

平成21年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19580382  
 研究課題名（和文） メダカ初期胚におけるエストロゲン受容体によるレチノイン酸シグナルの調節機構  
 研究課題名（英文） Estrogen receptor-mediated regulatory mechanisms for retinoic acid signaling in early embryos of medaka fish  
 研究代表者 山下 一郎 (YAMASHITA ICHIRO)  
 広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授  
 研究者番号：20144884

研究成果の概要：レチノイン酸は動物初期胚の発生に重要である。メダカにおいて、レチノイン酸はダイオキシン受容体の転写を活性化し、血管形成に必要である。本研究では、ダイオキシン受容体が血管内皮細胞増殖因子受容体遺伝子の転写に必要なこと、及びエストロゲン受容体がダイオキシン受容体遺伝子の転写に必要なことを明らかにした。また、エストロゲン様及びダイオキシン類の環境ホルモンによる複合汚染はヒトを含めた動物の発生に重大な障害を引き起こす可能性があることが示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境ホルモン、エストロゲン、レチノイン酸、ダイオキシン、メダカ、発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

近年になって野生生物、特に水系に生息する動物の奇形や孵化率の低下等が度々観察されている。ヒトにおいても、精子数の減少、子宮内膜症の増加、免疫機能障害、脳機能障害等が報告されており、これらは環境中に存在する化学物質によって胎児の発生や内分

泌系に悪影響を受けたことが原因ではないかとの指摘がなされている。

下水処理場から排出されるヒト由来のエストロゲンやプラスチック樹脂から溶出する種々のエストロゲン様物質、また、ゴミ焼却施設等から排出されるダイオキシン類

は、極微量で野生生物やヒトの発生・内分泌系を攪乱するおそれがあり、内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）と呼ばれている。これらの物質による環境汚染は世界的に深刻な社会問題となっている。

これらの物質は、それぞれエストロゲン受容体（ER）やアリルハイドロカーボン（ダイオキシン）受容体（AHR）に結合した後、標的遺伝子の転写を過剰に活性化するために障害を引き起こすことが培養細胞レベルの研究から推測されている。しかし、現在でも障害の原因となる標的遺伝子が個体レベルで特定された例は極めて少ない。

動物の初期胚は、成体に比べてエストロゲン様物質やダイオキシンに対して著しく感受性が高いことが知られている。これまでに、申請者はこれらの化学物質の作用機構を解明するために、メダカ受精卵を用いて以下のことを明らかにした。

（１）ダイオキシンはAHRの活性化を介してチトクローム P450 の過剰発現を引き起こし、メダカ胚の血管・骨形成を阻害する。また、AHRはメダカ胚の血管・骨形成に必須の機能を持つ。（Zool. Sci. 19: 309-319, 2002）。

（２）胚発生と細胞分化に普遍的に重要とされるレチノイン酸受容体（RAR）によるAHR1 遺伝子の転写活性化はメダカ胚の血管・骨形成に必須である。（Zool. Sci. 21: 541-551, 2004）。

（３）ER を高発現するトランスジェニック(Tg)メダカ系統を作製して解析した結果、エストロゲンがER を介してメダカ胚の血管形成を阻害する。（Zool. Sci. 19: 1355-1361, 2002）。

（４）エストロゲンはレチノイン酸やダイオキシン類化合物と相乗的に血管形成を阻害する。この原理を利用して、上記 Tg メダカ

卵を用いて下水処理水に含まれるエストロゲン総量を 10 ng/liter の感度で検出するバイオアッセイ法を開発した。（Environ. Sci. Technol. 40: 2051-2055, 2006）。

これらの研究は、マウス以外では初めてRAR、AHR、及びERが血管形成に関与することを明らかにした例である。また、RARとAHRが転写調節カスケードを形成していることを初めて明らかにしたこと、並びに世界最高感度のバイオアッセイ法を開発したことは世界的に高く評価されている。

## 2. 研究の目的

（１）エストロゲンの過剰投与、あるいはERを高発現した胚における血管形成及びVEGFR1 の転写に与える影響を調べることで、エストロゲン様環境ホルモンによる阻害機構を解明する。

（２）ERのアンタゴニストであるTamoxifen を投与した胚、あるいはantisense-ERを一過的に導入した胚における血管形成、並びにAHR1及びVEGFR1の転写に与える影響を調べることで、母性エストロゲンによる血管形成機構を解明する。

（３）Antisense-AHR1を一過的に導入した胚における血管形成、並びにVEGFR1の転写に与える影響を調べることで、AHRによる血管形成機構を解明する。

（４）エストロゲンとAHRアゴニストの同時投与による骨形成を調べることで、環境ホルモンの複合汚染による胚発生障害の可能性について検討する。

## 3. 研究の方法

（１）ERを高発現するメダカ胚における血管形成への影響をマーカー遺伝子（*raldh2*, AHR1, RAR, VEGFR）の発現を指標にして *in situ* ハイブリダイゼーション法あるいはRT-PCR法で調べる。ERを高発現する

メダカ胚は、野生型に比べてエストロゲンに対する感受性が 2000 倍高くなっている (Zool. Sci. 19: 1355-1361, 2002)。ER を介して転写調節が起こっているか調べるために、ER 高発現胚及び野生型胚を用いて転写調節を調べる。通常の発生過程におけるマーカー遺伝子の発現時期及び発現する組織については、すでに明らかにしている (Zool. Sci. 19: 309-319, 2002; Zool. Sci. 21: 541-551, 2004; 一部、未発表)。同様の方法で、上述の条件における転写調節を調べる。

(2) antisense ER を一過的に導入した胚における血管形成への影響をマーカー遺伝子(AHR1, VEGFR1)の発現を指標にして in situ ハイブリダイゼーション法あるいは RT-PCR 法で調べる。プラスミド: -アクチンプロモーターの下流に GFP (緑色蛍光タンパク)を、あるいは ER cDNA を sense あるいは antisense 方向に挿入したプラスミド pOL21、pOL22、及び pOL23 (Zool. Sci. 19: 1355-1361, 2002)。プラスミド DNA の一過的導入法は以下の通り: プラスミド DNA (pOL21 と pOL23)をそれぞれ 0.5 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )の濃度で含む 10 倍濃度 (10x) のメダカ生理食塩水 40  $\mu\text{l}$  をシャーレに置き、これに 1 ~ 4 細胞期の受精卵を 10 ~ 15 個入れる。Antisense ER による特異的反応であることを確認するために、上記溶液に pOL22 (sense ER )をさらに加えたものについても同様に準備する。実体顕微鏡下で縫い針を用いて受精卵外膜に穴を開け、浸透圧により DNA を含む溶液を卵に入れる。その後、シャーレに 1x 生理食塩水 20 ml を加える。エレクトロポレーションでプラスミド DNA を注入する。プラスミド DNA を注入した卵を 1x 生理食塩水 30 ml にて 2 日間インキュベートした後、GFP 蛍光を発

する卵を選別する。

(3) Antisense-AHR1 を一過的に導入した胚における血管形成、並びに VEGFR1 の転写に与える影響を上述と同様の方法で調べる。

(4) 孵化後 5 日目の胚を固定後、アリザリン S で骨染色した (Zool. Sci. 19: 309-319, 2002)。

#### 4. 研究成果

(1) エストロゲンの過剰投与、あるいは ER を高発現した胚では、血管形成が阻害され VEGFR1 の発現も阻害された。この結果より、エストロゲン様環境ホルモンは ER を介して VEGFR1 遺伝子の転写を阻害することで血管形成を阻害することが明らかになった。これはエストロゲン様環境ホルモンによる初期胚の発生阻害機構を初めて分子レベルで明らかにしたものである。

(2) Tamoxifen を投与した胚、あるいは Antisense-ER を一過的に導入した胚では、血管形成が阻害され、VEGFR1 及び AHR1 の発現が阻害された。この結果より、母性エストロゲンは ER に結合して AHR1 の転写、それに続く VEGFR1 の転写を活性化することで血管形成に必須の役割を持つことが明らかになった。これは母性エストロゲンが胚発生に重要であることを初めて報告したものである。

(3) Antisense-AHR1 を一過的に導入した胚では、血管形成が阻害され、VEGFR1 の発現が阻害された。この結果より、AHR1 は VEGFR1 の転写を活性化することで血管形成に必須の役割を持つことが明らかになった。これは AHR がマウス以外の胚発生においても重要であることを初めて報告したものである。

(4) エストロゲンと AHR アゴニストを環境ホルモンレベルで同時投与すると、相乗的に骨形成が阻害された。この結果より、エストロゲン様及びダイオキシン類の環境ホル

モンは密接に関連した作用経路で骨形成を阻害すること、及びこれらの化合物による複合汚染はヒトを含めた動物の発生に重大な障害を引き起こす可能性があることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 0件)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

山下 一郎 (YAMASHITA ICHIRO)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授

研究者番号：20144884

##### (2)研究分担者

##### (3)連携研究者