

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

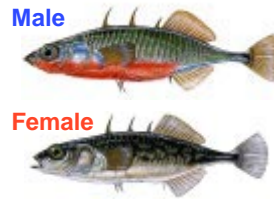
スピギン mRNA の測定系を確立する。英国より得たイトヨの曝露試験方法

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

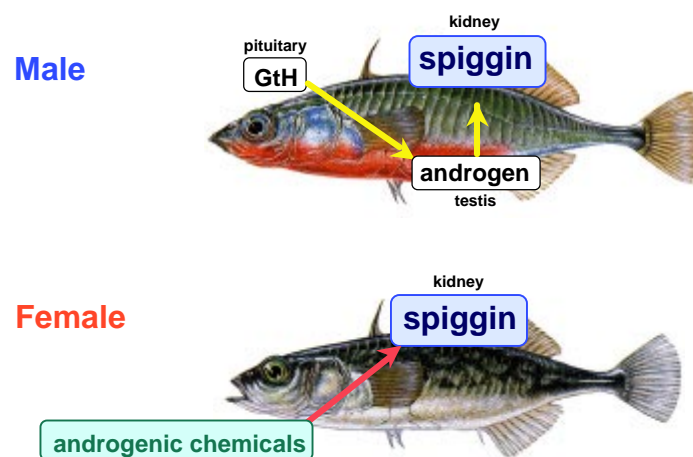
イトヨ人工繁殖の技術開発を目指し、飼育・繁殖条件等の情報をさらに収集する。

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



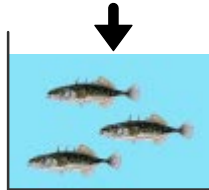
長崎大学環境科学部 長江真樹

バイオマーカーとしてのスピギン

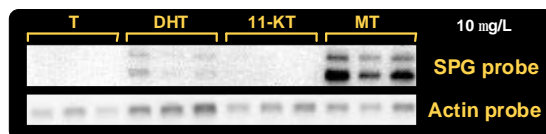


種々のステロイドによるイトヨ雌腎臓でのスピギン合成誘導試験

Steroid hormones
(10 or 100 mg/L)

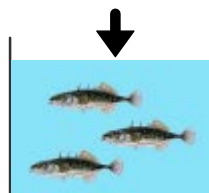


4 L aquarium
15 °C
Light : Dark = 10h : 14h
1 week treatment

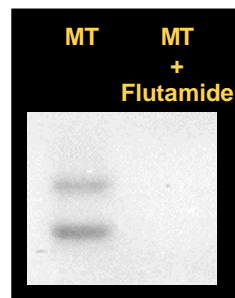


フルタミドによるスピギン合成阻害

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ト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ト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
AACAGCTCCCTGTCTAUCTTGGCCCGAGACCTGGTTTTCAATGACCAACG 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.....
AAGGCCTGTGTCTCTTTCAGCATCATGCCAGTGGAGGGCCTGAAGAACCA 250
.....T..C.T..T.....TC.T.....T.....T.....GT..
GCCTGTGTTTGGATGAACGCGACCTCCTGCATCAACGAACTAGACCG 298
.AAG.AC.....C.....TCT.A...A.....
```

Amino acid sequence

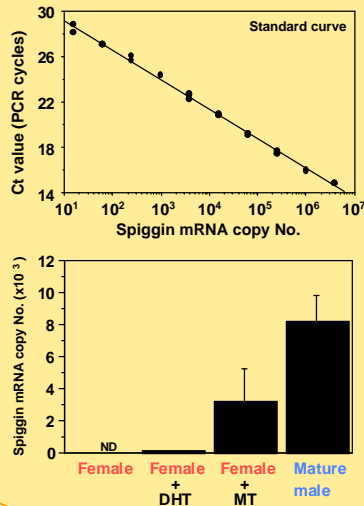
```
ARa  MGVMVFLGWRSYLTINSFLLYFAPDLVFNDRMEVSMYEHCVRMKLLS 50
ARb  .....KDV.GRM.....EH..QM.T.....I..RH..
QFPCMLKVTQEEFLCKALVLFIMPVGLKQRCFDELRTSYINELD 98
.E.LL.QIS.....L.....L.....S.KY.....LT.....
```

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。

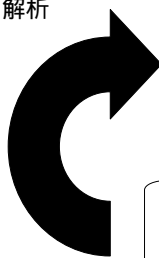
成熟条件の情報収集 (CEFAS および文献) + 人工管理下での成熟誘導

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)