

遺伝子発現を指標にした化学物質の女性ホルモン様作用の

体系的な研究

長崎大学大学院生産科学研究科 山口明美

第1章 緒言

近年、一般的に使用される化学物質の中に、ホルモン類似または阻害作用を示す内分泌かく乱性をもつものがあることが指摘された。その中でも女性ホルモン(Estrogen)は、発生や生殖など生物の存続における根幹的な部分を制御しているため、Estrogen様作用または阻害作用物質の影響により、生物の発達異常や生息数の減少が起こることが懸念されている。このため、既存の化学物質および今後新規に合成される物質の安全性評価にエストロゲン様作用の有無や強度についての概念を取り入れる必要があり、その正確な評価法の開発に加え、多様な構造の化学物質が生体内でEstrogen様または阻害作用を示す際の詳細なメカニズムの解明が求められている。現在の代表的な*in vivo*評価法は、Estrogenの作用によりメダカ(*Oryzias latipes*)などのモデル卵生生物の肝臓で誘導される卵黄タンパク質Vitellogenin (VTG)の発現を指標とするものがあり、国内外で広く行なわれるようになってきた。しかし、ゲノム解析等から魚類VTGには発現制御機構が異なると思われる数種類のサブタイプの存在が明らかになっているが、これらは評価の際に区別されていない。さらに、EstrogenはEstrogen receptor (ER)と結合し転写制御因子として標的遺伝子発現を直接制御するが、魚類や哺乳類等にER α 、ER β など少なくとも2種類以上のERサブタイプが存在することが明らかになった。これらのことから、現在の評価法は化学物質のEstrogen様作用を正確に評価できないと考えられる。魚類ER α とER β の機能的差異に関する研究が少ないことに加え、VTGの誘導とER分子種の関わりを調査した例はなく、この点を明確にすることは外因性化学物質のEstrogen様作用の詳細を明らかにする上で極めて重要であると考えられる。以上のことから、本研究はVTG1、VTG2、ER α およびER β の遺伝子発現の変動を明確に区別する評価法を開発し、化学物質のEstrogen様および阻害作用についての体系的な研究を行った。

第2章

メダカの遺伝子配列情報からVTG1、VTG2、ER α およびER β 特異的なプライマーを設計し、遺伝子発現の変動をQuantitative real-time PCR (QPCR)により調査する*in vivo*評価系を作成した。種々濃度のEstradiol (E2)に曝露したオスメダカの肝臓の遺伝子発現変動を本評価系により調査したところ、VTG1、VTG2、ER α およびER β のすべてが濃度依存的な特有の発現パターンを示すこと、経時変化の調査結果から8時間の曝露で遺伝子発現の変動が検出可能であること確認した。以上のことから、本評価系は化学物質のEstrogen様および抗Estrogen作用を詳細に調査することが可能であることを示すことができた。

第3章

難分解性と蓄積性の有機フッ素化合物の生物影響についての情報が現在も少ないことから、第2章で確立した評価系により、工業製品の原料として使われるフッ素テロマーアルコール1H,1H,2H,2H-perfluorooctan-1-ol (6:2PFOH)、1H,1H,2H,2H-perfluorodecan-1-ol (8:2PFOH)、1H,1H-perfluorodecan-1-ol (9:1PFOH) およびフッ素テロマーアルコールの代謝物であるカルボン酸体Perfluorononanoic acid (PFNA)、Perfluorododecanoic acid (PFDA)のEstrogen様作用について調査を行った。*in vivo*試験の結果、PFNA、PFDAはEstrogen様活性を示さなかったが、6:2PFOH、8:2PFOH、9:1PFOH

は VTG1, VTG2, ER α の発現量を増加させ、生体内で ER α を介した経路により Estrogen 様活性を示す可能性が示された。

第 4 章

メナジオン (ビタミン K3) は、*in vitro* で抗 Estrogen 作用を示すことが報告されたが、*in vivo* での影響は調べられていない。さらに、無脊椎動物に対して強い毒性を示すメナジオンは、外来生物の侵入経路として問題視されている船舶のバラスト水の殺生物剤としての使用が検討されている。バラスト水は使用後海洋へ直接投棄されるため、今後メナジオンは環境汚染物質として環境中に現れてくる可能性がある。そこで、第 2 章で述べた *in vivo* 評価系によりメナジオンの抗 Estrogen 作用について調査したところ、メナジオンは E2 共存下で VTG2 および ER α の発現を抑制し、*in vivo* で魚類に対して抗 Estrogen 作用を示すことを明らかにした。

第 5 章

第 5 章では VTG の誘導と ER 分子種の関わりについて検討した。ER α 選択的リガンド(Toho-8)は、メダカ肝臓の VTG1 の発現を上昇させ、E2 と比較すると低い一定量の VTG2 の発現を誘導した。ER β 選択的リガンド(HPHB)は VTG1 を誘導しなかったが、E2 に匹敵する VTG2 を誘導した。また、Toho-8 は E2 を共存させると VTG1 の発現を E2 単独暴露に対し有意に上昇させたが、HPHB は E2 と共存させても VTG1 発現を E2 単独と比較して上昇させなかった。一方 VTG2 の発現は E2 との共存下、Toho-8 でさらに誘導されることはなかったが、HPHB は E2 単独暴露の誘導を大きく上回った。この結果より、VTG1 は主に ER α によって発現が制御されていること、VTG2 の発現は ER α の作用に、ER β の作用が加わることで増強されることが確認された。

第 6 章 総括

本章では第 2 章から第 5 章で得られた結果を総括として記した。

第 7 章 結論

本研究での研究結果から、これまで詳細が不明であった魚類 VTG サブタイプの発現制御における ER α と ER β の役割について、ER α による VTG1 誘導および ER α と ER β の増強作用による VTG2 発現誘導モデルを提案する。また、VTG サブタイプ発現制御において、E2 のフィードバック効果による ER β 発現抑制機構が存在する可能性を示唆する。本評価系により今後幅広い化学物質の安全性評価を行い、エストロゲン様作用化学物質のプロファイリングに適用していくことで、化学物質のエストロゲン作用メカニズムの解明や、より安全性の高い代替物の開発などへ応用することができる有用な情報を得ることが可能である。また、VTG は卵生生物の繁殖において重要な役割を果していることから、VTG サブタイプの発現誘導機能を明らかにした本研究成果は、水産増殖の発展にも貢献することができると思う。