

3-3 生命環境

井 口 泰 泉 (教授)
渡 邊 肇 (助教授)

1) 専門領域：内分泌学，分子生物学，生殖生物学，環境科学

2) 研究課題：

- a) 周生期のマウスに対する性ホルモンの組織不可逆化誘導機構に関する研究
- b) エストロゲン応答遺伝子に関する研究
- c) オオミジンコのマイクロアレイの作成およびオオミジンコ性決定機構の解明
- d) 爬虫類の温度依存性性分化機構の解明
- e) 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
- f) 両生類のホルモン受容体遺伝子の単離
- g) 各種動物のホルモンおよびホルモン類似物質に対する臨界期に関する研究

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 周生期のマウスに対する性ホルモンの組織不可逆化誘導機構に関する研究

マウスの子宮および膺はエストロゲンの標的器官であり，エストロゲンに依存して，細胞増殖および分化を示す。しかし，生後3日以内にエストロゲンの投与を受けたマウスの膺は，エストロゲン非依存的に細胞増殖を続け，癌化へと向かう。出生直後にエストロゲン投与を受けたマウスの膺上皮は，エストロゲン非依存に上皮成長因子（EGF）ファミリーの遺伝子発現が継続し，erbB およびEGF受容体がリン酸化し，エストロゲン受容体アルファ（ER α ）のAF1領域もリン酸化しており，細胞増殖因子発現のオートループが形成されている。出生直後にアンドロゲン（5 α -dihydrotestosterone, 5 α -DHT）投与を受けたマウスの膺上皮も，エストロゲン非依存的にER α のAF1領域がリン酸化されていること，膺細胞の不可逆的増殖にはER α が不可欠であることを，ER α ノックアウトマウスを用いて明らかにした。また，新しく開発したER α 遺伝子の転写活性を測定するレポーター遺伝子アッセイ系を用いて，5 α -DHTはマウスER α に結合して転写を活性化することを明らかにした。その活性はエストロゲンと比較して100~1000倍の濃度が必要であることが分かった。

- b) エストロゲン応答遺伝子に関する研究

マイクロアレイ手法を用いて，マウス子宮および膺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。合成エストロゲンのジエチルstilbestロール，エストロゲン類似作用をもつノニルフェノール，さらにはダイオキシンによる遺伝子発現等を明らかにした。さらに，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。アドレノメジュリン遺伝子がエストロゲン応答遺伝子であることを見出し，マウス子宮での発現を解析した。

- c) オオミジンコのマイクロアレイの作成およびオオミジンコ性決定機構の解明

- ①オオミジンコのマイクロアレイの作成およびオオミジンコ性決定機構

環境化学物質の影響を調べるのに汎用されるオオミジンコは，単為生殖により雌が雌を産んで増殖する。農

薬として用いられ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ので、オオミジンコの遺伝子の ESTs を整理し、マイクロアレイを作成している。さらに、オオミジンコの性決定機構を調べている。

②オオミジンコにおける RNAi 法の試み

昨年単離したホワイト遺伝子、脱皮ホルモン受容体遺伝子の cDNA を用いて dsRNA を合成し、オオミジンコへのマイクロインジェクションを行っている。また、オオミジンコへのエレクトロポレーションによる遺伝子導入も試みている。

③オオミジンコ DM ドメイン遺伝子ファミリーの解析

オオミジンコの性差の分子基盤を明らかにするために、ショウジョウバエが有する DM ドメイン遺伝子全てのオーソログ (*dsx*, *dmrt11E*, *dmrt93B*, *dmrt99B*) の完全長 cDNA をオオミジンコから単離し、全塩基配列を決定した。cDNA の構造に性差は認められなかった。しかし、定量 PCR により胚発生過程における発現量を比較した結果、*dsx* は発生が進むにつれオスでより多く発現することが明らかとなった。一方、成熟個体の生殖腺では、*dsx* と *dmrt93B* は精巣、*dmrt11E* と *dmrt99B* は卵巣でより多く発現していることが判明した。

d) 爬虫類の温度依存性性分化機構の解明

爬虫類の中には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、性染色体に依存しない温度依存性性決定機構の分子メカニズムは解明されていない。女性ホルモンによって性が変わることから、性ホルモン受容体に着目して研究をすすめている。南アフリカとの共同研究により、ワニの一種であるクロコダイルから、ER α のクローニングを行った。クロコダイルの ER は他のワニの ER と非常に相同性が高く（カイマンと98%、アリゲーターと98%）、ニワトリともよく似ていることが判明した。同じ爬虫類であるトカゲとの相同性は82%であり、ER の分子進化という観点から、ワニの仲間は鳥類に近いことが示された。また、カメの ER 遺伝子、アンドロゲン受容体遺伝子、プロゲステロン受容体遺伝子のクローニングを行っている。アンドロゲン及びプロゲステロン受容体遺伝子のクローニングは爬虫類では初めての報告になる。次に、それぞれのホルモン依存的な転写活性の測定を試みた。培養細胞を用いた転写活性を測定する系を立ち上げ、各受容体の転写活性を測定した。ER α はエストロゲンに、アンドロゲン受容体はアンドロゲンに、プロゲステロン受容体はプロゲステロンに対して、濃度依存的な転写活性を有することが分かった。さらに、温度依存性に注目して、アメリカワニから、熱ショックタンパク質遺伝子のクローニングを試みており、HSP27, 40, 46, 60, 70, 90, 108 などの塩基配列の決定が完了している。性決定がおこる胚発生の時期における発現パターンを調べたが、少なくとも RNA のレベルでの顕著な変動は起こっていないことが確認された。現在、ワニの熱ショック転写因子の遺伝子単離を進めており、性決定への関与などを解析する予定である。

e) 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のローチの精巣卵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、性分化関連遺伝子およびホルモン受容体遺伝子のクローニングを行っている。得られた ER を用いて転写活性を測定した。ローチの ER は他の生物の ER と同様にエストロゲンに対して濃度依存的な転写活性を有することが判明した。また、他の指標となる魚類から ER をクローニングして、転写活性

を測定する系を立ち上げることに成功し、現在様々なエストロゲンおよびエストロゲン類似物質に対する作用機構を解析している。

魚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、メダカの精巣内に卵が発生する時に発現する遺伝子の探索を行っている。現在、2つの遺伝子に着目してその遺伝子の塩基配列・アミノ酸配列の決定、精巣卵誘導時における詳細な発現パターンを解析中である。

f) 両生類のホルモン受容体遺伝子の単離

広島のア佐動物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cDNAライブラリーを作成し、性ホルモン受容体遺伝子のクローニングを行い、オオサンショウウオのER α 遺伝子のクローニングを行った。組織特異性を調べたところ、腎臓、生殖腺、肝臓での発現量が多く、また皮膚でも発現していることが確認できた。さらに、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、従来の系よりもシンプルで感度が高い、新規の転写活性を測定する系を開発した。次のステップとして、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。現在、オオサンショウウオ、イモリ、アホロートル、アフリカ産ヒキガエルなどを材料として用いている。

4) 学術論文

H. WATANABE, E. Takahashi, M. Kobayashi, M. Goto, A. Krust, P. Chambon and T. IGUCHI, “The estrogen-responsive adrenomedullin and receptor-modifying protein 3 gene identified by DNA microarray analysis are directly regulated by estrogen receptor.” *J. Mol. Endocr.*, 36, 81-89 (2006).

N. Mitsui, T. Fujii, M. Miyahara, T. Oka, A. Kashiwagi, K. Kashiwagi, H. Handa, H. Urushitani, N. Santo, O. Tooi and T. IGUCHI, “Development of metamorphosis assay using *Silurana tropicalis* for the detection of thyroid hormone disrupting chemicals”. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 64, 281-287 (2006).

T. Oka, N. Mitui, M. Hinago, M. Miyahara, T. Fujii, O. Tooi, N. Santo, H. Urushitani, T. IGUCHI, Y. Hanaoka and H. Mikami, “All ZZ male *Xenopus laevis* provides a clear sex reversal test for feminizing endocrine disruptors”. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 63, 236-243 (2006).

S. Oda, N. Tatarazako, H. WATANABE, M. Morita and T. IGUCHI, “Genetic differences in the production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs”. *Chemosphere*, 63, 1477-1484 (2006).

H. Kato, T. Furuhashi, M. Tanaka, Y. Katsu, H. WATANABE, Y. Ohta and T. IGUCHI, “Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats”. *Reprod. Toxicol.*, 22, 20-29 (2006).

T. Matsuno, N. Tominaga, K. Arizono, T. IGUCHI and Y. Kohara, “Graphical Gaussian modeling for gene association structures based on expression deviation patterns induced by various chemical stimuli”. *Jeice Trans. Inf. Syst.*, E89-D, 1563-1574 (2006).

K. Inada, S. Hayashi, T. IGUCHI and T. Sato, “Establishment of a primary culture model of mouse uterine and vaginal stroma for studying *in vitro* estrogen effects”. *Exp. Biol. Med.*, 231, 303-310 (2006).

M.P. Gunderson, S. Kohno, B. Blumberg, T. IGUCHI and L.J. Guillette Jr., “Up-regulation of an alligator Cyp3A gene by toxaphene and dexamethasone and its effect on plasma testosterone concentrations”. *Aquat. Toxicol.*, 78, 272-283 (2006).

- Y. Katsu, J. Myburgh, S. Kohno, G.E. Swan, L.J. Guillette Jr. and T. IGUCHI**, “Molecular cloning of estrogen receptor α of the Nile crocodile”. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 143, 340-346 (2006).
- Y. Katsu, and T. IGUCHI**, “Tissue specific expression of Clec2g in mice”. *Europ. J. Cell Biol.*, 85, 345-354 (2006).
- A. Suzuki, H. WATANABE, T. Mizutani, T. Sato, Y. Ohta and T. IGUCHI**, “Global gene expression in mouse vaginae exposed to diethylstilbestrol at different ages”. *Exp. Biol. Med.*, 231, 632-640 (2006).
- F. Grün, H. WATANABE, Z. Zamanian, L. Maeda, K. Arima, R. Chubacha, D.M. Gardiner, J. Kanno, T. IGUCHI and B. Blumberg**, “Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates.” *Mol. Endocrinol.*, 20, 2141-2155 (2006).
- Y. Katsu, 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. Guillette, Jr. and T. IGUCHI**, “Molecular cloning of estrogen receptor alpha (ER α ; ESR1) of the Japanese giant salamander, *Andrias japonicus*.” *Mol. Cell. Endocrinol.*, 257-258, 84-94 (2006).
- M. Kajiwara, S. Kuraku, T. Kurokawa, K. Kato, S. Toda, H. Hirose, S. Takahashi, Y. Shibuya, T. IGUCHI, T. Matsumoto, T. Miyata, T. Miura and Y. Takahashi**, “Tissue preferential expression of estrogen receptor gene in the marine snail, *Thais clavigera*.” *Gen. Comp. Endocrinol.*, 148, 315-326 (2006).
- M. Kobayashi, E. Takahashi, S. Miyagawa, H. WATANABE and T. IGUCHI**, “Chromatin immunoprecipitation-mediated identification of aquaporin 5 as a regulatory target of estrogen in the uterus.” *Genes Cells*, 11, 1133-1143 (2006).
- E.F. Orlando, Y. Katsu, S. Miyagawa and T. IGUCHI**, “Cloning and differential expression of estrogen receptor and aromatase genes in the self-fertilizing hermaphrodite and male mangrove *Rivulus*, *Kryptolebias marmoratus*.” *J. Mol. Endocrinol.*, 37, 353-365 (2006).
- H. Kato, K. Naito, Y. Katsu, H. WATANABE, Y. Ohta and T. IGUCHI**, “Ontogenic expression of estrogen receptor α in female rat corneas.” *Ophthalmic Res.*, 38, 358-362 (2006).
- K. Takashima-Sasaki, M. Komiyama, T. Adachi, K. Sakurai, H. Kato, T. IGUCHI and C. Mori**, “Effect of exposure to high isoflavone containing diets on prenatal and postnatal offspring mice.” *Biosci. Biotech. Biochem.*, 70, 2874-2882 (2006).
- A. Kirigaya, S. Hayashi, T. IGUCHI and T. Sato**, “Developmental effects of ethinylestradiol on reproductive organs of female mice.” *In Vivo*, 20, 867-873 (2006).
- H. WATANABE, H., E. Takahashi, Y. Nakamura, S. Oda, N. Tatarazako and T. IGUCHI**, “Development of *Daphnia magna* DNA microarray for the evaluation of toxicity of environmental chemicals.” *Environ. Toxicol. Chem.*, (in press).
- A. Hara, K. Hirano, M. Shimizu, H. Fukada, T. Fujita, F. Itoh, H. Takada, M. Nakamura and T. IGUCHI**, “Carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin: characterization of yolk proteins, development of immunoassays and use as a biomarker of exposure to environmental estrogens.” *Environ. Sci.*, (in press).
- M. Sumi, Y. Kawashima, T. Fukumaki, H. Ishibashi, K. Arizono, T. IGUCHI and M. Shimizu**, “Comparison of serum vitellogenin, steroid hormone, gonad histopathology and bioaccumulation in common carp (*Cyprinus carpio*) between two rivers and a lake in Japan: Potential for endocrine disruption.” *Environ. Sci.*, (in press).

A. Suzuki, H. Urushitani, T. Kobayashi, T. Sato, H. WATANABE, Y. Ohta and T. IGUCHI, “Gene expression change in the Müllerian duct of the mouse fetus exposed to diethylstilbestrol *in utero*.” *Exp. Biol. Med.*, (in press).

S. Oda, N. Tatarazako, M. Dorgerloh, R. Johnson, O. Kusk, D. Leverett, S. Marchini, T. Nakari, T. Williams and T. IGUCHI, “Strain difference in sensitivity to 3,4-dichloroaniline and insect growth regulator, fenoxycarb, in *Daphnia magna*.” *Ecotoxicol. Environ. Safety*, (in press).

T. Kobayashi, T. IGUCHI and Y. Ohta, “A betalipoproteinemia induced by ORP150 over-expression in mice.” *Comp. Med.*, (in press).

井口泰泉, “内分泌かく乱物質問題の解明のための Ecotoxicogenomics の重要性.” *日本衛生学雑誌*, 61, 11-18 (2006).

井口泰泉, “環境ホルモン研究の新たな話題.” *医学のあゆみ*, 216, 616-617 (2006).

永田恵美子, 井口泰泉, “内分泌かく乱物質への国際的取り組み.” *ホルモンと臨床*, 54, 253-260 (2006).

井口泰泉, “基礎生物学から環境問題を探る.” *総研大ジャーナル*, no.10, 2006秋: 11-13, 2006.

井口泰泉, “巻頭言: 多様な作用メカニズムの解明と研究体制の整備.” *環境ホルモン学会ニュースレター*, 9 (3): 1, 2006.

5) 著書, 総説

H. WATANABE and T. IGUCHI, “Using ecotoxicogenomics to evaluate the impact of chemicals on aquatic organisms”. *Marine Biol.*, 149, 107-115 (2006).

T. IGUCHI, H. WATANABE and Y. Katsu, “Application of ecotoxicogenomics for studying endocrine disruption in vertebrates and invertebrates.” *Environ. Health Perspect.*, 114 Suppl.1, 101-105 (2006).

T. IGUCHI, F. Irie, H. Urushitani, O. Tooi, Y. Kawashima, M. Roberts, L. Norrgren and T.H. Hutchinson, “Availability of *in vitro* vitellogenin assay for screening of estrogenic and anti-estrogenic activities of environmental chemicals.” *Environ. Sci.*, 13, 161-183 (2006).

J. Cook, T. IGUCHI, E. Linney, A. Miracle, J. Shaw, M. Viant and T. Zacharewski, ““Omic” Approaches in the context of environmental toxicology.” In Benson, W.H. and Di Giulio, R.T. (eds.) *Genomic Approaches for Cross-Species Extrapolation in Toxicology*. Taylor and Francis, CRC Press, pp. 1-31, (in press).

6) 国際会議発表リスト

T. IGUCHI, “Current progress of endocrine disruptor research in Japan.” Gordon Research Conference 2006: Environmental Endocrine Disruptors, Il Ciocco, Italy, June 4-9 (2006).

H. WATANABE, N. Tatarazako, S. Oda and T. IGUCHI, “Toxicogenomic approach on *Daphnia magna*.” Gordon Research Conference 2006: Environmental Endocrine Disruptors, Il Ciocco, Italy, June 4-9 (2006).

T. IGUCHI, H. WATANABE and Y. Katsu, “Application of toxicogenomics for studying endocrine disruption and basic biology in vertebrates and invertebrates.” 23rd Congress of European Comparative Endocrinologist, Manchester, UK. September 1 (2006).

T. IGUCHI, “Application of toxicogenomics for studying endocrine disruption.” Korea Genome Organization (KOGO), Annual Meeting, Seoul, Korea. September 22 (2006).

T. IGUCHI, “Developmental effects of sex hormones on fish.” *Ecophysiology in Marine Organisms*. Center for Marine Bioscience and Biotechnology, National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan. October 13-14 (2006).

T. IGUCHI, “Application of microarray for identification of estrogen response element, estrogen responsive genes and unpredictable effects through nuclear receptors.” Korean Society of Toxicogenomics & Toxicoproteomics, Incheon, Korea. November 6 (2006).

Y. Katsu and T. IGUCHI “Development of roach estrogen receptor reporter gene assays (ER α and ER β) and their application to screen environmental estrogens” The 8th UK-Japan Annual Scientific Workshop, UK, October, 2006.

7) 招待講演

T. IGUCHI, “Molecular approaches to understanding estrogenic contaminants and the reproductive system”. Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Facultad de Ciencias, Mexico City, Mexico. March 13, 2006.

T. IGUCHI, “Molecular approaches to understanding estrogenic contaminants and the reproductive system.” Universidad Juarez Autonoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, Mexico., March 15, 2006.

井口泰泉, “地球環境と生物—窒素の功罪—.” 第15回日本有病者歯科医療学会総会, 岡崎市, 3月26日 (2006).

井口泰泉, “化学物質による内分泌かく乱の幾つかのメカニズムについて.” 日本リスク研究学会第19回春期講演シンポジウム. 東京大学山上会館. 6月16日 (2006).

T. IGUCHI, “Temperature-dependent sex determination in alligators.” University of Florida, Gainesville, FL, USA. July 26 (2006).

T. IGUCHI, “Application of toxicogenomics for studying Endocrine disruption and basic biology in vertebrates and invertebrates”. IGB, Leibniz-Institute, Inland Fisheries Research Institute, Berlin, Germany. September 4 (2006).

T. IGUCHI, “Recent progress of endocrine disrupting chemical issues in Japan and application of ecotoxicogenomics for studying endocrine disruption in vertebrates and invertebrates”. Kyung Hee University, Korea. September 21 (2006).

井口泰泉, “内分泌かく乱物質の生体影響に関する最近の知見と今後の課題.” 第50回全国環境衛生大会, 11月1日 (2006).

8) 学会および社会的活動

環境省

厚生労働省

経済産業省

神奈川県化学物質等環境保全対策委員会 委員長

内閣府食品安全委員会容器包装部会 委員

OECD Validation and Management Group 委員

OECD Endocrine Disruptor Testing and Assessment 委員

中央環境審議会臨時委員

日本内分泌かく乱化学物質学会 副会長

Ecotoxicology and Environmental Safety 編集委員

Environmental Sciences 編集長

9) 他大学での非常勤講師, 客員教授

東京工業大学 非常勤講師

東京大学 非常勤講師

島根大学 非常勤講師

フロリダ大学 客員教授

11) 外部獲得資金

環境省日英共同研究「魚類精巣卵の誘起機構解析」

環境省基盤研究「オオミジンコの遺伝子の解析」

科学研究費特定領域「爬虫類の性決定・性分化の分子機構解析」

厚生科学研究「内分泌攪乱物質低用量影響・複合影響」

厚生科学研究「化学物質による子供への健康影響に関する研究」

環境省環境技術開発等推進費「ゲノミクスに基づく化学物質の生態影響」