域(系統)差の有無等を検討する。得られる知見から、野生メダカの性がどの程度可塑的であるのかについて考察する。

③平成20年度研究計画：野生集団中のXY雌、XX雄個体の存否を調査し、それらの出現原因を遺伝学、発生生物学的見地から検討した。これまでに、XY雌の原因は主として*DMY*遺伝子の突然変異、XX雄は常染色体上の遺伝子の多型性によること、また、胚の高温処理はXX個体の雄化を引き起こし得、高温への感受性は個体間で異なること等を明らかにした。今年度も、野生メダカを1200匹以上採集して、その性と遺伝的性を調べて、XX雄、XY雌を検出、遺伝学的検討によりそれら不一致の原因を検討する。また、今年度は、野生集団探索に加えて、化学物質への感

受性に関する遺伝的多型性を検討する目的で、ステロイドホルモンによる性転換率の近交系間の差の検討を行うと共に、野生集団から複数の雌雄ペアを作り、それらの中のF1集団間での性転換率を検討することにより、野生メダカ集団中に、感受性が異なる個体（感受性に関わる遺伝子の多型）が存在している可能性を実験的に明らかにする。

(2) 野生生物の生物学的知見研究課題(野生2)：東京湾における生態系かく乱の実態解明とその要因解析

①研究者：(独)国立環境研究所 環境リスク研究センター：堀口敏宏(代表研究者)、児玉圭太、北九州市立大学大学院 国際環境工学研究科：門上希和夫、長崎大学大学院 生産科学研究科：李政勳

②研究概要：本研究は、内分泌攪乱化学物質をはじめとする有害化学物質や、その他の人間活動に由来する因子が、沿岸生態系、殊に魚介類の個体群及び群集レベルで及ぼす影響に着目したものである。特に、多数の人口を抱える首都圏に隣接し、種々の人間活動の影響を長年にわたって被ってきたと考えられる東京湾を対象に据えて、東京湾における底棲魚介類群集の質的及び量的な変化(生物相の変化)をもたらした要因を明らかにするべく、種々の解析を行う。

その際の着眼点は、1) 1980年代後半以降、複数の種が同調的に激減したのはなぜか、2) それらの種は現在まで低水準が続いていて、回復の兆候が見られないのはなぜか、3) その一方、板鰓類とスズキは増加しているが、それはなぜか、の3つである。具体的方法論として、代表種の生活史特性の変化など、個体群減少の背後にあった、もしくはそれと関連があると見られる現象を抽出し、それに対する物理、化学、生物的要因あるいは漁獲の影響を解析・評価する。

③平成20年度研究計画：研究目的を達成するためには、系統的なフィールド調査と、作業仮説検証のための精緻な室内実験が必要である。今年度は、一昨年度に試作した貧酸素-有害物質流水式連続曝露試験装置による実験的研究に用いる被検物質の選定に向けて、さらに検討を進める。これまでの文献調査並びに昨年度のGC/MSによる底質中有機化合物の一斉分析の結果を補完するべく、今年度は重金属分析を進める。具体的には、複数の種が同調的に著しく減少した時期(1990年代)の東京湾産スズキ試料と、個体数増加が阻害されているとみられる近年の底質試料に含まれる重金属濃度を測定し、明らかにする。また、LC/MSを用いた低揮発性化合物の分析に関する予備的検討も行う。

(3) 野生生物の生物学的知見研究課題(野生3)：アカトンボ減少傾向の把握とその原因究明

①研究者：石川県立大学 生物資源環境学部：上田哲行(代表研究者)、宮城大学 食産業学部：神宮字寛、愛媛大学 農学部：日鷹一雅

②研究概要：アキアカネをはじめとした水田依存性のアカトンボ類の急激な減少が各地で報告されている。しかし、それらのアカトンボ類の高い移動力や低い定住性などにより、その個体数を定量的に把握することはきわめて難しい。この研究は、市民、農民、トンボ研究者による全国的規模のモニタリング調査を実施することで減少傾向及びその地域性を把握することを1つの目的とする。また、そのモニタリング調査の実施及びインターネットなどによる結果の公表を通して、広く国民にアカトンボ類の危機的現状を周知してもらい、保全への機運を高めることにも努める。2年間のフィールドビリティースタディーにより、水田依存性のアカトンボ類の最近の急激な減少は、育苗箱に使用される浸透性殺虫剤によって引き起こされている可能性の高いことが明らかになってきた。また、圃場整備による乾田化が、中干しが行われる地域では、羽化直前の幼虫生存率を大きく低下させたり、アキアカネの産卵場所を著しく減少させたりすることで、長期的には重大な影響を及ぼしている可能性も示唆された。地球温暖化に伴う競合種(捕食者であり競争種でもある熱帯性のウスバキトンボ)の増加やアキアカネにおける越夏場所の縮小も可能性のある要因として浮かび上がってきた。この研究では、これらの要因群を広く視野に入れながら、緊急の課題として育苗箱施用浸透性殺虫剤の影響に焦点を当て、1つには実験的手法でリスク評価を行う。また一方で、実験室での結果が必ずしもそのまま実際の圃場において反映されないこともあるため、生態学的、疫学的観点から野外での調査も実施する。その際、殺虫剤の影響ばかりでなく他の要因による影響についても定量的に検討し、アカトンボの生活史を通して、個体数減少に対するそれぞれの要因の相対的な寄与率を把握するよう努める。また、現在の状況下では完全に無農薬で水稻を栽培することが難しいため、使用農薬の種類や施用時期を変えることで影響を軽減する方法についても検討を行う。

③平成20年度研究計画：全国各地のトンボ研究者に依頼し、アカトンボ類の個体数密度をモニタリング調査し、アカトンボ類の減少傾向の地域性を把握する。ライシメータ、実験圃場を使い、2種の箱施用浸透性農薬を施薬した区画、無農薬区画を設け、田面水中の農薬濃度の時間変化を追跡するとともに、既知数のアカトンボ若齢幼虫から羽化に至るプロセスを定量的に評価することで、農薬のアカトンボに対する影響を評価する。また、箱施用農薬の散布時期を早めることで、アカトンボ幼虫への影響をどの程度軽減できるか実証試験を行う。石川県と愛媛県、鹿児島県において農家の協力の下、水田からのトンボ類の発生量を調べ、使用農薬、農法、圃場整備状況の違いとアカトンボ類の発生状況の関連を調査する。石川県において、圃場整備による乾田化の影響を、非灌漑期の田面水残存度の評価を通じた産卵場所供給量の減少という観点から継続調査する。

3. 平成 20 年度フィージビリティースタディーズ採択課題

平成 19 年度にフィージビリティースタディーズ研究課題として実施した以下の 4 課題については、本年度もフィージビリティースタディーズ研究課題として採択した。調査内容については、ExTEND2005 基盤的研究企画評価検討会及び ExTEND2005 野生生物の生物学的知見研究検討会による合同検討会での協議の上、決定した。

課題 1. (FS1) ステロイド膜受容体を標的とした化学物質の内分泌かく乱作用に関する研究

課題 2. (FS2) 精子に存在するホスホリパーゼ A₂ 活性の阻害を介した環境化学物質の新たな内分泌かく乱作用機構に関する研究

課題 3. (FS3) シャジクモ類の衰退要因解明に向けた環境負荷化学物質の影響に関する生理・生態学的研究

課題 4. (FS4) 両生類への性ホルモン様物質暴露による精巣卵形成についての研究

(1) フィージビリティースタディー研究課題 (F S 1) : ステロイド膜受容体を標的とした化学物質の内分泌かく乱作用に関する研究

①研究者 : 静岡大学 理学部 : 徳元俊伸 (代表研究者)

②研究概要 : 魚類の最終卵成熟過程においては、まず黄体形成ホルモン (LH) が卵濾胞組織に作用し、ステロイド性の卵成熟誘起ホルモン (17, 20 β -DHP) が作られる。17, 20 β -DHPの作用により、卵成熟が誘起され、受精可能な卵へと成熟する。17, 20 β -DHPは、通常の核内受容体に作用するステロイドホルモンとは異なり、卵膜上に局在するステロイド膜受容体分子に作用し、比較的短時間で起こるノンゲノミック反応を誘導する。これまでにこのステロイド膜受容体を標的とする新規の内分泌かく乱物質の作用を発見し、その作用に関する研究を進めてきた。本研究では内分泌かく乱作用を有すると疑われる物質等についてステロイド膜受容体を標的とする新たな内分泌かく乱作用の可能性を探る。

③平成20年度研究計画 : 前年度に確立したプロゲスチン膜受容体 (mPR) の4種類のサブタイプのキングョホモログ (α 、 β 、 γ -1、 γ -2) の遺伝子導入細胞株を用いて、アイソトープラベルしたステロイドホルモンの結合阻害実験により、各種化学物質の膜受容体群への作用を評価する。化学物質については内分泌攪乱作用が疑われた物質群を中心に、ノンゲノミック反応に効果を示す物質を予測しながらできるだけ多くの種類について実験を行う。また、エストロゲン類のノンゲノミック作用についても調べるため、エストロゲン膜受容体 (mER) についても早急に培養細胞株を樹立し、各種化学物質の作用を評価する。内分泌かく乱作用が推察された物質群については卵母細胞を用いた細胞レベルでの作用の評価、ゼブラフィッシュ生体を用いた *in vivo* アッセイを行い、卵成熟、排卵に与える個体レベルでの作用を評価する。一方、より簡便なアッセイ系の確立のため、膜タンパク質の発現に適した酵母株 (*Pichia*) を用いた新たな大量発現系の構築を試みる。

(2) フィージビリティースターゼA₂研究課題 (F S 2) : 精子に存在するホスホリパーゼ A₂ 活性の阻害を介した環境化学物質の新たな内分泌かく乱作用機構に関する研究

①研究者：昭和大学 薬学部：原俊太郎(代表研究者)、桑田浩、昭和大学 遺伝子組み換え実験室：武富芳隆

②研究概要：ホスホリパーゼA₂ (PLA₂) は膜リン脂質より脂肪酸及びリゾリン脂質を生成する酵素である。哺乳類のPLA₂としてはこれまでに20種類以上のアイソザイムが同定されているが、これらはその構造や性状により、分泌性PLA₂ (sPLA₂)、細胞質型PLA₂ (cPLA₂)、カルシウム非依存性PLA₂ (iPLA₂) に大別される。以前より、精子に存在するPLA₂が受精反応、特にアクロソーム反応に深く関与することが示されてきたが、一方、PLA₂の中でも、ヒトやマウスの精子にはsPLA₂の多くのアイソザイムが高濃度存在することを見出してきた。さらに最近になり、PLA₂活性を阻害することが報告されていたフタル酸エステル類の代謝産物の1つ、MEHP (mono(2-ethylhexyl) phthalate) がマウス精子の*in vitro*における受精能を抑制することを見出した。環境化学物質の中には脂溶性が高く、脂質代謝酵素であるPLA₂の活性に影響を与えると考えられるものが少なくない。そこで、本研究では、精子に存在するsPLA₂が、環境化学物質の内分泌かく乱作用の標的となる可能性を考え、この可能性を実証することを目的とする。

そこでまず、昨年度は、MEHPが*in vitro*における精子の受精能を抑制するメカニズムについて検討した。その結果、1) 精子に存在するsPLA₂アイソザイムのうち、X型sPLA₂が受精の過程で重要な役割を果たすこと、2) MEHPは、このX型sPLA₂によるリゾホスファチジルコリンの産生を阻害することで、受精段階のアクロソーム反応を抑制し、その結果*in vitro*の受精能に影響を及ぼすことを明らかにした。

③平成20年度研究計画：マウス及びヒトの精子に存在するホスホリパーゼA₂の各アイソザイムの組換え蛋白質をバキュロウイルス発現系により調製し、フタル酸エステル類をはじめとし、ノニルフェノールやビスフェノールAといった代表的な環境化学物質がその酵素活性を阻害するか否か検討する。さらに、これらの各種化学物質がマウス精子を用いた*in vitro* fertilization (IVF) に影響を与えるか検討し、阻害活性と精子の受精能への影響との間に相関が見られるか、明らかにする。ホスホリパーゼA₂の阻害活性と精子の受精能への影響の間に相関が見られた場合には、このホスホリパーゼA₂のアイソザイムについて、遺伝子欠損マウス、過剰発現マウス、ヒト型酵素の発現マウスを作製し、これらの遺伝子組換えマウス由来の精子の受精能に対する環境化学物質の影響についてもIVFの系により検討を行う。

(3) フィージビリティースタディ研究課題 (F S 3) : シャジクモ類の衰退要因解明に向けた環境負荷化学物質の影響に関する生理・生態学的研究

①研究者 : 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 : 白岩善博(代表研究者)、兵庫
県立大学 生命科学研究科 : 新免輝男、国立環境研究所 : 笠井文絵

②研究概要 : 戦後、日本の湖沼におけるシャジクモ類の減少、衰退は著しく、本年 8 月のレッドリスト見直しの結果報告では、日本に現存する 78 種類のシャジクモ類のうち 62 種類が絶滅野生種・絶滅危惧種として記載されている。シャジクモ類は、汚染度の低い湖沼に生息するが、その生育がその湖沼の水質や環境を健全に維持することに果す役割も非常に大きく、湖沼の生態系を健全に保つ(きれいで多様な生物が生息する)ためのキーストーン生物であるとされている(Van Den Berg et al. 1998)。したがって、現状でみられるシャジクモ類の衰退や生息域の著しい減少が何に起因するかを科学的に解明することは、健全な湖沼生態系を再生・保全するための基礎的知見提供するために必要である。

シャジクモ類に対する農薬、栄養塩、内分泌かく乱物質等の環境負荷化学物質の影響を、一次スクリーニング及び二次スクリーニングの 2 段階評価で解析する(実験室レベルの解析)。また、急速に衰退、減少が見られる湖沼・フィールドにおけるシャジクモ類の生育状況をしっかりと継続的に観察する(野生生物の観察)と共に、生育場所の水質・農薬濃度の分析を行う。そして、それら生理実験及び野外調査の結果から、シャジクモ類衰退の原因物質を推定する。

③平成 20 年度研究計画 : 野生絶滅種・絶滅危惧種シャジクモ類に対する農薬、栄養塩、内分泌かく乱物質等の環境負荷化学物質の影響を、一次スクリーニング(短期的影響 : 光化学系 II 活性、光合成酸素発生活性)及び二次スクリーニング(長期的影響 : 成長、精子、卵胞子形成)の 2 段階評価で解析する(実験室レベルの解析)。シャジクモ類の生態観察及び生育状況の調査を行い、環境要因、周辺環境の変化に伴う影響について解析する。シャジクモ類の現生息湖水の環境と衰退した環境の生態学的比較調査研究(水質の変化の解析を含む)及び環境中の農薬濃度の比較検討を実施する。生理実験並びにフィールドでの生態・生育状況の調査の結果から、シャジクモ類衰退の原因、原因物質を特定する。

(4) フィージビリティースタディー研究課題 (F S 6) : 両生類の野外及び室内飼育における精巣卵の消長

①研究者: 広島大学大学院 理学研究科: 高瀬稔(代表研究者)、横浜市立大学 内分泌学: 佐藤友美

②研究概要: 野外両生類に精巣卵が観察される事が知られている。環境影響評価のため、その精巣卵形成は正常な現象であるのか、または内分泌かく乱作用などを持つ環境中の物質により誘導されるものなのかを明らかにする必要がある。本研究では、地方によりその出現率が異なるトノサマガエルを用いて、性ホルモン様物質及び野外環境中の物質が精巣卵形成に関与する可能性を検討することを目的としている。そこで、実験室で受精卵から発生させた幼生及び変態後のカエルを用いて、性ホルモン及び内分泌かく乱化学物質を暴露し、精巣卵形成率を対照群と比較する。また、野外から採集した個体を室内飼育し、採集時と飼育後における精巣卵出現率を比較する。そして、それぞれの飼育環境における性ホルモン様物質の状態をアンドロゲン受容体及びエストロゲン受容体のレポーター遺伝子アッセイ法により調べることを計画している。

③平成 20 年度研究計画: 材料には、地域により精巣卵出現率が異なるトノサマガエルを用いる。特に、精巣卵がほとんど見られない広島県産及び高率に見られる富山県産を用いる。

[暴露実験] エストラジオールベンゾエートまたはテストステロンプロピオネート、ビスフェノールA、ノニルフェノールを含んだ飼育水を用いて広島県産の幼生及び変態後の個体を飼育する。対照群には溶媒を用いる。暴露後に生殖腺の組織切片を作成し、精巣卵(精巣構造内の卵様細胞)の有無を調べる。さらに、アンドロゲン受容体及びエストロゲン受容体のレポーター遺伝子アッセイ系を構築し、室内飼育環境における性ホルモン様物質の存在を調べる。

[室内飼育影響] 富山県産のトノサマガエルを用いて、野外採集時及び室内飼育後における精巣卵出現率の変化を調べる。