

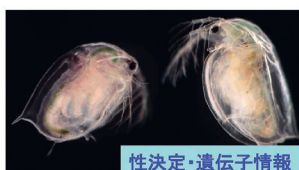
岡崎統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域 生命環境研究室

井 口 泰 泉

動物は体内の生理状態の影響を受けるとともに、光や温度また様々な化学物質など環境からも多くの影響を受けている。私たちの研究室は動物の生殖や性分化に対する化学物質を含めた内外の環境からの影響を、分子レベルで明らかにすることを目的に、2000年2月に基礎生物学研究所に発足し、2000年4月からは統合バイオサイエンスセンターに移行した。

1. 性ホルモンの組織不可逆化誘導機構に関する研究

生殖器官の子宮や膣は女性ホルモンであるエストロゲンの標的器官であり、成熟個体ではエストロゲンに依存して細胞増殖や細胞分化を示す。しかし、生後3日以内の臨界期にエストロゲン投与を受けたマウスの膣は、成熟後卵巣を摘出してエストロゲンがない状態にしても恒久的に細胞増殖を続け、最終的には癌化へと向かう。この不可逆的な膣上皮の増殖機構の解析に取り組んでいる。これまでに、不可逆的増殖を示すマウスの膣上皮では、エストロゲン受容体アルファ ($ER\alpha$) の AF1 領域が恒常的にリン酸化され、上皮成長因子 (EGF) ファミリーの遺伝子発現や EGF 受容体のリン酸化という、細胞増殖因子発現のオートループが形成されていることを見出している。また、出生直後に男性ホルモン (5 α -dihydrotestosterone, 5 α -DHT) の投与を受けたマウスの膣上皮も不可逆的な細胞増殖を示し、 $ER\alpha$ がリン酸化されていること、 $ER\alpha$ が不可欠であることなどを明らかにした。



性決定・遺伝子情報



ステロイドホルモン受容体・性分化



ステロイドホルモン受容体・
遺伝子情報



ステロイドホルモン受容体



エストロゲン応答遺伝子・組織不可逆化機構

2. エストロゲン応答遺伝子に関する研究

環境化学物質の中には ER を介してエストロゲン類似作用を示す物質が多く見出されてきた。エストロゲンは ER を介して標的器官の細胞増殖や分化を引き起こしているが、エストロゲン応答遺伝子に関する情報は極めて少ない。エストロゲンやエストロゲン類似作用を持つ物質の分子機構を明らかにするために、遺伝子を網羅的に解析できるマイクロアレイ手法を用いて、マウス子宮および膣のエストロゲン応答遺伝子の整理を行うとともに、カスタムアレイを作成している。これにより合成エストロゲン、エストロゲン類似作用をもつ化学物質、さらにはダイオキシンによる遺伝子発現等を明らかにするとともに、エストロゲンによって発現誘導される遺伝子のカスケードも明らかにしている。また、マウス子宮におけるエストロゲン応答遺伝子としてアドレノメジュリン遺伝子やアクアポリン 5 遺伝子を見出すとともに、遺伝子上のエストロゲン応答エレメントに関する解析を行っている。

3. オオミジンコのマイクロアレイの作成および性決定機構の解明

無脊椎動物は地球上の動物種の 95% 以上を占めるとも言われ、水の浄化作用や大型動物の餌になるなど、他の生物の生存に不可欠である。環境化学物質の影響を調べるための試験動物として用いられるオオミジンコは、幼若ホルモンと脱皮ホルモンにより成長が制御されており、単為生殖により雌が雌を産んで増殖する。興味深いことにエストロゲンやアンドロゲンなどの脊椎動物の性ホルモンはオオミジンコの生殖には影響しないが、昆虫の成長制御剤として用いられている幼若ホルモン類似物質が卵形成の特定の時期に作用すると雄を産むようになることを見出した。また、幼若ホルモン結合タンパク（受容体）の解明に取り組むとともに、オオミジンコの性決定機構を調べるためにオオミジンコの遺伝子の ESTs を整理してマイクロアレイを作成している。さらに、脱皮ホルモン類似物質も殺虫剤として環境中に散布されており、甲殻類に対する影響が危惧されていることから、脱皮ホルモン作用をする物質を検出する系を構築するためにオオミジンコより脱皮ホルモン受容体とウルトラスピラクルの cDNA を単離している。さらなる研究の発展を目指し、オオミジンコの個体での遺伝子発現や機能解析を進めるための RNA 干渉法を用いた遺伝子ノックダウン系の開発に取り組んでいる。

4. 爬虫類の温度依存性性分化機構の解明

爬虫類の中には性染色体を保持せず温度によって性が決定する種類（ワニ、大部分のカメ、一部のトカゲ）がいる。しかし、この性染色体に依存しない温度依存性の性分化機構の分子メカニズムは解明されていない。この温度依存性性決定機構を解明するために、フロリダ大学との共同研究により、アメリカワニの ER α をクローニングした。また、南アフリカ共和国のプレトリア大学との共同研究により、クロコダイルからも ER α 遺伝子のクローニングを行った。また、カメのステロイドホルモン受容体である ER、アンドロゲン受容体遺伝子 (AR)、プロゲステロン受容体遺伝子 (PR) のクローニングも行っている。AR 及び PR のクローニングは爬虫類では初めての報告となる。爬虫類のステロイドホルモン受容体は鳥類との相同性が非常に高く、また両生類よりは哺乳類に似ていることが判明した。ステロイドホルモン受容体の培養細胞を用いた転写活性を測定するレポーター遺伝子アッセイ

系を立ち上げ、各受容体の転写活性を測定した。ER はエストロゲンに、AR はアンドロゲンに、PR はプロゲステロンに対して、それぞれ濃度依存的な転写活性を有するというリガンド特異性を確認することが出来た。さらに、膜に局在するホルモン受容体遺伝子の単離を試みており、ワニやカメの膜型プロゲステロン受容体遺伝子の単離に成功している。これまでに、ワニの熱ショックタンパク質遺伝子・熱ショック転写因子や温度受容体 (TRP) のクローニングを行っており、これらを基にして爬虫類の温度依存的性決定機構の解析を進めていく予定である。

5. 魚の性ホルモン受容体遺伝子の単離・機能解析および精巣卵誘導機構の解明

イギリスの河川では、下水処理場からのエストロゲンおよびエストロゲン類似物質によるコイ科の魚であるローチの精巣に卵が形成され (精巣卵)、生殖の低下が問題となっている。精巣卵の発症機構を解明するために、ローチのステロイドホルモン産生に関与する酵素の遺伝子群、性分化関連遺伝子群および性ホルモン受容体遺伝子をクローニングした。また、馬の尿中に含まれるエストロゲンの一種であるエキリンとその代謝産物は、非常に高い転写活性を持つことを明らかにしている。さらに、魚類におけるエストロゲンによる精巣卵の誘起機構を解明する目的で、メダカを用いて精巣卵発症に関連する遺伝子の探索を行っている。

6. 両生類のホルモン受容体遺伝子の単離と遺伝子動物園への取り組み

広島市安佐動物公園との共同研究により、特別天然記念物のオオサンショウウオの ER α 遺伝子のクローニングを行なった。得られたオオサンショウウオ ER α の転写活性を測定し、エストロゲンに対する濃度依存的な転写活性を検出した。また、ステロイドホルモン受容体遺伝子を基にした分子進化、新たな分類・系統を行うために、様々な両生類からの遺伝子クローニングを試みている。さらに、多くの動物の遺伝子情報を保存する遺伝子動物園構想を国際的に進めつつある。

参考文献

1. Katsu, Y., S. Kohno, T. Oka, N. Mitsui, O. Tooi, N. Santo, H. Urushitani, Y. Fukumoto, K. Kuwabara, K. Ashikaga, S. Minami, S. Kato, Y. Ohta, L.J. Guillelte, Jr., and T. Iguchi (2006) Molecular cloning of estrogen receptor alpha (ER α ; ESR1) of the Japanese giant salamander, *Andrias japonicus*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 257-258,84-94.
2. Watanabe, H., N. Tatarazako, S. Oda, H. Nishide, I. Uchiyama, M. Morita and T. Iguchi (2005) Analysis of expressed sequence tags of the waterbfrea *Daphnia magna*. *Genome*, 48, 606-609.
3. Miyagawa, S., Y. Katsu, H. Watanabe and T. Iguchi (2004) Estrogen-independent activation of ErbBs signaling and estrogen receptor α in the mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Oncogene*, 23, 340-349.
4. Katsu, Y., D. Lubahn and T. Iguchi (2003) Expression of novel C-type lectin in the mouse vagina. *Endocrinology*, 144, 2597-2605.
5. Watanabe, H., A. Suzuki, T. Mizutani, S. Kohno, D.B. Lubahn, H. Handa and T. Iguchi. (2002) Genome-wide analysis of changes in early gene expression induced by estrogen. *Genes to Cells*, 7, 497-507,.
6. Iguchi, T., H. Watanabe and Y. Katsu (2001) Developmental effects of estrogenic agents on mice, fish and frog: a mini-review. *Horm. Behav.* 40, 248-251.

