

イボニシにおけるステロイドホルモンとその代謝能及び受容体に関する 実験的検討

○堀口敏宏(国立環境研,CREST)・勝 義直(統合バイオサイエンスセンター,CREST)・太田康彦(鳥取大・農,CREST)・
渡邊 肇・井口泰泉(統合バイオサイエンスセンター,CREST)・陸 明(ハルビン師範大)・安保 充・
大久保明(東大院・農学生命科学)・山崎素直(長崎大・環境科学)・白石寛明・柴田康行・森田昌敏(国立環境研)

【目的】船底塗料等として世界各地で使用されてきた有機スズ(トリブチルスズ(TBT)及びトリフェニルスズ(TPT)化合物が前鰓類(海産巻貝類)のうち、新腹足類と中腹足類に対し、ほぼ特異的に且つごく低濃度でインポセックスを引き起こすことが知られている。インポセックスの誘導機構について、現在までに5つの仮説が提出されているが、前鰓類の生殖生理に関する基礎的知見の不足のため、現時点では、いずれの仮説がもっとも合理的であるかを判断することが難しい。本研究では、インポセックスの誘導機構解明の一環として、前鰓類のステロイドホルモンとその代謝能及び受容体に関する実験的検討を加え、基礎的知見の獲得と蓄積を目指す。

【材料及び方法】2000年7月と8月に茨城・平磯で採集されたイボニシ及び2000年9月に新潟・寺泊で水揚げされたバイを用いて、それぞれの卵巣及び精巣からメタノール抽出画分を得て、精製とシリル化の後、高分解能GC/MSによりステロイドホルモンの同定と定量(内部標準法)を行った。また2002年4月に茨城・平磯で採集されたイボニシを実験室内で人工海水を用いて2ヶ月間飼育した後、摘出された卵巣もしくは精巣と消化腺の混合部ホモジェネートにテストステロンとNADPHを添加して(37°C)で30分間インキュベートし、ジエチルエーテル抽出画分を得て17β-エストラジオール(E2)を測定し、その生成割合を調べた。また2001年4月と5月に茨城・平磯及び神奈川県・城ヶ島で採集されたイボニシの卵巣、精巣及びペニス形成部位に対するアンドロゲン受容体(AR)、エストロゲン受容体(ER)及びアロマターゼ(P450_{Arom})の各抗体(Novocastra社製、Dako社製、Biogenesis社製及び北野 健博士(熊本大学理学部)から分与いただいた抗体)による免疫組織化学染色並びに中和抗原処理を行った。さらに、2001年7月に上記の平磯で採集されたイボニシの卵巣/消化腺混合部からcDNAライブラリーを作製し、これをテンプレートとしたPCR断片を得て、3'及び5'-RACE法により増幅し、ERのクローニングを試みた。そして、そのアミノ酸配列の解析と他種との相同性(homology)の比較、検討を行った。

【結果及び考察】イボニシの卵巣からE2、精巣からテストステロン(T)がそれぞれ検出され、同定された。またバイの卵巣からE2、エストロン及びエチニルエストラジオール(EE)、精巣からT及びアンドロステロンがそれぞれ検出され、同定された。このうち、EEは合成ステロイドであるため、バイが固有に有していたものか、腐肉食性であるために食物網を通じてあるいは生息域の海水から体内に取り込んだ汚染を示唆する結果であるかの判断が困難であった。なお、EとTについて内部標準法で定量した結果、イボニシの卵巣及び精巣でそれぞれ1.10±0.20及び0.80±0.20ng/g湿重、またバイの卵巣及び精巣でそれぞれ0.90±0.22及び0.95±0.29ng/g湿重であった。一方、イボニシの卵巣もしくは精巣と消化腺の混合部ホモジェネートにテストステロンとNADPHを添加してインキュベートし、E2の生成割合を対照(テストステロン非添加のホモジェネート)と比較した結果、卵巣/消化腺混合部と精巣/消化腺混合部で、それぞれ、5.4±1.4及び5.8±3.8であった。雌雄間で有意差は見られなかったが、イボニシの生殖巣/消化腺混合部においてTからE2が生成することが確認された。したがって、イボニシの生殖巣/消化腺混合部にP450_{Arom}様活性を有する酵素の存在が示唆され、脊椎動物と類似のステロイドホルモンと代謝酵素を有する可能性が高いと考えられた。なお、種特異的なステロイドホルモン及び代謝酵素の存在については、さらに検討が必要である。またイボニシの卵巣、精巣及びペニス形成部位に対するAR、ER及びP450_{Arom}の免疫組織化学染色並びに中和抗原処理の結果、生殖巣ではARとERに対する特異的染色が、またペニス形成部位ではARに対する特異的染色が、それぞれ認められたのに対し、P450_{Arom}に対してはいずれの組織においても特異的染色が認められなかった。またイボニシのERにおけるアミノ酸配列の相同性は、脊椎動物のERαと比較して、DNA結合ドメインで84~89%と比較的高かったが、リガンド結合ドメインでは39~40%と低いことが明らかとなった。これらの結果から、イボニシなどの前鰓類においても脊椎動物のそれと部分的に類似したARやERの存在が示唆されるものの、その構造の相同性は比較的低いと推察される。またP450_{Arom}についても存在が示唆されるが、脊椎動物のそれとは相同性が低いと考えられる。今後、ステロイドホルモン産生細胞の探索とともに受容体の構造解析やインポセックス発症との関連を含めたステロイドホルモンの機能解析に向けて、さらに研究を進める必要がある。

Experimental Examination on Steroid Hormones, Their Metabolic Ability and Steroid Hormone Receptors of the Rock Shell, *Thais clavigera*

○Toshihiro Horiguchi^{1,7}, Yoshinao Katsu^{2,7}, Yasuhiko Ohta^{3,7}, Hajime Watanabe^{2,7}, Taisen Iguchi^{2,7}, Ming Lu⁴, Mitsuru Abo⁵, Akira Okubo⁵, Sunao Yamazaki⁶, Hiroaki Shiraishi¹, Yasuyuki Shibata¹ & Masatoshi Morita¹

¹National Institute for Environmental Studies, Japan, ²Center for Integrative Bioscience, NIBB, Japan, ³Faculty of Agriculture, Tottori University, Japan, ⁴Harbin Educational University, China, ⁵Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Japan, ⁶Faculty of Environmental Studies, Nagasaki University, Japan, ⁷CREST, Japan

Testosterone (T), androsterone, 17 β -estradiol (E2), estrone and ethynylestradiol were detected and identified in gonads of the rock shell (*Thais clavigera*) and the ivory shell (*Babylonia japonica*), using high resolution GC/MS. Concerning T and E2, their concentrations were quantified, based on the internal standard method. As E2 was detected in homogenated tissues of gonad and digestive gland after adding T and incubating at 37°C for 30 minutes, aromatase (P450Arom) like activity was suggested in such tissues of the rock shell. Immunohistochemical staining of ovary, testis and penis-forming area of the rock shell for androgen receptor (AR), estrogen receptor (ER) and P450Arom showed specific positive staining of gonads for AR and ER, specific positive staining of penis-forming area for AR and negative/non-specific staining of those tissues for P450Arom. Regarding ER of the rock shell, homology of ligand binding domain was estimated 39-40% although that of DNA binding domain 84~89% with ER α of vertebrates.