

平成 17 年度 ExTEND2005 基盤的研究計画 (案)

課題 1 . エストロジェンによるメダカ精巣卵の誘起機構解析

代表研究者：勝 義直・井口泰泉

(自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター)

【ExTEND2005 との対応】

環境省は、生態系への内分泌かく乱作用による影響の評価手法として、魚類(メダカ)を用いた試験を実施してきている。魚類試験におけるエンドポイントのうちで、女性ホルモン様作用によるオスの生殖腺における精巣卵の出現は重要な指標である。精巣卵の出現という組織・臓器レベルの変化が、個体レベルではどのような影響を及ぼすのか(どの程度の精巣卵が繁殖に影響を与えるのか)については、平成 16 年度より研究が開始されたところである。個体レベルでの変化についての研究とあわせて、精巣卵の出現機構についての細胞・分子レベルでの研究が必要である。

なお、本研究は、国際協力関係事業の日英共同研究におけるテーマの一つである。

【具体的研究計画】

1) 研究の背景と目的

エストロジェンやエストロジェン活性を有する化学物質曝露によって遺伝的オスがメスに性転換したり、イギリスの河川に生息するローチのようにオス生殖腺(精巣)に卵細胞が出現する(精巣卵)現象が起こる。しかし、この詳細な誘起機構は不明である。本研究では、メダカとローチで起こるエストロジェンによる精巣卵の誘起機構の分子機構を解析することを目的として行う。

2) 研究概要

精巣と卵巣でそれぞれ特異的に発現する遺伝子の探索

精巣と卵巣でそれぞれ特異的に発現する遺伝子の比較による精巣卵発現に必要な遺伝子の探索

遺伝子発現の比較を行うために、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いる。精巣、卵巣から RNA を抽出しローダミンで標識したオリゴ dT を用いて cDNA を合成する。出来た cDNA を鋳型としてローダミン標識オリゴ dT と 5' プライマーを使って PCR を行う。増幅された DNA 断片を電気泳動し、精巣と卵巣それぞれで特異的な DNA 断片を抽出し、塩基配列の解析を行なう。さらに RT-PCR 法により発現の確認を行い特異的な発現を示す遺伝子断片を確定する。また、サブトラクション法を利用して遺伝子発現の比較を行う。さらに、精巣、卵巣、および精巣卵から RNA を抽出し cDNA ライブラリーを作製する。

エストロゲンによる魚類精巢卵の誘起機構解析 ～ ローチとメダカの比較を中心に～

自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター

勝 義直 井口 泰泉



Roach (*Rutilus rutilus*)



Medaka (*Oryzias latipes*)



コイ目 コイ科

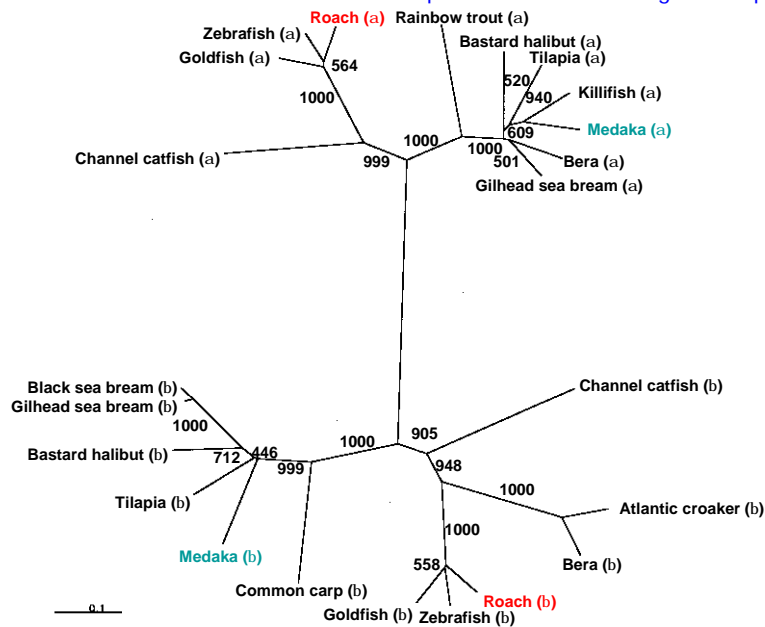


ダツ目 メダカ科

イギリスでは、1980年代の中頃、下水処理場の下流で雌雄同体のコイ科の魚「ローチ」が発見され、社会問題となりました。10年余りにわたる調査の結果、羊毛工場で使用されていた界面活性剤の分解物であるノニルフェノールが原因物質の一つであると指摘されました。また、避妊薬のピル由来の合成女性ホルモンや、ヒトの尿由来の女性ホルモンが污水施設を通じて流れ込んでいることが明らかにされています。

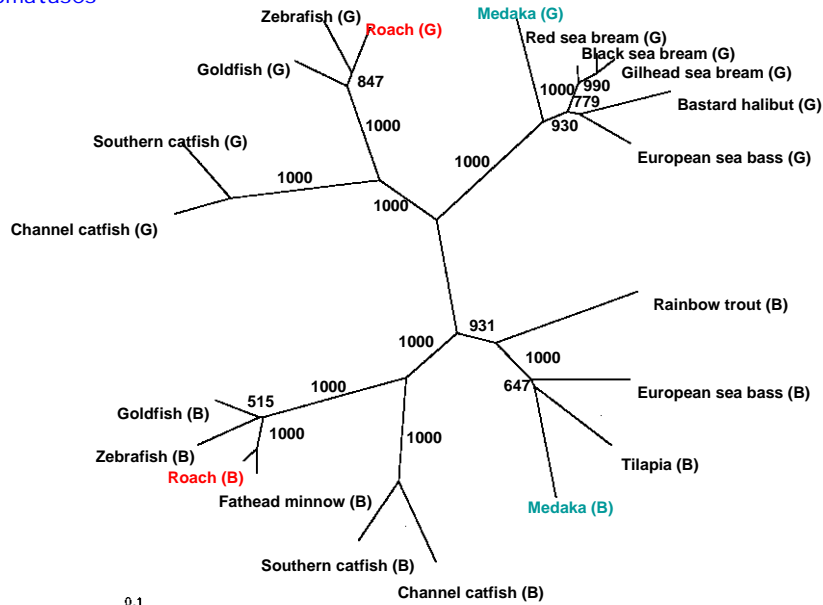
エストロゲンとエストロゲン様化学物質が 精巣卵の発生を誘導している

Phylogenetic tree of the full-ORF amino acid sequences of fish estrogen receptor a and b

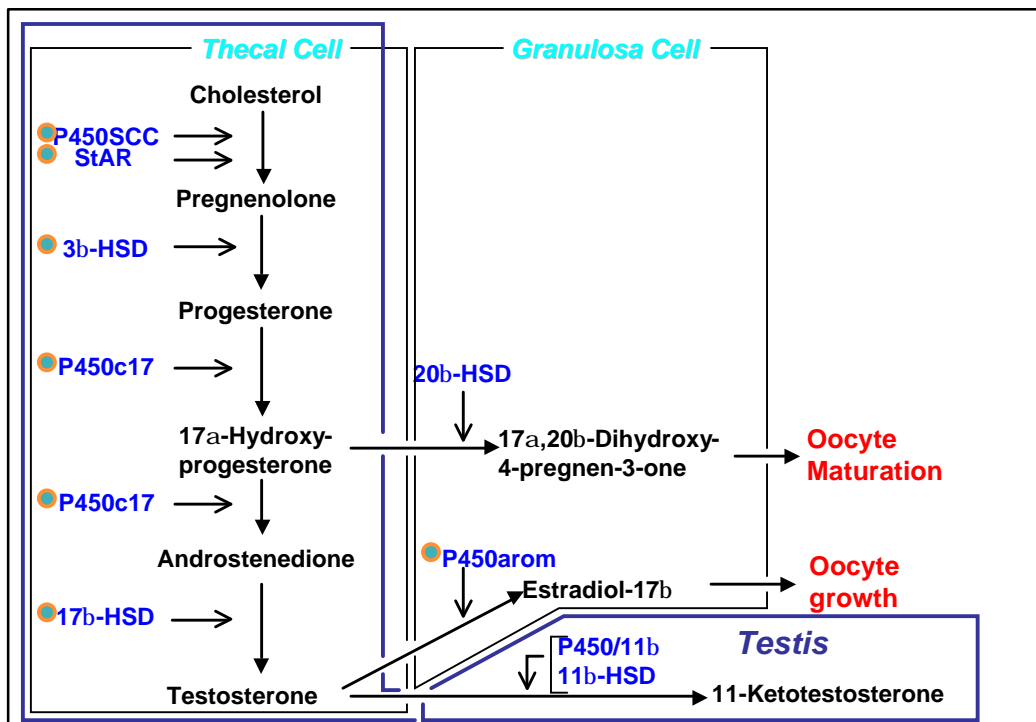


Phylogenetic tree was constructed by the neighbour-joining (NJ) method. Numbers indicate bootstrap values from 1000 replicates. Radial branch lengths indicate genetic distances. (a) shows estrogen receptor a and (b) shows estrogen receptor b.

Phylogenetic tree of the full-ORF amino acid sequences of fish gonad- and brain-type aromatases



Phylogenetic tree was constructed by the NJ method. Numbers indicate bootstrap values from 1000 replicates. Radial branch lengths indicate genetic distances. (G) shows gonad-type aromatase and (B) shows brain-type aromatase.

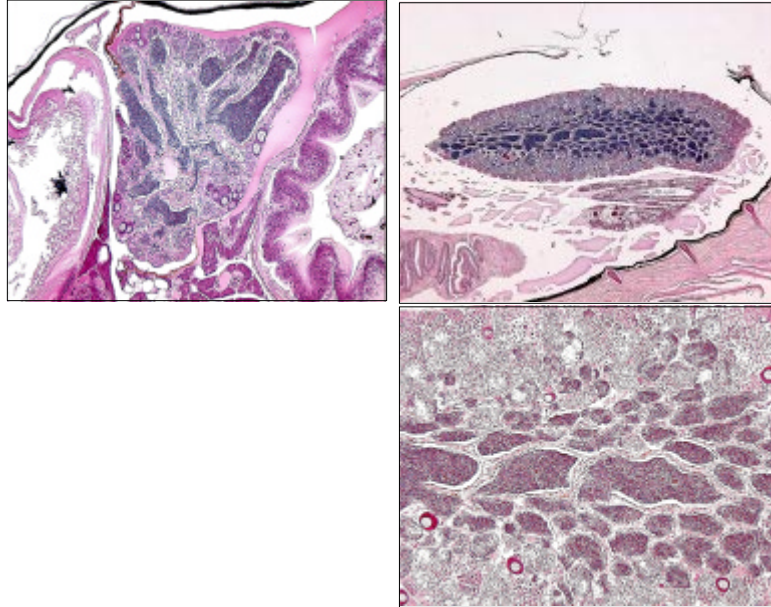


Roach genes	Current status		Roach genes	Current status	
ER alpha	Full clone	Steroid hormone receptor	vasa	Partial	Germ cell formation
ER beta	Full clone	Steroid hormone receptor	DMRT-1	Partial	Germ cell differentiation
GR	Partial	Steroid hormone receptor	Sox-9	Partial	Testis development
MR	Full clone	Steroid hormone receptor	Daz	Partial	Testis development
Aromatase-B	Full clone	Steroidogenic enzyme	Pumilio	Partial	Gonad development
Aromatase-G	Full clone	Steroidogenic enzyme	SF-1	Full clone	Regulator of aromatase gene
StAR	Full clone	Steroidogenic enzyme	WT-1	Full clone	Gonad development
C17,20-lyase	Partial	Steroidogenic enzyme	Wnt4	Partial	Gonad development
3b-HSD	Partial	Steroidogenic enzyme	beta-actin	Full clone	House keeping gene
17b-HSD	Partial	Steroidogenic enzyme	L8	Partial	House keeping gene
P450-SCC	Partial	Steroidogenic enzyme	EF-1	Partial	House keeping gene

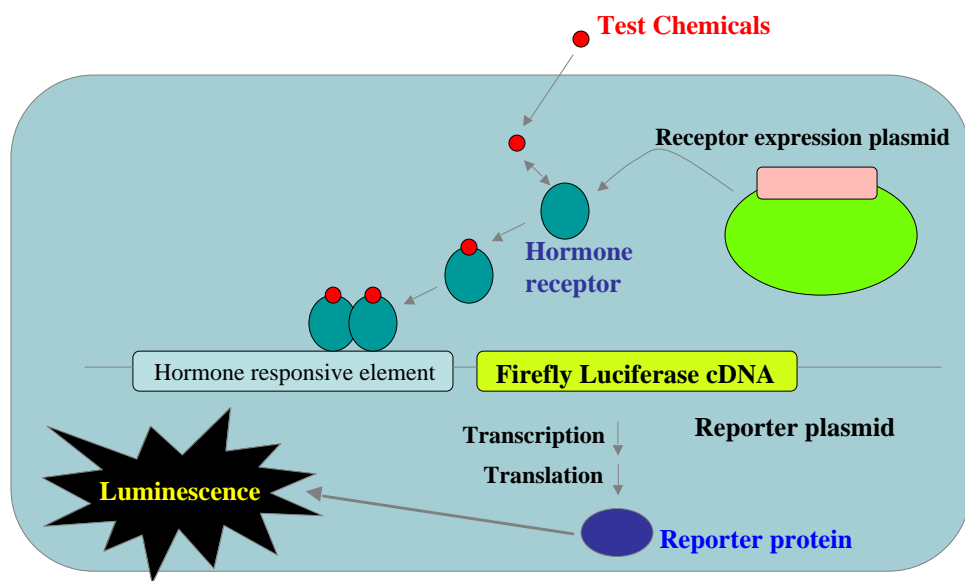
精巣卵の誘起機構を解析するために・・・

- I. 精巣卵の出現と生殖行動・受精卵の変動 (固体レベル)
- II. 様々な化学物質による精巣卵の出現 (組織レベル)
- III. イギリスの河川中に含まれる原因物質を探索する (分子レベル; レポータージーンアッセイ)
- IV. 精巣と卵巣でそれぞれ特異的に発現している遺伝子を探索する (分子・細胞レベル; ディファレンシャル・ディスプレイ、サブトラクション)

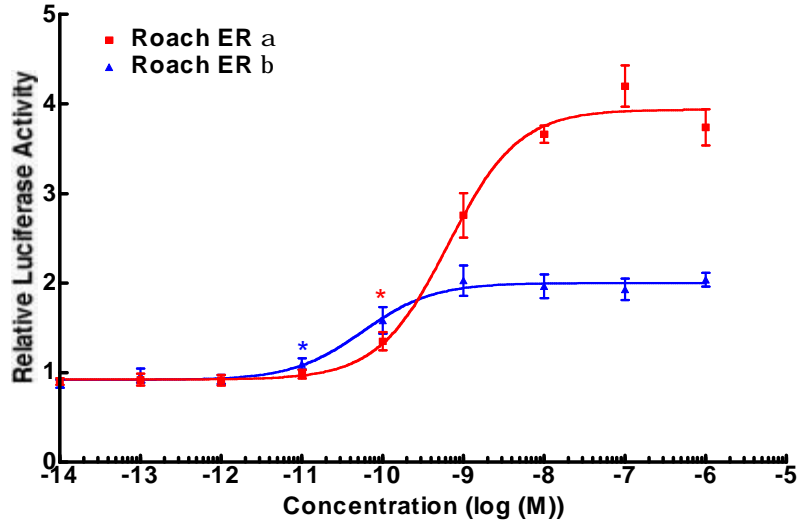
エチニルエストラジオールによる精巣卵の誘導



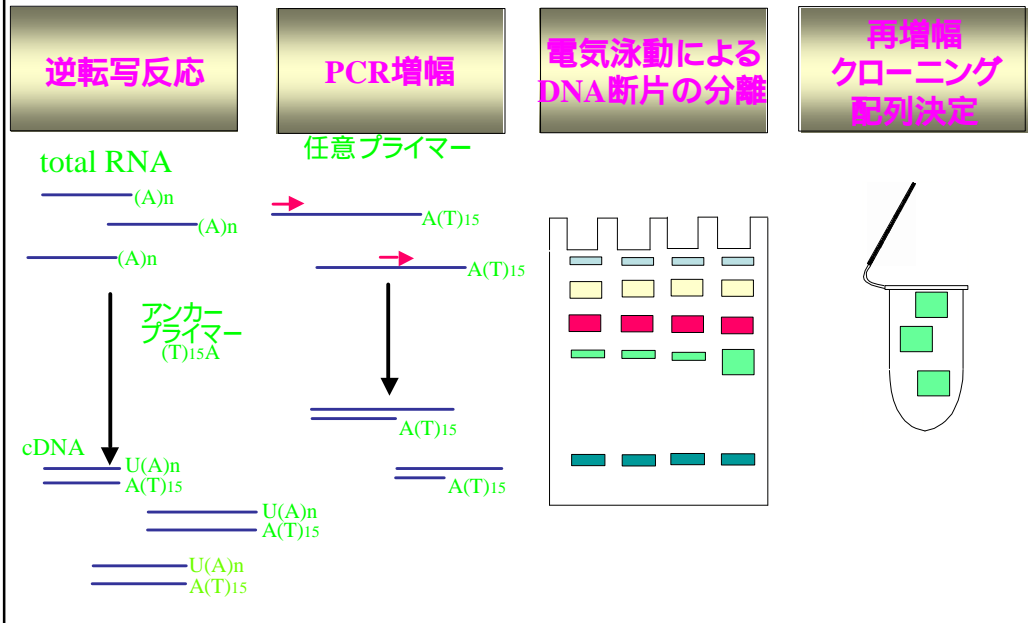
Principle of Reporter Gene Assay



Dose response of 17 β -estradiol (E2) on the Roach ERa and ERb reporter gene assay



FDD法の原理と操作手順



精巣卵の誘起機構を解析するために・・・

- I. 精巣卵の出現と生殖行動・受精卵の変動 (個体レベル)
- II. 様々な化学物質による精巣卵の出現 (組織レベル)
- III. イギリスの河川中に含まれる原因物質を探索する (分子レベル; レポーター遺伝子アッセイ)
- IV. 精巣と卵巣でそれぞれ特異的に発現している遺伝子を探索する (分子・細胞レベル; ディファレンシャル・ディスプレイ、サブトラクション)

課題 2 . 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

代表研究者：長濱嘉孝（自然科学研究機構 基礎生物学研究所）

【ExTEND2005 との対応】

環境省は、生態系への内分泌かく乱作用による影響の評価手法として、魚類（メダカ）を用いた試験を実施してきている。魚類試験体系においては、成魚におけるビテロジェニン産生をエンドポイントとするビテロジェニンアッセイはあくまでスクリーニング試験であり、より詳細に内分泌かく乱作用について検討するためには、受精卵から暴露を行う試験が用いられている。受精卵に対する暴露では、これまで、精巣卵出現のような組織レベルの変化やオスの二次性徴を含めた全メス化といった個体レベルでの変化が観察された。こういった生殖腺が未発達の稚魚期における影響について評価するためには、生殖腺の性分化についての基礎的知見の集積が必須である。

【具体的研究計画】

1) 研究の背景と目的

本研究では、日本に広く生息する水生生物メダカを研究対象として、生殖メカニズムに関する基礎的知見を集積するとともに、それらの知見を駆使して化学物質の内分泌かく乱作用の影響と作用メカニズムを分子、細胞レベルで明らかにすることを目指す。特に、胚・稚魚期（臨界期）と成体（魚）の生殖腺における性ホルモンや合成化学物質に対する感受性の違いを生じさせる分子メカニズムに注目する。メダカは、哺乳類以外で唯一性決定遺伝子（DMY）が明らかにされており、これをマーカーとして遺伝的性を正確に判定できる。

2) 研究概要

生殖腺の性分化メカニズム、特に性決定遺伝子の作用メカニズムと性分化に及ぼすエストラジオール-17 の影響と作用メカニズムの解明

成魚の生殖腺に及ぼすエストラジオール-17 の影響と作用メカニズムの解明

マイクロアレイ、EST、Differential hybridization 等の分子生物学的研究手法を駆使して魚類の生殖内分泌系、特に生殖腺の性分化、性転換、雌雄差を生じさせる遺伝子群と基本的メカニズムを明らかにする。さらに、これらの基礎的知見をもとに、Whole mount *in situ* hybridization、*In situ* hybridization、定量的 RT-PCR、GFP-トランスジェニックメダカ（Vasa、Nanos、DMY、DMRT1、

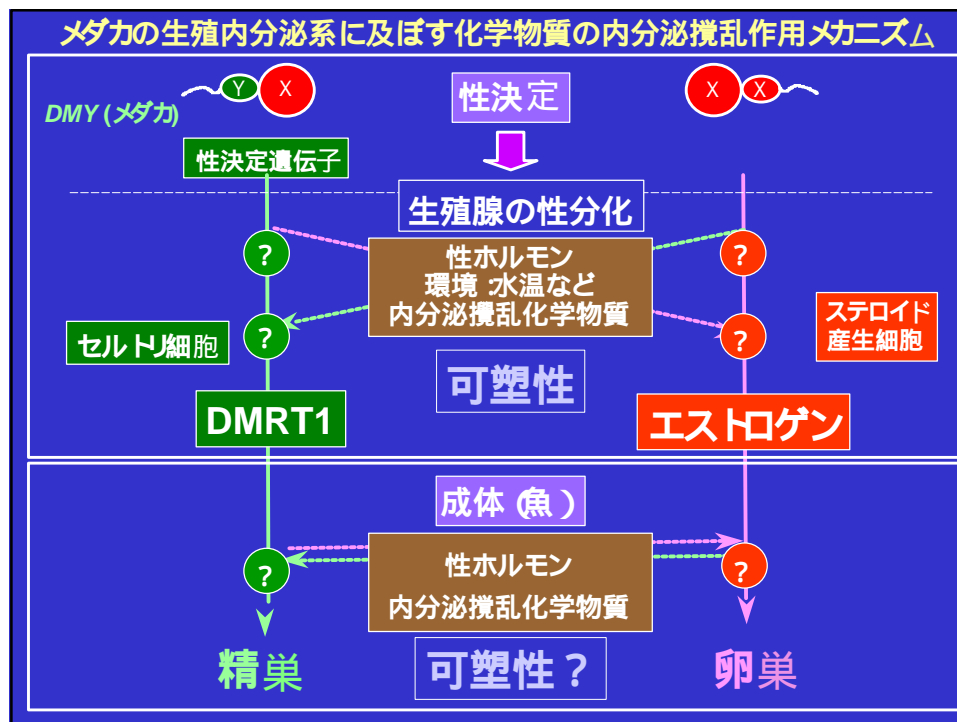
芳香化酵素、等) 器官培養(卵巣、精巣)などを駆使して魚類の生殖内分泌系、特に生殖腺に及ぼす性ホルモンや合成化学物質の影響と作用メカニズムの解明を目指す。

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

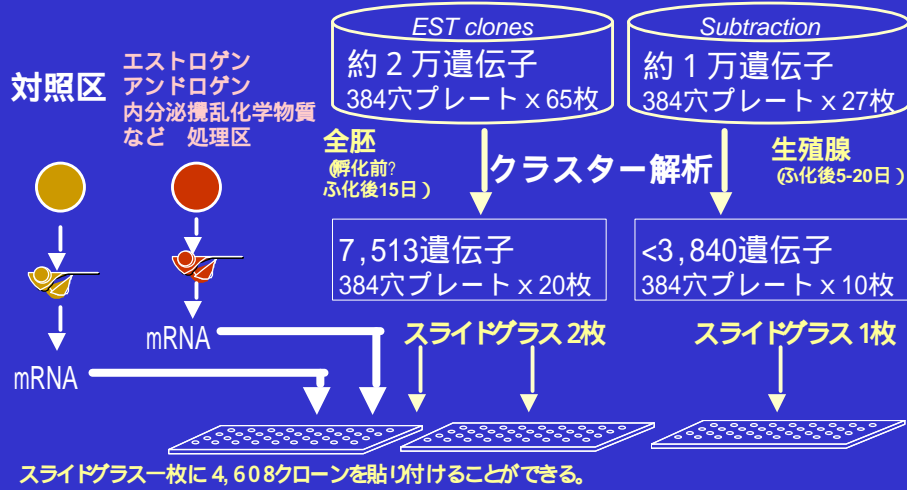
平成17年度 検討会

松田 勝・長濱嘉孝

自然科学研究機構 基礎生物学研究所



マイクロアレイを用いた解析



マイクロアレイを用いた解析から、雌雄で発現量が異なる遺伝子群、さらには、エストロゲン処理、アンドロゲン処理、内分泌攪乱化学物質処理、などにより発現量の変動する遺伝子群を同定する。

研究計画

年度 17 18 19 20 21

(1)生殖腺の性分化

基本的制御メカニズムの解析

性ホルモンの影響 (性転換) と作用メカニズム

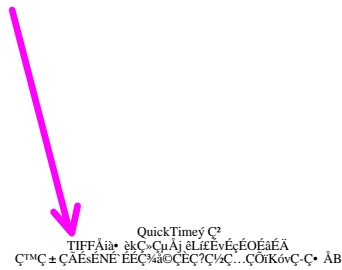
内分泌攪乱化学物質の影響 (性転換) と作用メカニズム

(2)成魚の生殖腺 (卵巣と精巣)

性ホルモンの影響と作用メカニズム

内分泌攪乱化学物質の影響と作用メカニズム

計画 (1) 生殖腺の性分化メカニズム、特に性決定遺伝子の作用メカニズムと性分化に及ぼすエストラジオール-17 の影響と作用メカニズムの解明

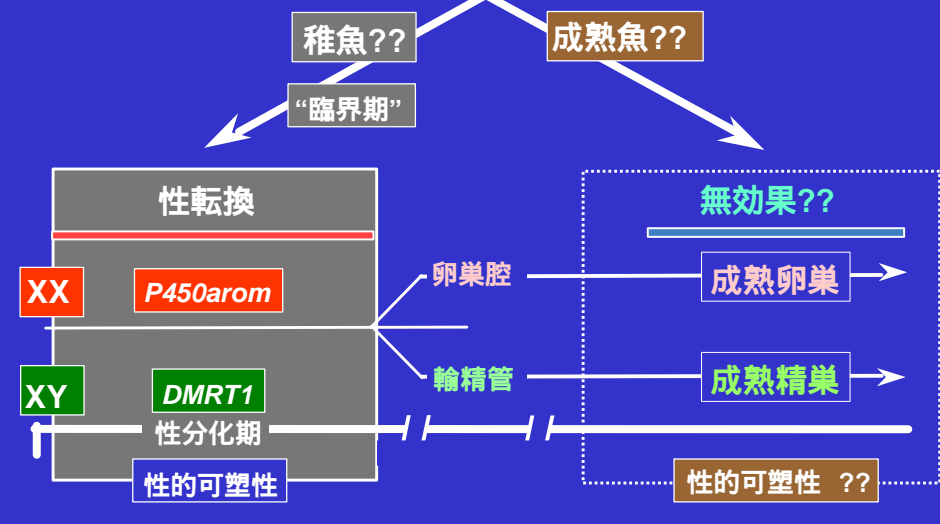


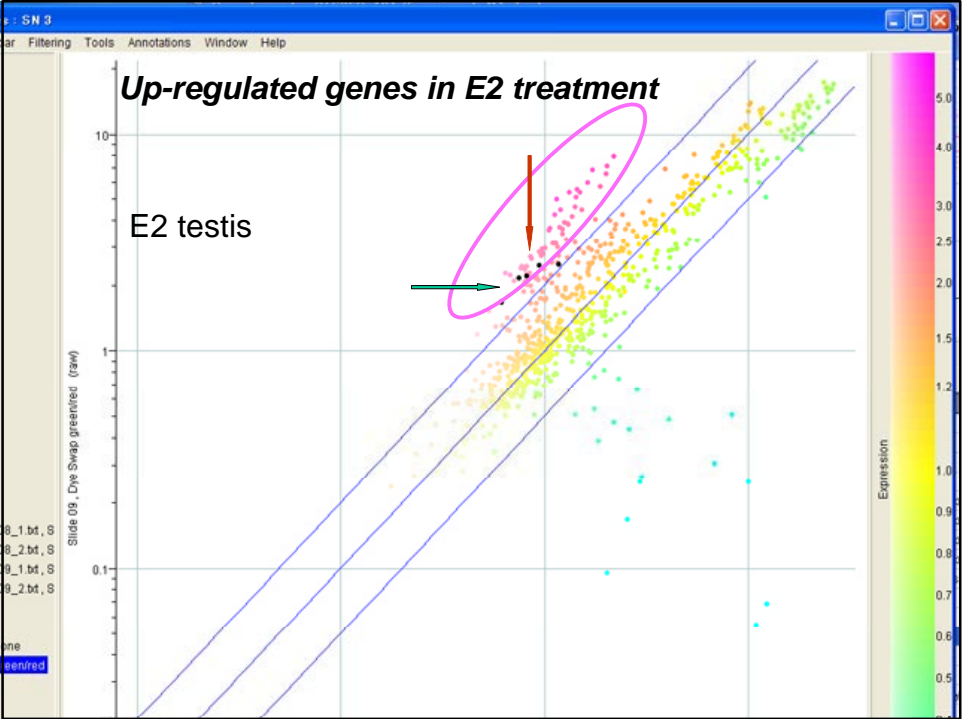
- XX胚-XY胚の比較
- XX生殖腺-XY生殖腺
- XX生殖腺分化過程
- XY生殖腺分化過程
- XY生殖腺 (エストロゲン処理)

計画 (2) 成魚の生殖腺に及ぼすエストラジオール-17 の影響と作用メカニズムの解明

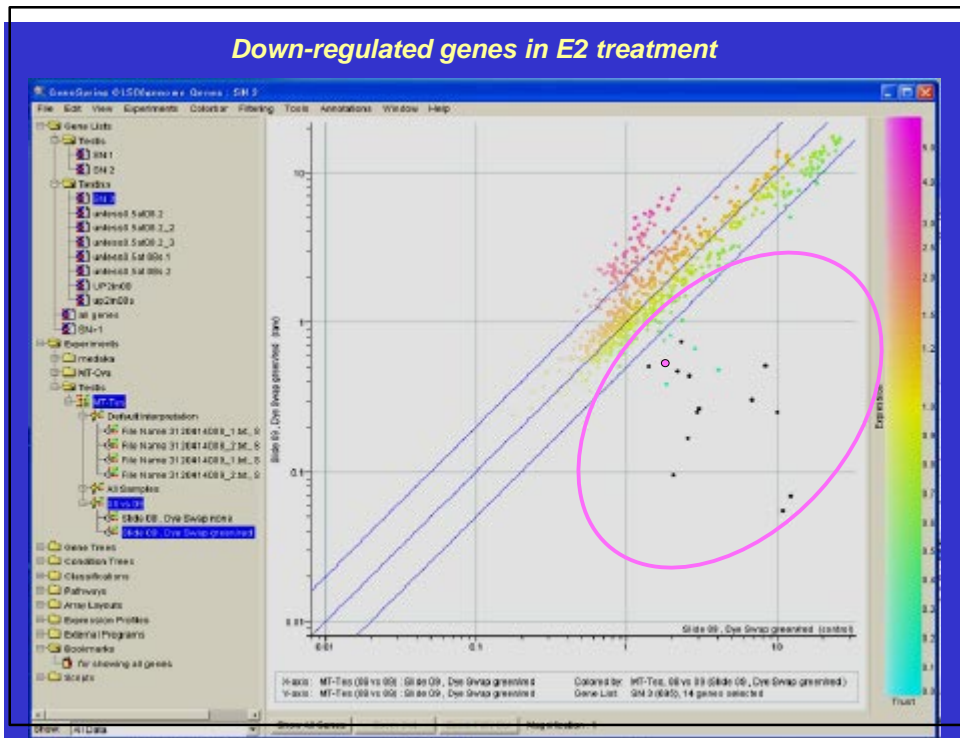
メダカ生殖腺の性的可塑性

性ステロイドホルモン (アンドロゲン、エストロゲン、内分泌攪乱化学物質)





Gene Name	Description
OLS06F-267	[AB008372] alpha 2 type I collagen [Oncorhynchus mykiss]
OLS06F-378	[AB041930] trypsinogen II [Engraulis japonicus]
OLS06C-317	[AB045645] tropomyosin [Pennahia argentata]
OLS06C-257	[AB045645] tropomyosin [Pennahia argentata]
OLS06D-357	[AB052836] collagen a3(I) [Oncorhynchus mykiss]
OLS06E-374	[AB052837] Collagen alpha 2(I) chain precursor collagen a2(I) [Oncorhynchus mykiss]
OLS06C-174	[AB086413] tropomyosin [Theragra chalcogramma]
OLS06B-60	[AF128810] ZPC domain containing protein 2 [Oryzias latipes]
OLS06C-82	[AF128814] RNA binding protein 42Sp43 [Oryzias latipes]
OLS06B-87	[AF128815] 42Sp50 [Oryzias latipes]
OLS06B-288	[AF128817] Unknown [Oryzias latipes]
OLS06B-156	[AF128818] Unknown [Oryzias latipes]
OLS06B-143	[AF128819] Unknown [Oryzias latipes]
OLS06D-28	[AF128821] Unknown [Oryzias latipes]
OLS06B-62	[AF128823] Unknown [Oryzias latipes]
OLS06A-380	[AF128824] Unknown [Oryzias latipes]
OLS06D-138	[AF281358] putative serum albumin-related protein [Oncorhynchus mykiss]
OLS06B-113	[AF331670] ZPAX [Oryzias latipes]
OLS06B-241	[AF331675] ZPC5 [Oryzias latipes]
OLS06D-169	[AK029137] Mus musculus 10 days neonate skin cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4732496L10 pro
OLS06B-37	[AL035250] prepro-endothelin 3 - Homo sapiens
OLS06E-81	[BC044160] Similar to neuronal protein [Danio rerio]
OLS06C-135	[BC045423] Unknown (protein for MGC:55673) [Danio rerio]
OLS06C-138	[BC045472] Similar to PC2 (positive cofactor 2, multiprotein complex) glutamine/Q-rich-associated protein
OLS06F-216	[BC049974] Myl9 protein [Mus musculus]
OLS06F-164	11-F-4 fatty acid-binding protein ISOTYPE-H6 - Chaenocephalus aceratus
OLS06B-155	10-B-11 No Hits
OLS06B-125	8-B-13 No Hits
OLS06C-145	10-C-1 No Hits
OLS06A-373	12-A-21 No Hits
OLS06C-121	8-C-9 No Hits
OLS06B-281	6-B-25 No Hits
OLS06B-14	1-B-14 No Hits
OLS06B-51	4-B-3 No Hits
OLS06A-381	12-A-29 No Hits
OLS06A-370	12-A-18 No Hits
OLS06B-141	9-B-13 No Hits
OLS06D-126	8-D-14 No Hits
OLS06D-383	12-D-31 No Hits
OLS06F-45	3-F-13 No Hits
OLS06F-235	3-F-27 No Hits



課題3．イトヨによる化学物質の内分泌かく乱作用の評価手法の研究

代表研究者：長江真樹（長崎大学 環境科学部）

【ExTEND2005 との対応】

環境省は、生態系への内分泌かく乱作用による影響の評価手法として、魚類を用いた試験を実施してきている。これまでの SPEED'98 に基づく取組では、女性ホルモン様作用の検出が中心であった。しかし、今後は女性ホルモン様作用以外の内分泌かく乱作用も含めた幅広い取組が必要である。

肝臓におけるビテロジェニン（卵黄蛋白前駆物質）産生という臓器レベルの変化によって女性ホルモン様作用の検出が可能であるように、男性ホルモン様作用についても、トゲウオ類のイトヨにおいては、腎臓におけるスピギン（トゲウオ科魚類のオスが産生する巣作り用の蛋白質）産生を用いて、検出が可能である。イトヨについては、現在 OECD においても、試験魚種としての使用が検討されており、このイトヨを用いて、男性ホルモン様作用について個体レベルでの有害影響と細胞・分子レベルでの変化との関連性に関する知見を収集する必要がある。

なお、本研究は、国際協力関係事業の日英共同研究におけるテーマの一つである。

【具体的研究計画】

1) 研究の背景と目的

硬骨魚の一種であるイトヨ (*Gasterosteus aculeatus*) の雄は繁殖期に営巣する。その際、アンドロジェンの刺激によってのみ「スピギン」という営巣のための接着タンパクを腎臓で産生することが近年明らかになった。本課題では、バイオマーカーとしてのスピギンの利用も含めて、イトヨを用いた化学物質のアンドロジェン作用を評価するための手法を研究し、生態系の保全に役立てることを目的として研究を推進する。

2) 研究概要

イトヨホルモン受容体を用いたレポーター遺伝子アッセイ系の構築

イトヨアンドロジェン受容体 (AR) の完全長をクローニングするとともに、イトヨアンドロジェン受容体 (AR および AR) を用いたレポーター遺伝子アッセイ系に用いるベクター系を構築し、培養細胞への遺伝子導入およびその発現確認を行う。

スピギンを用いたアンドロゲン作用評価試験法の開発

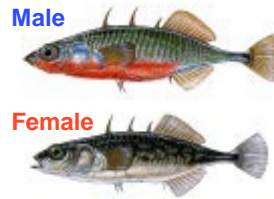
スピギン mRNA の測定系を確立する。英国より得たイトヨの曝露試験方法

の在来種への適用可能性を検討する。

イトヨの人工繁殖技術の導入

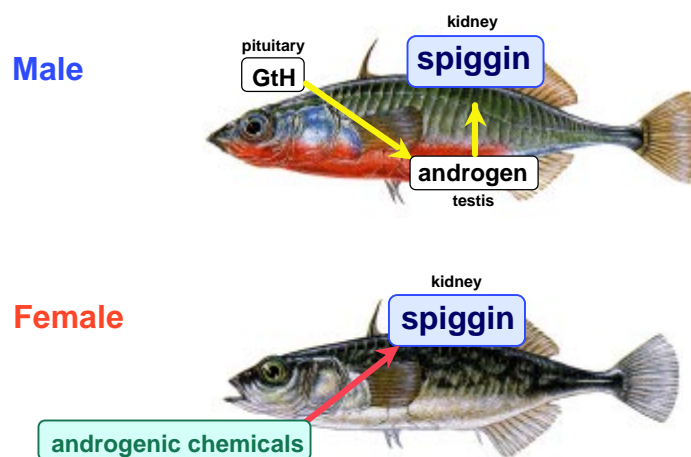
イトヨ人工繁殖の技術開発を目指し、飼育・繁殖条件等の情報をさらに収集する。

イトヨによる化学物質の内分泌かく乱作用の評価手法の研究



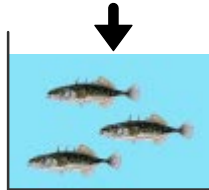
長崎大学環境科学部 長江真樹

バイオマーカーとしてのスピギン

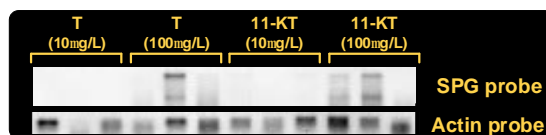
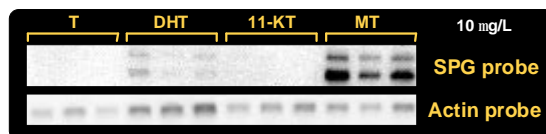


種々のステロイドによるイトヨ雌腎臓でのスピギン合成誘導試験

Steroid hormones
(10 or 100 mg/L)

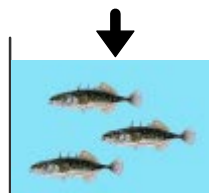


4 L aquarium
15 °C
Light : Dark = 10h : 14h
1 week treatment

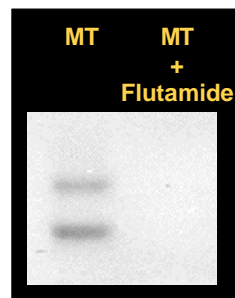


フルタミドによるスピギン合成阻害

MT (0.1mg/L) with or without
Flutamide (1mg/L)



4 L aquarium
15 °C
Light : Dark = 10h : 14h
1 week treatment



これまでの研究により、バイオマーカーとしてのスピギンの構造・発現等の諸性質が明らかとなった。

本年度以降の研究目的および研究計画

研究目的

バイオマーカーとしてのスピギンの利用も含めて、イトヨを用いた化学物質のアンドロゲン作用を評価するための手法を開発する。

研究計画

1. イトヨホルモン受容体を用いたレポーター遺伝子アッセイ系の構築
2. スピギンを用いたアンドロゲン作用評価試験法の開発
3. イトヨ人工繁殖技術の導入

1. イトヨホルモン受容体を用いたレポーター遺伝子アッセイ系の構築

PCR fragment of ARa and ARb

Nucleic acid sequence

```
ARa  GGATGGGGGGTATGGTGTTCCTTTGGGCTGGAGGTACACACTCTCACT 50
ARb  .....T...T...CT...A.....G..T.AGAA.GTC
AACAGCTCCCTGTCTCACTTTCGCCCCAGACCTGGTTTTCAATGACCAACG 100
.....G..AGGA.....T.....G..T..T..G.....A..T..
GATGGAAGTTTCCAGTATGTATGAACACTGTGTGAGGATGAAGTGTCTCT 150
.....A.GT...CA.....C..G.....CA.AC.....GA.AT..T.
CCCAAGGTTCTGATGCTGAGGTTCACTGAGGAGGAGTTCCTCTGATG 200
..A..GGA.....CTGC.....C..A..T.....
AAGGCCTGTGTCTCTTTCAGCATCATGCCAGTGGAGGGCTGAAGAACA 250
.....T..C.T..T.....TC.T.....T.....T.....GT..
GCCTGTGTTTGGATGAACGCGACCTCCTGCATCAACGAACTAGACCG 298
.AAG.AC.....C.....TCT.A...A.....
```

Amino acid sequence

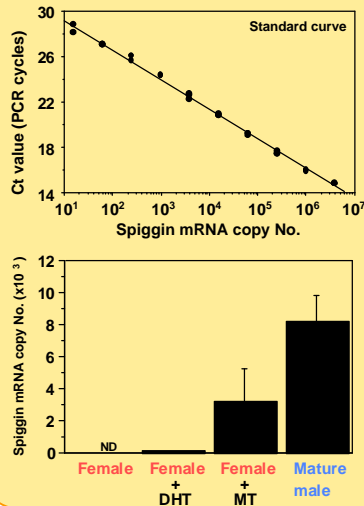
```
ARa  MGVMVFLGWRSYLTNSFLLYFAPDLVFNDRMEVSMYEHCVRMKLLS 50
ARb  .....KDV.GRM.....EH..QM.T.....I..RH..
QFPCMLKVTQEEFLCKALVLFIMPVGLKQRCFDELRTSYINELD 98
.E.LL.QIS.....L.....L.....S.KY.....LT.....
```

本年度計画

- 全長 ARa および ARb cDNA のクローニング
- レポーター遺伝子アッセイ系の開発 (ベクター構築、細胞への導入、発現確認等)

2.スピギンを用いたアンドロゲン作用評価試験法の開発

Real-time RT-PCR quantification



本年度計画

・コントロール遺伝子 (L8) の定量を導入したスピギン mRNA 測定系の確立 (リアルタイム定量 RT-PCR)

共同研究先 (CEFAS) が用いている曝露試験方法の適用 (測定系を含めた曝露試験の運用)

3.イトヨ人工繁殖技術の導入

イトヨは北半球の寒冷地では優先種である。一方、日本 (本州) では個体数が少ない。実験動物としての個体数確保には、人工的な種苗の生産が望まれる。

・人工的な種苗の生産 遺伝的背景の確かな個体を試験に用いることが可能。

種苗生産 = 親魚の成熟管理 + 稚魚の栄養供給 (餌料)

生殖腺発達に関する多少の知見はあるが、確実な成熟コントロール技術はない。

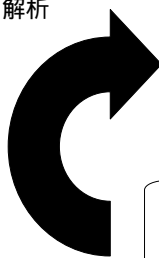
成熟条件の情報収集 (CEFAS および文献) + 人工管理下での成熟誘導

人工授精の試み

ExTEND2005 における本研究課題の位置づけ

イトヨを用いた環境アンドロゲン作用の評価

環境アンドロゲンの
個体・機能(生殖腺)
への影響とスピギン
産生との
相関解析



個体群レベル

↓
個体レベル

↓
組織・臓器レベル

↓
分子・細胞レベル

腎臓でのスピギン合成を指標にした
環境アンドロゲン作用の検出・評価

化学物質の性ホルモン受容体結合・
転写活性化能解析
(レポーター遺伝子アッセイによる解析)

課題４．メダカアンドロジェン受容体結合性試験の確立

代表研究者：中井 誠

(財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所)

【ExTEND2005 との対応】

環境省は、生態系への内分泌かく乱作用による影響の評価手法として、魚類（メダカ）を用いた試験を実施してきている。これまでの SPEED'98 に基づく取組では、女性ホルモン様作用の検出が中心であった。しかし、今後は女性ホルモン様作用以外の内分泌かく乱作用についても視野に入れて取組を進める必要がある。OECD（経済開発協力機構）においても、男性ホルモン様作用や酵素阻害作用をもつ物質を含めた検出系の確立が課題となっており、男性ホルモン様作用による、個体レベルでの二次性徴変化が観察されている。細胞・分子レベルでの評価手法としては、女性ホルモン様作用の検出に参考となるエストロジェン受容体結合性及び遺伝子転写活性試験法は既に確立しており、男性ホルモン様作用の検出が可能な試験法の確立が、今後の課題である。

【具体的研究計画】

1) 研究の背景と目的

化学物質の内分泌かく乱作用のうち、性ホルモン受容体結合を介した下流遺伝子の転写制御は主要なメカニズムであり、化学物質の受容体結合性、あるいは、遺伝子転写活性化能は内分泌かく乱作用を評価する上で、重要な指標となっている。これまでに、メダカエストロジェン受容体（ER）に対する結合試験系および ER 結合を介した転写活性化試験系、ならびにアンドロジェン受容体（AR）結合を介した転写活性化試験系を構築した。

本年度は、アンドロジェン受容体の結合性試験系の最適化を行う。

2) 研究概要

CV-1 細胞と同様にアフリカミドリザル腎臓由来細胞であり、代謝能を有する COS 細胞を用いた結合試験系を構築し、代謝能をもった結合試験系の最適化を行う。また、細胞内における発現受容体濃度等の試験条件の設定についても検討する。さらに、CV-1 細胞についても、培養条件等のさらなる検討を行い、結合試験系への適用の可否について検討する。

メダカアンドロジェン受容体結合試験の確立

財団法人化学物質評価研究機構

中井 誠

研究の背景～国内、国際的な取組～

これまでのSPEED'98に基づく取組：
女性ホルモン様作用の検出が中心であった。しかし、今後は女性ホルモン様作用以外の内分泌かく乱作用についても視野に入れて取組を進める必要がある。

OECD (経済開発協力機構) の取組：
分子レベルでの作用メカニズム解明 (レベル2に位置)
女性ホルモン様作用、男性ホルモン様作用、ステロイドホルモン合成酵素阻害作用をもつ物質を含めた *in vitro* 検出系の確立が課題

研究の背景 ~ *in vitro*試験の重要性 ~

受容体結合試験などの*in vitro*試験と、*in vivo*試験の結果との関連性を検討し、相関と共通性等について検討することが必要
(ExTEND2005)



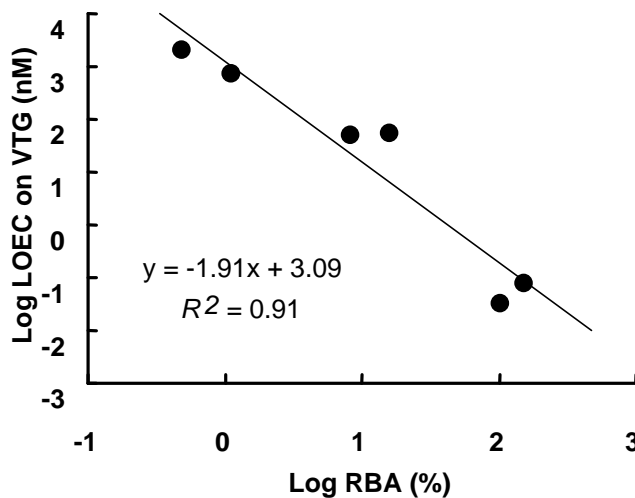
*In vitro*試験

特異的な作用メカニズムに基づいた情報



簡便で安価な*In vitro*試験の確立は重要な課題

*In vivo*試験と*in vitro*試験の関係
~ VTG誘導濃度とメダカER結合強度の関係 ~



これまでの成果と本課題の目的

個体レベルでの内分泌かく乱作用影響を評価するためには、分子・細胞レベルでの作用メカニズム解明は重要

これまでに構築したメダカ*in vitro*試験系

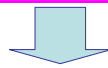
結合試験			レポーター遺伝子アッセイ アゴニスト検出系		
ER	ER	TR	ER	ER	AR

男性ホルモン様物質が魚類に対して影響（ビテロゲン産生抑制、二次性徴変化）を引き起こすことが明らかとなっており、**アンドロジェンあるいは抗アンドロジェン作用による生態影響を作用メカニズム（受容体結合等）に基づいて評価する必要がある**

研究の背景～代謝の重要性～

化学物質には代謝物が**アンドロジェン受容体**に対して活性を持つものが存在

個体レベルの評価・生体への外挿には**代謝物の評価が重要**

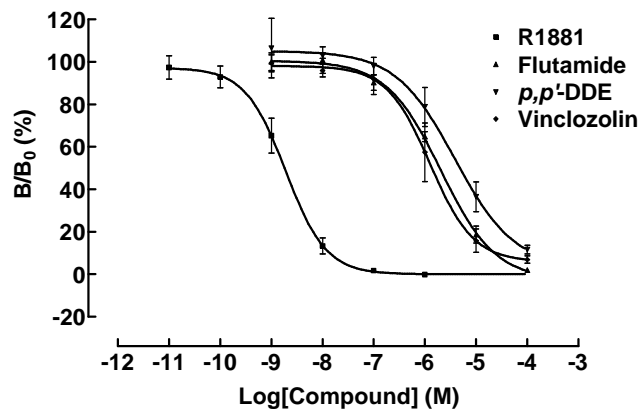


培養細胞を用いた結合試験のメリット

- ・生細胞を使用することで、細胞内のBasalな代謝能を利用することが可能
- ・無細胞系結合試験では困難であったS9等による代謝処理が容易

昨年度の成果

メダカARを用いたアンタゴニストの結合試験
 トレーサー $[^3\text{H}]$ R1881
 細胞 HeLa



Vinclozolin > Flutamide > p,p'-DDE

昨年度の成果 ~ メダカER試験系との比較 ~

試験化学物質	結合試験 (E2に対する相対結合強度)		レポーター遺伝子アッセイ アゴニスト検出系		
	ER	ER	ER	ER	AR
Flutamide	Negative ^a	Negative	Negative	Negative	Negative
p,p'-DDE	0.034	0.012	N.D. ^b	N.D.	Negative
Vinclozolin	Negative	Negative	Negative	Negative	N.D.

ER結合試験、レポーター遺伝子アッセイでは不検出



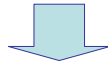
AR結合性 :Vinclozolin > Flutamide > p,p'-DDE



AR結合試験を実施することでいずれも検出可能

本年度の研究計画

代謝産物の評価



- 細胞内のBasalな代謝能の利用
COS細胞を用いた競争結合試験系の構築
と試験条件の至適化
CV-1細胞の適用可否の検討
- S9等による代謝処理
S9処理化学物質の結合性評価系の構築

課題5．両生類における変態のメカニズムに関する研究

代表研究者：柏木昭彦

(広島大学 大学院 理学研究科附属両生類研究施設)

【ExTEND2005 との対応】

これまでの SPEED'98 に基づく取組においては、内分泌かく乱作用の中でも、女性ホルモン様作用が特に注目されてきたが、生殖器官への影響だけでなく、その他の内分泌器官への影響も考慮した調査研究の必要性が指摘されている。両生類のカエルに特有の“変態”は、甲状腺ホルモンによって制御されているため、変態という個体レベルでの変化を評価することで、甲状腺ホルモン軸に対する内分泌かく乱作用を検出することが可能であり、これを利用した変態アッセイの開発が OECD で進められている。変態アッセイの基礎的知見として、変態のメカニズムを、細胞・分子レベルで解明する必要がある。

【具体的研究計画】

1) 研究の背景と目的

変態アッセイの開発過程において、暴露した化学物質種や濃度により、個体レベルの変化が認められている。その変化と細胞・分子レベルでの変化とを比較評価することは、化学物質の甲状腺軸への作用メカニズムを理解し、また試験法の妥当性を保証する上で必要不可欠な情報となる。本研究では、甲状腺ホルモン軸に対する内分泌かく乱作用により個体レベルで生じる変化について、変態アッセイの過程で組織をサンプルリングし、遺伝子発現プロファイリングより、細胞・分子レベルで遺伝子カスケードを整理するとともに、甲状腺ホルモン軸応答モデル両生類を用いて遺伝子発現と個体レベルで生じる変化とをリアルタイムで調べることにより、両生類の甲状腺軸に対する内分泌かく乱作用発現のメカニズムの解明を目指す。

2) 研究概要

異なる作用メカニズムにより甲状腺ホルモン軸に対し、かく乱作用を惹起する化学物質(甲状腺ホルモン; T4、プロピルチオウラシル; PTU、イオパノ酸; IOP)を、変態アッセイに準じてニシツメガエル幼生に暴露し、継時的に、これらの幼生から後肢、尾、甲状腺、肝臓等の組織を採取する。各組織から遺伝子を取得し、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いた遺伝子発現解析により、遺伝子発現変化をプロファイリングし、個体レベルで生じた変化と対応させて遺伝子カスケードを整理する。

両生類の甲状腺軸に対する内分泌かく乱作用 発現のメカニズムに関する研究

柏木昭彦

広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設

SCOPE OF THE OECD WORK ON EDs

OECD Test
Guideline
Programme

Special Activity

EDTA Task Force

- Oversees VMGs
- Defines the needs in terms of test methods

Country driven activity

- Manage validation work

VMG-mammalian

VMG-eco

VMG-non animal

fish

amphibian

birds

invertebrates

Technical Expert Groups:
discuss and agree on
protocol/ parameters before
validation

Phase II: 変態アッセイバリデーション試験条件

試験動物	アフリカツメガエル		
暴露期間	発生ステージ51から21日間*		
試験物質濃度	T4	0.25, 0.5, 1.0, 2.0 µg/L	
	パークロレート(PER)	65, 125, 250, 500 µg/L	
	イオパノ酸(IOP)	0.75, 1.5, 3.0, 6.0 mg/L	
実験方式	流水式 (流速 25mL/min)		
エンドポイント計測日	発生ステージ	0日目、7日目*、21日目	
	体長	頭胴長	7日目*、21日目
		完全長	7日目*、21日目
	後肢長	7日目*、21日目	
	湿重量	7日目*、21日目	
	死亡率	毎日	
	甲状腺組織切片	7日目*、21日目	

* (7日目に各水槽から5匹ずつサンプリング)

甲状腺軸かく乱作用による個体レベルの変化

Control

T4 $C_{15}H_{11}I_4NO_4$

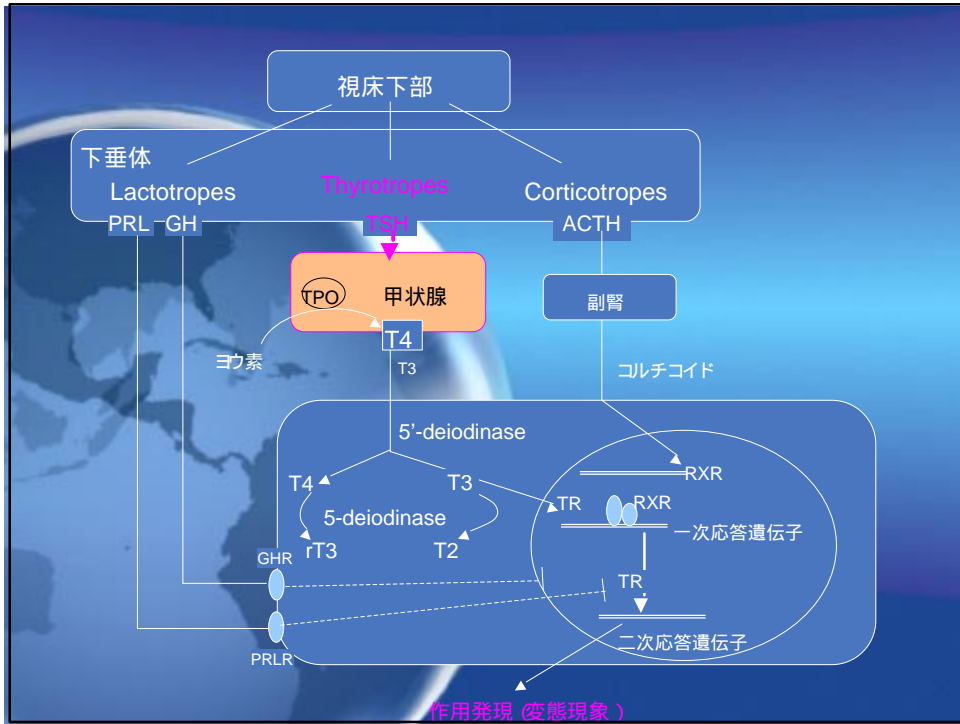
変態促進 (頭部・前後肢発達)

PTU $C_7H_{10}N_2OS$

変態抑制 (前後肢未発達)

IOP $C_{11}H_{12}I_3NO_2$

変態促進 (頭部発達)
変態抑制 (前後肢未発達)



平成17年度 研究計画

1) ニシツメガエルを用いた化学物質の暴露

ニシツメガエル幼生を甲状腺軸かく乱作用があるT4, PTU, IOPの3種類の化学物質で暴露し、変態アッセイの過程において尾、後脚、肝臓等の組織をサンプリングする。

2) ディファレンシャル ディスプレイを用いた遺伝子発現解析

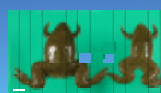
暴露試験で得られた組織からRNAを取得し、ディファレンシャルディスプレイを用いた遺伝子の発現解析を行い、遺伝子を同定する。

3) 遺伝子プロファイルの作成と遺伝子カスケードの整理

遺伝子発現解析で得られた情報から、遺伝子群の発現パターンをプロファイリングし、個体レベルで生じた変化と対応させて、遺伝子カスケードを整理する。

平成17年度 研究計画

ニシツメガエル (*Silurana tropicalis*) の特徴



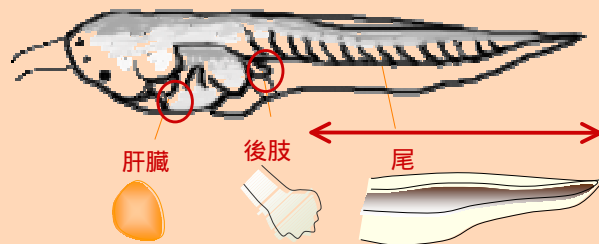
Species	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Silurana tropicalis</i>
Ploidy	tetraploid	diploid
N	18 chromosomes	10 chromosomes
Genome size	3.1×10^9 bp	1.7×10^9 bp
Breeding temp.	16-22	25-30
Generation time	1.5 ~ 2 years	0.5 ~ 1 year
Life cycle	fully aquatic	fully aquatic
Total length	100 mm	40-50 mm
Egg size	1-1.3 mm	0.7-0.8 mm
No. of eggs/spawn	300-1000	1000-3000
Genome project	No	On going

平成17年度 研究計画

1) ニシツメガエルを用いた化学物質の暴露



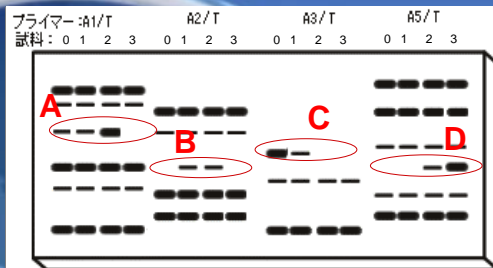
サンプリング / RNA調製



T4, PTU, IOPを、ニシツメガエル幼生に暴露し、変態試験の期間中、経時的に組織をサンプリングする。その後、遺伝子発現解析に使用するため、RNAを調製する。

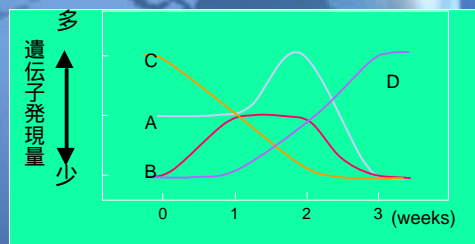
平成17年度 研究計画

2) ディファレンシャル ディスプレイを用いた遺伝子発現解析



変態時期において、「どの遺伝子が発現し、どの遺伝子が発現していないのか」について、組織ごとに確認する。また、化学物質を暴露したことで、遺伝子の発現がどのように変化するか調べる。

3 遺伝子プロファイルの作成と遺伝子カスケードの整理



上記で確認された遺伝子が、時間の経過とともにどのように変化していくのか、或は、化学物質の暴露によってどのように変化したのか組織ごとに追いかけて、遺伝子発現の挙動を調べ、発現に順序がないか確認する。

課題 6 . ミジンコにおける内分泌かく乱作用発現のメカニズムに関する研究

代表研究者：渡邊 肇

(自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター)

【ExTEND2005 との対応】

生態系への内分泌かく乱作用による影響を評価する際には、魚類等の脊椎動物だけでなく、多様な生物種が含まれ、食物連鎖においても重要な位置を占める無脊椎動物への影響についても考慮する必要がある。環境省は、無脊椎動物の中でも、古くから毒性試験に用いられてきたミジンコをモデル動物として、内分泌かく乱作用検出のための試験法開発を実施し、脱皮回数の減少という個体レベルの変化や、オスの発生という個体群レベルでの性比の変化をエンドポイントとする改良試験法 (enhanced TG211) を OECD に提出した。このような、ミジンコにおける化学物質暴露による個体・個体群レベルでの変化について、その機序を細胞・分子レベルで解明する必要がある。

【具体的研究計画】

1) 研究の背景と目的

本研究では、古くから環境毒性評価に用いられてきたミジンコをモデル動物として、無脊椎動物における内分泌かく乱の解析とその作用メカニズムの解明を目的とする。

2) 研究概要

遺伝子情報の整理

ミジンコの mRNA から作製した cDNA ライブラリーの情報の整理を行う。第 1 段階としてコンピューターを用いてクラスタリング解析をし、重複している情報を選択し、整理する。第 2 段階として、この配列をそれぞれ別のパラメーターを用いて再解析し、さらに目視により重複配列の確認を行うことにより、異常なクローンに由来する情報を除去する。第 3 段階として、有害な情報を除いた配列情報をもとに、もう一度クラスタリング解析などを行うことにより、取得した配列情報を利用可能な遺伝子情報として整理する。

DNA マイクロアレイの作製

平成 16 年度に作製した DNA マイクロアレイのプロトタイプは、非常に高い再現性を示したことから、基本的にはこのプラットフォームを踏襲し、搭載する遺伝子数を増やすことにより、実際に利用可能な DNA マイクロアレイを作製する。およそ 3,000 ~ 6,000 遺伝子に相当するオリゴ DNA を設計・合成しガラスアレイに搭載する。この新規に作製した DNA マイクロアレイについ

て、その性能の評価を行い、信頼性について検証する。一部の遺伝子については、定量 PCR などを併用してその発現について確認することにより、固定化したオリゴ DNA の信頼性について検証する。問題のあるオリゴ DNA については、遺伝子の別の領域からオリゴ DNA を設計しなおすことにより、次のバージョンのアレイ作製のための準備を行う。

平成17年度基盤的研究企画評価検討会

ミジンコによる細胞・分子レベルの作用メカニズムの解析

自然科学研究機構
基礎生物学研究所
岡崎統合バイオサイエンスセンター

渡邊 肇

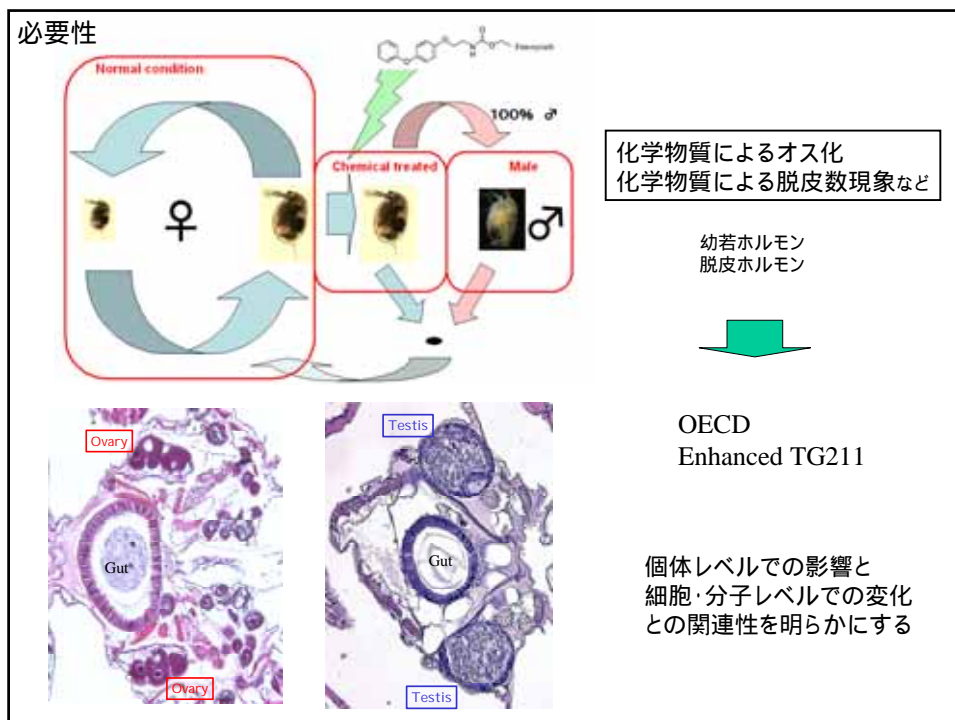
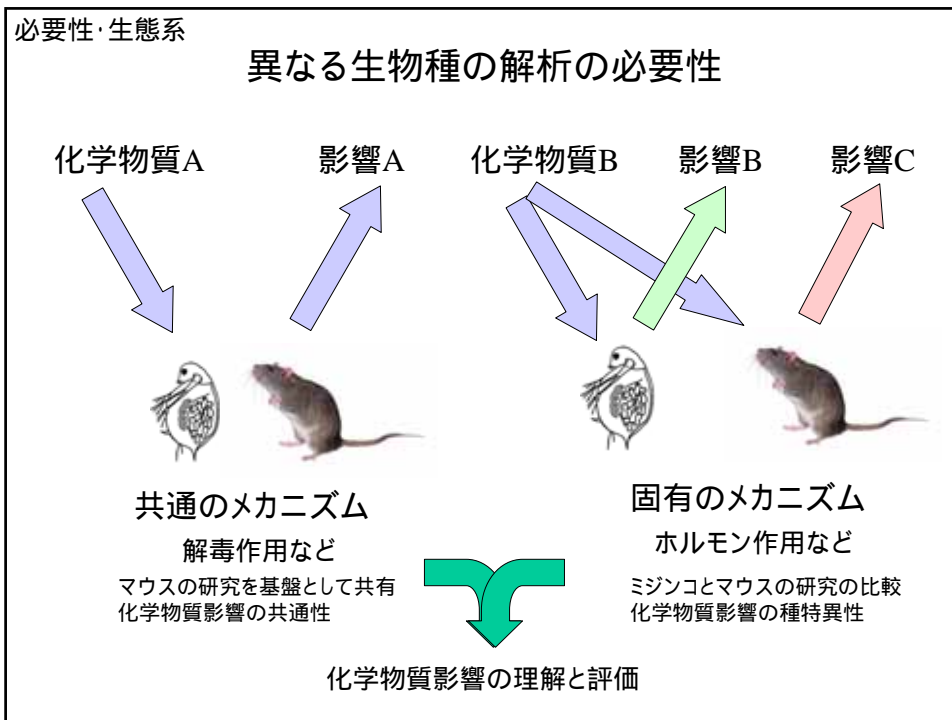
必要性

エストロゲン

野生生物・生態系への影響

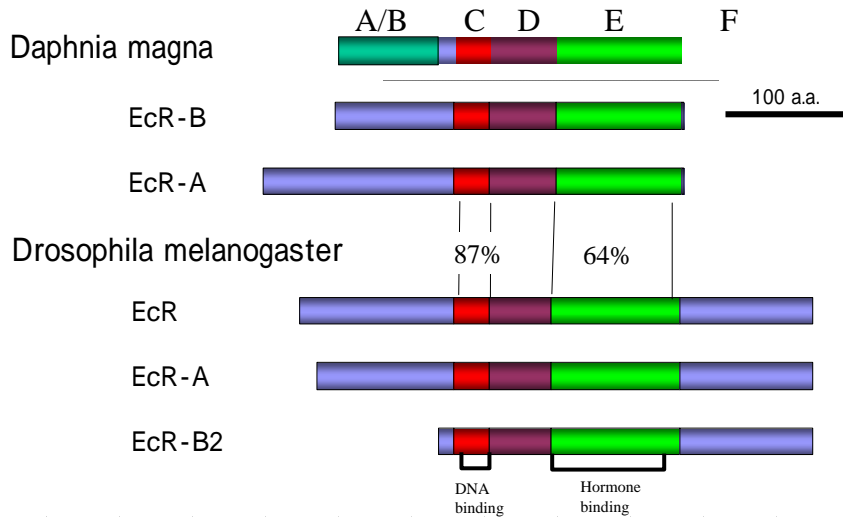
??エクダイソン??

The image is a composite of several elements. On the left side, there are four photographs: a frog on a rock, a kingfisher perched on a branch, a fish in a tank, and three water fleas (Daphnia) shown in different stages or views. In the center, there is a photograph of a whale breaching the ocean surface. On the right side, there is a hand-drawn food web diagram. It shows energy flow from Phytoplankton (250x) to Zooplankton (500x), then to Mysis (4000x), Snail (400,000x), and Lake trout (2,000,000x), finally reaching a Herring gull (25,000,000x). A red circle highlights the transition from Mysis to Snail. The text '必要性' is at the top left, 'エストロゲン' is in the middle left, '野生生物・生態系への影響' is at the top right, and '??エクダイソン??' is at the bottom center.

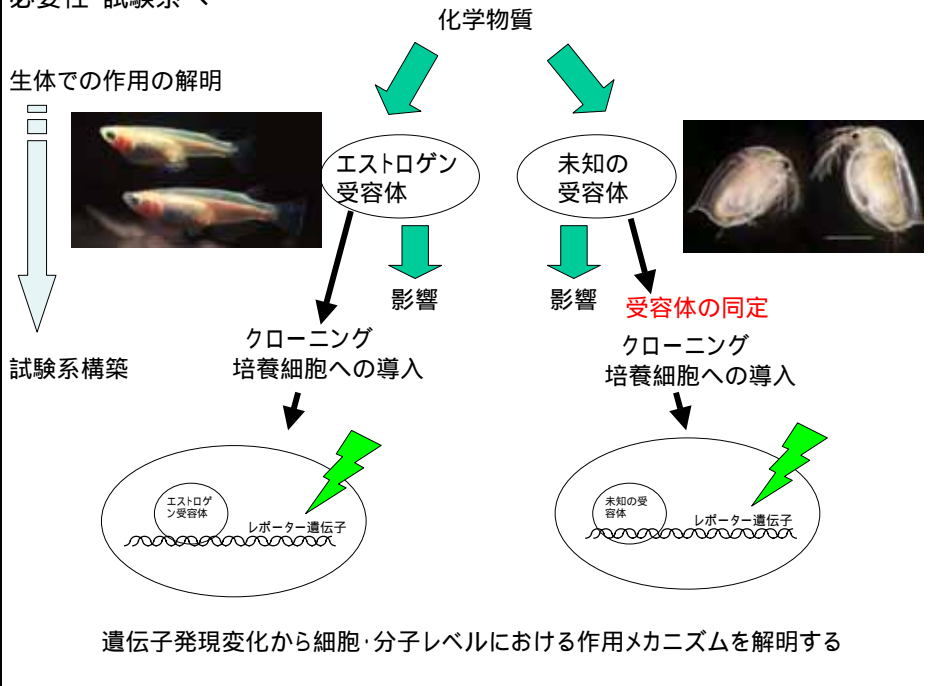


必要性・準備状況・受容体

エクジソン受容体の比較

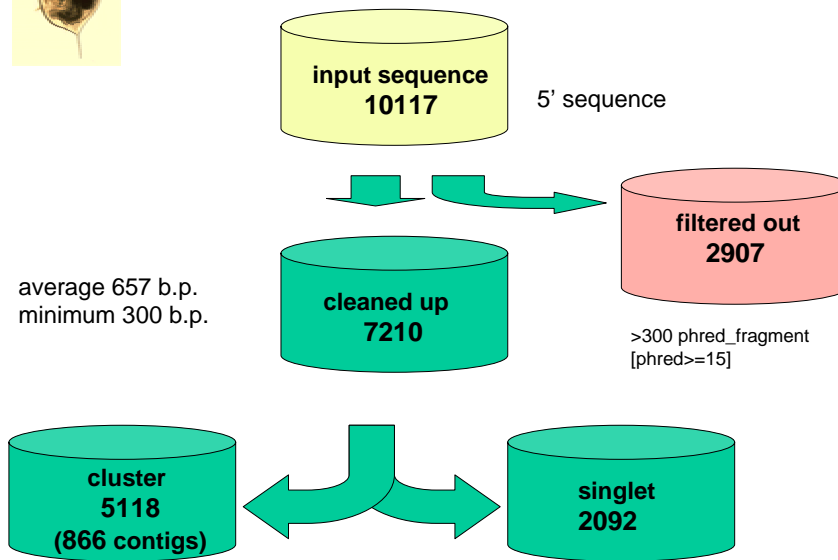


必要性・試験系へ





EST analysis



Daphnia magna EST database

<http://daphnia.nibb.ac.jp>

***Daphnia* cDNA analysis**

[BLAST search against *Daphnia*BASE](#)

[List of Clones](#)

[List of Contigs](#)

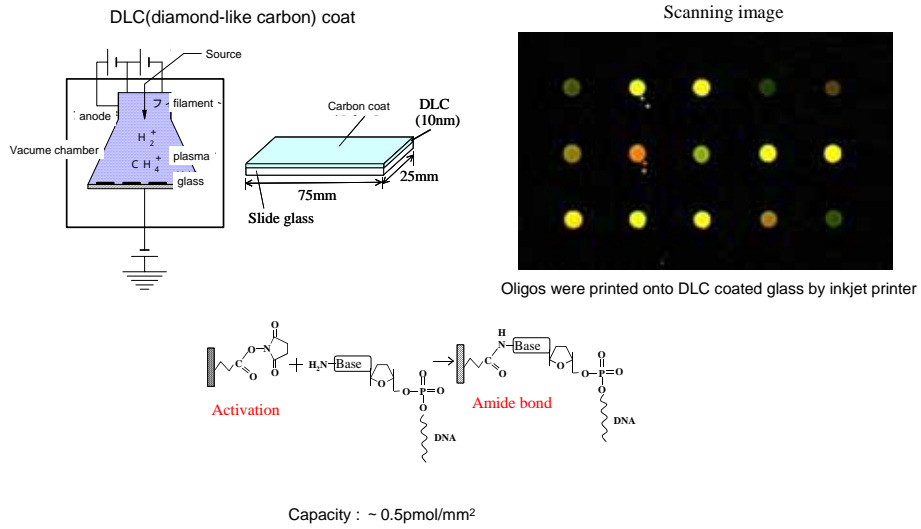
[List of Pairs](#)

[All results of homology searching](#)

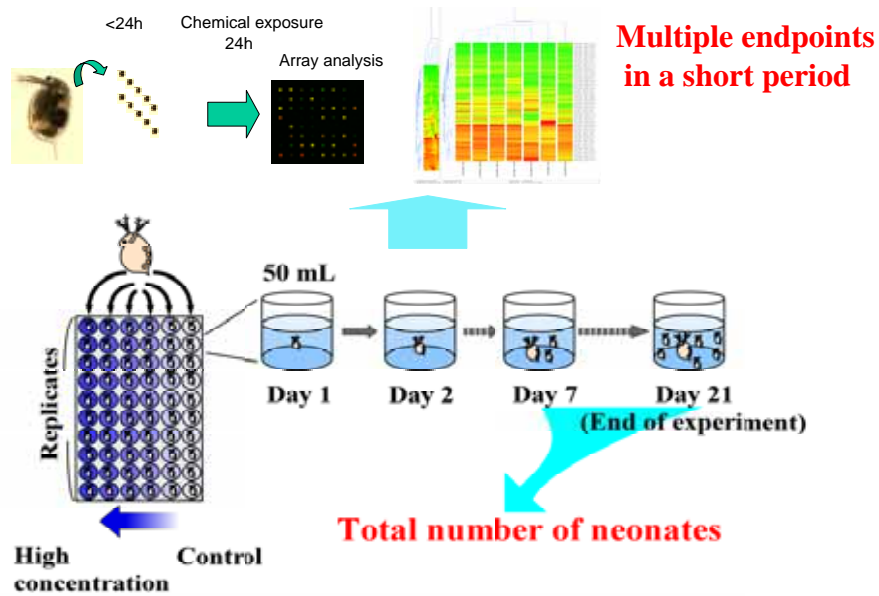
BJ925659-BJ936637: DDBJ

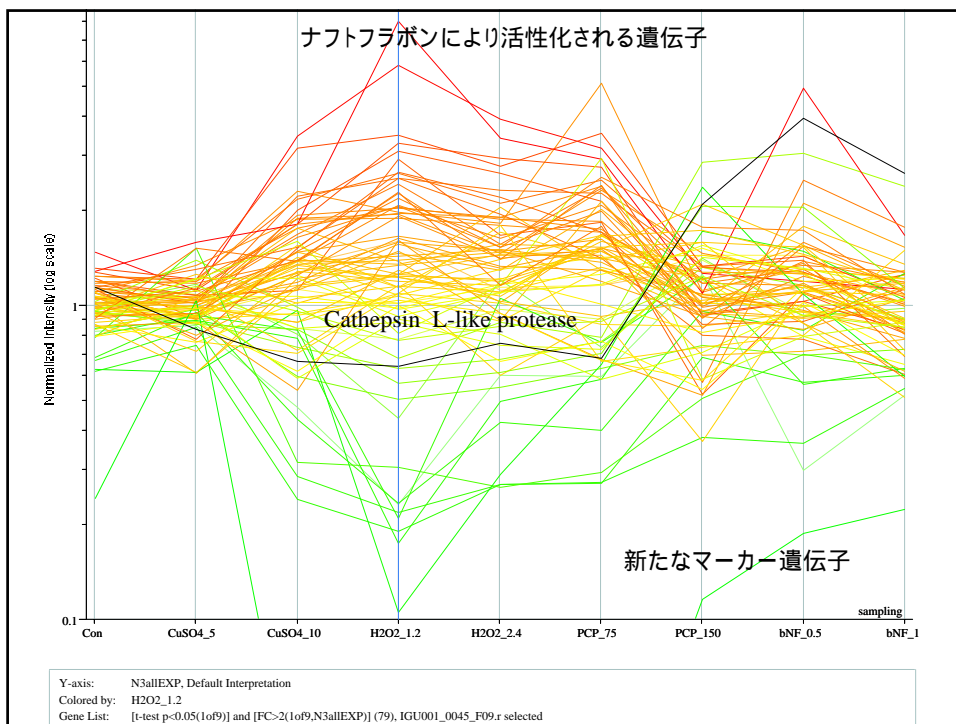
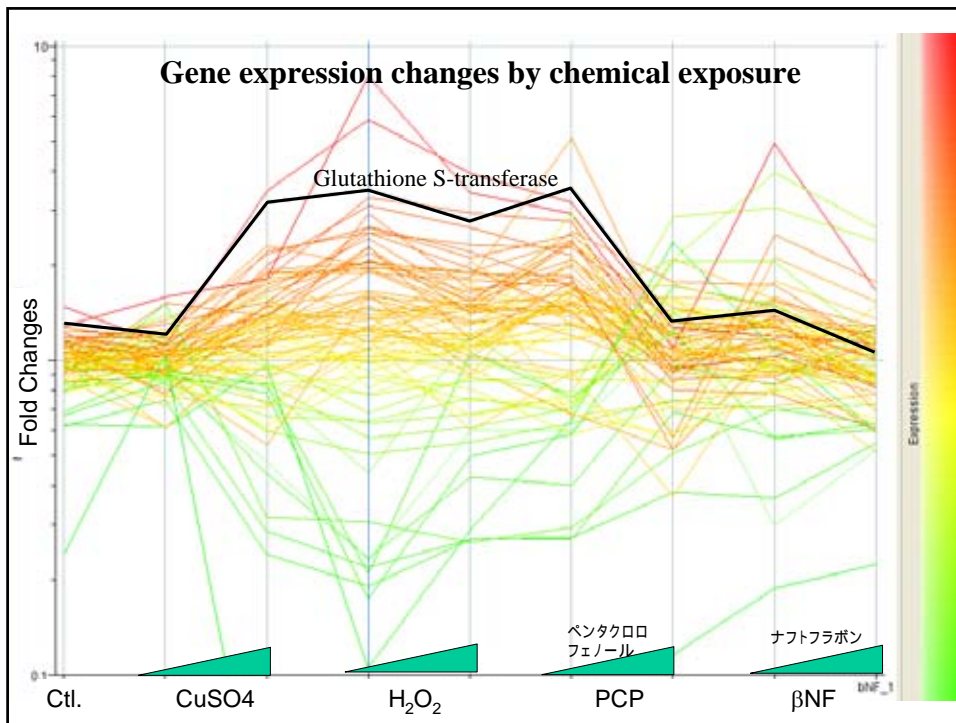
準備状況・DNAマイクロアレイ

プロトタイプのDNAマイクロアレイの作製



準備状況・DNAマイクロアレイ

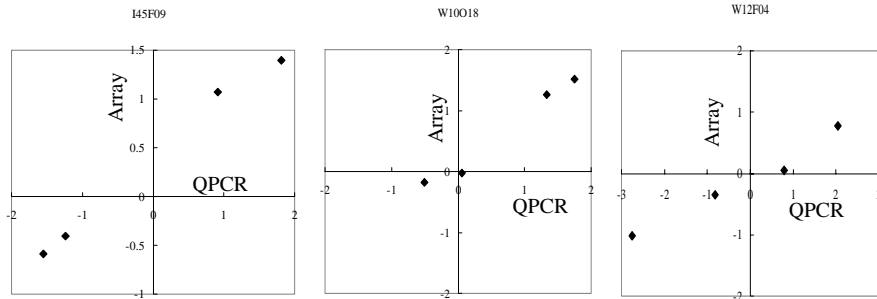




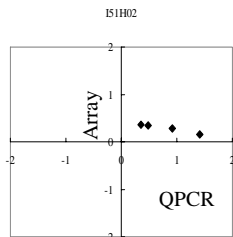
準備状況・DNAマイクロアレイ

解決すべき課題

定量PCRと相関のある遺伝子の例



定量PCRと相関の見られない遺伝子の例



- 遺伝子発現変化の検出感度の差
プローブなどの検討
- 搭載遺伝子数が少ない(ホルモン受容体など)
解析、搭載遺伝子の充実

今年度の計画

現在の評価用DNAマイクロアレイ 178遺伝子

ESTの解析とプローブ設計
搭載遺伝子数を増やす
問題点の解決(信頼性の向上)

3000 - 5000遺伝子を搭載した
DNAマイクロアレイを作製し評価

これにより 従来の内分泌攪乱化学物質の評価
作用メカニズムの解析
新規バイオマーカーの探索

をめざす

年次計画

2005 2006 2007 2008 2009

DNAマイクロアレイの作製

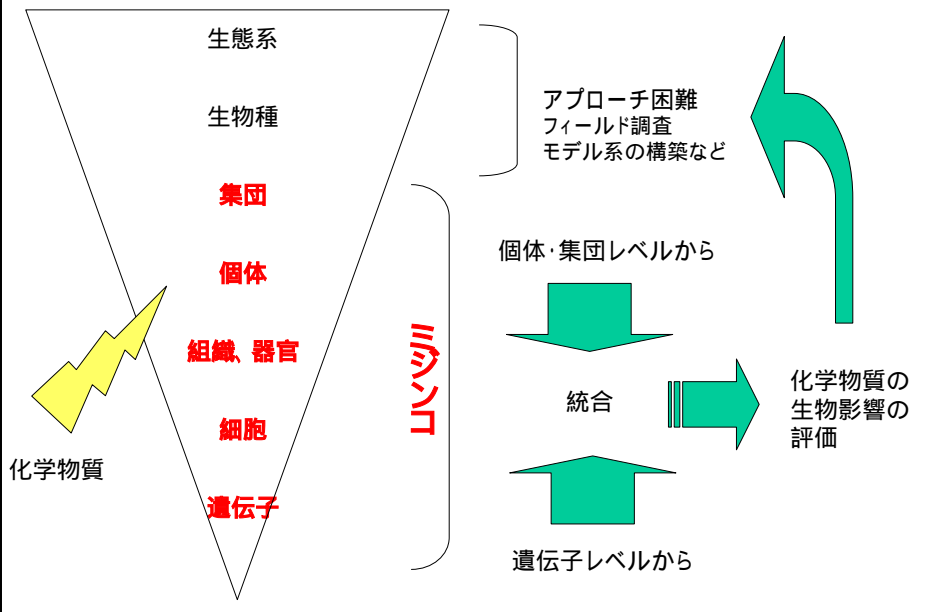
ホルモン曝露と
遺伝子発現解析

化学物質曝露と
遺伝子発現解析

責任遺伝子の探索

遺伝子発現に基づく作用メカニズムの解明

化学物質影響のレベル



課題7．哺乳類試験において観察される変化についての研究

代表研究者：鈴木勝士（日本獣医畜産大学）

青山博昭（財団法人 残留農薬研究所）

【ExTEND2005 との対応】

環境省は、ヒト健康への内分泌かく乱作用による影響の評価手法として、哺乳類（ラット）を用いた改良一世代試験を実施してきた。この試験は、メスのラットに妊娠及び哺育期間に化学物質暴露を行い、親動物及び仔動物への影響を把握するものであるが、各エンドポイントで認められた変化が有害影響であるか否かを判断するにあたっては、試験動物として使用しているラットにおいて観察される組織・臓器レベル及び個体レベルでの自然発生性の変化についての知見が不可欠である。自然発生性の変化としては、Wistar Hannover 系ラットにおける甲状腺の肥大等が挙げられる。このような自然発生性の変化と化学物質暴露に起因した変化とを区別して評価するためには、内分泌系だけでなく神経系・免疫系も含めた個体レベルでのエンドポイント設定が必要であり、また、設定されたエンドポイントにおける変化についての生物学的意義付けを明確にしておく必要がある。

【具体的研究計画】

1) 研究の背景と目的

これまでの内分泌かく乱化学物質の改良型世代試験において、業者から購入した動物のなかに自然発生的な遺伝性の突然変異とおぼしき変化を示す事例が紛れ込んでおり、投与群で低頻度にそのような変化が出現した場合、誘発性の変化なのか自然発生性の変化なのか判断が難しい局面に多々遭遇した。背景的な出現頻度や異常の種類を把握しているだけでは、この問題は基本的には解決せず、遺伝性あるいはエピジェネティックな変化であることを証明することが最も簡明であると考えられた。そのためには、そのような自然発生性の異常の発見、遺伝的固定、様々な遺伝実験や病態の解明と共に、原因遺伝子を探査確立し、診断用プローブを作成することが必要である。

2) 研究概要

11 種類の異常系統について常時合計 1,500 頭規模で動物を維持し、年産で合計 15,000 頭以上を目指す。動物の維持、交配、家系の記録、動物の個体識別、異常の特定、ゲノムサンプルの採取と保存、マイクロサテライトリンケージ試験、遺伝子配列分析、その他の実験を行う。反応性に関わる遺伝子(mdr1 など) のについて市販の動物における多型解析など、新規の関連遺伝子に関する探査を実施する。

哺乳類試験において観察される 変化についての研究

日本獣医畜産大学獣医学部

教授 鈴木勝士

(財)残留農薬研究所 毒性部

副部長 青山博昭

oed/+ の顔貌

哺乳類試験における変化？

誘発性と自然発生性変化の区別

クローズドコロニー由来のミュータント
系の確立維持

原因遺伝子の特定

診断用プローブの開発

反応性に関する遺伝子多型の調査

T1573
(+/?)

T1576
(hgn/hgn)

【ExTEND2005との対応】

哺乳類（ラット）を用いた改良一世代試験（環境省）
ヒト健康への内分泌かく乱作用による影響の評価手法
メスラット妊娠哺育期間に化学物質暴露 親と仔動物への影響
エンドポイントの変化が有害影響であるか否かを判断する

その判断には、試験動物（ラット）の臓器・組織レベル及び個体レベルでの自然発生性の変化についての知見が不可欠

自然発生性の変化で判断が難しかった実例

Wistar Hannover系ラットにおける甲状腺の肥大
/ 成長不良 / 均衡型矮小症

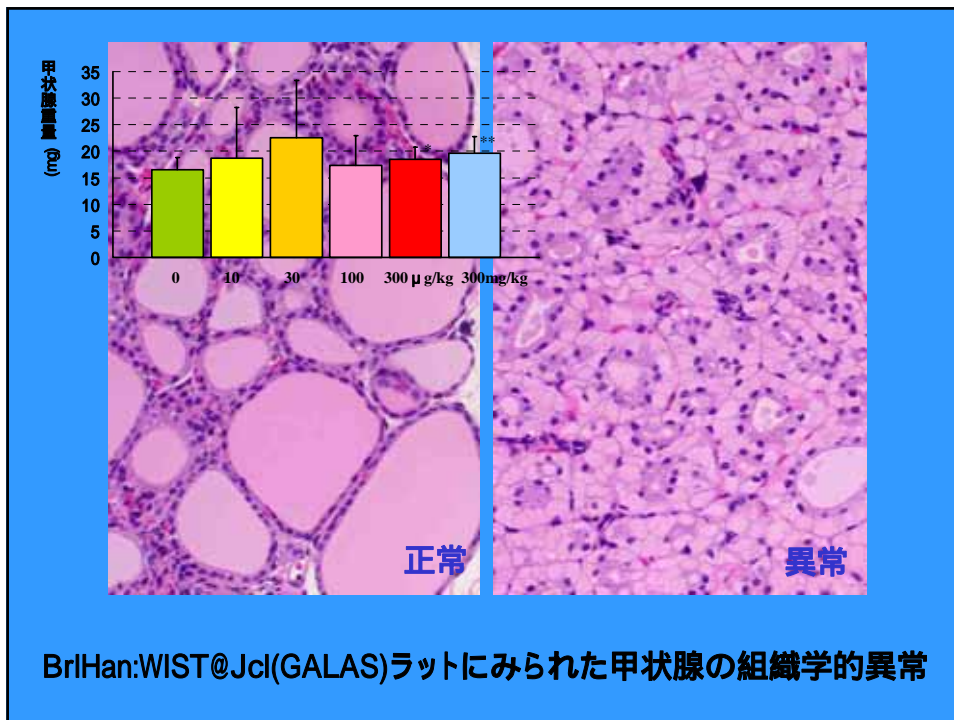
自然発生性の変化vs化学物質暴露に起因した変化との区別
個体レベルのエンドポイント：内分泌系 + 神経系・免疫系等
エンドポイントの変化の生物学的 + 毒性学的意義の明確化

改良型1世代生殖試験(Trans-generation assay)



試験の特徴:

- 必要に応じて、遺伝的背景が均一と考えられる近交系ラットを用いる。
- 必要に応じて、植物エストロゲンを含まない飼料を基礎飼料として与える。
- 被検物質の暴露を、少なくとも妊娠0日から哺育20日まで継続する。
- すべてのF1児動物を離乳まで哺育させる(間引きを行わない)。
- 各群の約半数の腹(6腹)について、すべての哺育児を離乳日に検査する。
- 残りの腹(6腹)から得られた離乳児は、すべて性成熟後の同一時期に検査する。



1) 研究の背景と目的

これまでの内分泌かく乱化学物質の改良型世代試験において、業者から購入した動物のなかに自然発生的な遺伝性の突然変異とおぼしき変化を示す事例が紛れ込んでおり、投与群で低頻度にそのような変化が出現した場合、誘発性の変化なのか自然発生性の変化なのか判断が難しい局面に多々遭遇した。

背景的な出現頻度や異常の種類を把握しているだけでは、この問題は基本的には解決せず、遺伝性あるいはエピジェネティックな変化であることを証明することが最も簡明であると考えられた。

そのためには、そのような自然発生性の異常の発見、遺伝的固定、様々な遺伝実験や病態の解明と共に、原因遺伝子を探査確定し、診断用プローブを作成することが必要であるとの結論に至った。

ood/+ の顔貌

2) 研究概要

11種類の異常系統について常時合計1,500頭規模で動物を維持し、年産で合計15,000頭以上を目指す(日獣大)。1000頭規模(残研)。

動物の維持、交配、家系の記録、動物の個体識別、異常の特定、ゲノムサンプルの採取と保存、マイクロサテライトリンケージ試験(BNまたはLE系)、遺伝子配列分析、

反応性に関わる遺伝子(mdr1など)について市販の動物における多型解析など、新規の関連遺伝子に関する探査

注目する異常な表現型:

致死(胎児期、出生後)

発育不良(矮小)

生殖異常

行動異常

その他

日獣大では、特に動物の維持管理が大きな仕事になり、安定的な動物を得るために専任の技術者(パート)を採用する必要がある。各系統の研究進捗状況に差があるところから、成果が上がった部分から順次公表していく手順を取ると共に、関連する動物業者の動物について当該遺伝子の保有状況の調査など新しいテーマとして実験を計画することになる。

affected

phenotypically,
normal

突然変異により規定された遺伝子のクローニング

Functional cloning : 原因遺伝子が既知であり、機能に関する情報があれば、それを利用して遺伝子を単離する。発現量が多く、正常過程が良く理解されている場合に限られる。

Positional cloning : 目的遺伝子の染色体上の位置に関する情報から遺伝子を同定する。物理地図や遺伝地図を作成し、染色体上での疾患遺伝子の位置を狭めていく。 **Cf. Association analysis**

Positional candidate gene approach : ある疾患遺伝子を染色体上にマップし、データベースで候補遺伝子を検索する方法。ゲノムプロジェクトの進展に伴い、データベースが整備され、この方法が主流を占めて来ている。

Position-independent candidate gene approach : 疾患の表現型がヒトや動物の既知の遺伝子による表現型と類似している場合に行える。

病態関連遺伝子の探索から : 蛋白質では二次元電気泳動で、mRNAではサブトラクト法、ディファレンシャルディスプレイ法、マイクロアレイなどの方法により、正常組織で発現し、異常組織で発現しない、あるいはその逆の病態関連分子を同定できるが、この過程で原因遺伝子産物が発見される可能性もある。

共同研究者:

日獣大 鈴木浩悦、斉藤賢一、千葉純子、甘粕晃平、教室所属学部学生3名

残農研 佐藤旭、外3名

