

## 平成 21 年度 ExTEND2005 基盤的研究課題、フィージビリティースタディー 研究課題及びその他の研究課題の研究成果概要

### 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

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

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 3000～4500 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修飾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。エストロゲン作動系やアンドロゲン作動系などのシグナル伝達系に感受性の差を引き起こす原因遺伝子を特定するためには、まず近交系の動物を用いた実験を実施し、得られた結果に基づいてアウトブリード系統における変異遺伝子の存在やその頻度を確認する必要がある。本研究により、内分泌かく乱作用が疑われる物質を含む様々な化合物の毒性を調べる実験に使用されるアウトブリード系統の特性をより正確に把握することが可能となり、毒性実験の結果をより正確に評価するための基盤が整備される。

今年度は、昨年度に引き続いて性ホルモンに対する感受性を修飾する遺伝子群の解析を進め、これまでに検出されたエストロゲンに対する感受性を修飾する QTL 遺伝座（Quantitative Trait Loci）について、責任遺伝子のクローニングを試みた。また、雄の精巣、精巣上体、前立腺、精囊およびカウパー線の重量にみられる個体差については、昨年度の実験で得られた B6xC3F2 個体群のゲノム DNA を用いてマイクロサテライト・マーカーの遺伝子型の判定を進め、QTL 解析を実施した。さらに、129xB6 Recombinant Inbred 系統群（RI 系統群）のマウスを用いた解析からもエストロゲンまたはアンドロゲンに対する感受性を修飾する可能性のある QTL 遺伝子座が示唆されているので、これらについても責任遺伝子を DNA レベルで同定することに努める。

研究結果のまとめと考察：本研究では、アウトブリード系統の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、実験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して、主として遺伝学的な解析を実施した。まず、自然発生奇形を誘発する突然変異として、(1) Wistar Hannover ラットに見出された矮小症と甲状腺の腫大、(2) Wistar 系統に由来する被毛異常ラット（CV 系統）、および (3) Wistar 系統に発見された 2 種類の四肢奇形ラット（PD 系統および MOD 系統）について、原因遺伝子を探索した。また、代表的なマウス系統間で性ホルモンに対する感受性を修飾する遺伝子多型を検出すべく、(4) 129xB6 RI 系統群の雌雄の離乳児、(5) B6xC3F2 個体群の雌離乳児、および (6) B6xC3F2 個体群の成熟雄を用い、それぞれ生殖器官重量を指標として QTL 解析を実施して、遺伝子多型の同定に努めた。

Wistar Hannover ラットに観察される矮小症と甲状腺の腫大については、交配実験により両者が同一の遺伝子変異に起因する異常であることを示すとともに、RT-PCR およびシーケンシング

グ解析等により、その原因となる変異が *thyroglobulin* 遺伝子のアクセプターサイトにおける 1 塩基置換 (SNP) であることを明らかにした。また、動物を屠殺することなく簡便にこの SNP を検出する方法を開発し、遺伝子型を確定診断する手法を確立した。さらに、この変異が Wistar Hannover ラットの集団中に 5~10% と極めて高い頻度で存在するとの報告があったことから、遺伝子型の診断方法を生産業者に開示することにより、動物の供給体制の整備にも貢献した。これらの成果は、Wistar Hannover ラットを用いて実施される今後の毒性試験において、試験結果を正しく評価するための基盤技術として応用されることが期待される。

被毛異常を示す CV ラットについては、CV 系統×BN 系統の交配に引き続く連鎖解析により、*cv* 遺伝子を第 8 染色体上のセントロメア近傍 (約 10Mb の範囲) に位置づけることができた。これらの結果と異常個体の表現型から、*cv* 遺伝子は EGF/EGFR シグナル伝達系に何らかの異常を引き起こす新規遺伝子であると推測されるので、今後も引き続きシーケンシング解析による原因遺伝子の同定を予定している。

Wistar 系統に見出された 2 種類の四肢奇形ラットの解析では、多指症発症の原因となる *pd* 遺伝子を、先に述べた連鎖解析と同様の方法によって第 10 染色体上の q12 の領域に位置づけることができた。また、この位置情報に基づいてヒトやマウスの疾患データベースを調査したところ、多指症を引き起こすような突然変異の報告はなかったことから、*pd* 遺伝子が哺乳類の四肢奇形の発症に関与する新規遺伝子である可能性を示すことができた。欠指症を発症する MOD ラットに関しては、CGH 解析の結果から、Y 染色体上に奇形発症の原因であると示唆される欠失領域の存在を見出すことができた。また、この欠失を細胞遺伝学的に検出する方法を確立する必要があると考えられたため、欠失配列を含むと考えられるプローブを用いて予備的に FISH 解析を実施し、Y 染色体上にシグナルを観察することができた。これらの成果に基づき、四肢奇形発症の原因となる遺伝子変異を同定することができれば、先に述べた如く毒性試験の結果を正しく評価するための基盤として利用できるばかりでなく、レチノイン酸等の様々な化合物により誘発される四肢奇形の発症に関して、これまでにない知見が得られるものと期待される。

マウスを用いた性ホルモンに対する感受性を修飾する遺伝子群の解析では、RI 系統群を用いた QTL スクリーニングにより、多数の候補遺伝子領域を明らかにすることができた。また、C3H マウスと C57BL/6J マウスを用いて実施した解析においても、significant level の QTL 遺伝子座を 4 箇所検出することができた。これらの QTL 遺伝子座のうち、雌の子宮重量 (実質重量の体重比) を修飾する第 1 染色体上の QTL 遺伝子座については、有力な候補の一つである *Aqp12* 遺伝子にアミノ酸置換 (グリシン>グルタミン酸) を伴う SNP を見出すことができた。また、RI 系統群を用いた解析では *Pgr* (プロゲステロン受容体) 遺伝子と *Amh* (アンチミュラー管ホルモン) 遺伝子のタンパク翻訳領域に変異を検出でき、その他の QTL 遺伝子座の候補についても順次変異の

有無を調査中である。今後は、検出された遺伝子多型と生殖器官重量の個体差との関係を分子生物学的手法で検証することにより原因遺伝子を同定すると共に、アウトブレッドマウスを含む様々な系統におけるそれらの遺伝子の多型性を調査することにより、遺伝的基盤の整備に貢献したいと考えている。

本研究によって得られた成果は、いずれもがアウトブレッドマウスやラットの集団中に毒性実験の結果を解釈する上で支障となるような突然変異や遺伝子多型が数多く潜在している可能性を強く示唆するものであった。また、実際に我々の研究室においても、この様な変異や多型に起因する異常個体の出現によって、実験結果を正しく解釈することが困難となる事例を数多く経験してきた。しかし、使用実績が豊富であることや安価に入手できること等の理由から、アウトブレッド系統は今後も毒性学の分野において頻繁に用いられるものと推測される。さらに、特に生殖・発生毒性の分野においては、その繁殖能力の高さから、アウトブレッド系統が欠くことのできない実験対象であることは言うまでもない。本研究において、5年間にわたって実施してきた“アウトブレッド系統における遺伝学的基盤の整備”は、その成果として毒性実験の結果を解釈する上で有用な情報を提供すると共に、毒性学をはじめとする様々な分野における基盤技術として、アウトブレッドストック由来の集団が保持する遺伝子多型を理解することの重要性を喚起するものと考えられる。

## 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

研究者：岐阜薬科大学 分子毒性学：中西剛(代表研究者)、吉田一郎

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するためのモデル動物として、マウス胎盤にヒトアロマターゼと enhanced green fluorescent protein (EGFP)の融合タンパク質（AromEGFP）を発現するトランスジェニック（TG）マウス（AromEGFP-TG マウス）を作製した。また我々はこのマウスを用いて、過去にエストロゲン様化学物質のエストロゲン作用による影響として報告されている様々なフェノタイプについて検討を行ってきた。しかしながら、ほとんどすべての項目において有意な差が認められなかったことから、胎児期における過剰な ER シグナルは体重増加や生殖器官形成には本質的な影響を与えない可能性が示唆された。その一方で、胎児期の血中には $\alpha$ -フェトプロテイン（AFP）が存在しており、AromEGFP-TG マウスの胎盤から過剰に供給されたエストロゲンの胎児組織への移行が AFP により阻害されることで、エストロゲンの影響が見られない可能性が考えられる。この問題を解決するために我々は、ルシフェラーゼ遺伝子上流にエストロゲン応答配列（ERE）を連結した遺伝子を導入したレポーターTG マウス（E-Rep マウス）の作製を行った。その結果、これまでに 17 $\beta$ -エストラジオール(E2)投与によりルシフェラーゼ活性の上昇が認められるファウンダーTG マウスを得ることができた。今年度は他の E-Rep マウスのラインに関して、引き続きエストロゲンなどのエストロゲン様化学物質を投与してエストロゲン応答性などの characterization を行うと共に、妊娠レポーターTG マウスにも投与して、どの程度胎児においてレポーター遺伝子が活性化されるのかについて検討を行った。また胎児期においてエストロゲンやエストロゲン様化学物質に対する応答性の高い E-Rep マウスを選択して、AromEGFP-TG マウスと交配させることにより胎盤で過剰に産生されたエストロゲンが胎児のどの組織に移行して ER の転写を活性化しているのかについても検討を行った。

研究結果のまとめと考察：E-Rep マウスの成熟期におけるエストロゲン応答性について、これまで

我々は、エストロゲン様化学物質の胎児期曝露に与える影響として報告されている種々のフェノタイプについて、AromEGFP-TG マウスを用いて生殖器に与える影響を中心に再検証を行ってきたが、特筆すべき影響は確認できなかった。この原因の一つとしては先述のとおり、胎児血中に存在している AFP がエストロゲンの組織への移行を阻害している可能性が考えられる。すなわち胎児期の TG マウスに供給されているエストロゲンが不十分であるため、過去に報告されているフェノタイプが確認できていない可能性が考えられる。そこで、胎児期におけるエストロゲンシグナルを検出するために、E-Rep マウスを作製し、これらのマウスを交配させることでエストロゲンシグナルを検出することを計画した。まず今年度は、昨年度に引き続き新たに得られた E-Rep マウスについて、成熟期におけるエストロゲン応答性等の *characterization* を行った。その結果、雌雄のマウスともライン C が E2 に対して最も良い反応性を示した。また E-Rep マウスに導入した E-レポーター遺伝子には免疫組織学的な検討を行う際の普遍性を高めるために、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に Myc タグを付加している。今回、Myc タグが有効に機能しているかを検討するために抗 Myc 抗体で染色を行ったが、十分に機能していることが示された。すなわち E-Rep マウスは、*in vivo* イメージングによる動物個体レベルでの検討、ルミノメーターによる臓器レベルでの検討、および Myc タグを用いた細胞レベルでの検討とあらゆるレベルにおけるエストロゲンシグナルを検出できる系を構築できた。

一般的にレポーターマ TG マウスは、非特異的な発光やバックグラウンドの発光強度が問題となっている。これまでも Ciana ら (1, 2) や Lemmen ら (3, 4) のグループも、エストロゲン応答性のレポーターTG マウスを既に作製しているが、尾部や鼻、肉球等が非特異的に発光することが報告されている。一方で、我々が作製した E-Rep マウスでは、そのような非特異的な発光はすべてのラインで確認されなかった。これはおそらく我々の用いているルシフェラーゼ遺伝子が、非特異的な転写が抑制され、かつ優れたシグナル・ノイズ比を示す次世代ルシフェラーゼである Luc2 遺伝子を用いていること、またバックグラウンドを低く抑え、ダイナミックレンジを可能な限り広げた TATA box を含む最小プロモータ (Minimal promoter) を用いているためであると考えられる。さらに E-Rep マウスでは、免疫組織学的解析に普遍性を持たせるために、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に Myc タグを付加しているが、これもルシフェラーゼ活性が高かった精巣などで機能的に働いていることが明らかとなった。以上の点から、我々が作製した E-Rep マウスは、これまでに作製されたエストロゲン応答性のレポーターTG マウスよりもより良いレポーターTG マウスであることが明らかとなった。

### 基盤的研究課題(基盤3)：胎仔期、新生仔期の代謝機能と内分泌かく乱作用発現

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、佐能正剛  
広島国際大学 薬学部：杉原数美  
日本薬科大学 健康薬学科：北村繁幸

研究概要：昨年度までの研究により、ラットは成長に従い CYP 活性が上昇し、特に離乳期における CYP1A 発現上昇が顕著であるが、精製飼料(pure diet:AIN-93G)で妊娠時より飼育すると成長後も CYP 活性が低値を継続することより、ラット発達期における CYP 発現は一般飼料(normal diet)中の成分によって誘導を受けていることを明らかにした。また、近交系マウス(C57BL/6J)を用い、飼料の影響が肝薬物代謝酵素活性に変動を与える影響の再現性を確認し、ラットと同様の結果が得られた。本年度は、近交系マウス(C57BL/6J)を用い、2種の食餌による影響を肝での遺伝子発現と尿の<sup>1</sup>H-NMR-メタボローム解析で網羅的に検索を行った。肝の Gene chip 解析により、薬物代謝酵素およびその転写制御系の発現量に差異が認められ、normal diet 群での誘導も確認できた。それら以外に、pure diet 群ではコレステロール生合成系、脂質系の誘導が認められた。脂質類が薬物代謝酵素の発現に関与するいくつかの転写因子のリガンドであることより、精製飼料中の脂質類の不足が薬物代謝酵素発現低下の一因と考えられた。<sup>1</sup>H-NMR を用いた尿のメタボローム解析では、主成分分析により normal diet 群と pure diet 群、雌雄での群分けが認められ、taurine をはじめいくつかの相違物質が見出された。以上、発生・成長期の食餌成分が仔ラットの薬物代謝能等を変動し、環境化学物質曝露による影響に差が生じることが考えられる。

胎児期、新生児期の化学物質による影響の中で、特に甲状腺ホルモン系のかく乱作用は発達障害など重篤な影響を起こすことが懸念されている。そこで、甲状腺ホルモン受容体への環境化学物質のリガンド活性スクリーニングを行い、難燃剤である polybrominated diphenylether (PBDE)類、ヒト用および動物用医薬品、農薬類などから甲状腺ホルモン受容体結合物質を見出した。さらに、生体内での代謝活性化も想定して *in vitro* 代謝後のリガンド活性も検討し代謝により活性が発現する物質も検出した。

研究結果のまとめと考察：これまでの本研究で、ラットを用い胎仔期、新生仔期の飼料成分が肝薬物代謝酵素活性発達に著しく影響すること、さらに肝薬物代謝酵素活性が環境化学物質等による生体影響に大きく関わっていることを明らかとしている。マウス(C57BL/6J)を用い、妊娠前より一般飼料と精製飼料で飼育を行ったところ、ラットと同様に精製飼料では薬物代謝酵素活性が成長後も低

いという結果を得た。このように薬物代謝酵素活性は食餌成分によって影響を受け、低活性では外来化学物質の代謝・排泄が遅延し、化学物質の毒性影響が持続すると予測される。さらに、その他の食餌による影響を Gene chip および尿の  $^1\text{H-NMR}$  メタボローム解析で網羅的に検索したところ、コレステロール生合成系および脂質系への影響などが見出され、精製飼料中の脂質類の不足が影響していることが示唆された。

胎児期、新生児期に重篤な影響を及ぼすと思われる甲状腺ホルモン系への影響を示す物質を、受容体結合活性を指標としてスクリーニングした。臭素化難燃剤である polybrominated diphenylether (PBDE)類および生体内から検出されている水酸化 PBDE 類が結合活性を示すことを見出した。また、近年環境中より検出されているヒト用医薬品、動物用医薬品そして農薬類より、甲状腺ホルモン受容体結合活性を示す物質を検出した。動物用医薬品 biothirol ( $\text{IC}_{50}$ :  $2.7 \times 10^{-7} \text{ M}$ )および closantel ( $9.8 \times 10^{-7} \text{ M}$ )は、水酸化 PBDE よりかなり結合活性が高く環境汚染によるヒトや野生生物への暴露が懸念される。さらに、nitrofen や acifluorfen のように、代謝によりさらに活性が上昇するものも見出しており、生体内での代謝活性化も無視できない。



## 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

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

研究概要：我々は、甲状腺ホルモン(TH)受容体(TR)を中心とした核内受容体への環境化学物質による作用を、臭素化化合物(ポリ臭素化ジフェニルエーテル、PBDE)をモデルに主にインビトロ実験系を用いて解析し、(1)低用量でTR作用を抑制すること、(2)この効果はTR-DNA結合解離によること、(3)TRのDNA結合領域を介して作用することを報告した。本年度は新生ラット小脳初代培養細胞を用いて解析をすすめた。

1. ラット小脳初代培養細胞を用いてPBDEによる形態変化を調べた。低用量のPBDEはTHによる樹状突起伸長を抑制した。しかし、過剰量のTHでも抑制は完全には解消できなかったことから、TRを介する転写抑制以外の作用経路の存在が示唆された。
2. Purkinje細胞のみならず、小脳顆粒細胞初代培養細胞を用いてPBDEによる形態変化を調べた。予備実験ではPBDEはTHによる神経突起成長を抑制した。
3. 環境化学物質の発達期脳毒性がTRを介するシグナル伝達系のみでは説明できなかったことから、顕微測光装置を用いて細胞内カルシウムのリアルタイムイメージングを行い、PCB添加により細胞内カルシウムの変動の変化が認められた。
4. 動物個体を用いて、環境化学物質投与による発達期小脳における影響を解析するため先天性甲状腺機能低下ラット(rdw)繁殖系を確立し、行動解析を中心に行った。

本研究により、環境化学物質、特に臭素化化合物の作用機構において重要な知見が多く得られた。特に、PBDEは内分泌かく乱作用のみならず、その他の情報伝達系も介して神経発達に影響している可能性が示唆された。有力な候補として、神経細胞膜に対する直接的な影響が示唆された。したがって、今後の研究は「内分泌かく乱作用」という範疇ではなく、「神経毒性」という範疇で総合的に作用を解析することが不可欠であることが明らかになった。

研究結果のまとめと考察：本年度で臭素化ジフェニルエーテルによるTRへの作用の初代培養細胞系での発達期ラット脳への影響の形態学的解析法をPurkinje細胞及び顆粒細胞においてほぼ確立した。今後サンプル数を増やして確かなことを発信するとともに、様々な環境化学物質のスクリーニングに利用することを考えている。我々の行った解析から、今後の研究方針として、次のような事を考えている。

- (1) 環境化学物質の脳発達に対する影響は核内ホルモン受容体を介する系のみならず、細胞内カル

シウム、膜電位など多くの情報伝達系へ複合的に作用しており、いわゆる「内分泌かく乱作用」のみならず、各システムを総合的に解析していく必要がある。

- (2) 小脳の正常脳発達には複雑であり、5種のニューロンが存在し、発達の段階がそれぞれ異なる。このため、アッセイ系を確立するには個々の特徴をよく理解したうえでアッセイ系を開発する必要がある。
- (3) 今後、動物個体に対する影響を解析することは必要不可欠である。特に、環境からの刺激に対し、抵抗力の弱い個体に対する影響を解析していきたいと考えている。そのため、疾患モデル動物を用いた環境化学物質の影響の解析を行ってきたい。現在まで成長遅延、ホルモン感受性異常、骨形成不全、多動性や育仔放棄等の表現型をもつ様々な遺伝子改変/自然発症モデル動物の作製や特性の同定に成功している（下表）。今後、これらの脆弱/異常を持った個体における環境化学物質の影響について解析を進めていきたい。

現在、我々の研究室においては、インビトロ-株細胞レベル-初代培養細胞-動物個体（遺伝子発現、電気生理、行動解析など）の各実験系が複数確立することができ、環境化学物質の正常脳発達への影響を総括的・多角的に解析する基礎が整備されたといえる。

当研究室で作製及び管理している遺伝子改変/自然発症モデル動物

系 統	原 因	特 徴	論 文
Rdw rat	自然発症 先天性甲状腺機能低下症	成長遅延 小脳異常 行動量減少	<i>Endocrinology in preparation</i>
Ishibashi -rat	自然発症 Hoxの発現低下	先天性脊椎側弯/後弯症 骨形成不全	<i>Mol. Cell. Biochem. 2008</i>
	トランスジェニック L7プロモーター下流にGFP挿入	プルキンエ細胞にGFP発現 ⇒イメージング	
Staggerer mouse	自然発症 ROR $\alpha$ の機能欠損	成長遅延 小脳異常 神経成長因子/受容体異常	<i>Endocrinology 2007</i>
86 mouse	トランスジェニック：プルキンエ細胞 特異的変異甲状腺ホルモン受容体	リガンドと結合できない 甲状腺ホルモン受容体	
CIN85 Mouse	ノックアウト CIN85機能欠損	多動性と育仔放棄 ドーパミンシグナル異常	<i>EMBO J. 2010</i>

## 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

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

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。

申請者は、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・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。

そこで申請者は、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、系統学的・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、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。

研究結果のまとめと考察：

- 1) AHR を介した CYP1A 転写活性化能に関して、クロアシアホウドリはニワトリに比べて低感受性の鳥種であると推測された。
- 2) ダイオキシン類は、クロアシアホウドリの北太平洋野生個体群に AHR を介した影響を及ぼしている可能性がある。
- 3) ニワトリとは異なり、クロアシアホウドリでは両 AHR アイソフォームが CYP1A 転写活性化

に参与していることが示唆された。

- 4) 複数の AHR アイソフォームを有する鳥類のダイオキシン類毒性は、哺乳類研究から予想されるよりも複雑な機序によって惹起される。
- 5) 対象種の AHR を導入した *in vitro* レポーター遺伝子アッセイは種固有のリスク評価に有用である。
- 6) 核内レセプター (CAR・PPAR) と結合するリガンド候補物質の HTS 法の高感度化に成功した。
- 7) 各野生生物種の核内受容体タンパク質を固定した SPR センサーチップを作製することにより、より簡便・迅速かつ網羅的にリガンド候補物質が探索できる可能性を示した。

これら一連の結果は、野生生物の組織で核内レセプターが活性化されているかどうかについては、実験室でその種の核内レセプターの機能を調べれば予想できることを意味している。つまり将来は野生生物の組織を採取しなくても、試験管のなかで化学物質の影響が評価できるかもしれない。

## 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

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

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)や生殖系列系の異常がどのような分子、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分子、細胞レベルで解析する。すでに、我々の研究室では、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。また、新規遺伝子の機能解析のための遺伝子ノックダウン法(RNAi)が開発されている。本研究では、これらを駆使して、性ホルモンや内分泌かく乱化学物質を含む種々の化学物質で処理した稚魚や成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できると期待される。昨年度までに、ジエチルスチルベストロール(DES)の影響を解析してきたが、最終年度にあたる平成21年度は、DESについてさらに詳細な研究(特に、*in situ hybridization*による遺伝子発現解析)を行い、DESの影響と作用の分子メカニズムについて考察を行った。特に、DES自体の雌化作用、及び昨年度にDESのターゲットとして特定した*gsdf*の発現を機能についても詳細な解析を行った。

研究結果のまとめと考察:平成21年度の結果から、メダカのXY稚魚は、ジエチルスチルベストロール(DES)に対して高い感受性を示すこと(性転換を起こし機能的な卵巣を形成させる)、さらに、XY稚魚におけるDESの影響は、1)雄型遺伝子の発現を完全に抑制すること、2)DESは生殖腺に直接作用して卵巣の分化と形成を促進する、と推察される。一方、XX稚魚では、DES処理は卵巣分化、形成には大きな影響は及ぼさないが、1)DESは内因性の芳香化酵素遺伝子(*Cyp19a1*)の発現を抑制すること、2)DESは生殖腺に直接作用して卵巣の分化と形成を促進する、ことが明らかになった。

性決定遺伝子*dmy*の発現はDES処理後にも変わらないので、DESは*dmy*の発現に影響を与えない

と結論された。一方、本研究の *in situ hybridization* による発現解析の結果から、*gsdf* の発現は DES 処理によって著しく影響されることが確認された。受精後 8 日の XY 生殖腺で強い発現量を示した *gsdf* はその後 DES 処理後に減少し、受精後 18 日では発現はほぼ完全に消失した。*dmrt1* の発現も *gsdf* と同様な傾向を示したが、発現変動は遅れて起こり、また変動幅も小さかった。また、これらの雄特異的遺伝子とは異なり、XY 生殖腺の *cyp19a1* に関しては、対照群でも DES 処理群でも発現が認められなかった。しかし、DES 処理後に通常の飼育水で飼育した XY グループでは *Cyp19a1* の発現は著しく高まった。

本年度における、生殖腺体細胞での *in situ hybridization* による遺伝子発現解析の結果を総合すると、XY 生殖腺の体細胞では *dmy* が発現することで *gsdf* の発現が誘導され、その後さらに *dmrt1* が発現し、これらの働きで精巢が形成され、精子形成が徐々に進行すると推察される。本年度の *in situ hybridization* による観察結果から、*gsdf* と *dmy* が同一の体細胞（セルトリ細胞）で発現することが隣接切片による観察から明らかになったことから、*gsdf* は *dmy* 直下に働く重要な標的遺伝子である可能性が高まったといえる。また、*gsdf* の精巢形成における重要性は、この遺伝子のノックダウンにより XY 個体でも卵巣が形成されたことから明確に示された。一方、XY 生殖腺でも DES で処理することで、*gsdf* (*dmy* の発現は抑制されない) の発現が急激に抑制され、また飼育水中に DES が存在することで、本来精巢が形成されるはずの XY 生殖腺で卵巣が形成されると推察される (DES 存在下では *Cyp19a1* の発現はまったく認められない)。XX 個体でみられる DES 処理の顕著な影響は、本来ならみられる筈の *gsdf* の発現が認められないことである。しかし、このような個体でも DES 処理が停止されれば *gsdf* の発現は回復することが初めて明らかになった。すなわち、DES は稚魚期の雌雄生殖腺に作用して内因性の *Cyp19a* の作用は介さずに雌性化作用を促進することが明らかになった。この場合に DES は、XY 稚魚での *gsdf* の発現、及び XX 稚魚では *Cyp19a1* の発現を、それぞれ抑制する。今後、このような DES の生殖腺への作用メカニズムが、エストラジオール-17 $\beta$ による卵巣形成促進作用メカニズムと異なるのかを詳しく調べる必要がある。

## 20 年度採択フェージビリティースタディー研究課題(20F S 2) : 化学物質誘発性のエピジェネティック修飾による DOHaD モデルの検証

研究者：東京大学 医学系研究科：大迫誠一郎(代表研究者)

研究概要：近年、いわゆる環境ホルモンと呼ばれる化学物質が、動物実験において胎児期曝露により生後個体の形質に不可逆的变化を誘起することが示された。中でも行政的に胎児期影響の更なる詳細な検討が求められているビスフェノール A (BPA) はその作用が強いことが示されつつある。本研究では、いわゆる環境ホルモンが未知の受容体に結合した後、発生途上の各臓器内でゲノムのエピジェネティックな異常を引き起こすという仮説を立証するため、網羅的解析を中心にその標的遺伝子を割り出し、さらにはこの実験系を DOHaD モデルとして個体の感受性変化の発生的機構を明らかとすることを将来的な目的として実施した。

研究結果のまとめと考察：近年 BPA の胎児期曝露によるゲノム DNA の CpG メチル化変動を中心としたエピゲノムへの影響の報告がなされはじめています。Avy マウスに BPA 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を曝露すると agouti 遺伝子内に挿入されたトランスポゾンが低メチル化するために毛色が変わるという報告 (Dolinoy et al., 2007)、ICR/Jcl マウスに BPA 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を曝露すると胎児前脳の遺伝子のメチル化頻度が変化したという報告 (Yaoi et al., 2008)、胎生期 BPA 曝露を受けた SD ラットで Phosphodiesterase Type 4 Variant の遺伝子 DNA 低メチル化により DMBA 投与による前立腺癌発生に対して高感受性になったとする報告 (Ho et al., 2007) がそれに当たる。本研究では海馬の RNA と DNA を用いてそのような遺伝子プロモーターに変動を起こす遺伝子の探索を行った。追試験的意味合いを持つ本研究でも、上記の報告で認められた遺伝子は変動レベル、メチル化解析を実施したが、再現性がなかった。だが、Tceb2 および Grik4 は変動の方向性とメチル化レベルの方向性が一致しており、興味深い遺伝子を検出できたものと言えよう。両者とも中枢神経系の機能や病態に関連することが報告されており、今後詳細に解析する必要がある。

本研究は、胎児期低用量 BPA 曝露影響でエピジェネティック影響が残りうるか検討したものである。得られたデータのみでは、果たして仮説として立てた生後のエピゲノムへの影響が残った否か断定することはできなかったが、今後、マウスにおける低用量 BPA の生後発達影響に関して、再現性のあるエンドポイントの新たな発見や個体差と系統差を考慮した観点からさらに綿密に研究することが必要であることが示唆された。

本実験で網羅的メチル化解析に用いた方法は、次世代シーケンサーを用いた昨今のメチル化

CpG 解析メソッドに比べて低コストで複数のサンプルを処理できる利点を持ち、今回のような毒性学的解析には適している。残念ながら、明確に変動する遺伝子は捉えられなかったが、今後汎用性の面で改良を加えて行きたい。



## 20 年度採択フーズビリティースタディー研究課題(20F S 3) : メダカの再生産に及ぼす化学物質及びその代謝物の影響とトキシコゲノミクスによる作用機序の解明

研究者：熊本県立大学 環境共生学部：有菌幸司(代表研究者)

愛媛大学 沿岸環境科学研究センター：石橋弘志

研究概要：ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) やペルフルオロオクタン酸 (PFOA) などの有機フッ素化合物は、環境中で難分解性、生物に対して高蓄積性を示すことから、化審法により第二種監視化学物質に指定され、残留性有機汚染物質 (POPs) の新規候補物質に挙げられている。また、PFOS や PFOA などの有機フッ素化合物は魚類などの水生生物に蓄積することが報告されているが、その生態影響や毒性発現機序に関する研究はほとんどない。一方、フッ素テロマーアルコール (FTOHs) は有機フッ素化合物の製造過程の原料として使用され、8:2 FTOH はマウス肝臓中で PFOA に代謝され、環境中では微生物により PFOA に分解・代謝され、野生生物などの蓄積に関与すると考えられている。FTOHs の水環境中濃度に関する知見は皆無であったが、近年、下水処理場放流水や河川水で検出されることが報告された。また申請者らの最近の研究では、8:2 FTOH は雄メダカ肝臓中で卵黄タンパク前駆物質ビテロゲニン (VTG) を誘導することを明らかにした。そのエストロゲン様活性はビスフェノール A (BPA) よりも強いことから、POPs に指定されている PFOS や PFOA などの有機フッ素化合物のみならず、その潜在的汚染源 FTOHs も含め、水生生物に対する影響評価を行うことは急務である。生態系保全の観点からも、未だ雄の VTG 誘導と繁殖ステージでの受精率低下との相関性は不明であり、エストロゲン様作用を持つ化学物質群の再生産に及ぼす影響とその作用機序の解明は、化学物質の次世代影響を考慮した生態リスク評価を試みる上で極めて重要である。

そこで本研究では、メダカの再生産に及ぼす FTOHs およびその代謝物 PFOA の影響を評価し、トキシコゲノミクス手法によりその作用機序の解明を試みた。一方で BPA や NP 等の内分泌かく乱作用が指摘されている化学物質による雄の VTG 誘導と繁殖期における産卵数・受精率低下との相関性の解明が待たれている。そこで本研究では、DNA マイクロアレイを中心にトキシコゲノミクス手法と繁殖阻害試験などの生態毒性評価を共用した解析手法を活用して基礎 (標準) データを蓄積し、その内分泌かく乱作用機序の評価手法開発を試みた。

研究結果のまとめと考察：

- 1) 8:2 FTOH 500 および 1,000  $\mu\text{g/L}$  曝露群の雌メダカの平均産卵数は対照群と比較して有意な

減少を示した。また、1,000 µg/L 曝露群の雌メダカの平均受精率は対照群と比較して有意な低下を示した。これらのことから、メダカの繁殖に及ぼす 8:2 FTOH の最小影響濃度 (LOEC) は 500 µg/L、最大無影響濃度 (NOEC) は 250 µg/L と算出された。

2) 次世代影響を調査したところ、1,000 µg/L 曝露群の受精卵において孵化率の減少が確認された。また、より低濃度の曝露群において、血管が細くなり血溜まりを起こしている個体や尾が丸まっている個体が観察され、胚発生への影響が確認された。さらに奇形や孵化後の遊泳阻害など孵化仔魚に影響がみられる個体も観察された。

3) 繁殖阻害が見られた 8:2 FTOH 濃度 (1,000 µg/L) で曝露した雌雄メダカを対象に DNA マイクロアレイ解析をおこない、繁殖阻害に関与する遺伝子群の探索に成功した。雄では CHG、VTG、ZP および alveolin 遺伝子などが顕著に発現変動しており、これらは特に繁殖阻害に関与する可能性が高いと考えられた。一方、PFOA(10 mg/L)曝露では、8:2 FTOH ほど大きく変動している遺伝子は少なく、繁殖への影響も小さいのではないかと考えられた。

今後は、さらに曝露濃度や各臓器間を比較し、繁殖阻害に関わる遺伝子をより詳細に調査する必要がある。また、孵化仔魚において奇形等が見られ、次世代への影響が懸念されたことから、仔魚の遺伝子発現解析や受精卵のステージごとの遺伝子発現解析を行うことで、次世代への影響をより詳細に調べていくことが極めて重要であろう。

## 20 年度採択フェージビリティースタディー研究課題(20F S 4) : 海産無脊椎動物ホヤのトキシコジェノミクス基盤研究と生態調査

研究者：北海道大学大学院 薬学研究院：安住薫(代表研究者)

研究概要：海産無脊椎動物ホヤは進化的に無脊椎動物から脊椎動物への移行期の動物で、脊椎動物と無脊椎動物の両者に共通の生物学特性を有する。さらに、ホヤは固着型の濾過生活者であるため、ホヤ生息海域の海洋環境を知る上でよい指標動物になりえる。本申請研究では、ホヤを用いて海洋汚染物質が海産動物に与える影響を解明し、かつ、野生ホヤを海洋汚染の指標動物として活用するための総合的な解析基盤の確立をめざしている。本年度は以下の課題に取り組んだ。1) ホヤトキシコジェノミクス解析基盤の確立：ホヤオリゴ DNA マイクロアレイを用いて、11 種類の化学物質および金属イオン暴露ホヤ 60 個体の遺伝子発現プロファイル情報を得た。「安住式ホヤ遺伝子分類法」を用いて各化学物質、金属イオンがホヤの生体機能に与える影響を予測した。2) 胚発生と変態阻害の大量スクリーニング系の開発：ホヤの受精卵と幼生を用いて、化学物質の影響を一度に多数スクリーニングできるバイオアッセイ系を開発した。上記 11 種類の化学物質等のホヤ胚発生および変態に対する影響を調べた。化学物質等の種類によって発生・変態阻害の程度や異常胚の形態が異なることを見いだした。3) 日本沿岸のホヤ生態調査の実施：Web アンケートを作製し、(社)日本動物学会会員に送付して回答を得た。回答数は少なかったが、ホヤの発生に異常が生じる湾の情報が得られた。

研究結果のまとめと考察：

1) 有機スズ化合物 2 種類 (TBT、TPT)、金属塩化物 3 種類 (塩化銅、塩化亜鉛、塩化カドミウム) と電極遊離亜鉛イオン、内分泌攪乱物質と関連物質 5 種類 (NP、OP、BPA、SDS、pyrene) および 4 種類の溶媒について比較的濃度で 3 日間、カタユレイボヤ成体を暴露し、体内で生じる遺伝子発現の変動を大規模ホヤオリゴ DNA マイクロアレイを用いて解析し、遺伝子発現プロファイル情報を得た。各物質につき n=4 のアレイデータを入手し、統計処理を行なうことによって精度の高い解析データが得られた。各物質の暴露によって発現が変動する遺伝子の機能的なカテゴリーを「安住式ホヤ遺伝子分類表」を用いて同定することにより、各物質がホヤの生体機能に及ぼす影響を予測した。有機スズと金属イオンがホヤを含む海産無脊椎動物の胚発生や変態を阻害することはすでいくつかの報告がなされており、予測はリーズナブルであった。一方、哺乳動物のエストロジェン受容体に作用して内分泌を攪乱させる物質として注

目されている NP、OP、BPA は有機スズや金属イオンとは異なる遺伝子発現プロファイルを示し、ホヤの胚発生および変態を阻害する予測はなされなかった。アレイ解析の結果から得られた胚発生と変態阻害の予測は、ホヤの受精卵と幼生を用いたバイオアッセイの結果とよく一致していた。今後は、全部のアレイデータを統合して、化学的ストレスに対して共通に発現が亢進あるいは低下する遺伝子群、および各化学物質、金属イオンに特異的に応答する遺伝子群の詳細な解析を行なうことが課題である。

- 2) 今年度の大きな成果として、ホヤ受精卵と幼生を用いた大量スクリーニング系が確立できた。ホヤの産卵期であれば、1週間で 10,000 個の受精卵あるいは幼生を用いた発生および変態の阻害実験が可能になった。今後、顕微鏡画像を用いた受精卵等の計数方法を工夫すれば化学物質の影響評価試験として実用化も可能であると考えている。バイオアッセイの実施により、化学物質等の発生、変態の阻害効果を数値化できるだけでなく、化学物質等によって引き起こされるホヤ発生胚の形態異常の実態が明らかになった。化学物質等の暴露によって発現が変動する遺伝子群の情報の中には、各暴露物質のホヤ体内における作用機構の情報が含まれているので、今後の詳細な解析によって化学物質や金属イオンによる形態異常が遺伝子レベルで解明できることを期待している。さらに、化学物質等によるホヤ胚の形態異常の画像のデータベースを製作、公開することによって、将来的には、類似の作用機構を示す化学物質のスクリーニング等に役立つことと思われる。
- 3) 日本沿岸に生息するホヤの生態状況を把握するにあたり、今年度は Web アンケート形式で情報を収集することを試みた。アンケート実施により、問題点が明らかになったので、今後、情報収集のための新たな方法を考案していきたいと考えている。

## 20年度採択フェージビリティースタディー研究課題(20F S 5):多環芳香族炭化水素類の内分泌かく乱作用の構造活性相関に基づく魚鱗の化学物質スクリーニング法に関する研究

研究者：金沢大学 医薬保健研究域薬学系：早川和一(代表研究者)

金沢大学 臨海実験施設：鈴木信雄

京都薬科大学：細井信造

研究概要：本年度は、1) 酵母 two-hybrid 法で多環芳香族炭化水素(PAH)のキノン体(PAHQ)のエストロゲン様/抗エストロゲン活性を解析して相対活性強度を求め、2) PAHQ トロゲン様/抗エストロゲン活性の構造活性相関を求めた。さらに3) 再生ウロコを用いて高感度な評価システムを開発して、PAH の水酸化体(OHPAH)及び PAHQ の骨代謝に及ぼす作用を評価した。4) PAH の一つである benz[a]anthracene(BaA)をキンギョの腹腔内に投与して *in vivo* におけるウロコの細胞活性および血液中の Ca 濃度との関係を解析した。

- 1) PAH は、石炭燃料やディーゼル車からの排ガス粉塵に起因する大気汚染物質である。動物体内に入ると P450 により代謝される。既に代謝産物の一つである OHPAH に内分泌かく乱作用(エストロゲン受容体と結合する作用)があることが、酵母 two-hybrid assay によりわかってきた (Hayakawa et al., 2007)。そこで本年度は、OHPAH 以外の代謝物である PAHQ の内分泌かく乱作用を、酵母 two-hybrid assay を用いて評価した。その結果、3種の PAHQ でエストロゲン様活性が見られ、最も活性の強かったのは benzo[a]pyrene-3,6-quinone であった。一方、抗エストロゲン活性は11種の PAHQ で見られ、最も抗エストロゲン活性が強かったのは 1,2-chrysenequinone, benzo[a]pyrene-7,8-quinone であった。
- 2) 酵母 two-hybrid アッセイ法によりエストロゲン様/抗エストロゲン活性が見られた PAHQ の構造的及び物理化学的パラメーターとの関係について考察した。エストロゲン様活性を示す3種の PAHQ は、O-H distance (カルボニル基の酸素原子とそれから最も離れた水素原子間の距離)、第1イオン化エネルギー、双極子モーメント、log P (Pはオクタノール/水分配係数)のパラメーターがそれぞれ 10.290~11.519 Å, 8.526~9.029 eV, 4.909~5.556 debye, 3.462~3.782 の狭い範囲に存在した。抗エストロゲン活性を示す11種の PAHQ では、第1イオン化エネルギー、log P がそれぞれ 8.526~9.201 eV, 2.459~3.782 の比較的狭い範囲に存在した。これらのパラメーターの範囲が活性を示すための指標となる可能性が示唆された。
- 3) 魚のウロコは再生し、再生ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞活性が普通のウロコと比較して約3~5倍高いということに注目して、再生ウロコを用いた高感度なアッセイシステムを構築した

(Suzuki et al., 2010)。このシステムを用いて、BaA の 4-位水酸化体 (4-OHBaA) を評価した結果、普通のウロコでは  $10^{-7}$  M までしか検出できなかったが (Suzuki et al., 2009)、再生ウロコの系では感度が 100 倍以上向上し、破骨細胞は  $10^9$  M、骨芽細胞は  $10^{10}$  M でも検出できることが判明した。さらに benzo[a]pyrene (BaP) の 7,8-キノン体 (BaP-7,8-Q) でも  $10^9$  M で抑制作用が確認できた。

4) BaA は、一時的に血液中の Ca 濃度及び破骨細胞の活性を低下させた。その後、破骨細胞の活性が上昇するにつれて血液中の Ca 濃度が上昇した。一方、骨芽細胞の活性は、徐々に低下した。したがって、*in vivo* においても *in vitro* の作用が確認できた。今後、胆汁中の水酸化体の濃度を測定してウロコの細胞活性の変化と比較していく予定である。

研究結果のまとめと考察：昨年度報告した OHPAH に加えて、PAHQ においてもエストロゲン様/抗エストロゲン活性があることが酵母 two-hybrid アッセイにより判明した。さらに構造活性相関を調べた結果、エストロゲン様活性を示す 3 種の PAHQ は、O-H distance、第 1 イオン化エネルギー、双極子モーメント、log P のパラメーターがそれぞれ 10.290~11.519 Å, 8.526~9.029 eV、4.909~5.556 debye、3.462~3.782 の狭い範囲に存在した。抗エストロゲン活性を示す 11 種の PAHQ では、第 1 イオン化エネルギー、log P がそれぞれ 8.526~9.201 eV、2.459~3.782 の比較的狭い範囲に存在し、これらのパラメーターの範囲が活性を示すための指標となる可能性が示唆された。今後、ER に対して特異的に結合する蛍光物質と競合反応させる受容体結合試験法についても解析して、エストロゲン受容体 (ER) と試験物質との結合親和性を調べていく予定である。

本研究において、ウロコは再生するという特徴 (Yoshikubo et al., 2005) に注目して、再生ウロコを用いた評価システムを構築した。このシステムを用いて、過重力に対する応答も解析しており、哺乳類の培養細胞よりも非常に感度がよいことを証明済みである (Suzuki et al., 2010)。骨のモデルとしてのウロコの重力応答性が評価され、本年 5 月に「きぼう」の国際宇宙ステーションにおける宇宙実験を予定している。

ウロコという非常に優れた骨のモデルを用いて開発された再生ウロコの評価システムは、PAH 類に対しても応答性がよく、普通のウロコの系と比較して感度が 100 倍以上向上した。 $10^{10}$  M の 4-OHBaA を検出することに成功した。さらに酵母 two-hybrid 法でエストロゲン様活性が検出された BaP-7,8-Q においても、 $10^9$  M で骨芽細胞と破骨細胞の活性が低下することがわかった。今後、他の化合物についても解析していく予定である。

BaA をキンギョの腹腔内に投与するという *in vivo* における実験により、*in vitro* と同様にウロコの骨芽細胞および破骨細胞の活性が低下することがわかった。また、破骨細胞の活性が低下すると共に血液中のカルシウム濃度が低下して、破骨細胞の活性が上昇するにつれて血液中のカルシ

ウム濃度が上昇して、対照群と同じレベルにまで回復した。このことは、魚においてウロコは、血液中のカルシウム濃度を調節する重要な器官であることを示している。一方、骨芽細胞の活性は徐々に低下しており、予備的な試験では、その時に胆汁中に 4-OHBaA が検出されている。再生ウロコのシステムにおいて、4-OHBaA の毒性は骨芽細胞の方が強いという結果を考慮すると、BaA が体内で代謝され、その代謝産物である 4-OHBaA が骨形成を抑制している可能性が高い。今後、GeneChip により詳細な機構を調べていく予定である。

## 21 年度採択フィージビリティースタディー研究課題(21F S 3) : 構造活性相関に基づくステロイド膜受容体作用物質群の同定

研究者：静岡大学 理学部：徳元俊伸(代表研究者)

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 $\beta$ -DHP) が作られる。17,20 $\beta$ -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 $\beta$ -DHP は、通常、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。

代表研究者らは内分泌かく乱物質の一種であるジエチルstilbestrol (DES) が魚類の卵成熟を誘起することを発見し、さらにその標的分子が、ステロイド膜受容体であることを明らかにした。さらに、DES をサカナの生体に作用させた場合にも卵成熟を誘起することを示した。これらの結果は、内分泌かく乱物質の新しい作用を示したばかりでなく、その標的分子を明確にした点で注目すべき知見である。さらに内分泌かく乱作用を有すると疑われる 65 物質についてもステロイド膜受容体への作用を調べたところこれらの物質の中にもステロイド膜受容体に作用するものが存在することが明らかになり、天然のホルモンとほぼ同等の濃度で作用する 2 種類も見つかった。これらの物質については卵母細胞を用いた *in vitro* の卵成熟誘起実験、ゼブラフィッシュ生体を用いた *in vivo* の実験により、ステロイド膜受容体をターゲットとしたノンゲノミック反応に与える影響を調べたところ *in vitro* のアッセイのみならず *in vivo* のアッセイにおいても卵成熟、排卵の阻害効果を示した。これらの結果は環境水中にこれらの物質が存在した場合、魚類の産仔数の減少を引き起こすことを意味している。このように膜受容体に作用する内分泌かく乱作用の実例が示された今、より広範な解析が進められるべきである。本研究では既に確立された培養細胞を用いた実験系により、多くの化学物質群について膜受容体を介したノンゲノミック反応に与える影響を評価し、構造活性相関により作用構造の同定を進める。一方、より実用的な試験法として膜受容体分子を用いた新たな相互作用解析法の確立を目指す。本研究によりステロイドのノンゲノミック作用に影響を及ぼす化学構造の同定が期待される。

研究結果のまとめと考察：本年度の研究の構造活性相関解析では反応性が見られない化合物がほとんどであったがそれらの結果からこれまで活性が見られた化合物との構造比較からステロイド膜受容体との相互作用に必要な原子、側鎖の推定も可能であった。また、明瞭な反応性を示す新たな物質



も見つかったことから構造活性相関解析の有効性が確認された。今後も新規物質の検索を進めるとともに作用の明瞭なものについては構造類自体を入手してより詳細なステロイド膜受容体への結合構造を明らかにして行く。

一方、翻訳後修飾系を有することが知られている *Pichia* 株によりステロイド膜受容体が発現可能であることが示された。今後の可溶化と精製法の確立が鍵となるがステロイド膜受容体反応性物質のハイスループットスクリーニング系の実現へ向けて大きな前進が出来た。

## 21年度フーズビリティースタディー研究課題(21FS4):無脊椎動物(アミ類)における生殖・発生異常とその発生メカニズム

研究者：熊本県立大学 環境共生学部：古賀実(代表研究者)、有菌幸司、内田雅也

研究概要：当該研究では、甲殻類(アミ類)の発生・脱皮・生殖に関する内分泌調節機構に着目し、これらに対する影響を形態学的、生化学、分子生物学的アプローチから多角的に評価し、これまで不明な点が多かった甲殻類の内分泌調節機構について文献調査も含め基礎的知見を得るとともに、内分泌かく乱作用の疑われている化学物質による影響評価(ミジンコ及び魚類等と比較を含め)を試みることを目的としている。

研究結果のまとめと考察：平成21年度は以下の検討項目を調べた。

- 1) 実環境中における化学物質がアミ類を含めた小型甲殻類に与える影響を検討するために、文献調査を行い、環境化学物質の濃度と異常個体の出現に相関関係がみられているか調査した。小型甲殻類における自然界での内分泌かく乱現象は、Fordら(2003)の調査によりスコットランド沿岸でヨコエビ(*Echinogammarus marinus*)に間性現象(Intersexuality)が確認されており、日本においても仙台湾の奥湾でミツクリハマアミ(*Acanthomysis mitsukurii*)の間性個体がみつつかっている(Yamashita *et al.*, 2001)。これら間性個体はいずれも雄個体における性転換や二次性徴の形成異常が見られており、間性個体がみられた仙台湾の奥湾ではノニルフェノール(NP)およびビスフェノールA(BPA)がそれぞれ200~400 ng/l、10~280 ng/lの濃度範囲で検出されている。また、近年、西欧の汽水域におけるNPの検出濃度範囲は<0.2~12 µg/lであることが報告されている(Vethaak *et al.*, 2002; Petrovic *et al.*, 2002; Verslycke *et al.*, 2005)。そこで、これらの濃度を参考にNP異性体あるいはBPA活性代謝物などを含めた化学物質群の急性毒性影響を調べた。その結果、NP異性体は4-NPと毒性が異なることが確認された。また、BPAとその活性代謝物である4-methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene(MBP)の急性毒性試験を行った結果、MBPはBPAよりも毒性が強いことが示唆されたことから、MBPの実環境中濃度の調査およびMBPの長期曝露による影響評価が必要であると考えられた。
- 2) アミの成長・成熟へ及ぼす化学物質の影響を評価する端緒として、USEPA(米国環境保護局)で推奨されている成長・成熟試験(EPA method 1007)の改良を試み、内分泌かく乱化学物質への適用を試みた。EPA method 1007は、生後7日齢の個体を用いて7日間曝露試験を行い、曝露終了後の体長・湿重量・二次性徴から雌雄の判別を行う。しかしながら、曝露期間が短く、

生殖腺の発達が行われていない可能性を考慮しなければならない結果を得た。さらには、甲殻類の内分泌系により制御されている明確な表現系の促進・阻害影響を判断できなかった。そこで、我々は曝露期間を14日間に延長し、影響指標として体長と正相関を示し奇形などの指標として用いられる頭胸甲長の測定と、アミの卵形生への影響を調べることを目的とした抱卵雌個体数を新たに追加した。さらに、内因性ホルモンにより制御され、成長に直接関連する脱皮行動に着目し、形態学的に脱皮数及びその頻度を観察することで、甲殻類に対する内分泌かく乱化学物質の影響評価を行う、より脱皮に着目した無脊椎動物試験法へと改良した。この生物影響試験法を用いて、NPについて曝露試験を実施したところ、環境中存在濃度に近い濃度(1 µg/l 以上)のNPはアミの成長阻害を引き起こした。また曝露期間中、毎日脱皮殻を観察し、脱皮数から累積した総脱皮数についても対照区と比較し有意な低下が認められたことから、NP曝露によりアミの脱皮が顕著に抑制され、それに伴い環境中存在濃度に近い濃度において成長及び成熟の遅延が誘起されることが示唆された。

3) 発生・脱皮・生殖を制御する 20-hydroxyecdysone の測定を行うため、競合免疫測定法(EIA)による測定法の確立を行った。抗 20-hydroxyecdysone 抗体及び HRP 標識 20-hydroxyecdysone を用いて競合 EIA の確立を行った。抗体及び HRP 標識抗原の希釈倍率を最適化し、0.03~100 ng/ml の定量範囲で良好な 20-hydroxyecdysone の標準曲線を得ることができた。また、0.8 及び 4 ng/ml の既知濃度の 20-hydroxyecdysone を添加し、添加回収試験を行った。0.8 ng/ml 添加において平均 108 %、4 ng/ml 添加においては平均 102 % の良好な回収率を得ることができた。以上のことから、競合 EIA により 20-hydroxyecdysone の測定法を確立できた。

本研究では、アミ *Americanysis bahia* をモデル生物として、NP 異性体あるいは BPA 活性代謝物などを含めた化学物質群の急性毒性影響を調べ、親化合物とは異なる毒性影響を示すことを明らかにした。次に、USEPA で推奨されている成長・成熟試験(EPA method 1007)の改良を試み、エクジステロイドによって制御される脱皮に着目し、形態学的に脱皮数(頻度)を観察することで、甲殻類に対する内分泌かく乱化学物質の影響評価を多角的に評価できる新規無脊椎動物試験法を確立した。また、エンドポイントとして追加した頭胸甲長は、単に成長抑制だけではなく、体長と比較することでその形態学的異常を把握することが可能であり、化学物質が成長へ及ぼす影響を感度よく調べるができる有効な指標であることが示唆された。確立した試験法を用いて NP の成長・成熟試験を実施したところ、水環境中で検出される濃度の NP 曝露はアミの成長阻害や総脱皮数の減少を惹起する可能性が高いことを明らかにした。これらは、NP の曝露によってアミの脱皮が顕著に抑制され、それに伴い成長・成熟の遅延が誘起されているものと考えられた。そこで、NP による脱皮抑制の作用機序解明を試みるため、20E の測定系として競合法に基づく酵素免

疫測定法（EIA）を構築した。本研究ではアミを対象としたため、エクジステロイド測定に使用する個体数は3個体が最も良好であった。また、エクジステロイドはステロイド骨格を有するホルモンであるため、従来の抽出法が十分適用可能であった。すなわち、構築した20E-EIAは試料の諸検討（個体、組織、血清、組織培養などの選択や抽出液の希釈や濃縮）を行うことで、他の甲殻類におけるエクジステロイド測定法として使用でき、かつ定量を簡便、迅速に行うことが可能である。さらに、実験施設に制約のあるラジオアイソトープを使用しない定量法として有効である。

以上のことから、アミは化学物質の影響評価指標生物として非常に有用であることを示唆し、作用機構解明に向けたツールとして、発生および脱皮を制御する内因性ホルモンの測定系を確立することができた。今後、内分泌かく乱あるいは毒性発現に関わると考えられる受容体や酵素などの生体分子の機能を解析し、新規バイオマーカーの検索を行う必要もある。

## 21 年度その他の研究課題(課題 1) : ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析

研究者 : 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 : 井口泰泉(代表研究者)、加藤泰彦、小林かおる  
大阪大学大学院 工学研究科 : 渡邊肇

研究概要 : 内分泌かく乱作用については科学的に未解明な点が多いことから、その影響に関連した作用メカニズムを細胞・遺伝子・分子レベルで解明していくことが重要である。中でも内分泌かく乱化学物質により引き起こされる一連の遺伝子の発現変化と、それにより引き起こされる細胞レベルでの変化などを明らかにすることは、内分泌かく乱作用のメカニズムの解明への糸口となる。

こうした試みは従来、実験動物や魚類を中心として進められてきた。しかし、今後生態系への影響を明らかにしていくためには、研究対象を、生態系を構成する生物種に広げて解析を進めていく必要がある。特に無脊椎動物においては、様々な影響が報告される中で、作用メカニズムを解明するための基礎的な知見は非常に限られている。OECD(経済協力開発機構)EDTA(内分泌かく乱タスクフォース)VMGeco では、無脊椎動物(アミ、コペポッド、ユスリカ、オオミジンコ、マキガイ)を用いた試験法の開発を行っている。これらの生物においては生殖試験を内分泌かく乱の検出試験と位置付けており、個体レベルへの影響に主眼がおかれている。

近年になって、我々はオオミジンコでは、殺虫剤として使用されている幼若ホルモン類似物質が単為生殖でメスしか生まないオオミジンコにオスを産ませることが見出した。この知見に基づいて日本はTG211生殖試験に、性比をみるエンドポイントを追加することを提案し、承認された。さらに、我々は現在までに、オオミジンコの遺伝子を整理し、マイクロアレイを開発した。OECDで用いているアミ、ユスリカ、コペポッドでは遺伝子情報も得られていないため、オオミジンコを用いた化学物質の作用メカニズムの理解が国際的に期待されている。

昆虫を中心とした無脊椎動物においては、脱皮ホルモンと幼若ホルモンが個体発生や成長に関わっていることが知られている。脱皮ホルモンについては、ショウジョウバエなどを中心としてその受容体や関連遺伝子の解析が進んでいる。我々も、オオミジンコの脱皮ホルモン受容体のクローニングおよび脱皮ホルモン遺伝子を組み込んだレポーターアッセイを確立してきた。一方、幼若ホルモンについては、その受容体についてすら明らかになっておらず、不明な点が多い。特に幼若ホルモンが単為生殖と有性生殖とのスイッチングに関与しているという現象は従来知られておらず、無脊椎動物における内分泌系の発生、生殖への関与を理解する上で興味深いモデルとなる。そこで本研究では、このミジンコのオス産生の誘導をモデルとして、無脊椎動物における

内分泌かく乱作用の分子レベルでのメカニズムの解明を目指す。これにより、拡張板 TG211 生殖試験を分子レベルからサポートすると同時に、無脊椎動物におけるホルモンと性についての基礎的な知見を得る。

研究結果のまとめと考察：我々は通常は単為生殖をするミジンコにおいて、幼若ホルモン様化学物質を曝露した場合に、オスの産生が誘導されることを見出している。また前年度までの DM ドメイン遺伝子の解析と、性決定関連遺伝子の解析によって以下のことが明らかになってきた。

- 1) ミジンコにフェノキシカルブを 1 $\mu$ g/l の濃度で曝露することにより、通常の条件ではメスしか生まないミジンコが 100% オスを産むようになる。
- 2) 曝露直後に産まれた個体は、化学物質の影響を受けずに全てメスとして産まれるが、2 回目に産まれる個体は化学物質の影響を受けており全てオスとして産まれてくる。
- 3) 一連の曝露による解析から、フェノキシカルブのみならず、ピリプロキシフェン、メトプレンなど、昆虫、甲殻類の幼若ホルモン様化学物質がオスの産生を誘導することが可能である。
- 4) こうした幼若ホルモン様化学物質によるオス産生は、*Daphnia magna* のみならず、*Daphnia* 属以外の、*Ceriodaphnia reticulata*, *Ceriodaphnia dubia*, *Moina macrocopa*, *Moina micrura* などにおいても誘導されることを確認し、比較的広範囲のミジンコにおいて共通に生じる現象である。
- 5) ミジンコが幼若ホルモン様化学物質によって性決定に影響を受けるのは、卵成熟の比較的後期、排卵の 8~7 時間前の非常に限られた時間である。
- 6) 多くの生物種において保存されている DM ドメインをもつ遺伝子がミジンコにも存在する。
- 7) これら DM ドメインをもつ遺伝子には、性特異的な遺伝子発現をする遺伝子が存在する。
- 8) DM ドメイン遺伝子を制御する遺伝子は、生物種間で異なり、ミジンコにおいては、ショウジョウバエなどとは別のメカニズムによって DM ドメイン遺伝子の性特異的な発現が制御されている。

オオミジンコにおいては、無脊椎動物試験で用いているアミ、コペポッド、ユスリカとは異なり、オオミジンコの EST データベース、アメリカで終了したオオミジンコの近縁種ミジンコ (*Daphnia pulex*) のゲノム配列や、現在進行中のオオミジンコのゲノム解読のデータベースを効率よく利用できるようになっており、マイクロアレイ法によるゲノミクスも可能となった。ところが、他のモデル生物とは異なり、遺伝子機能解析実験を *in vivo* で行う方法が全く開発されておらず、本研究課題を進める上での大きな問題の 1 つとなっている。今年度における進展の 1 つは、オオミジンコへの遺伝子導入とオオミジンコ体内で外来遺伝子を異所的に発現させる方法を

開発したことである。未だ改善する点が多いが遺伝子導入法によりトランスジェニックオオミジンコを作製することもできるようになり、本研究期間で明らかにしてきた性決定関連遺伝子などの機能解析を *in vivo* で行うことが可能となる。また将来的には、環境変化に応答するレポーター遺伝子をもつトランスジェニックミジンコを作製することで、*in vivo* での毒性評価を遺伝子レベルで行うことも可能となる。

本研究課題を進める上でのもう1つの問題点は、幼若ホルモンの受容体が未だ昆虫類においても解明されておらず、幼若ホルモンの多様な生理作用も相まって、その作用機序がほとんど明らかにされていないことである。そこで、幼若ホルモン作用の分子メカニズムの解明の基礎として、マイクロアレイを用いた幼若ホルモン応答遺伝子の網羅的解析を行った。本研究で明らかとなった幼若ホルモン応答遺伝子のプロモーター領域を解析することで、幼若ホルモン応答配列を明らかにすることができる。これは、今後幼若ホルモン受容体の探索につながるものである。また、幼若ホルモン応答性の顕著な遺伝子については、幼若ホルモン活性を示す化学物質のスクリーニングのためのマーカー遺伝子として利用可能である。本解析系を用いることで、2日で化学物質の幼若ホルモン活性を測定することができ、21日間を必要とする拡張版 TG211 よりもさらに迅速な評価系となり得る。

## 21 年度その他の研究課題(課題 2) : 魚類エストロゲン受容体を用いた種特異性・リガンド特異性の *in vitro* スクリーニング系開発

研究者：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：井口泰泉(代表研究者)、宮川信一、小林かおる

研究概要：本研究は、OECD からの要請もあり、化学物質の魚類への影響評価を行うための物質選定の際に利用可能な、魚類のエストロゲン受容体(ER)を用いた化学物質のスクリーニング系の開発を目的として行っている。

OECD では、動物愛護の観点から、化学物質のスクリーニングに使用する魚の数を減少させることが求められており、日本、イギリスおよびスウェーデンに対して、ER タンパクへの結合試験、ER 遺伝子を哺乳動物の細胞に組み込んだレポーターアッセイ系の利用などについてまとめるように要請を受け、Detailed Review Paper としてまとめて OECD に提出している。メダカの ER タンパクを用いた結合試験については、環境省予算により化評研で行われた。この受容体結合試験では受容体への結合は明らかとなるが、エストロゲン作用をもつのか、抗エストロゲン作用を示すのかは明確にできない。このためには、レポーター遺伝子アッセイの方が適当と思われる。複数の魚種の ER 遺伝子を用いたレポーター遺伝子アッセイ系を開発していたのは日本だけであり、OECD で用いている試験動物種(魚類のメダカ、ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノー、トゲウオからエストロゲン受容体遺伝子をクローニングし、内在性の ER を持たない細胞に、レポーター遺伝子とともに組み込んだ、レポーターアッセイ(トランスアクチベーションアッセイ)系を開発した。イギリスでエストロゲン作用を受けていることが明らかとなっているコイ科の魚のローチ、日本のコイに加えて、キンギョ、ブルーギルおよびグッピーの ER 遺伝子も用いて、9 種類の魚種のエストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ ) を用いたレポーターアッセイ系を構築し、合計 12 物質のエストロゲン活性を解析した。現在までのメダカを用いた環境省の試験に用いられた 3 物質、DDT 関連の 6 物質、合成エストロゲンのジエチルスチルベストロール、ホルモン補充療法に用いられており、イギリスの河川中から見出されている妊馬のエストロゲンであるエクイリンおよび殺菌剤として汎用されており、河川水中からも検出されているトリクロサンを用いた。ポジティブコントロールとしては 17 $\beta$ -エストラジオールを用いた。エストラジオールに対しては魚種間での差はほとんどないが、DDT 関連物質やトリクロサンなど化学物質に対する応答には種差が存在することが明らかとなった。また、イギリスより、レポーターアッセイの技術習得のために研究者が我々の研究室に 2 か月滞在した。



一方、真骨魚類では遺伝子重複が起こっており、エストロゲン受容体はエストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ )、エストロゲン受容体 $\beta$ 1 (ER $\beta$ 1)、エストロゲン受容体 $\beta$ 2 (ER $\beta$ 2)の3種類が存在する。メダカおよびゼブラフィッシュの3種類のER遺伝子をクローニングして、レポーター遺伝子アッセイ系を立ちあげ、複数の化学物質を用いて、ERサブタイプに特異性があるか否かを調べた。メダカおよびゼブラフィッシュともに、エストラジオールに対しては3種類のERはほぼ同じように応答したが、ビスフェノールA、ノニルフェノールおよびオクチルフェノールに対しては、ER $\alpha$ はほぼ同じ応答を示したが、ER $\beta$ 1の応答が極めて低く、ノニルフェノールおよびオクチルフェノールはレポーター活性を上げなかった。ER $\beta$ 2では、オクチルフェノールとノニルフェノールはビスフェノールAよりも強く応答した。

以上の結果から、真骨魚類の3種のERの機能を明らかにし、どのERサブタイプのレポーターアッセイ系を用いることが、*in vivo*でのビテロゲン発現を予測できるかを明らかにすることが必要である。

研究結果のまとめと考察：現在までに、OECDや各国の試験魚、環境調査の対象魚として用いられている9種類の魚種（メダカ、ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノー、トゲウオ、ローチ、コイ、ブルーギル、キンギョおよびグッピー）のER $\alpha$ 遺伝子を新たにクローニングし、HEK293細胞にレポーター遺伝子とともに組込むことにより、レポーター遺伝子アッセイ（トランスアクチベーションアッセイ）系を確立した。

これら9種類の魚種のER $\alpha$ のトランスアクチベーションアッセイにより、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDT、*o,p'*-DDE、*p,p'*-DDE、*o,p'*-DDD、*p,p'*-DDDのエストロゲン活性を調べたところ、メダカ、トゲウオ、ブルーギル、グッピーのER $\alpha$ の感受性が高く、コイのER $\alpha$ の感受性が最も悪く、キンギョがそれに続いた。また、*o,p'*型の方が、*p,p'*型よりもエストロゲン活性は強い。

ビスフェノールA、ノニルフェノール、オクチルフェノールは、いずれもER $\alpha$ の転写活性を引き起こし、ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノー、ローチのER $\alpha$ は、BPA、NP、OPに対する感受性があまり変わらないが、他の魚は、ビスフェノールAよりもノニルフェノール/オクチルフェノールに対する感受性が高い。また、エストラジオールのEC<sub>50</sub>を100とした時の他の化学物質の比活性を計算したところ、メダカ、トゲウオ、ブルーギル、グッピーのER $\alpha$ の比活性が他の魚類よりも高い（より、17 $\beta$ -エストラジオールの活性に近い）事が明らかとなった。

9種類の魚類ER $\alpha$ に対する種特異性・リガンド特異性を調べた。その結果、明らかに種によって化学物質に対する感受性の差が認められた。例えば、グッピーやメダカは感受性が高いが、コイやキンギョなどは、感受性が低いことがあげられる。これは、ER $\alpha$ のアミノ酸配列の相同性の比較から、メダカのリガンド結合領域は、グッピーやブルーギルでは90%以上の相同性を示すが、

コイやキンギョでは 80%台に留まっている事が原因だと思われる。また、コイ科の魚よりもそれ以外（メダカ科やカダヤシ科など）の ER $\alpha$  がより化学物質に対する感受性が高い。また、単純にエストロゲンに対する感受性が高ければ、化学物質に対する感受性が高まるという訳ではないと考えられる。というのは、キンギョの 17 $\beta$ -エストラジオールに対する活性 (EC<sub>50</sub>) はブルーギルの活性とほぼ同じであるが、化学物質に対する活性は、ブルーギルの ER $\alpha$  の方が断然高い結果が得られている。このことは、エストロゲンが受容体と結合するポケット領域以外のアミノ酸が化学物質との結合（認識）に重要な役目を担っている可能性を示している。

真骨魚類は進化の過程で遺伝子重複が起こっており、3 種類のエストロゲン受容体(ER $\alpha$ 、ER $\beta$  1、ER $\beta$  2)、2 種類のアンドロゲン受容体(AR $\alpha$ 、AR $\beta$ )がある。そのため、ER のどのサブタイプがエストロゲンの作用を媒介しているのかは、現在のところ不明である。従って、メダカおよびゼブラフィッシュから 3 種類の ER をクローニングし、レポーター系を確立して、リガンドに対してそれぞれ受容体のサブタイプの応答性を調べた。メダカとゼブラフィッシュともに、3 種類の ER サブタイプはエストラジオールに対しては、同じように応答したが、ビスフェノール A、ノニルフェノール、オクチルフェノールに対しては ER $\alpha$  と ER $\beta$  2 は応答がよいが、ER $\beta$  1 はビスフェノール A にわずかに応答したのみで、ノニルフェノールおよびオクチルフェノールには応答しなかった。

*in vitro* のレポーターアッセイの結果をもとに、*in vivo* 曝露の影響を類推するためには、今後、*in vivo* で魚に曝露した時のビテロゲニン遺伝子の発現等とレポーターアッセイのデータをあわせて検討することが必要である。また、ヒトの ER 遺伝子 $\alpha$ を用いたレポーターアッセイの結果と、魚類、両生類を含めた野生生物の ER 遺伝子を用いたレポーターアッセイを比較することにより、エストロゲン類似物質に対する反応性を、ヒトを含めた種差としてとらえることが可能となる。

これまで、1 種類のエストロゲン受容体に対する化学物質の感受性を調べる研究は多くなされてきたが、複数種の受容体を同じ方法で調べ比較検討する研究報告はなかった。本研究は、同じ魚類でも種によって化学物質に対する感受性が大きく異なっている事を明確に示したことが、非常に意義深いと思われる。また、比較的容易に複数種類の受容体に対する感受性の差を調べることが可能であり、種特異性・リガンド特異性を調べる方法としては、非常にパワフルな方法である。調べる化学物質の種類を増やしてデータベース化することにより、OECD の VMGeco や VMGnon-animal グループとデータを共有し、国際貢献に資することができる。

今後、さらに化学物質を増やすこと、ER $\beta$  1 および ER $\beta$  2、さらにアンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体及び副腎皮質ホルモン受容体に広げる必要がある。特に、エストロゲン受容体に関しては、真骨魚類では 3 種類が見いだされているが、それぞれの受容体の機能分化についての研究は行われていないので、エストロゲン受容体の機能分化の研究も必要である。ちなみに、

マウスを用いたエストロゲン受容体の機能分化の研究は、ノックアウトマウスの利用により、生殖に機能しているのは主として  $ER\alpha$  であることが分かっている。また、調べる魚類の種類を増やす事により、魚類にとって感受性が高い化学物質を特定することが可能となり、また詳細な種特異性をあきらかにすることが期待できる。本研究は、*in vitro* のアッセイ系を用いて種特異性・リガンド特異性を調べたものであり、次のステップとして実際に *in vivo*（例えば、魚個体を化学物質の含んだ水で飼育する等）で、ビテロゲニン産生を指標にした調査を行い、*in vitro* の結果との感受性の比較が必要となると考えられる。