

メダカエストロゲンレセプター β のクローニングと化学物質の受容体結合性

○信川貴子^{a,c}、中井 誠^a、浅井大輔^b、矢可部芳州^a、高月峰夫^a、下東康幸^b

^a(財)化学物質評価研究機構・安全性評価技術研究所、^b九大院・理・分子科学、^c新エネルギー・産業技術総合開発機構

最近、化学物質の生産の増加とその排出によって、環境中に残留する化学物質が野生生物や人の内分泌系に影響を及ぼすことが問題になっている。そこで、本研究では魚類への内分泌攪乱作用の影響を評価するために、メダカ肝臓 cDNA からメダカエストロゲンレセプター β を単離し、その受容体のリガンド結合領域 (LBD) に対する化学物質の結合性を測定した。

まず、既に報告されている魚類のエストロゲンレセプター β の保存領域からプライマーを設計し、メダカ肝臓 cDNA を鋳型に用いた PCR によって部分領域を増幅した。その結果、RACE 法によって、翻訳領域及び非翻訳領域を含む全長 2.3kb の cDNA を得た。このレセプターの DNA 結合領域及び LBD は、他の魚類と高い相同性を示した。次に、レセプター-LBD を発現ベクターに導入し、大腸菌を用いてグルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質として発現し、化学物質のレセプターに対する競争結合試験を行った。その結果、アルキルフェノールの受容体結合性は、これまでにヒトで得られている結合性と比較してメダカでは 10 倍程度強く、分岐型アルキルフェノールの強い結合性が明らかになった。

この研究は環境省「内分泌攪乱化学物質の生態影響に関する試験法開発」の一環として行ったものである。

cDNA cloning of estrogen receptor β from Medaka (*Oryzias latipes*) and binding properties of chemical substances to the receptor

○Takako Nobukawa^a, Makoto Nakai^a, Daisuke Asai^b, Yoshikuni Yakabe^a, Mineo Takatsuki^a, and Yasuyuki Shimohigashi^b

^aChemicals Assessment Center, Chemicals Evaluation and Research Institute, ^bDepartment of Molecular Chemistry, Graduate School of Science, Kyushu University, ^cNew Energy and Industrial Technology Development Organization

Recently, it becomes a problem that certain classes of environmentally persistent chemicals have adverse effect on endocrine systems of wildlife and human, because of increases of the production and release of chemical substances. Thus, in order to evaluate the effects of endocrine disruptors on fish in the aquatic ecosystem, we newly isolated Medaka (*Oryzias latipes*) estrogen receptor β (kER β) cDNA from the liver, and measured binding properties of chemical substances to kER β ligand binding domain (LBD).

At first, degenerated primers were designed based on the sequences that were highly conserved among fish ERs β , and a partial region of kER β cDNA was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using liver cDNA library as a template. The 2.3-kb cDNA was obtained by the rapid amplification of cDNA ends (RACE), and was found to have a high sequence homology in the DNA-binding domain and LBD compared to other ERs β and kER α . The expression vector was prepared by inserting the LBD of kER β cDNA and fusion protein with glutathione S-transferase was expressed in *E. coli*. The binding affinities of chemical substances were measured by competitive receptor binding assay. Consequently, it was found that the binding affinities of alkylphenols for the receptor were approximately 10 times higher than those for human ER and alkylphenols with branched alkyl chains bound to the receptor with higher affinity than those with linear alkyl chains.

We acknowledge Ministry of the Environment, Japan for their financial support of this work.