



International Symposium on Environmental Endocrine Disruptors 2000

Saturday, December 16 - Monday, December 18, 2000

セッション 4
2000年12月18日(月)

Session 4
Monday, December 18, 2000

作用メカニズム

Mechanisms of Action

内分泌かく乱物質の魚類の性分化に及ぼす作用機構

中村 將

琉球大学 熱帯生物圏研究センター、CREST、JST（科学技術振興事業団）

はじめに

魚類では、他の脊椎動物と同様に発生の途上で生殖腺の原基が形成される。その後、発生の進行に伴い卵巣または精巣へと分化する。この過程が性分化である。性分化期の生殖腺に極微量の性ホルモンを作用させると遺伝的性とは異なる性へ性転換したり、雌雄同体や精子、卵子を作らない不妊化を惹き起こすことが知られている。このように性分化期の生殖腺は、外部からの刺激に対して反応して不可逆的影響を受け易い特徴を持つ。このことが、性ホルモン様働き、或いは性ホルモンの働きを阻害する作用を持つと考えられる内分泌かく乱物質が、野生魚類の性分化に作用して悪影響を及ぼしているのではないかと考える最大の理由である。

本研究では、魚類性分化の内分泌機構、性ホルモンのステロイド代謝酵素の発現に及ぼす影響（ティラピア）及び内分泌かく乱物質の魚類性分化に及ぼす影響（アマゴ）について紹介する。

正常性分化の内分泌機構

内分泌かく乱物質の性分化に及ぼす作用機序の詳細を明らかにするためには、先ず正常な性分化の機構を明らかにすることである。ティラピア *Oreochromis niloticus* を用いて性分化の内分泌調節機構、とりわけ内因性性ホルモンの役割について明らかにすることを試みた。電子顕微鏡観察により性分化期の生殖腺にすでに性ホルモンを合成するステロイドホルモン産生細胞の分化が確認された。これらの細胞での性ホルモンの合成を明らかにするためにステロイド代謝酵素4種（コレステロール側鎖切断酵素、 17α -水酸化酵素、 3β -水酸基脱水素酵素、アロマターゼ）の特異抗体を用いて性分化に伴うこれら酵素の発現を免疫組織化学的に調べた。この研究には、雌雄が遺伝的に産み分けられた、全雌群、全雄群を用いて行った。その結果、遺伝的雌の未分化生殖腺には4種の抗体に陽性反応を示す細胞が確認された。その後、卵巣の分化、発達にともない陽性細胞は増加、発達した。一方、遺伝的雄の未分化生殖腺、精巣分化時の精巣には陽性反応を示す細胞は認められなかった。アロマターゼを除く3種の抗体に陽性反応を示す細胞は精巣分化後しばらくして出現し、その後、精子形成開始期に強い反応が見られた。以上の結果から、遺伝的雌では、性分化以前にアロマターゼを含む女性ホルモンの合成に必要なステロイド代謝酵素の発現があり、すでに女性ホルモンの合成が始まっていることが強く示唆された。このことから、内因性の女性ホルモンが卵巣分化に重要な働きをしていることが示された。一方、遺伝的雄の場合は、精巣分化時にステロイド代謝酵素の発現が全く見られないことから、雄性ホルモンを含む性ホルモンの合成は行われていないものと考えられる。このことは、性ホルモンが働かないことが精巣分化に重要であると考えられる。

内因性女性ホルモンの卵巣分化に果たす役割について詳細に明らかにするために、全雌群にアロマターゼの阻害剤であるファドロゾール（100、200、500 $\mu\text{g/g}$ 餌料）処理を行い性分化に及ぼす影響を調べた。その結果、高濃度処理群では、全て精巣を持つ雄へと性転換した。ファドロゾール（500 $\mu\text{g/g}$ ）と

女性ホルモン (250 $\mu\text{g}/\text{g}$) 同時に投与した群では雄への性転換は見られなかった。性分化期の女性ホルモン産生の阻害により遺伝的雌の雄化をもたらすことから、やはり卵巣分化に女性ホルモンが決定的役割を果たしていることが強く示唆された。女性ホルモンの働きの低下は精巣分化をもたらすものと考えられた。

性ホルモンのステロイド代謝酵素の発現に及ぼす影響

外因性の性ホルモンや内分泌かく乱物質は、正常の性分化過程のどこに作用して異常を惹き起こすのかについては明確に分かっていない。ティラピアでは雄性ホルモンは遺伝的雌を雄へと性転換させる。この性転換過程のステロイド代謝酵素の発現を調べた。その結果、性転換途上では、アロマターゼを含むステロイド代謝酵素の発現は見られなかった。このことは、外因性の雄性ホルモンはステロイド代謝酵素の発現を抑制し、その結果女性ホルモンの合成が低下して性分化に影響を及ぼしたものと考えられた。外因性雄性ホルモンは性分化後の卵巣でもアロマターゼの発現を抑制することが確認された。このことは、内分泌かく乱物質もステロイド代謝酵素の発現に作用して性分化異常を惹き起こす可能性があることを示している。

性分化に及ぼす内分泌かく乱物質の影響

実際の内分泌かく乱物質の性分化に及ぼす影響を調べた。はじめに、全雄のアマゴ *Oncorhynchus rhodurus* を用いて、エストラジオール (E2) (250ng/l) 処理によりに雌化に有効な期間の検討を行った。その結果、孵化後 5~25日の時期がE2に反応して性転換する感受期であると判断された。この時期のE2処理では、20ng/lでも処理した少数個体の精巣に卵を作る雌化を惹き起こした。経口避妊薬に含まれるエチニールエストラジオールでは、10ng/lの極低濃度でも処理したほとんどの個体は、性転換して正常な卵巣を持つ雌となった。プラスチックや農薬に含まれていたり、洗剤に含まれる物質が分解を受けて生成されるノニルフェノールは、20 $\mu\text{g}/\text{l}$ で精巣の中に卵を作るなどの影響が見られ、100 $\mu\text{g}/\text{l}$ で処理した魚は卵巣を持つ完全に性転換した雌、精巣卵を持つ生殖腺、雌雄同体個体が多く見られた。プラスチックに含まれるビスフェノールAも、1000 $\mu\text{g}/\text{l}$ で雌化を惹き起こした。このように、内分泌かく乱物質が、サケ科の魚で低濃度でも生殖腺の雌化を引き起こすことが明らかとなった。

終わりに

正常性分化の内分泌調節機構を明らかにすることにより女性ホルモンが卵巣分化に決定的役割を果たしていることが明らかになった。一方、精巣分化には、男性ホルモンを含む性ホルモンが働かないことが重要であることが示唆された。このことは、女性ホルモン様働きをしたり、性ホルモンの阻害効果を持つ働きを持つと考えられる内分泌かく乱物質が魚類の性分化に作用すると性分化に影響を及ぼすのは必然であると結論される。内分泌かく乱物質の性分化に及ぼす作用機序は未だ明確ではない。一般的に考えられている様にエストロジェンのレセプターに結合してアゴニスト或いはアンタゴニストとして作用することに加えて、本研究からステロイド代謝酵素の遺伝子、蛋白質合成に影響し内分泌かく乱する可能性もあることが示唆された。

謝辞

本研究の一部は、中央水産研究所の農林水産業における内分泌かく乱物質の動態解明と作用機構に関する総合研究の委託研究費を使い行われた。

生殖腺の性分化を支える転写因子

諸橋 憲一郎^{1,4}、吉岡 秀文^{2,4}、川尻 要^{3,4}

¹岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所、²兵庫教育大学、³埼玉県立がんセンター、⁴CREST

有性生殖を行う多くの高等動物の性は性染色体の構成によって決定される。しかしながら自然界では性染色体を有しながらも、それ以外の要因による性の決定が行われているのも事実である。哺乳類においては性決定の遺伝的支配が強く、外的要因によって性が動くことはないと考えられているが、ある種の疾患においては性の逆転が起こることも知られている。このことは哺乳類以外の動物種の例から明らかのように、性的に未分化な生殖腺は本来、雌雄両方向への分化能を有することを示唆するものである。性決定の過程には性決定に関与する遺伝子が発現しなければならず、その制御機構こそが性の分化を支える分子的基盤であると思われる。未分化性腺に形態的な性差が認められる頃には雌雄生殖腺における遺伝子発現にも性差が現れる。この性差は生殖腺の形成に不可欠な一群の転写因子の発現量のみならず発現分布においても認められる。従って、これら転写因子の性依存的発現が生殖腺の性分化を規定しているものと考えることが可能であろう。このような観点から、生殖腺の形成に不可欠な転写因子遺伝子の性依存的発現制御の機構と、これら転写因子による転写調節機構は性決定の素過程を理解する上で極めて重要なポイントである。これまでの解析からAd4BP/SF-1とDax-1、GATA4やWT-1の間では遺伝子発現調節における上下関係が、またこれら転写因子の活性調節のメカニズムも明らかになってきている。一方で、各種細胞増殖因子の生殖腺分化への関与も重要であり、転写因子遺伝子の調節機構との関連で興味ある結果も得られているところである。このような研究は生殖腺の分化の機構を理解する上で必要不可欠のものであり、外来性の物質の影響を知る上でも重要な情報を与えるものである。

ステロイド生成とStARタンパク質に対する内分泌攪乱物質の影響

ダグラス マイケル ストッコ、L. P. ウォルシュ

テキサス工科大学保健科学センター

テキサス工科大学保健科学センター、細胞生物学/生化学学部環境内汚染物質は野生生物とヒトの双方の生殖能力に対する有害作用を有し、多くの場合これらの作用はテストステロンの生合成が低下することに起因している。実際、血清中のステロイドホルモン濃度の変動は、環境内毒素への曝露後のヒトおよび動物に典型的に見られる所見である。精子形成の維持、雄の第2次性徴、および雄の正常な受精能には、精巣のライディッヒ細胞により適切な濃度のテストステロンが合成されていることが必要となるため、ステロイド生成を攪乱する殺虫剤または除草剤は当然ながら不妊の原因になり得る。このような観察は数多くあるが、これらの化合物がステロイド生合成の阻害をもたらす機序については十分には理解されていない。本研究では、内分泌攪乱物質はStAR (Steroidogenic Acute Regulator) タンパク質の発現を抑制することでステロイドホルモンの生合成を抑制しているのではないかという仮説を検証することに重点を置いた。StARタンパク質は、ステロイド生成における律速かつ急性的なステップ、すなわち、ミトコンドリア膜の外側からミトコンドリア膜の内側へのコレステロールの移動を媒介している。ミトコンドリア膜ではチトクロームP450側鎖切断 (P450scc) 酵素がすべてのステロイドホルモンの合成を開始する。ステロイド生成過程におけるStARタンパク質の重要性は、StAR遺伝子の変異が、致死に至る可能性がある先天性副腎皮質リポイド過形成の唯一の原因になりうるということが明らかになったことで、はっきりと証明された。この疾患は、罹患した新生児のステロイド合成能がほぼ完全に欠落していることを特徴としている。我々は、ステロイド生成ではStARタンパク質が主要な調節役を担っているため、環境汚染物質の標的はStARタンパク質である可能性が高いと考えた。そこで、汚染物質のいくつかのクラスについて研究を行い、ステロイド生合成を抑制する濃度を検討した。研究対象には、環境中における残存性の高い殺虫剤の1つでヘキサクロシクロヘキサン (HCH) の γ -異性体であるリンデン、広範囲に使用されている殺虫剤のジメトエート、および除草剤のラウンドアップが含まれる。StARおよびステロイド産生経路の最初の2種類の酵素であるチトクロームP450sccと 3β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素に対するこれら化合物の影響は、MA-10マウスライディッヒ腫瘍細胞をモデル系に用いて判定した。

ヘキサクロシクロヘキサン (HCH) の γ 異性体であるリンデンは、現在も世界中で使われている最も古い合成殺虫剤の1つである。この有機塩素系殺虫剤が動物の生殖機能に悪影響を与えることは数多く報告されているが、生殖機能に影響を及ぼす機序についてはまだ分かっていない。しかし、最近の複数の報告では、HCHは副腎および性腺のステロイド生成を直接阻害することがあるとしている。ステロイドの生産、P450sccならびに 3β -HSDステロイド産生酵素の発現と活性、およびStARの発現に対し、 γ -HCHおよびその異性体である α -HCHと δ -HCHが影響を及ぼすかどうかをMA-10細胞を使用して検討した。我々の研究では、 α -、 δ -、および γ -HCHは、一般のタンパク質の合成およびプロテインキナーゼAやステロイド産生酵素の発現と活性に影響を与えることなしに、MA-10細胞における (Bu) $2c$ AMP 刺激性のプロゲステロン生産を用量依存的に阻害することが分かった。一方、これらの各異性体は、(Bu) $2c$ AMP 刺激性のStARタンパク質濃度を、用量依存的に劇的に低下させた。従って本研究の結果は、 α -、 δ -、および γ -HCHがStARタンパク質の発現を低下させるという作用によりステロイド生成を直接的に阻害しており、この作用がリンデンで誘発される生殖機能不全の病因の一因となっている可能性が高い

ことを示している。

ジメトエートは、広範囲に使用されている有機リン酸系殺虫剤であり、同じく動物の生殖機能を攪乱することが確認されている。リンデンの場合と同様、ジメトエートで誘発される生殖毒性の病因はまだ分かっていないが、血清テストステロン濃度の低下がジメトエート誘発性の不妊で重要な役割を果たしていると思われる。ジメトエートは総タンパク質量を減少させることなく用量依存的にプロゲステロン生産を低下させた。したがって、ジメトエートのステロイド生合成抑制作用は急性毒性や通常の翻訳異常によって起こるものではないと考えられる。我々の研究では、ジメトエートは (Bu) 2cAMP 刺激性のプロゲステロン生産を76%まで抑制する。この (Bu) 2cAMP 刺激性のプロゲステロン生産に対するジメトエートの阻害作用が、ステロイド産生酵素P450sccおよび/または3 β -HSDの活性を阻害することによるものであるか否かを検証するため、22R-ヒドロキシコレステロール (22R-HC) を供試細胞へ加える基質として用いた。ジメトエートは22R-HC刺激性のステロイド生成を63%も低下させており、P450sccおよび/または3 β -HSDの酵素活性を抑制することが示唆された。しかし、(Bu) 2cAMPと22R-HCを同時に用いて刺激した場合のステロイド生産は、わずか43%低下させたただけであったため、22R-HCは、(Bu) 2cAMP刺激性ステロイド生成の低下を部分的に逆転することができたことを示唆している。さらに研究を進めたところ、ジメトエートはP450sccの活性を著しく低下させるが、3 β -HSDの酵素活性は変調させないことが示され、ジメトエートという除草剤は細胞やミトコンドリアに対しては急性毒性がないことが示された。ミトコンドリアタンパクのウェスタンブロット法による分析では、ジメトエートはP450sccまたは3 β -HSDの濃度を変動させなかったことが確認され、一方、ノーザンブロット法による分析では、P450scc mRNA濃度には影響を及ぼさないが、3 β -HSD mRNA濃度を著しく低下させたことが明らかになった。極めて劇的であったのは、ウェスタンブロット法では、ジメトエートがStARタンパク質の濃度を83%低下させたことが示され、ノーザンブロット法では、StAR mRNAの総濃度を81%低下させたことが確認されたことである。ジメトエートがStARの転写を遮断することによってStARタンパク質濃度を低下させているか否かを検証するため、核run-on解析を実施した。Bu2cAMPは、StAR遺伝子の転写速度を5倍に増加させた。しかし、ジメトエートはStAR転写を55%低下させており、転写レベルでは主にStARタンパク質の発現とステロイド生成を低下させたことを示唆していた。

ラウンドアップを用いた複数の研究では、この除草剤も用量依存的にステロイド生成を低下させており、転写後にStARの発現を攪乱することによってステロイド生成を低下させていることが示された。ラウンドアップの急性曝露では、StARタンパク質濃度の低下に加え、P450sccの活性および3 β -HSD mRNA濃度も低下した。しかし、StARはP450sccおよび3 β -HSDの上流に作用しており、ラウンドアップはステロイド生成で観察された抑制に比例してStAR濃度を低下させていたため、StARタンパク濃度の低下だけがステロイド生成に対するラウンドアップの影響の原因である可能性が高い。さらに、ラウンドアップは3 β -HSD mRNA濃度を低下させたが、3 β -HSD酵素の活性は変動させなかった。これらの研究所見は、ステロイド生成に対するラウンドアップの影響を説明する際には、P450sccの活性または3 β -HSD mRNA濃度の低下よりも、StAR濃度の低下の方が生理学的重要性があることを示している。

これらの結果を総合すると、環境の内分泌攪乱物質への曝露後に野生生物やヒトに見られる生殖能力の低下はステロイドホルモンの生合成が低下したことに起因する可能性があることを示している。我々は、ステロイド産生経路の様々なレベルおよびいくつかのケースでは、これらの毒素の一部が複数のレベルでステロイド生合成を阻害することがあることを証明した。さらに我々は、特に影響を受けやすい作用点がStARタンパク質レベルにあることを示し、内分泌攪乱物質の研究においてStARがバイオマーカーとして有用である可能性があることを示した。

転写因子・共役因子と内分泌攪乱化学物質

名和田 新、後藤 公宣、柳瀬 敏彦、斉藤 雅之、森永 秀孝、趙 越

九州大学、CREST

ステロイドホルモン受容体は転写共役因子と複合体を形成し、この複合体が基本転写因子群と結合することによって標的遺伝子の転写調節が行われる。我々は、ステロイドホルモン受容体と転写共役因子群より構成される複合体に注目し、内分泌かく乱物質が、この複合体形成さらには基本転写因子群とのコミュニケーションを障害することを明らかにしつつある。レポーター遺伝子を用いたスクリーニング法と、レーザー共焦点顕微鏡を用いた三次元画像解析システムを組み合わせ化学薬品をスクリーニングし、新規の抗アンドロゲン活性を有する化学薬品の同定、さらに内分泌かく乱物質の作用機序別の分類を行っている。

47種類の内分泌攪乱物質を検討した。我々が確立した画像解析システムは、レポーター遺伝子を用いた転写活性化能測定によるスクリーニングと組み合わせることにより、内分泌攪乱物質のスクリーニングに極めて有効に機能することが確認され、さらに、同じ抗アンドロゲン活性を有する内分泌かく乱物質でも、その作用機序が異なることを明らかにした。

即ちアンドロゲンレセプター(AR)はリガンド依存性に核内に転送され、コアクチベーターであるTSRC-1、TIF-2をリクルートし、ヘテロクロマチンの辺縁のユークロマチン上にドットを形成して局在する。抗アンドロゲン剤、内分泌かく乱物質は、このドット形成が出来ず、ドット形成が転写活性化の必須の過程である事を明らかにした。

巻貝類のメスがオス化する現象imposexは船舶塗料に用いられてきた有機スズ化合物が原因であることが、疫学および、実際に巻貝類に投与してimposexを誘導できることより実証されている。我々の樹立したヒト顆粒膜細胞由来株KGNにおいてimposexを誘導できる低濃度の有機スズがアンドロステネジオンからエストラジオールの変換を濃度依存性に、また、側鎖依存性に抑制することを明らかにした。

内分泌攪乱物質の作用と毒性： エストロゲン受容体遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究

ケネス・S. コラック、J.F.コーズ、W.P.ボッチンヒューズ、S.W.カーティス、J.リンゼイ
米国 国立環境保健科学研究所 (NIEHS)

エストロゲンレセプター (ER) は、発生、生殖、発癌性および通常の生理機能に重要な役割を演じていると考えられている。我々は、遺伝子ターゲティング技術を用いて、ER α 遺伝子ノックアウト (α ERKO) ホモ接合体マウスとER β 遺伝子ノックアウト (β ERKO) ホモ接合体マウスを作成した。 α ERKOマウスの組織中には通常と同じレベルのER- β mRNAが観察されたことから、ER- β の発現はER α に依存しないことが示唆される。 α ERKOマウスは、エストラジオール、ゲニステイン、ヒドロキシTAM、DESあるいはEGFを用いた子宮増殖試験においてまったく反応を示さなかった。プロゲステロンレセプター (PR) mRNAは α ERKOマウスにおいても検出されたが、子宮、乳腺および卵巣におけるPR mRNAの発現はエストロゲンによる刺激を受けなかった。下垂体ホルモンは、雌の α ERKOマウスでは上昇しているものの、 β ERKOマウスでは野生型マウスと同等であり、ペプチドホルモンの制御にはER α が主要な役割を演じていることを示している。ゲニステインは、 α ERKOマウスおよび野生型マウスのいずれにおいても血清中のLH濃度を抑制したことから、エストロゲンにより引き起こされるこの作用については、子宮に対するゲニステインの作用とは違ってERを介さない機序が関与していることが示唆される。 α ERKOマウス成熟個体の乳腺を分析したところ原始的で未発達な管組織が観察されたが、 β ERKOマウスでは同腹の野生型個体と同様に充分発達した管組織が認められた。 α ERKOマウスを乳癌発症率の高いWNT-1癌原遺伝子導入マウスと交配することにより、乳癌の発症に及ぼすER α 活性の影響を評価した。野生型のER濃度をもつWNT-1遺伝子導入マウスは、27週齢で98%の腫瘍発症率を示した。 α ERKO/WNT-1マウスでは、発症の遅れが見られた (54週齢)。これらの結果は、ERの存在しない組織においても乳癌は発生することが可能だが、発症時期が遅れることを示している。次に行なったerbB2 (Neu) 遺伝子導入マウスとの交配実験では、野生型およびヘテロNeuマウスが54週齢で癌を発症することが示された。 α ERKO/Neuでは、90週齢を過ぎた後に極めて低率で発症が観察された。WNT/ERKOマウスに較べてERKO/Neuマウスの癌発症率が低いことは、ER α がこの腫瘍誘発に重要な役割を演じていることを示唆している。ヒトおよびマウスにおけるDESの発癌性が言及された当初から、DESの作用のうちどの側面がERを介したものであり、またどの側面がレセプターを介していないものであるかが重要な問題であった。野生型マウスを周産期にDESで処置すると、メスに陰の持続的な角質化、子宮肥厚、卵管肥大など様々な表現型をとる毒性や発癌性が観察された。同様にDESで処置したオスでは、精囊萎縮や前立腺肥大が誘発された。DES処置した α ERKOの雌雄にはこのような毒性効果が見られなかったことは、DESのこれらの作用はER β ではなくER α を介していることを示している。野生型マウスの子宮内Hoxa10遺伝子発現のDESによる減少は、雌性生殖管の形態異常と関係していた。 α ERKO雌はHoxa10の減少を示さなかったことから、毒性によるこの早期の反応はER α を介したものであることが示唆される。

エストロゲンホルモンの毒性学とホルモン依存性発癌における2種の異なった形のERの特異的役割をより深く解明するためには、マウスの更なる特性評価や、 β ERKOマウスとER遺伝子二重ノックアウトマウス間でDES作用を比較することが必要となるであろう。