

平成 20 年度

化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究

報 告 書

平成 21 年 3 月

 いであ株式会社

DDT: DDT は DDD や DDE と比較すると、最もエストロゲン受容体の転写活性を引き起こす力を持つ事が分かった。しかし、コイエストロゲン受容体に関しては 10^{-5} M という高い濃度の p,p' -DDT を用いても転写活性はほとんど誘起されなかった (図 24)。

以上の結果から、 p,p' -のフォームよりも o,p' -のフォームの方がエストロゲン受容体の転写を活性化させる力が強い (魚類のエストロゲン受容体は o,p' -フォームにより反応する) 事が分かった。さらに、DDT が DDD や DDE よりも魚類エストロゲン受容体の

転写活性を増加させることも判明した。最も重要な事は、同じ魚類でも種によって DDT とその代謝物に対する反応性の差がある事がわかった。メダカやトゲウオは反応性が高く、コイは感受性が低いようだ。これは、実際に個体に作用させてその反応性を確認する必要があると思われる。

エストロゲン受容体のタンパク質は細胞内では、様々なタンパク質リン酸化酵素によってリン酸化の修飾を受けている。とくに A/B ドメインは、リン酸化部位が存在し、その転写活性に影響を与えていることが知られている。A/B ドメインは種によって大きく異なる事から、A/B ドメインの影響を受けないアッセイ系も必要である。そこで、酵母の GAL4 DNA-binding domain とのフュージョンタンパク質の形にしたエストロゲン受容体 (この場合、A/B ドメインは除いている型) のコンストラクトを用いて A/B ドメインの影響を受けないアッセイ系を併用することが必要かもしれない。これを用いることによって、DDD/DDE/DDT との相互作用に必要なドメイン、アミノ酸の探索が可能となるとと思われる。

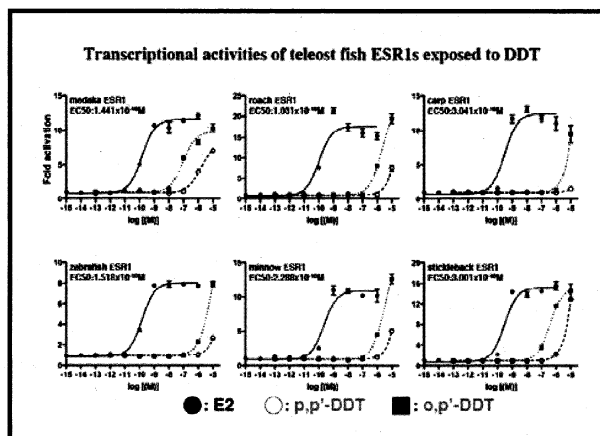


図 24

3. 平成20年度 研究項目

レポータージーンアッセイを用いた6種類の魚 (メダカ、ローチ、コイ、ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノー、トゲウオ) のエストロゲン受容体の化学物質に対する特異性

4. 平成20年度 研究成果

レポータージーンアッセイを用いた6種類の魚 (メダカ、ローチ、コイ、ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノー、トゲウオ) のエストロゲン受容体の化学物質に対する特異性

方法:

(レポータージーンアッセイ) これまで、報告されているゼブラフィッシュのエストロゲン受容体 α (AF349412) とファットヘッドミノーのエストロゲン受容体 α (AY727528)、メダカエストロゲン受容体 α (AB033491) 及び私たちの研究グループが単離した、ローチ、コイ、トゲウオのエストロゲン受容体 α を哺乳類細胞での発現が可能なベクターに組み込み、さらにエストロゲン受容体が認識する ERE 配列をもったレポーターベクターを準備した。このベクタ

ーはルシフェラーゼと呼ばれる遺伝子を持っている。さらにアッセイに使う哺乳類培養細胞はヒト胎児腎臓の細胞である HEK293 cell を用いた。この細胞を 24-well のマルチプレートに植え継ぎ(5×10^4 cells/well)、翌日コンストラクトを細胞に導入した。導入試薬はロッシュ社で販売されている Fugene 6 を用いた。この時に測定するステロイドや化学物質の添加を行なう。2 日後に細胞を処理し測定を行なった。測定には、プロメガ社から販売されている Dual-Luciferase Assay System を用いた。

(遺伝子単離) これまでに報告があったゼブラフィッシュの 2 種類の β 型のエストロゲン受容体 ($\beta 1$ と $\beta 2$) を登録情報に基づいてプライマーをデザインし PCR によって遺伝子の増幅単離を行なった。同様にメダカエストロゲン受容体 $\beta 1$ の単離を行なった。メダカエストロゲン受容体 $\beta 2$ の報告は無かったので、これまで私たちのグループがエストロゲン受容体のクローニングに用いてきた PCR をベースにしたクローニング方法 (Katsu *et al.*, 2008) によって単離を行なった。得られた魚類エストロゲン受容体 β を発現ベクターに組み込んでレポーター遺伝子アッセイに使用した。

結果および考察：

エストロゲンまたはエストロゲン活性を有するホルモン／化学物質がオスの魚において精巣卵を誘起することは明白であるが、その分子機構は不明である。エストロゲン様の化学物質のターゲットは当然エストロゲン受容体であることから、ホルモンによるエストロゲン受容体の転写活性の誘導を調べることは、それぞれの (河川中に含まれる化学物質を含めて) ホルモンの影響を調べる重要なポイント

である。また、実験動物であるメダカを用いた実験・調査が先行しており、他の野外に生息している魚類に関するデータは乏しい。私たちの研究グループは、本研究プロジェクトにおいて、エストロゲン受容体の転写活性を指標としたレポーター遺伝子アッセイを確立し、様々な魚類エストロゲン受容体の転写活性を同一の条件で調べることができるようになった。培養細胞を用いたこのアッセイ系は非常に感度・再現性の効率が優れており、それぞれのホルモン・化学物質に対するエストロゲン受容体の転写活性を調べる有用な系である。この系を用いて、内分泌かく乱作用を有する化学物質であるビスフェノール A (BPA)、NP、OP に対する 6 種類の魚類エストロゲン受容体の転写活性を調べた。

BPA、NP、OP のいずれも調べた 6 種類の魚類エストロゲン受容体の転写活性を誘導する事が分かった。6 種類のうち、

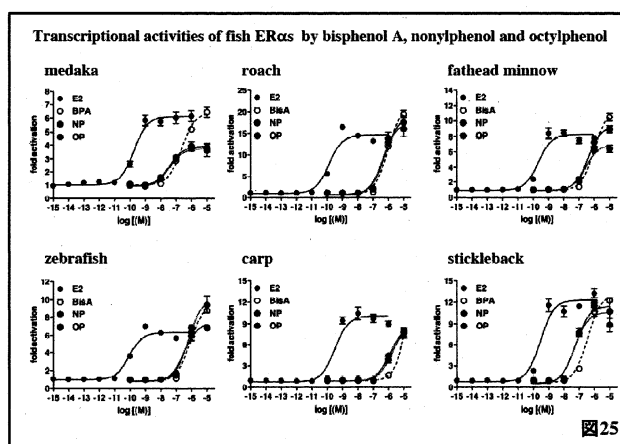


図25

	E2	BPA	NP	OP
medaka	1.766×10^{-10}	0.08	0.49	0.5
zebrafish	8.944×10^{-11}	0.011	0.014	0.026
fathead minnow	2.099×10^{-10}	0.022	0.018	0.055
roach	1.290×10^{-10}	0.0014	0.003	0.0023
carp	3.182×10^{-10}	0.00019	0.018	0.024
stickleback	2.916×10^{-10}	0.082	0.59	0.49

図26

メダカとトゲウオのエストロゲン受容体はそれ以外の魚のエストロゲン受容体と比較して化学物質に対する感受性が高い事が分かった (図 25)。また、それぞれの E2 に対する比活性を計算したところ、メダカとトゲウオの値が高い事が判明した。BPA は E2 を 100 とした時に、0.08 倍、NP や OP は 0.5 倍程度だった。一方、コイエストロゲン受容体は化学物質に対する感受性が低く、BPA に対してはメダカやトゲウオよりも 400 倍低く、NP と OP に対しては 30 倍ほど低かった。また、メダカやトゲウオ、コイは BPA よりも NP や OP に対する感受性が高いが、ゼブラフィッシュやファットヘッドミノーでは、それらの化学物質に対する感受性はあまり変わらない事も分かった (図 26)。

その結果、昨年報告した DDT とその代謝物に対する感受性と同じように、メダカ・トゲウオエストロゲン受容体は、他の魚エストロゲン受容体よりも BPA、NP、OP に対する感受性が高く、次にローチ、ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノーエストロゲン受容体のグループが、最後にコイエストロゲン受容体の感受性の順番になる。また魚の種類によって、BPA よりも NP/OP により感受性が高いエストロゲン受容体と BPA/NP/OP に対する感受性があまり変わらないエストロゲン受容体とに分けられることも判明した。

次に、魚類が持つ 3 種類のエストロゲン受容体(α , $\beta 1$, $\beta 2$) について、それぞれのリガンド特異性を調べた。この実験は、これまで哺乳類では主にエストロゲン受容体 α が生殖器官で機能するという報告があるが、実際に 3 タイプのエストロゲン受容体を有する魚類では、そのタイプが主に働くのか分かっていない。それを解析する一つの手段として、レポーター遺伝子アッセイを用いたリガンド特異性を調べてみた。まず、ゼブラフィッシュでは、エストロゲン受容体 $\beta 1$ は BPA/NP/OP にほとんど反応しない事が分かった。一方、エストロゲン受容体 $\beta 2$ はエストロゲン受容体 α と同じように BPA/NP/OP に反応した。また、今回新しくクローニングしたエストロゲン受容体 $\beta 2$ を含めたメダカエストロゲン受容体 β の活性を調べたところ、1) エストロゲン受容体 $\beta 1$ よりもエストロゲン受容体 $\beta 2$ の方が DDT とその代謝物に対する感受性が高い

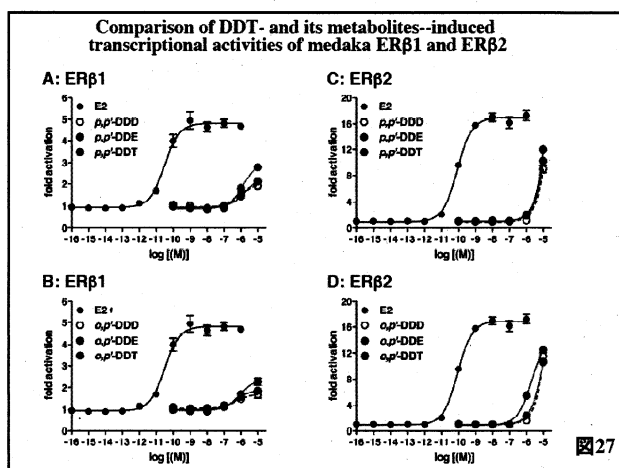


図 27

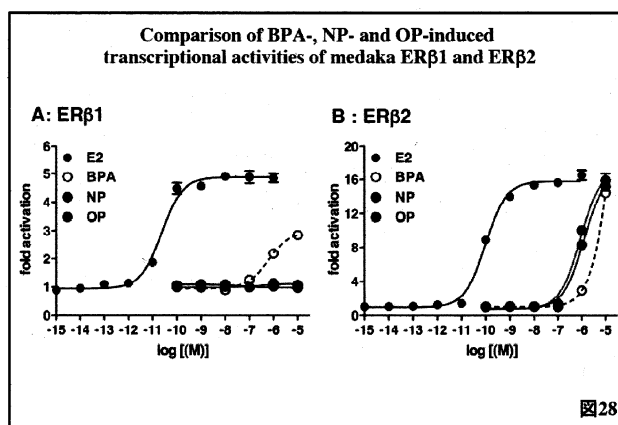


図 28

(図 27)、2) エストロゲン受容体 $\beta 1$ よりもエストロゲン受容体 $\beta 2$ の方が BPA/NP/OP に対する感受性が高い (図 28)、3) E2 と EE2 に対する活性は、エストロゲン受容体 $\beta 1$ がエストロゲン受容体 α やエストロゲン受容体 $\beta 2$ よりも高い、4) エストロゲン受容体 α やエストロゲン受容体 $\beta 1$ は E2 よりも EE2 に対する感受性が高いが、エストロゲン受容体 $\beta 2$ は EE2 よりも

E2 に対する感受性が高い、ことが分かった。以上のように、2 種類存在する β 型のエストロゲン受容体は特に化学物質の感受性を調べると明確に異なったリガンド特異性を示す事が明らかになった。また、 β 型のエストロゲン受容体は、 α 型よりもエストロゲンや化学物質に対する感受性の高い場合があり、今後生体中のそれぞれのエストロゲン受容体の役割を解析する事が重要な研究課題となると思われる。

5. 平成20年度研究成果のまとめ

平成20年度は、化学物質に対するエストロゲン受容体の種特異性・リガンド特異性を調べた。特にBPA、NP、OPに対する魚類エストロゲン受容体の転写活性を調べた。その結果、メダカとトゲウオエストロゲン受容体の感受性が高く、コイエストロゲン受容体の感受性が低い事が分かった。この結果は、前年のDDTとその代謝物に対する影響の結果と同様で、コイ科の魚はより化学物質に対する感受性が低い可能性を示している。さらに多くの魚類を用いてエストロゲン受容体の感受性を調べる必要があると思われる。さらに、魚類の発現する2種類の β 型エストロゲン受容体についてそのリガンド特異性を調べたところ、1つの β 型は化学物質に対する感受性が悪いが、もう1つの β 型は α 型と同等かそれ以上に感受性が高い事が分かった。これは、2種類の系統が異なる魚類（メダカとゼブラフィッシュ）で同じ結果であり非常に興味深い結果である。さらに、他の魚類でも同様の結果が得られるのかを調べる必要がある。また、実際にどのタイプのエストロゲン受容体が生体内で働いているのか、機能的な差があるのか、など基礎の生物学的にも重要な問題に取り組む必要があると感じられた。

6. 平成16年度～20年度 研究成果

『魚類精巣卵の誘起機構解析』という研究課題にこの5年間取り組んできた。本格的な解明に至っていない部分があると同時に、5年前とは比較にならないほど非常に研究が進み、今後のプロジェクト推進の原動力となる結果も得られたと感じている。

1) レポータージーンアッセイの確立とその応用

もっとも本研究期間中に得られた大きな成果は、エストロゲン受容体のホルモンや化学物質に対する感受性を調べるためのアッセイ系としてレポータージーンアッセイを確立できたことにある。これまで、個体にホルモンや化学物質を作用させて、「精巣卵が誘起された」、「血中のビテロゲン濃度が上昇した」などの調査はあるが、そのターゲットとなるエストロゲン受容体を用いたアッセイ系はあまり活用されてこなかった。そこで、本研究課題では魚類からエストロゲン受容体の遺伝子を単離することから始め、一連のアッセイ系を立ち上げる事が出来た。この方法は、数種類のエストロゲン受容体を使って様々な化学物質を一度に検定出来る方法であり、その再現性は非常に高い。今後、この方法を使って、様々な動物種のエストロゲン受容体のリガンド特異性・種特異性を調べる事が可能である。さらに、エストロゲン受容体だけではなく、アンドロゲン受容体の転写活性を測定する方法も同時に開発しており、この方法を駆使する事により、様々な化学物質のエストロゲン活性、アンドロゲン活性、または抗エストロゲン活性、抗アンドロゲン活性を測定する事が可能となった。