

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21510069

研究課題名（和文）環境アンドロゲンバイオマーカー（スピギン）の合成における 2 種 AR の役割解明

研究課題名（英文）Study of the role of two AR subtypes on spiggin synthesis in stickleback kidney

研究代表者

長江 真樹 (NAGAE MASAKI)

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究科・准教授

研究者番号：00315227

研究成果の概要（和文）：成熟したイトヨ雄腎臓から AR α および AR β cDNA を単離した。これら cDNA を導入したレポーター遺伝子アッセイ系により、何れの AR も機能的であり、両者の転写活性化能には違いがないことも明らかにされた。次に種々の濃度の男性ホルモンを未成熟のイトヨ雌に曝露し、腎臓でのスピギンおよび両 AR mRNA の発現変化をリアルタイム定量 RT-PCR 法および *in situ hybridization* 法によりそれぞれ明らかにした。スピギン mRNA 濃度は、男性ホルモン濃度および曝露期間に依存した増加が認められた。一方、AR mRNA 濃度は、何れのタイプにおいても、曝露により顕著な発現量の低下が認められた。このことから、AR は腎臓でのスピギン合成を仲介すると同時に、男性ホルモン受容に応じて自身の発現量を調節（ダウンレギュレート）することが示唆された。また、両 AR の mRNA 濃度は大きく異なっており、AR α mRNA 発現量は β のそれに比べて少なくとも 10 倍高値を示した。このことから、腎臓でのスピギン合成には、主に AR α が関与するものと示唆された。

研究成果の概要（英文）：Full length of AR α and AR β cDNAs were isolated from mature male stickleback kidney. It was showed by reporter gene assay that both were functional AR, and had almost same potency of transcriptional activation. The changes in the mRNA levels of spiggin and both ARs of immature female stickleback treated with androgen were measured and detected by quantitative RT-PCR and *in situ hybridization*. Spiggin mRNA levels increased in androgen dose and exposure duration-dependent manner. In contrast, the mRNA levels of both ARs were significantly decreased by androgen exposure. In addition, the levels of AR α were about 10 times higher than that of AR β during androgen exposure. These results suggested AR α was essential for the spiggin synthesis in stickleback kidney.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：バイオマーカー・環境ホルモン・イトヨ・男性ホルモン・スピギン

1. 研究開始当初の背景

内分泌かく乱化学物質（環境ホルモン）の生物影響を推定する際に、特定のホル

モン刺激に対してのみ鋭敏に反応して合成されるタンパクをバイオマーカーに用いることは極めて有効な方法である。

これまで卵生脊椎動物、特に魚類における化学物質のエストロゲン様作用検出では、卵黄タンパク前駆物質（ビテロゲニン）がバイオマーカーとして多用されており、その有用性が認められている。それに対して、化学物質のアンドロゲン様物質に関しては有効なバイオマーカーが少なく、個体レベルでの作用把握等が十分に行われていないのが現状である。

トゲウオ科魚類の仲間であるイトヨが繁殖期に営巣することは広く知られており、その際、雄がアンドロゲンの刺激により営巣のための接着タンパク「スピギン」を腎臓で特異的に産生することが近年明らかとなった。雌は巣を作らず、通常はスピギンを合成しないが、外因性アンドロゲンにより極めて容易に腎臓での合成が誘導される。そのため、環境アンドロゲン解析において、イトヨ雌でのスピギン産生をバイオマーカーに用いる評価法は非常に有効である。

トゲウオ科魚類のイトヨ雄は、繁殖期に巣作りのために腎臓でスピギンと呼ばれる粘着タンパクを産生する。このタンパクは男性ホルモン特異的に産生されるため、男性ホルモン作用をもつ化学物質に対する優れたバイオマーカーである。

申請者はこれまでに、2種類のスピギン遺伝子のクローニングを終了し、そのアンドロゲン応答性を確認するとともに（若手研究(B)、2004～2005年採択課題）、リアルタイム RT-PCR を用いたスピギン mRNA の高感度測定系を確立済みであり、現在化学物質のもつ男性ホルモン作用および抗男性ホルモン作用評価を行っている（基盤研究 C、2006～2007年採択課題）。しかしながら、スピギン合成に関する男性ホルモン受容体 (AR) の役割を直接的に明らかにした研究は全くない。スピギンをバイオマーカーに用いた解析法は現在、申請者の共同研究者である Katsiadaki 博士らによって OECD の環境ホルモン評価法の一つとして提案されているが、本申請課題である AR を介したスピギン合成メカニズムの解明は、その基礎となる重要な知見であり、早急に明らかにされる必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、本バイオマーカー（スピギン）産生を仲介する重要な調節因子である AR の関与を直接的に証明し、環境ホルモン研究における本バイオマーカーの利用のための論理的裏付けを付与する。

3. 研究の方法

(1) イトヨ AR 遺伝子の単離・構造解析および測定系構築

魚類の AR には α および β の 2 型の存在が示唆されており、イトヨ以外の多くの魚種では両タイプが存在する。イトヨでは α タイプの存在が未知である。本項目ではまず、イトヨ AR の二重性を明らかにするため、同一個体から α と β の 2 種類の AR cDNA をクローニングする。また、リアルタイム定量 RT-PCR 法を用いて、それらの mRNA 測定系を構築する。

(2) 腎臓でのスピギン合成に伴う AR 発現変化の解析

男性ホルモン投与による腎臓でのスピギン産生に伴い、2 型の AR 発現がどのように変化するかを、上記(1)で構築したリアルタイム RT-PCR 法により定量するとともに、*in situ hybridization* 法を併用し、腎臓のどの細胞でその変化が生じるのかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) イトヨ AR 遺伝子の単離・構造解析および測定系構築

まず、イトヨ AR α cDNA を単離し、イトヨ AR の二重性を明らかにした。成熟イトヨ雄腎臓由来の cDNA ライブラリーから、699 全アミノ酸残基をコードするイトヨ AR α (GenBank No. AB545869) をクローニングした。また、AR β についても同時に単離したが、これまで報告されていた配列よりも 5' 部分が少し長いクローンが新たに得られた (GenBank No. AB545870)。これらクローンがコードするアミノ酸配列中には、核内受容体に共通して存在するドメイン構造が認められること、また各ドメイン構造が他魚種で既報の AR と類似性が高いことから、それぞれイトヨ AR α および β をコードする cDNA であると判断された。また、これら cDNA を導入したレポーター遺伝子アッセイ系で、それぞれ機能的 AR であることが確認されたとともに、両者の転写活性化能には違いがないことも明らかにされた。

さらに、それら AR のゲノム配列も部分的に解読し、エクソン-イントロン構造を明らかにしたうえで、mRNA 由来の cDNA のみを増幅可能なプライマーを設計し、両 AR mRNA の高感度測定系を確立した。

(2) 腎臓でのスピギン合成に伴う AR 発現変化の解析

未成熟イトヨを 4L ガラス水槽に收容し、0.1、1 および 10 μ g/L の濃度で 17 α メチルテストステロン (MT) 曝露を 1 週間行った。同時に control として、MT の溶媒として用いたジメチルスルホキシド (DMSO) のみ

を添加する群を設けた。曝露期間は 3 および 7 日とし、毎日飼育水を全交換し、その都度 MT を再添加して曝露設定濃度に調整する半止水式で行った。水温は 15 °C とし、光周期を明期：暗期 = 10 h：14 h に設定した。

摘出した腎臓から RNA 抽出を行い、先で構築したリアルタイム定量 RT-PCR 法により、スピギン、AR α および AR β mRNA 濃度を測定した (図 1)。

スピギン mRNA 濃度は、これまでの解析同様、MT 濃度および曝露期間に依存した濃度増加が認められた。一方、AR mRNA 濃度は、何れのタイプにおいても、曝露により顕著な発現量の低下が認められた。このことから、AR は腎臓でのスピギン合成を仲介すると同時に、男性ホルモン受容に応じて自身の発現量を調節 (ダウンレギュレート) することが示唆された。また、両 AR の mRNA 濃度は大きく異なっており、AR α mRNA 発現量は β のそれに比べて少なくとも 10 倍高値を示した。このことから、腎臓でのスピギン合成には、主に AR α が関与するものと示唆された。

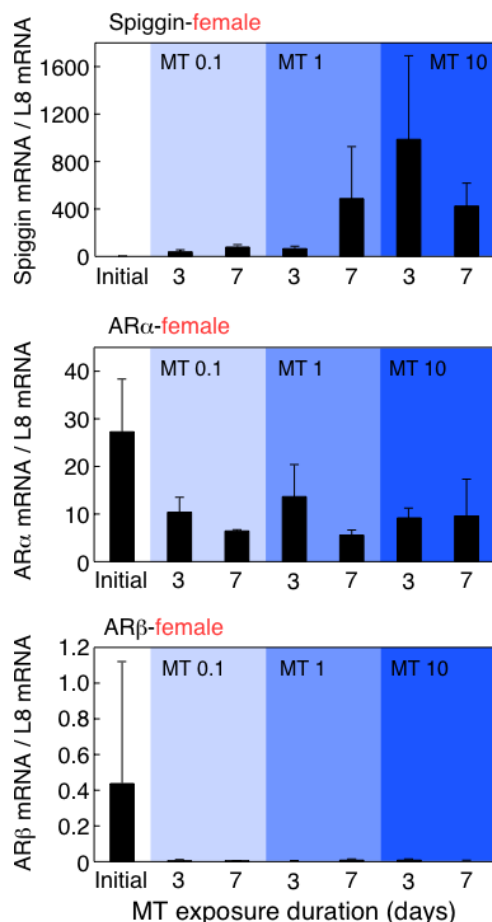


図 1. MT 曝露したイトヨ雌腎臓でのスピギン (上段)、AR α (中段) および AR β (下段) mRNA 発現変化

同じ曝露個体を用いて、*in situ hybridization* 法により腎臓での両 AR mRNA 発現を組織学的に観察した。

図 2 に示すように、MT 曝露前の initial 個体では、AR α mRNA はある程度検出されるが、AR β mRNA 陽性シグナルは殆ど認められない。10 μ g/L の濃度で 7 日間 MT 曝露したイトヨ雌腎臓では、強いスピギン mRNA の発現が認められたが、両 AR mRNA 発現量は initial 個体との間に顕著な差はなかった (図 3)。なお、両 AR、特に AR α mRNA とスピギン mRNA は同一の細胞で発現していることが、隣接切片を用いた観察から明らかにされた。

本法と先に述べた定量 RT-PCR 法での結果から、AR α mRNA 発現量が AR β のそれに比べて明らかに高いことは間違いない。本法で AR β mRNA が殆ど検出されなかったのは、単にリアルタイム定量 RT-PCR 法に比べて検出感度が劣るためと結論付けた。

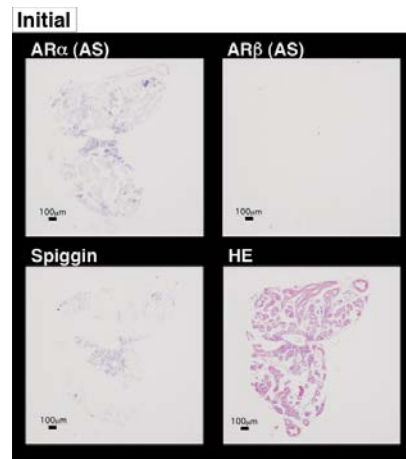


図 2. MT 曝露前 (initial 個体) のイトヨ雌腎臓での AR α (上段左)、AR β (上段右) およびスピギン (下段) mRNA の *in situ hybridization* 像。HE: ヘマトキシリン-エオシン染色像。

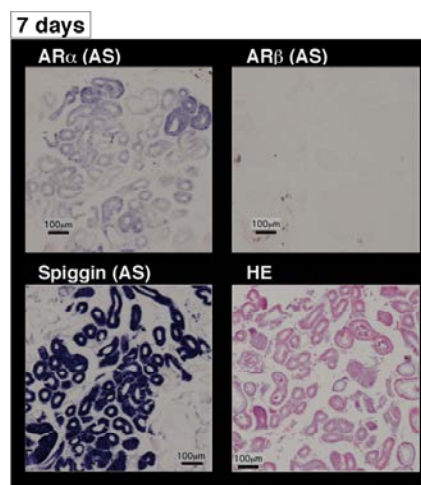


図 3. MT 10 μ g/L、7 日間曝露個体のイトヨ雌腎臓での AR α (上段左)、AR β (上段右) およびスピギン (下段) mRNA の *in situ hybridization* 像。

以上、本研究の結果から、イトヨ腎臓でのスピギン合成には AR α が深く関与することが示された。この結果は、本魚種を用いてスピギンをバイオマーカーに化学物質の男性ホルモンあるいは抗男性ホルモン作用を *in vivo* 試験法により評価する場合、主に AR α を介した作用を見ていることになることが示唆された。

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 6 件)

1. Lange A., Katsu Y., Miyagawa S., Ogino Y., Urushitani H., Kobayashi T., Hirai T., Shears J.A., Nagae M., Yamamoto J., Ohmishi Y., Oka T., Tatarazako N., Ohta Y., Tyler C.R. and Iguchi T. Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring. *Aquatic Toxicology* 109:250-250 (2012)
2. Aoki J., Hatsuyama A., Hiramatsu N. and Soyano K. Effects of ethynylestradiol on vitellogenin synthesis and sex differentiation in juvenile grey mullet (*Mugil cephalus*) persist after long-term exposure to a clean environment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 154(4):346-352 (2011)
3. Park C.B., Aoki J., Lee J.S., Nagae M., Lee Y.D., Sakakura Y., Hagiwara A. and Soyano K. The effects of 17beta-estradiol on various reproductive parameters in the hermaphrodite fish *Kryptolebias marmoratus*. *Aquat. Toxicol.* 96(4):273-279 (2010)
4. Aoki J., Nagae M., Takao Y., Hara A., Lee Y.D., Yeo I.K., Lim B.S., Park C.B. and Soyano K. Survey of contamination of estrogenic chemicals in Japanese and Korean coastal waters using the wild grey mullet (*Mugil cephalus*). *Sci. Total Environ.* 408(3):660-665 (2010)
5. Rhee J.S., Kim R.O., Seo J.S., Kang H.S., Park C.B., Soyano K., Lee J., Lee Y.M. and Lee J.S. Bisphenol A modulates expression of gonadotropin subunit genes in the hermaphroditic fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 152(4):456-466 (2010)
6. Hong L., Fujita T., Wada T., Amano H., Hiramatsu N., Zhang X., Todo T. and Hara A. Choriogenin and vitellogenin in red lip mullet (*Chelon haematocheilus*): Purification, characterization, and evaluation as potential biomarkers for detecting estrogenic activity.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C 149(1):9-17 (2009)

[学会発表] (計 7 件)

1. 長江真樹, 松尾昂, 瀬川卓也, 東藤孝, 勝義直, 井口泰泉, Alexander P. Scott, Ioanna Katsiadaki “イトヨ腎臓での男性ホルモン刺激によるスピギン合成にはAR α が必須である” 第14回環境ホルモン学会研究発表会, 2011年12月1日, 東京.
2. 鈴木絢子, 長江真樹, 征矢野清 “トビハゼを用いた干潟における環境ホルモン汚染の影響評価”, 第14回環境ホルモン学会研究発表会, 2011年12月1日, 東京.
3. 瀬川卓也, 松尾昂, 長江真樹, 平松尚志, 東藤孝, 原彰彦 “イトヨ腎臓におけるスピギンとアンドロゲン受容体の発現解析” 平成23年度日本水産学会北海道支部大会, 2011年11月26日, 函館.
4. 三浦嘉仁, 山城詩織, 山中潤二, 久保隆, 長江真樹, 有蘭幸司, 高尾雄二 “使用方法の異なるPPCPsをマーカーとして用いた河川水の生活排水等による汚濁パターンの分類法の開発” 第20回環境化学討論会, 2011年7月17日, 熊本.
5. 瀬戸彩友, 小柳祐美, 秦拓朗, 荒木一清, 奈須一晃, 高尾雄二, 長江真樹 “九州北部河川における環境エストロゲン汚染の解析”, 第13回環境ホルモン学会研究発表会, 2010年12月16日, 東京.
6. 松尾昂, 岩田健志, 大久保信幸, 松原孝博, 征矢野清, Ioanna Katsiadaki, Alexander P. Scott, 長江真樹 “外因性男性ホルモンにより誘導されるトゲウオ腎臓での特異的バイオマーカー(スピギン)と男性ホルモン受容体の遺伝子発現”, 第12回環境ホルモン学会研究発表会, 2009年12月7日, 東京.
7. 長江真樹, 秦拓朗, 武村幸紀, 城山健一郎, 奈須一晃, 高尾雄二, 大久保信幸, 松原孝博, 征矢野清 “マハゼビテロゲニンを指標にした九州北西部河口域における環境エストロゲン汚染評価”, 第12回環境ホルモン学会研究発表会, 2009年12月7日, 東京.

[図書] (計 3 件)

1. Nagae M., Takao Y., Ohkubo N., Matsubara T. and Soyano K. Estrogenic activity in estuaries by measuring serum vitellogenin concentration of Japanese male common goby in Northwestern part of Kyusyu. In: *Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea*, A. Ishimatsu and H.J. Lie (eds), Nagasaki University/TERRAPUB, Tokyo, pp205-213 (2010).
2. Takao Y., Kuwahara K., Nagae M. and Soyano K. Relationship between concentration of chemical substances in estuarine sediments and

- concentration of vitellogenin in mudskipper (*Periophthalmus modestus*) and common goby (*Acanthogobius flavimanus*) serum. In: *Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea*, A. Ishimatsu and H.J Lie (eds), Nagasaki University/TERRAPUB, Tokyo, pp191-204 (2010).
3. Soyano K., Aoki J., Itashiki, Y., Park C.B., Nagae M., Takao Y., Lee Y.D., Yeo I.K. and Zhong J. Contaminations by endocrine disrupting chemicals in coastal waters of the East China Sea. In: *Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea*, A. Ishimatsu and H.J Lie (eds), Nagasaki University/TERRAPUB, Tokyo, pp215-226 (2010).

6. 研究組織

1) 研究代表者

長江 真樹 (NAGAE MASAKI)
長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究
科・准教授
研究者番号：00314227

(2) 研究分担者

征矢野 清 (SOYANO KIYOSHI)
長崎大学・環東シナ海海洋環境資源研究セ
ンター・教授
研究者番号：80260735
東藤 孝 (TODO TAKASHI)
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教
授
研究者番号：60303111