

日本—中国 国際共同研究（都市における環境問題または都市におけるエネルギー問題に関する研究） 平成 29 年度 年次報告書	
研究課題名（和文）	上水の安全性を確保するためのハイスループット性毒性評価システムの構築
研究課題名（英文）	High throughput identification technologies of toxic chemicals for protecting the safety of drinking water
日本側研究代表者氏名	中西 剛
所属・役職	岐阜薬科大学 薬学部 准教授
研究期間	平成 28 年 8 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日

1. 日本側の研究実施体制

氏名	所属機関・部局・役職	役割
中西 剛	岐阜薬科大学・薬学部・准教授	研究全般、統括
伊川正人	大阪大学・微生物病研究所・教授	毒性試験用遺伝子改変マウスの作製
永瀬久光	岐阜薬科大学・薬学部・教授	有害汚染物質の分離手法の確立、遺伝子改変マウスの性状解析

2. 日本側研究チームの研究目標及び計画概要

昨年度に引き続き、水検体中に存在する有害汚染物質を同定するための各種核内受容体アフィニティーカラムの作製を行う。カラム作製に必要な核内受容体タンパク質を得るための遺伝子コンストラクトの作製とタンパク質作製のための条件検討を行う。また作製したアフィニティーカラムにより分画された水検体について、作製した *in vitro* レポーターアッセイ系を用いて、各画分のリガンド活性を評価する。さらに *in vitro* 試験で認められた活性を実験動物でも検出するための、エストロゲン応答性レポーターマウスを用いた評価系の構築を行うとともに、アンドロゲン応答性レポーターマウスの作製を引き続き行う。

3. 日本側研究チームの実施概要

WP1 では、水検体中に存在する有害汚染物質を同定するための、アフィニティーカラムの作製用の受容体タンパク質の作製に関する条件検討を行った。retinoid X receptor (RXR)、retinoic acid receptor (RAR) について 3 種類のタグタンパク質を付加したものを用意して検討を行ったが、Trigger Factor タグが最適であることが確認された。

WP2 では、WP1 で得られた検体の生物活性を迅速に同定するために、エストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR)、retinoid X receptor (RXR)、retinoic acid receptor (RAR)、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ を対象とした、酵母 two-hybrid 法を用いた核内受容体アゴニスト活性評価系の構築を行った。その結果、PPAR γ 以外の受容体については、特定のコアクチベーターとの組み合わせで構築することで、培養細胞を用いたレポーターアッセイと同等の応答性を示す評価系の構築を行うことができた。PPAR γ については、今後最適な条件の再検討を行う必要がある。

WP3 では、WP1 および WP2 で同定された化学物質のエストロゲン作動性およびアンドロゲン作動性を *in vivo* で迅速に評価するために、全身イメージングを用いた *in vivo* スクリーニング試験の構築を試みた。エストロゲン応答性レポーターマウスを用いた検討では、参照エストロゲンであるエチニルエストラジオール (EE) を用いて、具体的なプロトコールの策定を行った。その結果、現在エストロゲン作動性の *in vivo* スクリーニング試験としてガイドライン化されている子宮肥大試験との比較検討において、非侵襲的かつ簡便に検出できるだけでなく、検出感度の向上や試験期間の短縮が可能な優れた試験となる可能性を見出した。一方で、アンドロゲン応答性レポーターマウスについては、ライン化したマウスにおけるアンドロゲン応答性の検討を行ったところ、アンドロゲン応答性を示す可能性のあるラインを見出した。現在、化学物質のアンドロゲン作動性を検出するために最適な条件を検討中である。