

「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、特に卵巣分化に果たすエストロゲンの役割、精巣分化に果たすDMRT1 遺伝子の役割、減数分裂の制御因子、雌から雄への性転換時における性ホルモン、特にエストロゲンの役割、海産魚(ヒラメ)の水温依存性性分化に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と *in vitro* 評価法の開発、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、エストロゲンは遺伝的雌の生殖腺における生殖細胞の増殖を誘起すること、ベラにおいて卵巣エストロゲン量低下は卵巣の急激な退行をもたらすばかりでなく精巣形成への引き金をも引くこと、ノニルフェノールとビスフェノールがヒラメを雌化させること、さらにはジエチルstilbestrol (DES) が卵成熟誘起作用を持つ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。本年度は、来年度以降の本格的な研究の準備として、脳における性ステロイドホルモン受容体遺伝子の発現についても解析を開始した。

### 2. 研究実施内容

#### (1) 基礎研究グループ(長濱グループ)

##### 1) 生殖腺の性分化機構

生殖腺及び脳の性分化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上

で、内因性エストロゲンの作用機構を知ることが重要である。そこで、孵化直後の遺伝的雌(XX)を芳香化酵素阻害剤(ファドロゾール)で処理することにより内因性エストロゲンの合成を抑制させた後の生殖細胞数の変動を連続切片を作成して解析した。その結果、正常の卵巣分化に特異的に起こる生殖細胞数の増加は完全に抑えられた。これらの結果から、卵巣分化時におけるエストラジオール-17 $\beta$ の重要な作用の一つは生殖細胞数を増加させることであることがはじめて明らかになった。今後、このエストロゲン(あるいは内分泌かく乱物質等)による生殖細胞数の増加機構を明らかにする必要がある。

昨年度のテイルピアを用いた研究で、精巣の分化にはアンドロゲン/アンドロゲン受容体は主要な働きは示すことなく、かわって DMRT1 遺伝子が重要であることがわかった。そこで、孵化直後の遺伝的雌(XX)にアンドロゲン(メチルテストステロン)を処理させた時に未分化生殖腺に起こる DMRT1 遺伝子の発現パターンの変動を *in situ hybridization* により解析した。その結果、アンドロゲンを処理して2-3日後(孵化後約15日)に、DMRT1が生殖腺体細胞に急激に出現することが明らかになった。遺伝的雌の生殖腺ではこの時期にはすでに内因性エストロゲンの作用により生殖細胞数が増加を開始している。したがって、アンドロゲン処理によりDMRT1を発現した体細胞は前顆粒膜細胞であると考えられる。このことは、この時期の生殖腺体細胞は外因性(例えば内分泌かく乱物質など)に曝されると雌型体細胞から雄型体細胞に分化転換する可能性を示唆する。

また、内分泌かく乱物質の生殖過程に及ぼす影響を解析していくうえで必要となる他の遺伝子のクローニングについても引き続き進めている。本年度は、ステロイドホルモン産生経路において重要な役割を果たし、内分泌かく乱物質の標的とも考えられている Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) 遺伝子、さらには哺乳類の生殖腺の性分化に関わると考えられる Dax1 遺伝子をテイルピア卵巣 cDNA ライブラリーからクローニングした。

## 2) 精子形成の制御機構

ウナギの精子形成は、脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモンの働きで精巣の体細胞で生成される精子形成誘起ホルモン(11-ケトテストステロン)の作用で起こる。これらのホルモンによる精子形成誘起機構を明らかにする目的で、大腸菌の *recA* 遺伝子と相同性が高い遺伝子で、減数分裂期に特徴的な組み換えに関与すると考えられている、Dmc1 (disrupted meiotic cDNA 1) 遺伝子を、ウナギ精巣よりクローニングし、精子形成の進行に伴う、mRNA、及びタンパク質の発現を調べた。Dmc1 の mRNA 及びタンパク質は共に、第一精母細胞にその発現が限局された。この減数分裂初期に特異的に発現する Dmc1 は、減数分裂への移行のメカニズムを明らかにする上で、その発現機構、及び機能は非常に興味深いとともに、精子形成(減数分裂)に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用機構を明らかにする上で有益なマーカーにもなると考えられる。

## 3) プロゲステロン受容体遺伝子

魚類においてプロゲステロンは卵と精子の成熟を誘起する重要な性ホルモンである。本年度はウナギ精巣の cDNA ライブラリーより2種類のプロゲステロン受容体をクローニングした。これら2種類の受容体タンパク質はいずれも機能的であり、pull-down assay によりお互いがヘテロダイマーと形成することがわかった。また、精子形成期の精巣における発現パターンは異なることから、これら

2 種の受容体は精子形成の過程で異なる働きを示すと推察される。特に、配偶子成熟を制御するプロゲステロン膜受容体との関連が注目される。

#### 4) 脳における性ステロイドホルモン受容体遺伝子の発現

性分化期のテトラピア脳におけるエストロゲン受容体(ER)、アンドロゲン受容体(AR)  $\alpha$ 、 $\beta$  遺伝子の発現に性差が認められた。ER  $\beta$  と AR  $\alpha$  の発現は、孵化後 15 日の雄の脳で強く発現がみられるようになることから、これらの遺伝子は脳の雄化の関与が示唆された。一方、雌の脳では ER  $\alpha$  遺伝子が恒常的に発現していること、また ER  $\beta$  遺伝子の発現が孵化後 15 日に強くなることから、これらの遺伝子の発現が脳の雌化に重要な働きをするものと推察される。

### (3) 性転換研究グループ(中村グループ)

#### 1) ベラの生殖腺成熟に果たす生殖腺刺激ホルモンの役割

本研究で用いるベラ科の魚の多くは雌から雄へ性転換する。ハワイ産ベラでは、視覚的認識が鍵となり性転換が起きることは証明されているが、この視覚刺激によりいかなるメカニズムにより性転換が誘導されるかはまだ明らかではない。そこで本年度は、先ず生殖腺の活動を制御する生殖腺刺激ホルモン(GTH)遺伝子のクローニングを行なうとともに、生殖周期における mRNA の発現量の変動を調べた。RACE 法によりハワイ産ベラ及びミツボシキュウセンの FSH (GTHI)  $\beta$  鎖、LH (GTHII)  $\beta$  鎖の全長 cDNA をクローニングした。次いで、ハワイ産ベラの雌雄の生殖活動における FSH  $\beta$ 、LH  $\beta$  mRNA の変動をリアルタイム PCR により解析した。雌では、FSH  $\beta$  鎖の発現量は発達期に高く、LH  $\beta$  鎖は成熟期に高かった。このことから、FSH は卵巣の発達に重要であり、LH は卵巣の成熟に重要であると考えられる。また、同様な結果が雄でも得られた。成熟期における FSH  $\beta$  と LH  $\beta$  鎖の発現量は、雌が雄に比べ約 4 倍高く、卵巣を成熟するためには、精巣を成熟させるよりも多量な GTH 量を必要とすると考えられる。このような GTH 量の違いが雌から雄への性転換とどのような関連があるのか今後検討する必要がある。

#### 2) 性転換に及ぼすエストロゲン量低下の影響

性ホルモンの性転換に果たす役割を明らかにするため、ハワイ産ベラにおける芳香化酵素(エストロゲン合成酵素)タンパク質の変動について特異抗体を用いた免疫組織化学法により調べた。芳香化酵素の強い反応は、成熟した卵を取り囲む濾胞組織に観察されたが、これらの反応は性転換に伴い急激に消失し、以後精巣に転換するまでの過程で反応は全く認められなかった。このことから、性転換時に先ず起こる卵巣の退化は、濾胞細胞における芳香化酵素のタンパク質レベルでの急激な低下により起こるエストロゲンの低下が原因となり起こることが明らかとなった。

次に、エストロゲン低下が性転換を誘導するか否かを、ハワイ産ベラと同様な雌から雄への性転換を行うミツボシキュウセン雌を芳香化酵素阻害剤(ファドロゾール)で処理する実験により解析した。その結果、ファドロゾールを処理した全ての個体は、実験開始 2 週間で性転換を開始し、6 週間目には全て雄個体になる性転換した。このことから、エストロゲンは卵巣の維持に重要であるのみならず、その欠如は性転換の引き金となることがはじめて明らかになった。同様なことがハワイ産ベラでも起こるかを早急に調べる必要がある。この結果から考えても、芳香化酵素遺伝子の発現抑制機構が性転換機構の解明にポイントとなると考えられるので、今後この点を重点的に解析

する必要がある。

#### (4) 海産魚研究グループ(北野グループ)

##### 1) ヒラメにおける内分泌かく乱物質の in vitro 評価系の開発

魚類における内分泌かく乱物質の in vitro 評価系を開発するため、先ずエストロゲンにより誘導されることが明らかになっているビテロゲン遺伝子の発現制御機構を調べた。ヒラメのビテロゲン遺伝子の 5' 上流域を単離した結果、5' 上流域 880 bp 以内に 2 つのエストロゲン応答配列(ERE)を確認した。次に、この領域とルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターと、ヒラメの ER $\alpha$  または ER $\beta$  の強制発現ベクターを COS-7 細胞に導入した。その結果、エストラジオール-17 $\beta$  の濃度依存的にルシフェラーゼ活性が誘導されたが、その誘導はタモキシフェン(ER のアンタゴニスト)により抑制された。また、COS-7 細胞においては、ルシフェラーゼ活性の増加は ER $\beta$  よりも ER $\alpha$  の発現ベクターを導入した方が明らかに高かった。一方、ノニルフェノール及びビスフェノール A の投与によってもルシフェラーゼ活性の増加が認められたことから、これらの内分泌かく乱物質は、ヒラメにおいてもエストロゲン様作用があると判断される。このシステムは、魚類における内分泌かく乱物質の in vitro 評価系として大変有用であると思われるが、ER $\alpha$  と ER $\beta$  を導入した時のルシフェラーゼ活性に大きな違いが認められる。これは、培養細胞中のコファクターが原因である可能性もあるため、今後は魚類の肝細胞を用いた in vitro 評価系の開発を行う予定である。

##### 2) ヒラメの性分化に与えるノニルフェノール及びビスフェノール A の影響

魚類の性分化における内分泌かく乱物質の影響を明らかにするために、遺伝的全雌ヒラメを高水温で飼育し(全雄へと誘導)、性分化時期にノニルフェノール及びビスフェノール A を投与して雌化するかどうか調べた。方法は、日齢 30-100 日間、高水温処理下でノニルフェノールを 0、100、1000  $\mu$ g/g 飼料の濃度、ビスフェノール A を 0、100  $\mu$ g/g 飼料の濃度で経口投与し、10-12 ヶ月間飼育した個体の性比を調査した。その結果、100  $\mu$ g/g 飼料の濃度において、ノニルフェノールでは 30%、ビスフェノール A では 57% の雌化率を示したことから、これらの物質はヒラメの性分化に影響を与えて雌化させることが明らかになった。

##### 3) ヒラメ DMRT1 遺伝子の単離

雄化マーカーとして、今年度は脊椎動物において精巢分化に重要であることが明らかになっている DMRT1 遺伝子の単離を試みた。その結果、ヒラメ精巢から全翻訳領域を含む 2350 bp の cDNA を単離することができた。ノーザンブロット解析では、精巢で強く、卵巣で弱い発現が認められた。また、この遺伝子の発現量を RT-PCR により調べた結果、生殖腺に特異的に発現し、性的未分化時期である日齢 50 日目以降、雌雄両方の生殖腺において発現が認められた。このことから、ヒラメにおいては、これまで報告されているティラピアやサケ科魚類とは異なり、精巢だけでなく卵巣においてもこの DMRT1 遺伝子の発現が認められることが明らかになった。

##### 4) 内分泌かく乱物質のモニタリング用トランスジェニックヒラメ作製のための遺伝子導入方法の検討

海水魚でのトランスジェニック魚作製の報告はほとんどないため、まず、ヒラメ受精卵への遺伝子導入方法の検討を行った。ベクターとして、サイトメガロウイルスプロモーターに、レポーター遺伝

子として GFP を連結した CMV-GFP ベクターを用いた。その結果、遺伝子銃法では GFP の蛍光が観察される個体は確認できなかったが、マイクロインジェクション法では、遺伝子注入後 1 日から、体全体に蛍光が認められる個体が数尾存在した。このことから、トランスジェニックヒラメ作製のための遺伝子導入方法としては、マイクロインジェクション法が適していることが分かった。

#### (5) 卵成熟研究グループ(徳元グループ)

##### 卵成熟誘起に及ぼす内分泌かく乱物質の影響

魚類卵の最終成熟は、LH の働きにより卵濾胞組織でつくられる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)の作用により誘起される。しかし、この  $17\alpha, 20\beta$ -DP は、通常のステロイドホルモンとは異なり、卵表に局在すると考えられるステロイド膜受容体に作用すると考えられている。 $17\alpha, 20\beta$ -DP がこの膜受容体に結合することにより、卵細胞内の 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が崩壊(GVBD)して、卵は成熟する。昨年に引き続き、本年度も種々の内分泌かく乱物質について魚類の卵成熟誘起作用、あるいは天然の卵成熟誘起ホルモンである  $17\alpha, 20\beta$ -DP の卵成熟誘起作用に対する阻害効果について in vitro 実験系により調べた。その結果、試みた十数種類の内分泌かく乱物質のうちで、ジエチルスチルベストロール(DES)が唯一、それ自体で卵成熟誘起作用を持つことがわかった。また、この DES で誘起される卵成熟は、 $17\alpha, 20\beta$ -DP で誘起される卵成熟の場合と同様に、MPF の活性化を介して起こされていことが確認された。今後、DES で誘起される卵成熟機構、特にステロイド膜受容体との関連について詳細に検討する予定である。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 基礎研究(長濱)グループ

① 研究者名

長濱嘉孝 (基生研 教授)

② 研究項目

魚類生殖内分泌系に及ぼす内分泌かく乱物質と性ステロイドホルモンの影響の分子メカニズムに関する研究

#### (2) 性転換研究(中村)グループ

① 研究者名

中村 将 (琉大・熱生研、教授)

② 研究項目

性転換魚類に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用機構に関する研究

#### (3) 海産魚研究(北野)グループ

① 研究者名

北野 健 (熊大・自然科学、助手)

② 研究項目

ヒラメの水温依存性性決定・分化に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用機構に関する研究

(4) 卵成熟研究(徳元)グループ

① 研究者名

徳元俊伸 (静大・理・地球、助手)

② 研究項目

卵成熟に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用機構に関する研究

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Tokumoto, M., Nagahama, Y. and Tokumoto, T. (2001). Molecular cloning of cDNA encoding polypeptide chain elongation factor 1a from goldfish (*Carassius auratus*). DNA Sequence 12, 419-424.
- Nakamura, M., Nagoya, H. and Hirai, T. (2001). Effects of nolyphenol on the gonadal sex differentiation in male amago salmon. Perspective in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity. Monduzzi Editore 1285-1289.
- Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y. and Abe, S.-I. (2001). Role of P450aromatase in gonadal sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Environmental Sci. 8, 1-11.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T. and Iguchi, T. (2002). Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. J. Exp. Biol. 205, 711-718.
- Ikeuchi, T., Todo, T., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2002). A novel progestogen receptor subtype in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. FEBS 510, 77-82.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H. and Nagahama, Y. (2002). Two isoforms of *vasa* homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. Mech. Dev. 111, 167-171.
- Morrey, C.E., Nagahama, Y. and Grau, E.G. (2002). Terminal phase males stimulate ovarian function and inhibit sex change in the protogynous wrasse *Thalassoma duperrey*. Zool. Sci. 19, 103-109.

(2) 特許出願

なし