

メダカビテロゲニン cDNA のクローニング及び RT-PCR を用いた ビテロゲニン mRNA 量の定量法の検討

○村上秀和¹、横田弘文²、中井 誠¹、矢可部芳州¹、高月峰夫¹

¹(財) 化学物質評価研究機構・安全性評価技術研究所、²(財) 化学物質評価研究機構・久留米事業所

環境中に存在する化学物質による内分泌攪乱作用が懸念されているが、その詳細については未知の部分が多く早急な解明が必要となっている。こうした現状の中、これまでに、様々な評価法が開発されてきた。その中で、女性ホルモン作用を有する内分泌攪乱物質の検出法として、魚類のビテロゲニン (VTG) をバイオマーカーとして利用する方法が注目されている。そこで、本研究では RT-PCR による VTG mRNA の定量法の確立を検討した。

まず最初に、既に報告されている他の魚類の VTG の保存領域からプライマーを設計した。これを用いて、メダカ (雌) 肝臓 cDNA を鋳型とし、PCR により部分領域を増幅した。この部分領域の塩基配列を基に、RACE 法を用いて VTG II cDNA (全長 5,323bp) を単離した。得られた cDNA の塩基配列は他の魚類と高い相同性を示した。次に、RT-PCR 法による VTG mRNA 量の定量法を行うために、メダカ VTG II cDNA を特異的に増幅させるプライマーを設計し、6-FAM で標識した。PCR 増幅産物について、オートシーケンサーを用いた検出及び定量法を検討した。

cDNA cloning of vitellogenin in the liver of Medaka (*Oryzias latipes*) and investigation of quantitative RT-PCR to the analysis of its mRNA levels.

○Hidekazu Murakami¹, Hirofumi Yokota², Makoto Nakai¹, Yoshikuni Yakabe¹, and Mineo Takatsuki¹

¹Chemicals Assessment Center, Chemicals Evaluation and Research Institute, ²Kurume Laboratory, Chemicals Evaluation and Research Institute

It has been of great concern that some environmental chemicals cause the disruption in endocrine system of wildlife. To study such affection, development of simple and reliable bioassay is desired. Vitellogenin (VTG) has been proposed as an biomarker for detection of estrogenic effects of endocrine disruptors. In this study, We investigated a method to quantitate hepatic VTG mRNA in medaka using competitive RT-PCR.

At first, a partial region of a VTG II cDNA was amplified from medaka liver by polymerase chain reaction (PCR) method. The 5' and 3' end portion of the cDNA was obtained by the rapid amplification of cDNA ends (RACE) method and sequenced. As a result, it was found that medaka VTG II cDNA was 5,323 bp long, and have high similarity to those from other fish. Specific primers for competitive RT-PCR were designed and labeled with 6-FAM. Detection and quantification methods of amplified products using auto sequencer were examined.