

「内分泌かく乱物質」
平成12年度採択研究代表者

長濱 嘉孝

(岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所 教授)

「魚類生殖内分泌系に及ぼす内分泌かく乱物質の 影響の分子メカニズム」

1. 研究実施の概要

内分泌かく乱物質は性ステロイドホルモン・受容体系を介して生殖機能に障害をもたらすことが多いが、その作用メカニズムの詳細は未だ明らかにされていない。我々はこれまで魚類を対象として生殖腺の性分化や配偶子形成を制御する性ステロイドホルモン因子を単離、同定するとともに、それらの産生と作用の分子機構を解明してきた。本研究では、内分泌かく乱物質が深く影響を及ぼすと考えられる3つの過程(生殖腺の性分化、精子形成、卵成熟)に焦点を絞り、各々の過程における内分泌かく乱物質の影響と作用メカニズムを分子・細胞レベルで解明することを目指す。また同時に、これら3過程の制御機構については遺伝子レベルの基礎的研究をさらに発展させ、内分泌かく乱物質の作用メカニズム解析のための堅固な基盤とする。

本年度は、生殖腺の性分化機構、特にアンドロゲンやエストロゲン受容体(ER)アンタゴニスト処理などによる遺伝的雌から雄への性転換の分子機構、ベラの性転換時における性ホルモンの働き、さらには卵成熟誘起に及ぼす内分泌かく乱物質の影響などについて解析した。その結果、アンドロゲン処理などによる不可逆的な雄への性転換は芳香化酵素の発現抑制により起こること、またベラの性転換も芳香化酵素遺伝子の急激な発現抑制が引き金となって誘導されることなどが明らかになった。孵化直後の性分化期生殖腺でつくられる性ステロイドホルモンは卵巣と精巣の形成に不可欠であるばかりでなく、脳-視床下部の性分化、発生に重要な役割を果たすと考えられる。この点は孵化直後における性ホルモンや内分泌かく乱物質の影響が不可逆的であることから考えても重要なことである。従って、今後は生殖腺に加えて脳-視床下部の性分化機構についても内分泌かく乱物質との関わりで解析する必要がある。

2. 研究実施内容

本研究プロジェクトの目的は、魚類を用いて生殖腺の性分化と配偶子形成の基本的制御機構とそれらの過程に及ぼす内分泌かく乱物質の影響の分子メカニズムを明

らかにすることである。本年度は特に、生殖腺の性分化と性転換の制御機構、さらには卵成熟に及ぼす内分泌かく乱物質の影響を重点的に解析した。

(1) 性分化の基本的制御機構

これまでに我々は孵化直後のティラピアに対する性ステロイドホルモンや芳香化酵素阻害剤（ファドロゾール）の処理実験、さらには各種ステロイド代謝酵素及びERのタンパク質・遺伝子レベルでの発現解析により、遺伝的全雌群での卵巣分化は内因性エストロゲンの働きにより誘導されることを示した。しかし、遺伝的全雄群の生殖腺では性分化に先立ちアンドロゲン合成酵素及びARの発現は認められないので、精巣分化が内因性アンドロゲンの働きにより誘導されるとは考えにくい。

他の魚類と同様に、ティラピアでも孵化直後の稚魚をアンドロゲンやエストロゲンで処理すると不可逆的性転換が誘導され、機能的な精巣や卵巣が形成される。メチルテストステロン（MT）処理では遺伝的雌が雄に性転換する。本年度は遺伝的雌にみられるMTによる雄化の仕組みを明らかにする目的で、この雄化とAR及び芳香化酵素との関連をプロモーターアッセイにより調べた。これらの実験を計画したのは、1）孵化直後の遺伝的全雌ティラピア稚魚をMTで処理すると芳香化酵素タンパク質の発現が抑制される、2）芳香化酵素（生殖腺型）遺伝子のプロモーター領域にアンドロゲン応答配列（ARE）が二箇所存在する、3）孵化10 - 15日後の全雌群生殖腺でAR β 遺伝子の特異的発現が認められる、からである。COS7細胞に、ルシフェラーゼをレポーターとして芳香化酵素プロモーターにつないだコンストラクトとAR（ α または β ）の発現ベクターとをコトランスフェクションし、MT添加が芳香化酵素遺伝子の転写活性に及ぼす影響を調べた。その結果、AR α とAR β ともにMTの濃度依存的に芳香化酵素遺伝子の転写を抑制した。このようなMTの抑制作用はER（ α または β ）をコトランスフェクションさせた場合には認められなかった。これらの結果を総合すると、孵化直後の雌稚魚をアンドロゲン処理することにより起こる雄化はAR/AEを介した芳香化酵素遺伝子の転写抑制により起こるものと推察される。孵化10 - 15日後のティラピア雌生殖腺ではAR β 遺伝子のみが発現しているため、MTの雄化作用を媒介するARは β 型であると考えられる。前述したように、アンドロゲンは遺伝的雄における精巣形成には重要な働きをすることは考えられない。すでに我々は精巣形成に先立ちDMRT-1遺伝子が雄特異的に発現すること、さらには孵化直後のMT処理により遺伝的全雌生殖腺でDMRT-1遺伝子の急激な発現が誘導されることを見出している。従って、このDMRT-1遺伝子の雄生殖腺特異的発現機構とその標的遺伝子の探索が遺伝的全雄生殖腺で作動する性分化制御機構を明らかにする上での重要なポイントとなる。

(2) 水温依存性の性決定・分化機構

水温依存性の性決定・分化を示すヒラメを用いて生殖腺の性分化に及ぼす内分泌かく乱物質の作用メカニズムを明らかにすることが本研究の目的の一つである。今年度は先ず、ERに対する内因性リガンド（エストラジオール - 17 β ）及びアンタゴニスト（タモキシフェン、TAM）がヒラメの温度依存性の性分化に与える影響について調べた。遺伝的全雌群を通常水温（雌化温度）で飼育しながらTAMを処理すると、TAMの濃度に依存して雄の割合が増加したが、TAM + エストラジオール - 17 β 処理群では全ての個体で雌化がみられた。一方、遺伝的全雌群を高水温（雄化水温）で飼育すると全ての個体で雄化がみられたが、同じ高水温飼育でもエストラジオール - 17 β を処理した場合には全てが雌化した。また、これら各群の生殖腺における芳香化酵素、ER(α 、 β) 遺伝子の発現を処理終了直後の日齢100日目にRT-PCRを用いて調べた結果、ER α とER β 遺伝子の発現量は各群間でほとんど差が認められなかったが、芳香化酵素遺伝子の発現は雌化がみられたTAM + エストラジオール - 17 β 処理群、高水温 + エストラジオール - 17 β 処理群、及び対照群（雌の割合：97.8%）に限られた。これらのことから、ヒラメ雌をERアンタゴニスト処理することにより誘導される雄化は、芳香化酵素遺伝子の発現抑制によるものと推察される。しかし、TAM処理や高水温飼育の場合でも、同時にエストロゲンを過剰に処理すると雄化が回避されて雌化が起こる。この場合の雌化は、過剰に処理されたエストロゲンにより芳香化酵素遺伝子の発現が誘導されたために起こると考えられる。今後は、正常水温、高水温条件下での雌化、雄化機構について調べるとともに、それぞれの過程における内分泌かく乱物質の影響についても調べる。

(3) 性転換機構

ハワイ産ベラの性転換における性ステロイドホルモンの役割を明らかにする目的で、エストラジオール - 17 β （エストロゲン）の鍵合成酵素である芳香化酵素と11 - ケトテストステロン（アンドロゲン）の鍵合成酵素である11 β - 水酸化酵素のcDNAをクローニングした。RT-PCR法を用いて、性転換時におけるこれら2種類の酵素のmRNAの発現量を調べたところ、性転換前の雌の卵巢中で芳香化酵素が高い発現量を示したのみならず、11 β - 水酸化酵素の発現量も高値を示した。雌のみ（2尾）を飼育して大きい方の個体に性転換を誘導させると、先ず芳香化酵素と11 β - 水酸化酵素のいずれのmRNAも急激に減少したが、精子形成の開始に伴い11 β - 水酸化酵素の発現量が再び上昇した。一方、芳香化酵素の発現量は再び上昇することはなかった。これらの結果より、卵巢維持にエストラジオール - 17 β が、また精子形成の誘起に11 - ケトテストステロンが重要な働きをするものと結論された。しかし、性転換前雌の卵巢で11 β - 水酸化酵素の発現量

が高値を示した生理的意義は不明である。ベラの性転換は、視覚刺激が脳 脳下垂体を経て生殖腺に伝播され、最終的には芳香化酵素遺伝子の発現が抑制されることで誘導されると考えられる。今後は生殖腺に加えて脳や脳下垂体も含め、それぞれのレベルで作動する性転換制御因子を単離し、その作用機構を明らかにする必要がある。

(4) 卵成熟の制御機構

第一減数分裂の前期で停止している魚類の卵母細胞は、ステロイド性の卵成熟誘起ホルモン($17\alpha, 20\beta$ - ジヒドロキシ - 4 - プレグネン - 3 - オン、 $17\alpha, 20\beta$ -DP) が卵表(ステロイド膜受容体) に作用すると、細胞内のcAMP 濃度の減少、サイクリンBタンパク質の翻訳、Cdc2のリン酸化が順次起こり、その結果卵成熟促進因子(MPF) が活性化され卵核胞は崩壊(GVBDと略：卵成熟の形態的指標) して、卵成熟が誘起される。本年度は内分泌かく乱物質の中でも界面活性剤系の3種類の物質、ビスフェノールA、ノニルフェノール、オクチルフェノールについて卵成熟誘起作用、あるいは $17\alpha, 20\beta$ -DPの卵成熟誘起作用に対する阻害あるいは促進効果について調べた。その結果、これら3種類はいずれも、卵成熟誘起作用ならびに $17\alpha, 20\beta$ -DP作用に対する阻害・促進作用を持たないことが明らかになった。今後はこれら以外の種々の内分泌かく乱物質についても同様の解析を進める。卵成熟誘起作用を示す物質が見つかった場合には、内分泌かく乱物質により誘起される卵成熟が正常な卵成熟と同様に引き起こされたものであるかをMPFの活性化やサイクリンタンパク質の合成を指標として検討する。その後、内分泌かく乱物質の作用点(標的分子) を種々の卵成熟阻害剤を用いた培養実験により明らかにする。標的分子の候補が絞りこめた段階で、最終的に内分泌かく乱物質をプローブとして結合活性を指標に分子の同定を行ない作用機構の分子メカニズムを解明する。

3 . 主な研究成果の発表(論文発表)

なし