

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580307

研究課題名(和文) 家禽の卵黄関連遺伝子発現による内分泌攪乱化学物質の検出法の確立

研究課題名(英文) Establishment of Detection Method of Endocrine Disrupter by Avian Yolk-Related Gene Expression

研究代表者

森 誠 (MORI MAKOTO)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：90143411

研究成果の概要(和文)：家禽の卵黄関連遺伝子発現を指標として内分泌攪乱化学物質の効果を調べるための敏感な方法を確立した。特に卵形成と胚発生に及ぼす影響に焦点をあて、分子レベルで因果関係を用量依存的に調べるとともに、内分泌攪乱作用が指摘されている重金属や抗酸化剤の効果も調べ、ウズラの超低密度リポタンパクの遺伝子を指標とするとジエチルstilbestrolの影響や、重金属の影響を敏感に検出できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：A sensitive method by using the gene expression related to avian yolk protein was established to detect the effect of endocrine disrupters. Especially focusing on oogenesis and embryonic growth, the most appropriate gene is suggested to be quail very-low-density-lipoprotein. The effect of heavy metals and antioxidants as well as diethylstilbestrol was examined with the causal relationship with dose-related manner at molecular level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究代表者の専門分野：家禽学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：代謝、内分泌制御

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 内分泌攪乱化学物質は脂溶性、産卵期の鳥類は脂溶性物質を選択的に卵黄に蓄積、鳥類の胚は卵黄のすべてを吸収。これまで本研究代表者は家禽の産卵生理学及び発生学を研究してきたが、このような既知の事実を総合的に考察し、卵黄の特定部位に内分泌攪乱化学物質を蓄積させることが可能であることを証明し、本研究を着想するに至った。脂溶性色素を毎日投与し

たウズラが産んだ卵の卵黄には色素の同心円状の模様ができるが、内分泌攪乱化学物質も同じように同心円状に蓄積し、発生中には表面から胚の特定の臓器に移行すると予想している。

脂溶性物質を産卵中のウズラに投与して卵黄に蓄積させ、次世代に対する効果を測定する方法は本研究代表者が独自に開発したもので、新たな活性測定法として国内外から高く評価されている。卵黄膜内層

の構成タンパクである ZP1 遺伝子は、エストロゲンに敏感に反応する遺伝子として世界に先駆けてクローニングしたものである。

(2) 一般にステロイドホルモンは特異的受容体と結合して作用を発現するが、最近発見されたエストロゲン受容体の  $\alpha$  と  $\beta$  の 2 種類の分子種は異なる反応に関与している可能性が指摘されている。そこで大腸菌に発現させたウズラのエストロゲン受容体  $\alpha$  と  $\beta$  に対する内分泌攪乱化学物質の結合親和性を測定し、内分泌攪乱化学物質がエストロゲン受容体  $\beta$  と強く結合することを見出した。この結果は内分泌攪乱化学物質がなんらかの生理作用を有していることを示しており、本研究はこの研究成果をもとに計画した。

## 2. 研究の目的

(1) 内分泌攪乱化学物質は脂溶性物質で、生体の内分泌調節に悪影響を及ぼすと考えられているが、その作用機序は不明である。本研究は家禽の肝臓の卵黄関連遺伝子群の発現を指標とした内分泌攪乱化学物質の検出法の確立にある。

(2) 実験動物としては本研究代表者がこれまで詳しく研究して卵黄蓄積と発生の過程が明らかになっているニホンウズラ (*Coturnix japonica*) を、また内分泌攪乱化学物質としてはエストロゲン受容体  $\beta$  との結合親和性が強いことが証明されているゲニスタインとクーメステロールを用いる。ポジティブコントロールとしてジェチルスチルベステロールとエチニルエストラジオールを用いる。測定する卵黄関連遺伝子は女性ホルモンによる誘導が明らかとなっている ZP1、ピテロゲニン、アポ VLDL の 3 種類とする。

## 3. 研究の方法

(1) 産卵中の雌ウズラに内分泌攪乱化学物質を投与する。投与方法は飼料に混入する経口投与、飲水に混入する経口投与、腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与で比較する。一回の投与によってこれらの物質はその後の 5 日間に産卵される卵の卵黄の特定部分に濃縮される。5 日間連続して投与することによって卵黄全体に濃縮させることも可能である。これらの受精卵から発生した雌雄胚の肝臓に含まれる卵黄関連遺伝子群の mRNA をリアルタイム PCR によって定量し、最適な投与方法を決定する。投与した雌個体の肝臓の遺伝子群についても同様に測定する。

(2) 内分泌攪乱化学物質の効果を ZP1、ピテロゲニン、アポ VLDL の遺伝子の転写で比較する。(1)で得られた結果をもとに決定した最適な投与方法で卵黄に蓄積させた内分泌攪乱化学物質による各種 mRNA の増減をリアルタイム PCR によって定量し、特に発生中期から後期にかけて、および孵化後 2 週間までの経時的変化を詳細に検討する。

(3) 内分泌攪乱化学物質の効果は従来の薬理学的用量依存反応ではなく、ある特定の狭い範囲でその効果が発現している可能性が指摘されている。そこで(1)と(2)で確立された方法を用いて、広い範囲の投与量を設定し mRNA の誘導に対する効果を詳細に探る。

(4) これまでの結果をもとに、発生中に内分泌攪乱化学物質に曝露されたヒナを孵化し、性成熟後に再度内分泌攪乱化学物質を投与する。雄肝臓の卵黄関連遺伝子の mRNA をリアルタイム PCR で定量することによって、胎児期に内分泌攪乱化学物質に曝露されると内分泌攪乱化学物質の影響を受けにくくなるという仮説を立証する。

## 4. 研究成果

(1) 内分泌攪乱化学物質がウズラ肝臓の卵黄関連遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかを調べた。実験に用いた物質は、合成エストロゲンであるジェチルスチルベステロール (DES)、および最近内分泌攪乱効果が指摘されているカドミウム (Cd) とセレン (Se) で、雄ウズラ肝臓における超低密度アポリポタンパク II (apoVLDL) mRNA の転写に及ぼす影響を調べるために、腹腔内に投与した。RNA を肝臓から抽出し、逆転写反応をおこない、得られた cDNA は、apoVLDL 遺伝子に対する特異的プローブを用いた PCR 法で解析した。その結果、雌特異的遺伝子の発現は成熟雌にのみ認められ、無処理の雄には発現が認められなかったが、未成熟雄に DES を投与することで誘導できることがわかった。また、遺伝子の発現量は投与後 1 日でもっとも高く、投与後 2 日には減少することがわかった。様々な量の DES を投与したところ、apoVLDL 遺伝子の発現量は用量依存的に増加した。効果の認められた最少量は、体重 100g あたり 100 および 10  $\mu$ g であった。内分泌攪乱化学物質が母親から移行して雄胚肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響を調べるために、母親に DES を 10 日間、腹腔内に連続投与した。最初の投与後の 6 日目から受精卵を回収し、孵卵各日令の雄胚から肝臓を採取した。母親へ DES を投与したところ、遺伝子発現に有意な影響を与えなかった。胚の肝臓の遺伝子発現を DES が誘

導できない原因が、肝臓のDESに対する反応性によるものなのか、卵黄へのDESの蓄積量に関係するものなのかを調べるために、未処理の母親が産卵した受精卵の卵黄内にDESを直接投与した。その結果、apoVLDL 遺伝子の発現量は、DES 投与で増加することがわかった。効果の認められた最小量は、いずれの場合でも  $1\mu\text{g}/\text{卵}$  であった。同様な効果は Cd でも認められた。

(2) ウズラ肝臓の卵黄関連遺伝子群 (卵黄膜タンパク、ピテロゲニン、超低密度リポタンパク等) の発現を指標として内分泌攪乱化学物質の検出法の確立を試みているが、内分泌攪乱化学物質投与による酸化ストレスを指標とするため、メタロチオネイン mRNA 転写量、カタラーゼ活性、およびマロンジアルデヒド産生量を測定した。その結果、内分泌攪乱作用を持つ Cd を、抗酸化剤であるアスコルビン酸と同時に投与するとマロンジアルデヒド産生量の上昇抑制が確認できた。これはオスウズラでもメスウズラでも観察されたが、メタロチオネイン mRNA の上昇抑制はメスウズラのみで顕著であった。これらの結果から、Cd 暴露は胚発生の停止に至る毒性を呈し、これに対する抗酸化剤の保護効果は性によって違いがあることが示唆された。次に 1 型グルタチオンパーオキシダーゼ (GPX1) の発現を酸化ストレスの指標とするため、ウズラの GPX1 をクローニングし、843 塩基対の全長の塩基配列を決定した。これには 153 アミノ酸残基に相当するオープンリーディングフレーム、5' -末端非翻訳領域 7 塩基、及び 3' -末端非翻訳領域 377 塩基が含まれていた。通常は停止コドンである TGA のひとつはセレノシステインのコドンとして使われていた。他の動物のアミノ酸配列と比較したところ、ウズラ GPX1 は 65~74 % の相同性を示した。GPX1 mRNA は腎臓、副腎、肝臓、小腸、心臓、胸筋といったすべての臓器で発現していた。この GPX1 cDNA は、ウズラにおける内分泌攪乱化学物質の効果を知る上で有効なツールとなることが示された。

(3) 最後に、ウズラの卵黄関連遺伝子群の肝臓における発現を用いて、内分泌攪乱化学物質やセレンやカドミウムのような重金属のもつ内分泌攪乱作用を簡便に検出する方法を確立することを目的として研究を実施した。これまでに確立した最適な投与方法によって卵黄に蓄積させた内分泌攪乱化学物質によるピテロゲニンと超低密度リポタンパク VLDL mRNA の増減を半定量的 PCR によって定量し、発生中および孵化後 2 週間までの経時的变化を検討した。ただしリアルタイム PCR による定量方法は、煩雑で、高価な試薬を使うため、実用的とは言い難い。そこで新

たにプライマーを設計し、リアルタイム PCR と半定量的 PCR の結果を比較することによって本方法の実用性を確認することができた。内分泌攪乱化学物質の効果は薬理的用量依存反応ではなく、ある特定の狭い範囲でその効果が発現しているため、広い範囲の投与量を設定してその効果を詳細に探るべく、そのモデル実験を行なったが、超低密度リポタンパク遺伝子をもっとも敏感な遺伝子であることが判明した。またウズラの系統を確立して研究に供することが可能になったので、ジエチルスチルベストロールのような内分泌攪乱化学物質の影響を幅広く検出することができるようになった。

## 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 9 件)

- ① Mariko Mochizuki, Makoto Mori, Ryo Hondo and Fukiko Ueda, The Biological Monitoring of Wild Birds - Part 2: The Possibility of a New Index for Biological Monitoring. International Journal of Energy, Environment, and Economics, 査読有、19:145-163, 2010 年
- ② Mariko Mochizuki, Mayumi Shiozawa, Makoto Mori, Hiroshi Kajigaya, Shin-ichi Hayama, Yoshitsugu Ochiai, Ryo Hondo and Fukiko Ueda, The Biological Monitoring of Wild Birds - Part 1: The Cadmium Content of Organs from Migratory Birds. International Journal of Energy, Environment, and Economics, 査読有、19:22-32, 2010 年
- ③ Mariko Mochizuki, Makoto Mori, Mutsumi Miura, Ryo Hondo, Takashi Ogawa and Fukiko Ueda, A New Technique for Biological Monitoring Using Wildlife. International Journal of Energy, Environment, and Economics, 査読有、18:88-94, 2010 年
- ④ Toshiyuki Akachi, Yasuyuki Shiina, Yayoi Ohishi, Takumi Kawaguchi, Hirokazu Kawagishi, Tatsuya Morita, Makoto Mori & Kimio Sugiyama, Hepatoprotective Effects of Flavonoids from Shekwasha (Citrus depressa) against D-Galactosamine-induced Liver Injury in Rats. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 査読有、56:60-67, 2010 年
- ⑤ Sopon Wilaison & Makoto Mori, Effect of Selenium on Hatchability and Cellular Glutathione Peroxidase mRNA Expression during Embryogenesis in Japanese Quail

(*Coturnix japonica*). Journal of Poultry Science, 査読有、46:340-344, 2009年

⑥ Md. Shahidur Rahman, Mariko Mochizuki & Makoto Mori, In-ovo Cadmium Toxicity in Developing Quail Embryo (*Coturnix japonica*): Sex-dependent Responses to Ascorbic Acid Protection. Journal of Poultry Science, 査読有、46:334-339, 2009年

⑦ Seiya Ohuchi, Tatsuya Morita, Makoto Mori & Kimio Sugiyama, Hepatic Cystathionine  $\beta$ -Synthase Activity Does Not Increase in Response to Methionine Supplementation in Rats Fed a Low Casein Diet: Association with Plasma Homocysteine Concentrations. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 査読有、55:178-185, 2009年

⑧ Sopon Wilaison & Makoto Mori, Cloning and Expression of Cellular Glutathione Peroxidase (GPX1) in Japanese Quail (*Coturnix japonica*). Journal of Poultry Science, 査読有、46:52-58, 2009年

⑨ J. Sha, J. Gao, J. Li, Q. Zhao, G. Tao, C. Zhao, H. Han, M. Mori & Z. Li, Absence of Donor-Derived Zona Pellucida Protein C Homologue in Inner Perivitelline Layer of Peking Duck (*Anas platyrhynchos*) - Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Chimeras (Duails). Poultry Science, 査読有、87:2064-2072, 2008年

[学会発表] (計16件)

① Mariko Mochizuki, Makoto Mori, Ryo Hondo & Fukiko Ueda, A New Index for Heavy Metals in Biological Monitoring. 9th Asia Pacific Poultry Conference, Taipei, 2011年3月22日

② Tetsuya Kohsaka, Keiichiro Yogo & Makoto Mori, Potential Actions of Relaxin and Its Related Peptide on Male Reproductive Processes in Domestic Animals. 14th AAAP Animal Science Congress Pingtung, 2010年8月25日

③ 竹本 麻里子・森 誠・奥富 幸・羽山 伸一・梶ヶ谷 博・本藤 良・植田 富貴子・望月 眞理子、野鳥の重金属汚染に関する疫学的研究 5) 新たな指標による野鳥の鉛汚染の解析. 第35回 鳥類内分泌研究会 岡山三光荘, 2010年11月25日

④ 貝塚 千博・森 誠・本藤 良・植田 富貴子・望月 眞理子、野鳥の重金属汚染に関する疫学的研究 6) 因子分析による複合汚染の解析. 第35回 鳥類内分泌研究会 岡山三光荘, 2010年11月25日

⑤ Sopon Wilaison & Makoto Mori, Effect on Selenium on Hatchability and Glutathione Peroxidase mRNA Expression during Embryogenesis in Japanese Quail. 日本家禽学会 春季大会 日本大学 生物資源科学部 湘南キャンパス, 2009年3月28日

⑥ Fukiko Ueda, Makoto Mori, Takashi Takano, Yoshitsugu Ochiai, Ryo Hondo & Mariko Mochizuki, Basic Investigation for an Epidemiological Study on Cadmium Contamination of Wildlife - Cadmium Distribution in the Rat Body after Intravenous Cadmium Exposure. 5th International Conference on Energy, Environment, Ecosystems and Sustainable Development Athens, 2009年9月28日

⑦ Fukiko Ueda, Mariko Mochizuki, Makoto Mori & Ryo Hondo, A New Technique for Biological Monitoring. 5th International Conference on Energy, Environment, Ecosystems and Sustainable Development Athens, 2009年9月29日

⑧ Mariko Mochizuki, Makoto Mori, Ryo Hondo & Fukiko Ueda, A New Index for Heavy Metals in Biological Monitoring. 5th International Conference on Energy, Environment, Ecosystems and Sustainable Development Athens, 2009年9月30日

⑨ Makoto Mori, Md. Shahidur Rahman, Mariko Mochizuki, Ryo Hondo & Fukiko Ueda, Acute Effect of Cadmium on Female Reproduction in Birds. 5th International Conference on Energy, Environment, Ecosystems and Sustainable Development Athens, 2009年9月30日

⑩ 奥富 幸・森 誠・梶ヶ谷 博・落合 由嗣・本藤 良・小河 孝・植田 富貴子・望月 眞理子、野鳥の重金属汚染に関する疫学調査-9) カドミウム汚染の性差による違い. 第147回日本獣医学会学術集会 公衆衛生学分科会、栃木県総合文化センター, 2009年4月2日

⑪ Md Shahidur Rahman & Makoto Mori, Suppression of Yolk Protein Gene Expression and Egg Production by Cadmium in Japanese Quail (*Coturnix japonica*): Protection by Ascorbic Acid. 23rd World's Poultry Congress 2008 Brisbane, 2008年7月2日

⑫ Md Shahidur Rahman & Makoto Mori, Ascorbic Acid Protection of Yolk Protein Gene Suppression by Cadmium in Japanese Quail (*Coturnix japonica*). 5th SETAC (The Society of Environmental Toxicology and Chemistry) World Congress Sydney, 2008年8月6日

⑬ Sopon Wilaison & Makoto Mori, Effect of

Selenium on Cellular Glutathione Peroxidase mRNA Expression and Consequent Hatchability in Japanese Quail (*Coturnix japonica*). 13th AAAP Animal Science Congress Hanoi, 2008年9月25日

⑭ Zandong Li, Jin Sha, Junshuang Gao & Makoto Mori, Identification of a 35 kDa Glycoprotein, Zona Pellucida Protein C (ZPC) Homologue in Inner Perivitelline Layer Produced by Peking Duck-Japanese Quail Chimaeras. 日本家禽学会 秋季大会、北里大学 獣医学部, 2008年8月29日

⑮ 高梨 ありこ・森 誠・小河 孝・本藤 良・植田 富貴子・望月 真理子、野鳥の重金属汚染に関する疫学的研究 3) 新たな指標であるカドミウム標準回帰直線を用いた生物モニタリングの可能性. 第33回 鳥類内分泌研究会 草津温泉中沢ヴィレッジ, 2008年11月13日

⑯ 三浦 睦・森 誠・小河 孝・本藤 良・植田 富貴子・望月 真理子、野鳥の重金属汚染に関する疫学的研究 4) カドミウム標準回帰直線を用いた実例. 第33回 鳥類内分泌研究会 草津温泉中沢ヴィレッジ, 2008年11月13日

[図書] (計3件)

① Mariko Mochizuki, Makoto Mori, Ryo Hondo & Fukiko Ueda, Chapter 15. A Cadmium Standard Regression Line: A Possible New Index for Biological Monitoring.

“Impact, Monitoring and Management of Environmental Pollution” Ed. A. El Numr, pp. 111-125, Nova Science Publishers: New York, 2010年

② Mariko Mochizuki, Makoto Mori, Ryo Hondo & Fukiko Ueda, Biological Monitoring Using A New Technique.

“Wildlife: Destruction, Conservation and Biodiversity” Ed. J. D. Harris & P. L. Brown, pp. 291-300, Nova Science Publishers: New York, 2009年

③ Mariko Mochizuki, Makoto Mori, Hiroshi Kajigaya, Shin-ichi Hayama, Yoshitsugu Ochiai, Ryo Hondo & Fukiko Ueda, The Biological Monitoring of Wild Birds; The Cadmium Content of Organs from Migratory Birds. “Biological Monitoring , pp. 46-60, 2009年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 誠 (MORI MAKOTO)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号: 90143411

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: