

平成 18 年度 ExTEND2005 基盤的研究 フィージビリティースタディ－採択 6 課題

課題 1 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

岩田久人、金 恩英（愛媛大学沿岸環境科学研究センター）

（ 1 ）研究の概要

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、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・環境ホルモン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。

そこで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。本申請では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、核内レセプターを指標とした敏感種・鈍感種の探索と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。

（ 2 ）平成 18 年度研究計画

・野生生物核内レセプターの全長 cDNA クローニング

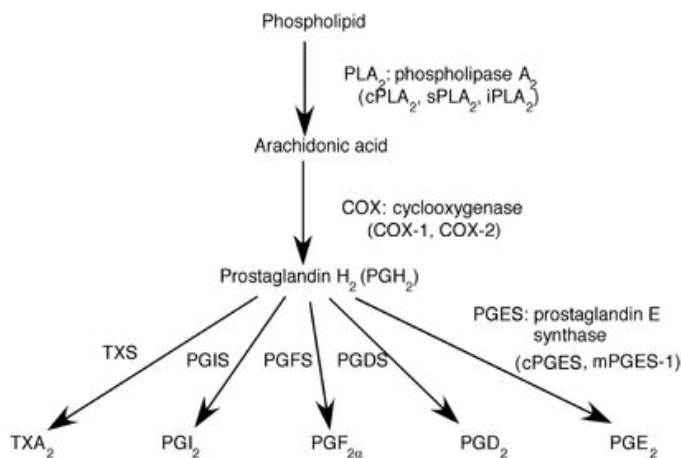
・核内レセプターを発現させた in vitro レポーター遺伝子アッセイ系による化学物質の転写活性化能の測定

課題2 アラキドン酸代謝変動への影響からみた環境化学物質の内分泌かく乱作用機構の解析

原 俊太郎、工藤一郎、中谷良人、桑田 浩、武富芳隆（昭和大学薬学部）

(1) 研究の概要

プロスタグランジン産生などのアラキドン酸代謝系は、排卵、受精、個体発生、分娩といった生殖生理系で重要な役割を果たす。本研究では、環境化学物質の生体内標的として、このアラキドン酸代謝系に注目し、アラキドン酸代謝変動への影響から環境化学物質の内分泌かく乱作用機構の解明を試みる。アラキドン酸代謝系に関わる酵素としては、右下図に示したように、その初発酵素であるホスホリパーゼ A₂ (PLA₂)、アラキドン酸からプロスタグランジン H₂ への変換を触媒するシクロオキシゲナーゼ (COX) および、プロスタグランジン E 合成酵素 (PGES) などの各プロスタグランジンの最終合成酵素があり、さらに、PLA₂、COX、PGES には各々多数のアイソザイムが存在する。本研究では、環境化学物質が PLA₂、COX、PGES の各アイソザイムに与える影響について、それぞれの酵素の組換えタンパク質を用いた分子レベルの解析 (酵素活性や他のタンパク質との相互作用に対する影響の検討)、過剰発現・ノックダウン細胞を用いた細胞レベルの解析 (細胞からのアラキドン酸遊離やプロスタグランジン産生に及ぼす影響の検討)、過剰発現・遺伝子欠損マウスを用いた個体レベルの解析 (受精、個体発生等の表現型への影響の検討) を行い、環境化学物質の内分泌かく乱作用の新たな標的の同定を試みる。



(2) 平成 18 年度研究計画

- ・アラキドン酸代謝系への関与が考えられているポリ塩化ビフェニル、ノニルフェノール、ビスフェノール A、フタル酸エステル類を被験物質としたアラキドン酸代謝酵素を過剰発現した HEK293 細胞からのアラキドン酸遊離、プロスタグランジン類 (特にプロスタグランジン E₂) の産生への影響把握
- ・酵素活性に対する影響把握
- ・PLA₂ の各アイソザイムの遺伝子組み換えマウスから調製した精子を用いた PLA₂ の各アイソザイムの発現が精子の受精能に及ぼす影響の解析

課題3 日本沿岸における生態系攪乱の実態解明とその要因解析

堀口敏宏、櫻井健郎、児玉圭太（国立環境研究所）、李 政勲（長崎大学大学院）

（1）研究の概要

代表研究者は、これまでに、船底防汚塗料や漁網防汚剤などとして使用されてきた有機スズ化合物がイボニシヤバイなどの新腹足類、また中腹足類にごく低濃度で特異的に作用してインポセックスを引き起こし、重症の場合には産卵障害を伴って個体群が減少すること、また、同様の内分泌攪乱現象が原始腹足類のアワビ類においても有機スズによって引き起こされてきたことをフィールド調査と室内実験を組み合わせることによって実証してきた。さらに、インポセックスの誘導機構に核内受容体の一種であるレチノイド X 受容体 (RXR) が関与していることを *in vitro* 及び *in vivo* 実験で示し、従来の仮説とは全く異なる斬新な説を 2004 年に提示した。

一方、巻貝類以外の野生生物の内分泌攪乱の実態や作用機構は、わが国ではこれまで十分に明らかにされてこなかった。

本研究は、内分泌攪乱化学物質の関与が疑われるわが国沿岸の生態系の変化を解明し、その要因について詳細に解析を進める研究の一環として、内湾生態系の変化に着目した FS 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をフィールド調査によって追跡し、解析する。これにより、その特徴や傾向を評価する。さらに、複数の種が 1980 年代後半から 1990 年代初頭にかけて同調的に減少し、現在まで低水準のまま推移している点、及び同時期に東京湾において PCBs をはじめとする種々の化学物質の濃度が上昇に転じたと考えられる点に注目すると、貧酸素水塊とともに有害化学物質（内分泌攪乱化学物質を含む）などの複数の環境要因の影響解析を進める必要がある。本研究では、その一環として、貧酸素条件下で化学物質などに連続曝露させるための装置（貧酸素-有害物質流水式連続曝露試験システム）を試作し、予備実験も行なう。本 FS では、これらの結果を基に、東京湾における底棲魚介類群集の質的及び量的な変化をもたらしてきた環境要因の特定と評価に向け、今後 3 年間で詳細に調査・実験・解析等を進めて成果を得る可能性についても検討する。

（2）平成 18 年度研究計画

- ・東京湾に設定した 20 定点における試験底曳き及び環境調査
- ・貧酸素条件下での有害物質の流水式連続曝露試験システムの試作と予備試験の実施

課題4 農薬がシャジクモ類減少の一因である可能性に関するフィージビリティースタ ディー

山室真澄（産業技術総合研究所）、白岩善博（筑波大学大学院）、浅枝 隆（埼玉大学大学院）

（1）研究の概要

シャジクモ類の衰退・消滅が、平野部の湖沼では開発が遅れた地域も含めて、1950年代半ばを中心に全国的にほぼ同時期に生じていることから、当時使用されていた除草剤が衰退の要因である可能性を検討するとともに、それ以外の要因や、シャジクモ類衰退以前の繁茂状況の復元や、生態系に与えた影響について検証するためのFS的研究を行う。

1. 除草剤が湖沼におけるシャジクモ類消滅および復活阻止の要因である可能性の実験による検討

1950年代当時登録され広く使用されていた、除草剤（2,4-D, MCP, PCP等）を中心に、実験室実験によって、そのシャジクモ類に与える影響を検討する。本研究期間がシャジクモ類の栄養体が枯死する期間にあたることから、実験室実験の主要な確認事項は、培養株による光合成活性および短期間での生育(growth)や繁殖(reproduction)に与える影響の有無とする。対象となる除草剤として、2,4-D, MCP, PCP以外にも、減少が顕著になった頃に使用されていたものを文献や聞き取り調査から特定し、次期における調査対象とする。植物の衰退・消滅を検討する上で、増殖試験や生殖に与える影響は不可欠なので、本FS研究では、増殖や生殖に与える影響を実験的に検討する手法も検討する。

2. シャジクモ類衰退以前の繁茂状況の復元法の検討

1950年代以前にシャジクモ類がどの程度繁茂していたかは、この植物が通常は観測されにくい、湖沼における植物帯の最も深いところを占めていたこともあって、記録が残っている湖沼は限定されている。島根県の宍道湖ではかつて、シャジクモ類を肥料目的で大量に採取していたが、1950年代半ばに除草剤を大量に使い始めた頃に、急速に消滅したことが明らかになっている。またこの湖沼での堆積速度も、代表者らの研究で明らかになっている。そこで、宍道湖から柱状堆積物試料を採取し、植物の種子や卵胞子などから古環境を復元するPaleocarpologyの手法によって、1950年代以前の水草類、特にシャジクモ類の繁茂状況を復元する方法を検討する。

3. 除草剤が湖沼におけるシャジクモ類消滅および復活阻止の要因である可能性の野外調査による検討

2,4-D, MCP, PCP等の除草剤は一部、もしくは全形態において失効になっているものもあることから、1950年代半ばに全国的に減少した原因と、現在もなお復活しない原因は別である可能性がある。この点について、農薬が散布されている区域とそうでない区域とで、シャジクモ類の繁茂状況（集団サイズ、雌雄生殖器官形成状況等）が異なるかどうかを、シャジクモ類が分布する地域、もしくはシャジクモ類が最近生えてきた水田や溜め池などで分布の状況を把握し、その生態特性と使用する農薬の有無（使用量）や、農薬以外の影響因子との関係について、野外調査の結果から推定する。ただし、本研究が行われる10月以降はシャジクモ類の栄養体は枯死しており、調査内容は聞き取りおよび、表層土壌中の卵胞子の有無による確認など、限定的な手段に頼らざるを得ない。こ

のため、今年度は東北から九州に至る広い地域を対象とし、次年度以降の本研究で、定量的な調査を行う上で適切なフィールドを選定することを目的とする。

日本の湖沼におけるシャジクモ類消滅の原因として、富栄養化以外に、コンクリート護岸による浅瀬の消失や草魚の放流などが指摘されている。これらが原因とされている湖沼について、消滅と改変の時期関係について検討する。

4. シャジクモ類消滅による生態系への影響の検討

シャジクモ類消滅による生態系への影響について、水質（環境）と生物相への変化の双方について検討する。

(2) 平成 18 年度研究計画

- . 1950 年代以前の日本の湖沼におけるシャジクモ類繁茂状況復元法の検討
- . シャジクモ類衰退が生態系に与えた影響に関する予備的調査
- . 除草剤が湖沼におけるシャジクモ類消滅および復活阻止の要因である可能性の実験室実験による検討
- . 除草剤が湖沼におけるシャジクモ類消滅および復活阻止の要因である可能性に関する野外調査による検討、除草剤以外の上記要因に関する野外調査による検討

課題5 アカトンボ減少傾向の把握とその原因究明に向けて

上田哲行（石川県立大学）、松良俊明（京都教育大学）、神宮字 寛（秋田県立大学）

（1）研究の概要

近年、アキアカネをはじめとしたアカトンボ類の急激な減少が各地で指摘されている。その原因として、浸透性殺虫剤、耕地整備による乾田化などが指摘されている。しかし、アカトンボ類の高い移動力や広い生息場所選択性などにより、その個体数を定量的に把握することはきわめて難しく、減少傾向の指摘も印象の域を脱していない。この研究は、既存資料を収集分析して減少傾向を抽出するとともに、学校プールから発見されるアカトンボ類幼虫を定量的に把握することで、アカトンボ類の個体数変動を広域的・長期的にモニタリングする方法の可能性を検討する。また、アカトンボ類減少の原因として、主に浸透性殺虫剤の影響と圃場整備による乾田化の影響に焦点を当てて究明する。水稻に使われる浸透性殺虫剤類は植物への残留性は高いが水・土壌などの環境中での分解速度が大きいので、イネを食害する昆虫だけを選択的に殺し長期間の効果を発揮する理想に近い農薬であると考えられている。アカトンボ類はイネを食害することはないが、水田に依存した生活様式をもつため、次のような形で浸透性殺虫剤の影響を受ける可能性がある。

（1）薬剤耐性の低い若齢幼虫期と田植えの時期が重なるため、分解前の殺虫効果によって死亡率が高まる（直接効果）

（2）イネ枯死部-菌類-ミジンコ-アカトンボ類幼虫の腐食性食物連鎖を介した生物濃縮がおきる（間接効果）などである。

これらの可能性について圃場実験と室内実験を組み合わせた検討を行う。一方、圃場整備による乾田化は、

（1）非灌漑期の田面水の滞留時間を短くし、アキアカネなどの産卵場所供給量を減少させる、

（2）中干し時の乾燥度合を強化し、幼虫の死亡率を高くするなどによって個体数の減少を招く可能性がある。

この点について、主に圃場整備前後の水田調査により検討する。

（2）平成18年度研究計画

- ・モニタリングネットワーク構築の事前準備
- ・秋季成虫センサス法の標準化

課題6 無脊椎動物幼若ホルモン受容体の探索と作用機構の解明

鑑迫典久(国立環境研究所)、渡邊肇(岡崎国立共同研究機構 統合バイオセンター)

(1) 研究の概要

節足動物(甲殻類、昆虫類、その他の分類群)に共通に存在する2つの主要なホルモンの、エクジステロイドと幼若ホルモン(JH)がある。エクジステロイドが主に脱皮の制御を司る一方、JHはその脱皮の質をコントロールすることによって、昆虫の場合には幼虫から幼虫、幼虫から蛹、蛹から成虫への変態という、生活ステージの変化を制御しているといわれている。また、JHはこれ以外にも、長翅・短翅などの相変異、社会性昆虫のカースト分化、ミツバチのワーカーの役割分担などといった、多様な生活史形成に関与していることがわかっている。最近の研究によると大型枝角類であるミジンコの場合には、JHによって雄仔虫の発生が誘発されることが判明している。これも、JHがミジンコの性決定に関与しているホルモンであると考えより、単為生殖と有性生殖の切り替えに作用するホルモンであると解釈すると理解しやすい。

エクジステロイドと幼若ホルモンの両ホルモンの作用は、特異的なレセプターを介して行われていることは過去の研究から明らかであるが、エクジソンレセプターが既にほとんどの生物で明らかとなっているのに対し、JHレセプターは全ての生物で未解明のままであり、ここ数十年にわたり多くの研究者を惹きつけて止まない謎となっている。JHの研究が遅れている最大の理由として、JHの簡易な生物検出法が今までは存在していなかったことが挙げられる。最も有名な検出法は、手術でアラタ体を除去したカイコの蛹化制御をもって判定する方法であるが、確実性、感度、時間、コスト、技術全ての点で問題があった。これに対し、我々の開発したミジンコの雄仔虫発現によるJHの検出系はカイコを用いた系より確実・鋭敏・簡易・短時間に検出できるためJH作用を検出する上で有利な点が多い。

上述したようにJHはその表現系は生物によって多様なために、JHの攪乱によって生じる生態リスクは生物毎に考慮する必要がある。ミジンコの雄仔虫発現は単なるその一側面にしか過ぎない。しかし化学構造(セスキテルペン)は単純でかつ節足動物界ではほぼ共通の物質(ジュベニルホルモンI、II、III、およびメチルファルネソエート)であることから、レセプターの形も似ていることが想像に難しくなく、一般化が可能であると考えられる。よって、上記ミジンコの、実験生物としての特徴と利点を生かし、JHについてレセプターレベルでの解明を行い、無脊椎動物のホルモン作用機構全般の解明に寄与することを目的とする。

(2) 平成18年度研究計画

- ・ミジンコの培養、核内受容体の抽出・分離・精製、蛋白質のアミノ酸解析、生理活性測定、蛋白質結合能力測定
- ・ESTライブラリー作成、遺伝子解析、*In vitro*アッセイ系の開発