

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「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」

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

長濱 嘉孝 (自然科学研究機構基礎生物学研究所 教授)

主たる研究参加者

中村 将 (琉球大学熱帯生物圏研究センター 教授)

北野 健 (熊本大学理学部 助教授)

徳元 俊伸 (静岡大学理学部 助教授)

3. 研究内容及び成果

内分泌かく乱物質は、ヒトを含む動物の生体内の正常なホルモン作用を攪乱する物質であり、生殖系、免疫系、脳神経系等に影響を及ぼすものと考えられている。内分泌かく乱作用の本質を理解するためには、それぞれの動物種に関する基礎的知見の蓄積が必要不可欠である。

世界各地の海洋、河川、湖沼で性的異常魚の発見が相次いだが、特定の化学物質との因果関係やその発生機構については殆どが不明であると言っても過言ではない。魚類のみならず多種・多様な野生動物への影響中で最も懸念される事の一つは、自然界における性比の混乱である。内分泌かく乱物質への長期的曝露が性比の混乱を来し、種の維持に重大な影響を及ぼす事が危惧されるが、野生動物の性決定／性分化機構に関する知見は極めて僅かであるのが現状である。内分泌かく乱物質を含む外因性化学物質の性決定／分化過程への影響を正確に判断するためには、対象とする動物種の「遺伝的な性」を理解する事が前提条件となる。

これらの背景から、本研究では①魚類の性決定／性分化機構を解明する、②内分泌かく乱物質がそれらの過程に及ぼす影響の分子機構を解明する、③魚類を用いた新しい内分泌かく乱物質スクリーニング法を開発する、事を目標とした。

本研究の成果概要は以下の通りである。

(1) 魚類生殖系における性ホルモン機能、内分泌かく乱物質の影響と作用機構(長濱グループ)

性ホルモンや内分泌かく乱物質は、性決定過程(性決定遺伝子発現による遺伝的雌雄の決定)ではなく生殖腺の性分化過程(未分化生殖腺の成熟卵巣、成熟精巣への分化)に作用する事、その作用点は生殖腺の体細胞である事、成体魚も性的可塑性を有している事、を明らかにした。

1) 性決定:ヒトの性決定遺伝子SRYに続く2例目として、メダカの性決定遺伝子DMYを単離した。XX個体にDMYを導入し過剰発現させると雄に、XY個体のDMYを破壊すると雌になる事、DMY発現は性ホルモンの影響を受け無い事、を明らかにした。性ホルモンや内分泌かく乱物質は、

性決定そのものではなく、生殖腺性分化過程に影響している事を明らかにした。

2) 生殖腺の性分化: 魚類の卵巣分化にはエストロゲン(E2) / E2受容体(ER)が中心的役割を果たしている事、卵巣分化時のE2作用の一つは生殖細胞数の増加である事、を明らかにした、精巣分化ではアンドロゲン / アンドロゲン受容体(AR)ではなく、DMRT1遺伝子が重要な役割を果たしている事を明らかにした。DMRT1遺伝子過剰発現が、遺伝的雌を雄に性転換する事を明らかにした。遺伝的雌の雄への機能的性転換に成功した脊椎動物での最初の例である。XY個体のE2処理で、生殖腺の卵巣分化、DMRT1発現の完全抑制、E2合成酵素発現の急速な誘導、が起こる事を明らかにした。XX個体のアンドロゲン処理で、生殖腺の精巣分化が起こる事、E2合成抑制を介する間接的作用である事、DMRT1発現が必須である事、を明らかにした。

3) 精子形成: 精原幹細胞から精子までの全精子形成過程をin vitroで再現できるウナギ / ティラピア精巣器官培養系を確立した。サイクリンE2発現増加が精子形成の開始に重要な役割を果たしている事、セルトリ細胞で合成されるE2が精原細胞の増殖調節を行っている事、を明らかにした。

4) 卵成熟: メダカとティラピア卵巣から2種(α 、 γ)のプロゲステロン膜受容体遺伝子を単離した。 α 型は脳、副腎、筋肉、卵巣、精巣で発現しており、特に脳で強く発現している事、 γ 型は卵巣と精巣でのみ発現している事、を明らかにした。

5) 成体魚の性的可塑性: ベラ卵巣器官培養系で、芳香化酵素阻害剤処理により、卵巣退行、精巣分化が起こる事を明らかにした。脊椎動物でin vitroで生殖腺性転換に成功した最初の例である。成体雌個体でも精巣形成、成熟精子産生が起こる事を明らかにした。雌成魚でも充分量のE2が存在しなければ雄に性転換可能であり、魚類の性的可塑性を明確にした重要な知見である。自然条件下で性転換を行う魚種であるか否かに係らず、魚類は一般的に、生涯にわたり、強弱の差こそあれ、脳の性的可塑性を有している可能性が示唆された。内分泌かく乱物質が、生殖腺分化には影響せず生殖腺が正常に発達したとしても、雄どうし、雌どうしの性行動を誘発する可能性が示唆された。

6) 内分泌かく乱物質スクリーニング法の開発: ステロイド受容体及びレポーター恒常的発現細胞系、芳香化酵素プロモーター転写活性測定系、ティラピア生殖腺発現遺伝子DNAマイクロアレイ系、器官培養系、トランスジェニックメダカ系統を開発した。

(2) 性転換魚に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用機構(中村グループ)

1) 雌性先熟魚(雌から雄に性転換): ハワイ産ベラから2種の芳香化酵素遺伝子(脳型、卵巣型)を単離し、卵巣成熟には卵巣型酵素が重要である事を明らかにした。E2が雌性維持に重要な役割を果たし、血中E2濃度が低下すると性転換する事、芳香化酵素遺伝子のオン、オフが性転換の重要な要因である事、を明らかにした。成熟精巣を成熟卵巣に転換する事は不可能と考えられてきたが、性分化後でもE2で転換可能である事を始めて明らかにした。アンドロゲンによる性転換誘起は、E2低下が基本的要因となり、アンドロゲンは促進的に作用する事を明らかにした。ミツボシキウセン卵巣組織培養系で、アンドロゲン処理が卵巣を精巣に誘導する事を明らかに

した。生体外で卵巣から精巣への全過程を誘導できた初めての例である。生体外卵巣培養系を用い、E2、ノニルフェノール (NP) が精巣への転換を抑制する事を明らかにした。

2) 両方向性転換魚 (繰り返し何度も両方向に性転換) : 生殖腺刺激ホルモンは受容体を介して生殖腺の発達/機能を調節しているが、受容体は機能している性の生殖腺で強く発現し、不機能側では極微弱である事、性転換時には発現部位が急速に切り替わる事、を明らかにした。顕著な発現変化であり、性転換の引き金的役割を果たしている可能性が示唆された。芳香化酵素は、雌から雄時には急減し、雄から雌時には急増しており、芳香化酵素/E2が性転換に重要な役割を果たしている事が示唆された。芳香化酵素の卵巣での発現は雌機能時に高く、雄機能時に低い事、その発現は性転換の方向に従って変化する事、を明らかにした。

(3) 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 (北野グループ)

ヒラメでは、遺伝的 (XX/XY) に決定された性でも性分化期の水温の影響を受け、遺伝的雌を高水温で飼育すると全てが雄に転換する。XX集団を18°Cで全雌に、27°Cで全雄に誘導可能である事を明らかにした。ミューラー管抑制因子 (MIS) は雄特異的に、芳香化酵素は雌特異的に発現している事を明らかにした。

1) 性分化機構: E2は雌への性分化に不可欠であり、MIS発現を抑制する事を明らかにした。アンドロゲンはステロイド合成酵素群の発現を抑制し、E2量を減少させて、雄へ性転換する事を明らかにした。

2) 内分泌かく乱物質の影響と作用機構: NP、BPA、植物エストロゲンのゲニスタインは雌化作用を有する事、芳香化酵素発現誘導、MIS発現抑制を通して雌化させる事、を明らかにした。TBToxide が芳香化酵素の発現を抑制し、雄化作用を有する事を明らかにした。トリブチルスズ (TBT) の脊椎動物での雄化作用が証明されたのは始めてである。

3) 内分泌かく乱物質評価系の開発: ウナギ肝臓培養細胞 (Hepa-E1) を利用した、E2様及びアンドロゲン様物質評価法を開発した。NP、BPAは主としてER α を、ゲニスタインは α 、 β 両方を介してE2様作用を示す事を明らかにした。

(4) 卵成熟に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用機構 (徳元グループ)

ジェチルスチルベストール (DES) はステロイド膜受容体を介して卵成熟を誘起する事、その作用経路は天然の卵成熟誘起ホルモン (17 α , 20 β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン) と同一である事、を明らかにした。

1) 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、卵成熟誘起ホルモンが膜受容体に結合し、卵成熟促進因子 (MPF) が活性化されて誘起される。DESが卵成熟誘起作用を有している事、MPF活性化を介する事、を明らかにした。DESはステロイド膜受容体を介して作用する事が示唆された。ペンタクロロフェノールが強い卵成熟阻害作用を有する事を明らかにした。

2)ステロイド膜受容体の同定:キンギョのステロイド膜受容体遺伝子を単離し、 α 、 β 、 γ (1、2)の4タイプが存在する事を明らかにした。 α タイプの解析結果から、DESの標的分子である事を明らかにした。

3)in vivo評価系の確立:DES、ペンタクロロフェノールはin vivoでも作用する事を明らかにした。プロゲステロン類は卵成熟と排卵の両者に作用するが、DESは卵成熟にのみ作用する事を明らかにした。E2は卵成熟を誘起せず、既知のDESのE2様作用とは異なるものである事を明らかにした。内分泌かく乱物質のプロゲステロン様作用として、その作用機構に新しい観点を導入する重要な知見である。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況
魚類の性分化に関し、性決定遺伝子・性分化制御因子・性ホルモンの役割を明らかにし、性分化制御因子や内分泌かく乱物質の作用点が生殖腺の体細胞であることを世界に先駆けて明らかにした。性分化の仕組みや性決定遺伝子が驚くべき多様性を有している事、成体魚でも性の可塑性を保持しており性転換誘起が可能である事、ホルモンや外因性化学物質が成体の性行動にも影響を及ぼす事、等々の新知見は従来の常識/定説を覆すものであり、極めてインパクトの高い成果といえよう。これらの成果が、性の基礎科学に与える影響は計り知れず、今後のさらなる展開を期待したい。

ジエチルスチルベストロール(DES)が膜受容体を介して卵成熟を誘起することを明らかにした。この事は、核内受容体を介したジェノミック作用ばかりでなく、ノンジェノミックな急性的作用をも考慮すべきであることを示している。性ステロイドホルモンが関与する内分泌作用の内のあるものは、遺伝子発現では説明のつかない時間的経過で発揮される事が知られている。内分泌かく乱物質でもその様な作用を示す例が幾つも報告されており、それらの作用機構解明に繋がる事を期待したい。これら一連の成果は、我国が発信した内分泌かく乱物質関連基礎研究中で、最も注目され、重要な役割を果たしたものの一つとして極めて高く評価される。

研究成果は質の高い国際誌を中心に多数(国際誌125報、国内誌4報)報告されている。また、学会発表も活発に(国際学会61件、国内学会214件)行われている。さらには、内分泌かく乱物質のスクリーニング法に関連する特許出願(日本出願1件)も行われている。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

従来、「雄性決定遺伝子の関与が無ければ、生殖腺は雌に分化する様にプログラムされている」と理解されていたが、雌への分化にはステロイド合成酵素遺伝子の発現が、雄への分化にはDMTR1遺伝子の発現が、重要な役割を果たしている事を明らかにした。魚類の性の分化機構と可塑性の一端が明らかにされた事により、これをモデルケースとして、他の脊椎動物での性決定・性分化機構の研究が加速度的に進展するものと期待される。

内分泌かく乱物質のターゲットとして生殖腺体細胞が特定された事、新規ステロイド膜受容体を

介したノンジェノミック／急性的作用を示す可能性がある事、魚類の性の可塑性が示された事、等々により、野生生物／生態系での、ひいては人類への影響をも考慮した、「内分泌かく乱物質問題」の本質的理解が深化するものと期待される。

本研究で開発した各種組織・器官培養系は、性分化機構解明等々の基礎科学の有用・有効なツールとなるばかりでなく、内分泌かく乱物質の簡便な評価法としても有用であろう。既述の高レベルな基礎研究成果に加え、多数の内分泌かく乱物質評価・スクリーニング法をも開発した事を高く評価したい。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

本研究は平成17年度の「継続研究課題」に採択され、研究代表者は引き続き研究を継続中である。