

3-2 生命環境

井口泰泉（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の解明
- b) オオミジンコ性決定機構の解明
- c) 爬虫類の温度依存性性分化機構の解明
- d) 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
- e) エストロゲン受容体の分子進化の解析

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の解明

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。膺では臨界期でのエストロゲン投与により，上皮成長因子関連の遺伝子およびそれらの受容体遺伝子のエストロゲン非依存の発現が起こることを明らかにしている。臨界期における内分泌かく乱化学物質曝露が生体に影響を及ぼすメカニズムを明らかにすることを目的として，出生直後のマウスに合成エストロゲン（DES）を投与し，膺上皮細胞のエストロゲン非依存の増殖を誘導した。この現象は，曝露影響が不可逆的に持続することから，エピジェネティクスな観点から遺伝子発現制御機構について明らかにする必要がある。DES 曝露マウスと対照群を用いて DNA マイクロアレイにより遺伝子発現レベルの解析を行った。この結果をもとに，発現に変化があった遺伝子のゲノム領域についてヒストン修飾をクロマチン免疫沈降法（ChIP）により解析した。その結果，特有の遺伝子について，新生児期曝露マウスにおいてクロマチン状態が変化していることが明らかになった。更に，DNA メチル化状態を ChIP on chip 法で網羅的に解析することを試みている。

b) オオミジンコ性決定機構の解明

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，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た。

昆虫では，ミツバチの CSD やハエの TRA 等の SR (arginine serine-rich) タンパク質が性決定に関与することが知られている。そこでオオミジンコの性差の分子基盤を明らかにするために，CSD のオーソログの完全長 cDNA をオオミジンコから単離し，発現解析を行った。興味深いことに，CSD cDNA の構造及び発現量に性差は認められなかった。オオミジンコにおいて CSD は，性決定に機能していないと予想される。

c) 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。これまで不明であったベータ型のエストロゲン受容体遺伝子の単離に成功した。エストロゲンに対する転写活性を調べ、また種特異性について解析した。また、膜に局在するホルモン受容体遺伝子の単離を試み、ワニとカメの膜型プロゲステロン受容体と膜型エストロゲン受容体の遺伝子を単離した。現在、ベータ型のエストロゲン受容体や膜型ホルモン受容体の胚発生中の発現パターンを解析中である。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いる。また、温度感受性蛋白質である TRP ファミリーに着目して、これまでの TRPV4 遺伝子を単離している。今後、これらの蛋白質の発現解析・機能解析とともに他の種類の熱ショックタンパク質や TRP ファミリー遺伝子の単離を進める予定である。

d) 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、馬の尿中に含まれるエストロゲン的一种であり、イギリスの河川中に存在しているエキリンとその代謝産物について、ER の転写活性を調べたところ、非常に高い活性を持つことが判明した。実際にこれらの化学物質が魚の個体にどのような影響を及ぼすのかを今後調べる必要がある。また、魚類の ER に対するエストロゲンや化学物質の感受性を解析するレポーター系を確立している。この系を用いて、ローチ、コイ、メダカ、ファットヘッド、ミノー、ゼブラフィッシュ、イトヨ、ブルーギル、キンギョ、グッピーの9種類の魚の ER に関して解析を行なっている。これまでに、環境中に存在するエストロゲン様の活性をもった化学物質に対する活性を測定したところ、メダカとグッピーが他の魚よりも化学物質に対する感受性が高い事が示された。今後、*in vitro* で得られた結果と個体への影響の相関を調べて行く予定である。

e) エストロゲン受容体の分子進化の解析

女性ホルモンであるエストロゲンは、エストロゲン受容体を介して脊椎動物の生殖器官の発生・分化・維持機構に密接に関わっている。しかし、この「エストロゲン-エストロゲン受容体」のシグナル伝達系が進化上どの段階から出来上がってきているのかは不明である。エストロゲン受容体遺伝子の分子進化を解明する目的で、古代魚からのエストロゲン受容体の遺伝子の単離を試みた。ハイギョ、ガー、チョウザメからエストロゲン受容体を単離する事が出来た。いずれも、高等脊椎動物と同じようにアルファ型とベータ型の2種類のエストロゲン受容体が見つかった。さらに、魚類ではベータ型は2タイプ存在するが、古代魚ではベータ型は1種類のみ保持している事が判明した。この結果は、魚類で見つかっている2種類のベータ型は遺伝子の重複によって出現したことを示し、この遺伝子重複は真骨魚類への進化の際に起こった事が示唆される興味深い内容を提供している。さらに、無脊椎動物と脊椎動物の境界線上に位置するヤツメウナギとナメクジウオからエストロゲン受容体遺伝子の単離に成功しており、エストロゲンに対する転写活性等の機能解析が進行中である。

4) 学術論文

Y. Katsu, R. Ichikawa, T. Ikeuchi, S. Kohno, L.J. Guillette Jr. and T. Iguchi, "Molecular cloning and characterization

of estrogen, androgen and progesterone nuclear receptors from a freshwater turtle (*Pseudemys nelsoni*)." *Endocrinology*, **149**, 161-173 (2008).

Y. Kato, K. Kobayashi, S. Oda, J.K. Colbourne, N. Tatarazako, H. Watanabe and T. Iguchi, "Molecular cloning and sexually dimorphic expression of DM-domain genes in *Daphnia magna*." *Genomics*, **91**, 94-101 (2008).

T. Kobayashi, Y. Takita, A. Suzuki, Y. Katsu, T. Iguchi, and Y. Ohta, "Vacuolar degeneration of skeletal muscle in transgenic mice overexpressing ORP150." *J. Vet. Med. Sci.*, **70**, 115-118 (2008).

H. Nishida, S. Miyagawa, D. Matsumaru, Y. Wada, Y. Satoh, Y. Ogino, T. Iguchi, S. Fukuda, T. Taga and G. Yamada, "Gene expression analyses on the embryonic external genitalia: identification of regulatory genes possibly involved in masculinization processes." *Congen. Anorm.*, **48**, 63-67 (2008).

M.R. Milnes, T.A. Bryan, Y. Katsu, S. Kohno, B.C. Moore, T. Iguchi and L.J. Guillette Jr., "Increased post hatching mortality and loss of sexually dimorphic gene expression in alligators (*Alligator mississippiensis*) from a contaminated environment." *Biol. Reprod.*, **78**, 932-938 (2008).

R. Connon, H.L. Hooper, R.M. Sibly, F.L. Lim, L.H. Heckmann, D.J. Moore, H. Watanabe, A. Soetaert, K. Cook, S.J. Maund, T.H. Hutchinson, J. Moggs, W. De Coen, T. Iguchi and A. Callaghan, "Linking molecular and population stress responses in *Daphnia magna* exposed to cadmium." *Environ. Sci. Technol.*, **42**, 2181-2188 (2008).

T. Oka, O. Tooi, N. Mitsui, M. Miyahara, Y. Ohnishi, M. Takase, A. Kashiwagi, T. Shinkai, N. Santo and T. Iguchi, "Effect of atrazine on metamorphosis and sexual differentiation in *Xenopus laevis*." *Aquat. Toxicol.*, **87**, 215-226 (2008).

M.R. Milnes, A. Garcia, E. Grossman, F. Grun, J. Shiotsugu, M.M. Tabb, Y. Kawashima, Y. Katsu, H. Watanabe, T. Iguchi and B. Blumberg, "Activation of steroid and xenobiotic receptor (SXR, NR112) and its orthologs in laboratory, toxicological, and genome model species." *Environ. Health Perspect.*, **116**, 880-885 (2008).

S. Kohno, D. Bermudez, Y. Katsu, T. Iguchi and L.J. Guillette Jr., "Gene expression patterns in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed to environmental contaminants." *Aquat. Toxicol.*, **88**, 95-101 (2008).

A. Lange, Y. Katsu, R. Ichikawa, G.C. Paull, L.L. Chidgey, T.S. Coe, T. Iguchi and C.R. Tyler, "Altered sexual development in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to environmental concentrations of the pharmaceutical 17 α -ethinylestradiol and associated expression dynamics of aromatases and estrogen receptors." *Tox. Sci.*, **106**, 113-123 (2008).

T. Nakamura, Y. Katsu, H. Watanabe and T. Iguchi, "Estrogen receptor subtypes selectively mediate female mouse reproductive abnormalities induced by neonatal exposure to estrogenic chemicals." *Toxicology*, **253**, 117-124 (2008).

V. Naido, Y. Katsu, and T. Iguchi, "The influence of non-toxic concentrations of DDT and DDE on the old world vulture estrogen receptor α ." *Gen. Comp. Endocrinol.*, **159**, 188-195 (2008).

H. Watanabe, K. Kobayashi, Y. Kato, S. Oda, R. Abe, N. Tatarazako and T. Iguchi: "Transcriptome profiling in crustaceans as a tool for ecotoxicogenomics." *Cell Biol. Toxicol.*, **24**, 641-647 (2008).

Y. Katsu, S. Kohno, S. Hyodo, S. Ijiri, A. Hara, L.J. Guillette Jr. and T. Iguchi, "Molecular cloning, characterization and evolutionary analysis of estrogen receptors from phylogenetically ancient fish." *Endocrinology*, **149**, 6300-6310 (2008).

H. Kim, S. Hayashi, P. Chambon, H. Watanabe, T. Iguchi and T. Sato, "Effects of diethylstilbestrol on ovarian follicle development in neonatal mice." *Reprod. Toxicol.*, (in press).

A. Lange, G.C. Paull, T.S. Coe, Y. Katsu, H. Urushitani, T. Iguchi and C. R. Tyler, "Sexual re-programming and estrogenic sensitization in wild fish exposed to ethinylestradiol." *Environ. Sci. Technol.*, (in press).

5) 著書, 総説

T. Iguchi, H. Watanabe, Y. Ohta and B. Blumberg, "Developmental effects: estrogen induced vaginal changes and organotin induced adipogenesis." *Int. J. Androl.*, **31**, 263-268 (2008).

D.A. Crain, S.J. Janssen, T.M. Edwards, J. Heindel, S.-M. Ho, P. Hunt, T. Iguchi, A. Juul, J.A. McLachlan, J. Schwartz, N. Skakkebaek, A.M. Soto, S. Swan, C. Walker, T. Woodruff, T. Woodruff, L.C. Giudice and L.J. Guillette, Jr., "Female reproductive disruption: The roles of endocrine disrupting compounds and developmental timing." *Fertil. Steril.*, **90**, 911-940 (2008).

T. Iguchi, H. Watanabe and Y. Katsu, "Toxicogenomics and ecotoxicogenomics: Studying chemical effects and basic biology in vertebrates and invertebrates." In: *Toxicogenomics: A Powerful Tool for Toxicology Assessment*. John Wiley & Sons, 143-158 (2008).

T. Iguchi, and Y. Katsu, "Commonality and difference in mechanisms of endocrine disruption in various animal species." *BioScience*, **58**, 1061-1067 (2008).

H. Watanabe, K. Kobayashi, Y. Kato, S. Oda, R. Abe, N. Tatarazako and T. Iguchi, "Genomic response in *Daphnia* to chemical pollutants." In: *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry - Biological Response to Chemical Pollutants*. Eds. Y. Murakami, K. Nakayama, S.-I. Kitamura, H. Iwata and S. Tanabe, TERRAPUB, 133-142 (2008).

S. Kohno, Y. Katsu, T. Iguchi and L.J. Guillette Jr., "Novel approaches for the study of vertebrate steroid hormone receptors." *Integ. Comp. Biol.*, (in press).

T.M. Edwards, T. Iguchi and L.J. Guillette, Jr., "Genes to ecosystems: viviparous fishes and endocrine disruption." In: *Viviparous Fishes II*. Carmen, M. ed. (in press).

J.P. Myers, F.S. vom Saal, B.T. Akingbemi, K. Arizono, S. Belcher, T. Colborn, I. Chahoud, D.A. Crain, F. Farabolini, L.J. Guillette, Jr., T. Hassold, S.-M. Ho, P.A. Hunt, T. Iguchi, S. Jobling, J. Kanno, H. Laufer, M. Marcus, J.A. McLachlan, A. Nadal, J. Oehlmann, N. Olea, P. Palanza, S. Parmigiani, B.S. Rubin, G. Schoenfelder, C. Sonnenschein, A.M. Soto, C.E. Talsness, J.A. Taylor, L.N. Vandenberg, J.G. Vandenberg, S. Vogel, C.S. Watson, W.V. Welshons and R.T. Zoeller, "Why public health agencies cannot depend upon 'good laboratory practices' as a criterion for selecting data: The case of bisphenol A." *Environ. Health Perspect.*, (in press).

井口泰泉, 中村武志, "内分泌かく乱物質が及ぼす発生, 成長への影響" *バイオフィリア*, **4**, 13-17 (2008).

勝義直, 井口泰泉, "レポータージーンアッセイを利用した魚類エストロゲン受容体の種特異性" *環境ホルモン学会ニュースレター* (2008).

井口泰泉, "2.13 乳腺・生殖器 (女性)" *からだと水の事典*, 佐々木成, 石橋賢一 (編集), 朝倉書店, 205-213 (2008).

6) 国際会議発表リスト

Y. Kato, K. Kobayashi, J.K. Colbourne, H. Watanabe and T. Iguchi, "Cloning and characterization of DM domain genes from the water flea, *Daphnia magna*." Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors,

Waterville Valley Resort, NH, USA, (2008.6).

A. Lange, Y. Katsu, T. Iguchi and C.R. Tyler, “Development and application of molecular tools for establishing mechanistic information on chemical effect pathways.” The 10th Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Bovey Castle, Devon, (2008.10).

Y. Katsu, A. Lange, C.R. Tyler and T. Iguchi, “Comparative responsiveness and sensitivity of fish estrogen receptors to steroid estrogens and estrogen mimics mimicks.” The 10th Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Bovey Castle, Devon, (2008.10).

Y. Ohta, Y. Katsu, T. Iguchi, S. Kohno, B. Moore and L.J.Jr. Guillette, “Estrogen receptor expression in American alligator oviduct.” The 10th Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Bovey Castle, Devon, (2008.10).

N. Tatarazako, N. Hirai and T. Iguchi, “Embryo toxicity in Japanese medaka and zebrafish exposed to endocrine disruptors, pesticides, and PPCPs.” The 10th Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Bovey Castle, Devon, (2008.10).

A. Lange, G.C. Paull, Y. Katsu, H. Urushitani, R. Ichikawa, T.S. Coe, T. Iguchi and C.R. Tyler, “Sexual re-programming and oestrogenic sensitization in wild fish exposed to ethinylestradiol.” The 10th Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Bovey Castle, Devon, (2008.10).

7) 招待講演

T. Iguchi, “New concepts in environmental endocrine signaling.” e. hormone 2008, Tulane University, New Orleans (USA), (2008.4).

T. Iguchi, “Activities in OECD and Japan.” NERC International Workshop on Fish Toxicogenomics: Moving into Monitoring and Regulation. Vancouver (Canada), (2008.4).

T. Iguchi, “Sex determination mechanisms of fish food, *Daphnia magna*.” Sex Determination and Gametogenesis in Fish: Current Status and Future Directions, Honolulu (USA), (2008.5).

T. Iguchi and O. Tooi, “Achievements of UK Japan collaboration.” DEFRA meeting: Endocrine Disruption in Aquatic Environments: Lessons for Taking the Science Forward in Support of Chemical Management, (UK), (2008.5).

T. Iguchi, “Current situation of endocrine disruptor issue in Japan.” Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors, Waterville (USA), (2008.6).

T. Iguchi, “The novel field of ecotoxicogenomics in the study of endocrine disruption in non-mammalian models.” The Endocrine Society 90th Annual Meeting, San Francisco (USA), (2008.6).

T. Iguchi, “Ecotoxicogenomics and transactivation assays as tools for studying endocrine active chemicals in aquatic animals.” Korean Society of Toxicogenomics, Incheon (Korea), (2008.11).

井口泰泉, “内分泌かく乱物質の作用メカニズム.” 第9回比較3学会合同シンポジウム. 東京医科歯科大学, (2008.8).

8) 学会および社会的活動

環境省 中央環境審議会臨時委員
厚生労働省 薬事・食品衛生審議会臨時委員
経済産業省 化学物質審議会臨時委員
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
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
横浜雙葉中学・高校 土曜講座講師

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
静岡大学 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 日英研究「魚類精巣卵の発症機構」勝義直・井口泰泉.
環境省 基盤研究「ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析」渡邊肇.
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評価法の開発」渡邊肇.
環境省「魚類エストロゲン受容体を用いた種特異性・リガンド特異性の *in vitro* スクリーニング系の開発」井口泰泉.
環境省「環境中に放出されたヒトおよび動物医薬品の野生生物への影響の試験法開発」井口泰泉.
厚生労働科研費「化学物質リスク研究事業：内分泌かく乱化学物質の生体影響メカニズム（低用量効果・複合効果を含む）に関する総合研究」（分担）井口泰泉.
科学研究費補助金 基盤研究B 「周産期ホルモン曝露により標的器官への不可逆的影響の分子メカニズム」井口泰泉（2007年－2009年）.
科学研究費補助金 基盤研究（C）「婦人科悪性腫瘍におけるリガンド非依存性エストロゲン受容体（ER）活性化機構の解明」（分担）井口泰泉.
科学研究費補助金 萌芽研究 「ミジンコにおける生殖戦略としてのクオラムセンシングシステムの解明」渡邊肇.
科学研究費補助金 基盤研究（C）「性ステロイドホルモン受容体の分子進化の解析」勝義直.
日本化学工業協会長期自主研究「ミジンコ（*Daphnia magna*）の性決定機構の解明」井口泰泉.