

メダカビテロゲニン遺伝子によるエストロゲン様化学物質の評価法

○西川 智浩、白石 寛明、森田 昌敏 (国立環境研究所)

目的 ビテロゲニン (VTG) は卵黄タンパク前駆体でありメス特異的に合成されるが、エストロゲン存在下ではオスでも合成が誘導される。この現象を利用して、魚類雄中の VTG タンパクの定量によるエストロゲン活性の評価法が検討されている。今回、我々はヒメダカの同遺伝子 (*vtgI*) の全長をクローニングし、その発現をリアルタイム RT-PCR 法により定量することによって、短時間でエストロゲン様活性を評価することを試みた。さらにエストロゲンのアンタゴニスト活性の評価も検討したので報告する。

方法 アゴニスト試験には 17β -エストラジオール (E2)、ノニルフェノール、ビスフェノール A およびアンタゴニスト試験にはタモキシフェンを試験物質とし、2L のビーカーを水槽として 3 濃度区で成魚雄ヒメダカ各 5 匹、水温 25°C で半量ずつ毎日換水して曝露を行った。肝臓から全 RNA を抽出し、50ng の全 RNA を鋳型として ABI7700 Sequence Detector (Perkin Elmer Applied Biosystems) を用いてリアルタイム RT-PCR を行った。PCR 産物は、増幅部位を組み込んだプラスミドを標準として定量を行った。*vtgI* 遺伝子とハウスキーピング遺伝子である β -actin 遺伝子の PCR 産物を同時定量することにより、*vtgI* の相対発現量を両者の比から求めた。アンタゴニスト試験は、雄ヒメダカに E2 (100ppt) と被検物質を同時に 12 時間曝露し、*vtgI*mRNA の減少量を E2 のみ曝露したコントロールと比較することにより行った。

結果および考察 E2 濃度 10ppt による曝露では、1, 3, 6 時間後では、*vtgI*mRNA の誘導は確認されなかったが、12 時間後に *vtgI*mRNA が有意に誘導されていることが確認された。また、E2 濃度 100ppt による曝露では、6 時間以降に *vtgI*mRNA の誘導が確認された。エストロゲンのアゴニストであるノニルフェノール (10、100、1000ppb)、ビスフェノール A (10、100、1000ppb) の曝露では、それぞれ 100ppb、1000ppb 以上の曝露区で 3 日後に *vtgI*mRNA の誘導が観察された。タモキシフェン (500、1000、2000ppb) を用いた E2 アンタゴニスト試験では、最低濃度区 500ppb でも 12 時間の曝露によって 100ppt の E2 曝露による *vtgI*mRNA の誘導が顕著に抑制された。以上の結果は、本法によりエストロゲンのアゴニストおよびアンタゴニスト活性を短期間に評価することが可能であることを示している。

Ebtrogen Assay Using the Vitellogenin Gene Expression of Medaka (*Oryzias latipes*)

Tomohiro Nishikawa, Hiroaki Shiraishi, Masatoshi Morita

(National Institute of Environmental Studies)

We have sequenced complete cDNA of Medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin gene (*vtgI*), and developed rapid *in vivo* estrogen agonist and antagonist assays using *vtgI* expression in Medaka liver. *VitIm* RNA was quantified by multiplex real time RT-PCR method using ABI7700. Five fishes were caged and exposed in 2L glass beakers at 25 °C. Total liver RNA of 50 ng was subject to RT-PCR reaction. The amplification signals for *vtgI* and β -actin were monitored simultaneously, and the relative quantities of *vtgI* to β -actin were used for the measure of *vtgI* gene expression. The results showed that male Medaka expressed *vitI* mRNA by 10ppt 17β -estradiol (E2) exposure within 12 hours, and by 100ppt E2 exposure within 6hours. The lowest concentrations, which induced *vtgI* by 3 days exposure, were 100ppb for nonylphenol and 1000ppb for bisphenol A. Antagonist test, which was performed by the simultaneous exposure of chemicals and 100ppt E2 for 12 hours, showed that less than 500 ppb tamoxifen reduced the expression of *vtgI*m RNA. These results show that this bioassay is useful for rapid evaluation of estrogen agonist and antagonist activity.