

3-2 生命環境

井口泰泉（教授）

1) 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) オオミジンコの性決定機構の解明
- c) 爬虫類の温度依存性分化機構の解明
- 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に関する研究: マウスの子宮および膣はエストロゲン (女性ホルモン) 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細胞分化を示す。しかし, 生後3日以内 (臨界期) にエストロゲンの投与を受けたマウスの膣は, エストロゲン非依存的に細胞増殖を続け, 腫瘍化へと向かう。したがって, 内分泌かく乱物質の周生期での影響を調べる良いモデル系となると考えられる。膣では臨界期のエストロゲン投与により, 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 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ことを明らかにしている。出生直後の非芳香化アンドロゲンの 5 α -ジヒドロテストステロン投与によっても, マウス膣上皮のエストロゲン非依存の増殖が起こる。エストロゲン受容体 α ノックアウトマウスを用いた研究から, 臨界期でのエストロゲンやアンドロゲン投与による膣上皮のエストロゲン非依存の不可逆的増殖にはエストロゲン受容体 α が不可欠であることも明らかにした。
- b) オオミジンコの性決定機構の解明: 水質や環境化学物質の影響を調べるのに汎用されているオオミジンコは, 単為生殖によりメスがメスを産んで増殖する。しかし, 餌不足, 混雑および短日などの環境の変化によりオスを産み, 生まれたオスとメスが交尾して乾燥に耐えられる耐久卵を産む。耐久卵は新たに水が入るとメスに発生する。オオミジンコは1週間程度で成体になり3日毎に産仔する。また, 体が透明であり, 卵はシャーレの中でも発生する。また, 我々が中心となってオオミジンコから多くの ESTs を得ている。オオミジンコのゲノムコンソーシアムにも協力しており, ゲノム解析の終了も近い。農薬 (昆虫成長制御剤, 植物保護剤) として用いられる幼若ホルモン類似物質をオオミジンコの卵形成の特定の時期に特定の濃度で曝露すると100%オスを産むことを見出した。オオミジンコのオスに関連した遺伝子を探索し, 雌雄で発現の差がある遺伝子 Dsx 遺伝子を見出した。オオミジンコでは遺伝子導入手法も確立されていなかったために, オオミジンコの卵に遺伝子を導入する手法を確立し, 幼若ホルモン曝露によりオスになる卵に Dsx 遺伝子のダブルストランドを用いて RNA 干渉法を行い発現量を下げたところ, 第一触角はメスタイプを示し, 精巣の分化は起こらず卵巣が発達した。さらに, ショウジョウバエで Dsx を制御する tra 遺伝子はオオミジンコでも存在するが発現に雌雄差はなく, オオミジンコでは性分化の制御には関与していない可能性も示した。マイクロアレイを用いて幼

若ホルモン応答遺伝子を探索している。

- 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。性決定には温度よりもエストロゲンの作用が強いことから、エストロゲンを含む性ホルモン受容体に着目して研究を進めている。アメリカワニは卵を30度で孵卵すると100%メスに、33度で孵卵すると100%オスになるという温度依存性性分化を示す。温度よりもエストロゲンの作用が強く、オスになる33.5度で孵卵してもエストロゲンやエストロゲン作用を持つ農薬などを塗付するとメスに発生する。この温度依存性性分化のメカニズムに興味を持ち、熱ショックタンパク質遺伝子の Hsp 関連遺伝子を単離して、雌雄での発現を比較した結果、このうちの数種類は雌雄で発現に性差があることを見出した。また、温度依存性性分化時期の胚を用いて性分化関連遺伝子の発現を調べ、発生ステージが進むにつれてオスでは AMH（抗ミュラー管ホルモン）遺伝子、メスではアロマターゼ遺伝子の発現が増加することを見出した。
- 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：化学物質の内分泌かく乱作用の研究を開始した時点では、化学物質のエストロゲン作用と水生生物への化学物質の影響に焦点が当てられていた。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ローチの精巣卵が1985年頃から問題になっていた。化学物質のエストロゲン作用を簡便に、しかも正確に把握するために、魚類を含む水生生物からエストロゲン受容体遺伝子を単離して機能解析すること、さらにエストロゲンで誘起されるオスでの精巣卵誘導機構を解明することを目指している。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た。さらに、イギリスの河川中に見出されている濃度（4 ng/L）のエチニールエストラジオール（排卵抑制剤の成分）を受精直後のローチに120日間曝露すると、3割のオスの精巣に卵ができ（精巣卵）、250–720日曝露すると全てメスになることを実験的に示した。また、馬の尿中に含まれるエストロゲン的一种（エクイリン）をイギリスの河川中に見出した。エクイリンとその代謝産物はホルモン補充療法に使用されたものであり、ローチのエストロゲン受容体に極めて高い活性を示すことを明らかにした。また、テイラピアから3種類のエストロゲン受容体のクローニングし、それらの機能についての研究を行った。さらに、2種のサメ類（トラザメ、ジンバイザメ）からエストロゲン受容体遺伝子をクローニングし、簡便に化学物質のエストロゲン作用を検出できるレポーターアッセイ系を確立した。
- e) エストロゲン受容体の分子進化の解析：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与している。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、進化上脊椎動物の祖先とされているナメクジウオのほか、軟骨魚のサメ類（トラザメ、ジンバイザメ）、各種の両生類（アカハライモリ、トウキョウサンショウウオ、アホロートル、アフリカ産のガマ）、爬虫類のヘビ（アオダイショウ、オキナワハブ）から、エストロゲン受容体 α と β の遺伝子を単離し、レポーターアッセイ系を確立した。これら動物のエストロゲン受容体は環境化学物質のビスフェノール A や DDT などによりエストロゲン受容体は活性化されること、ナメクジウオでは、エストロゲン受容体にはエストロゲンは結合せず、より祖先型のステロイド受容体にエストロゲンが結合して転写活性を上げることを見出した。

4) 学術論文

B.C. Moore, M.R. Milnes, S. Kohno, Y. Katsu, T. Iguchi and L.J.Jr. Guillette, “Influences of sex, incubation temperature, and environmental quality on gonadal estrogen and androgen receptor messenger RNA expression in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*)” *Biol. Reprod.*, **82**, 194-201 (2010).

Y. Katsu, K. Kubokawa, H. Urushitani and T. Iguchi, “Estrogen-dependent transactivation of amphioxus steroid hormone receptor via both estrogen-and androgen-response elements” *Endocrinology*, **151**, 639-648 (2010).

S. Miyagawa, Y. Katsu, Y. Ohta, T. Sudo, D.B. Lubahn and T. Iguchi, “Estrogen receptor α is indispensable for the induction of persistent vaginal change by neonatal 5α -dihydrotestosterone exposure” *Biol. Reprod.*, **82**, 497-503 (2010).

Y. Kato, K. Kobayashi, S. Oda, N. Tatarazako, H. Watanabe and T. Iguchi, “Sequence divergence and expression of a transformer gene in the branchiopod crustacean, *Daphnia magna*” *Genomics*, **95**, 160-165 (2010).

T. Horiguchi, H. Urushitani, Y. Ohta, T. Iguchi and H. Shiraishi, “Establishment of a polyclonal antibody against the retinoid X receptor of the rock shell *Thais clavigera* and its application to rock shell tissues for imposex research” *Ecotoxicology*, **19**, 571-576 (2010).

Y. Kato, K. Kobayashi, H. Watanabe and T. Iguchi, “Introduction of foreign DNA into the water flea, *Daphnia magna*, by electroporation” *Ecotoxicology*, **19**, 589-592 (2010).

S. Kohno, Y. Katsu, H. Urushitani, Y. Ohta, T. Iguchi and L.J.Jr. Guillette, “Potential contributions of heat shock proteins to temperature-dependent sex determination in the American alligator” *Sex. Devel.*, **4**, 73-87 (2010).

Y. Katsu, E. Taniguchi, H. Urushitani, S. Miyagawa, M. Takase, K. Kubokawa, O. Tooi, T. Oka, N. Santo, J. Myburgh, A. Matsuno and T. Iguchi, “Molecular cloning and characterization of ligand-and species-specificity of amphibian estrogen receptors” *Gen. Comp. Endocrinol.*, **168**, 220-230 (2010)..

Y. Saitoh, T. Hikake, S. Hayashi, T. Iguchi and T. Sato, “Involvement of insulin-like growth factor-I for the regulation of prolactin synthesis by estrogen and postnatal proliferation of lactotrophs in the mouse anterior pituitary” *Cell Tiss. Res.*, **340**, 147-158 (2010).

T. Hikake, S. Hayashi, P. Chambon, H. Watanabe, T. Iguchi and T. Sato, “Differential involvement of IGF-I and estrogen on prolactin cells in the mouse anterior pituitary” *Exp. Biol. Med.*, **235**, 974-980 (2010).

Y. Katsu, S. Kohno, H. Narita, H. Urushitani, K. Yamane, A. Hara, T.M. Clauss, M.T. Walsh, S. Miyagawa, L.J.Jr. Guillette and T. Iguchi, “Cloning and functional characterization of Chondrichthyes, cloudy catshark, *Scyliorhinus torazame* and whale shark, *Rhincodon typus* estrogen receptors” *Gen. Comp. Endocrinol.*, **168**, 496-504 (2010).

L.K. Davis, Y. Katsu, T. Iguchi, D.T. Lerner, T. Hirano and E.G. Grau, “Transcriptional activity and biological effects of mammalian estrogen receptor ligands on three hepatic estrogen receptors in Mozambique tilapia” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **122**, 272-278 (2010).

Y. Katsu, K. Matsubara, S. Kohno, Y. Matsuda, M. Toriba, K. Oka, L.J.Jr. Guillette, Y. Ohta, and T. Iguchi, “Molecular cloning, characterization and chromosome mapping of reptilian estrogen receptors” *Endocrinology*, **151**, 5710-5720 (2010).

S. Oda, Y. Kato, H. Watanabe, N. Tatarazako and T. Iguchi, “Morphological changes in *Daphnia galeata* induced by a crustacean terpenoid hormone and its analog” *Environ. Toxicol. Chem.*, **30**, 232-238 (2010).

J.G. Myburgh, F.W. Huchzermeyer, H.B. Groenewald, J.T. Soley, L.C. Bekker, D.G. Booyse, T. Iguchi and L.J.Jr. Guillette, “Technique for the collection of clean urine from the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*)” *J. South African Vet. Assoc.*, (in press).

D.S. Bermudez, J.P. Skotko, Y. Ohta, A.S.P. Boggs, T. Iguchi and L.J.Jr. Guillette, “Sex steroid and thyroid hormone receptor expressions in the thyroid of the American alligator (*Alligator mississippiensis*) during different life stages” *J. Morphol.*, (in press).

T. Chakraborty, Y. Katsu, L.Y. Zhou, S. Miyagawa, Y. Nagahama and T. Iguchi, “Estrogen receptors in medaka (*Oryzias latipes*) and estrogenic environmental contaminants: an *in vitro-in vivo* correlation” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, (in press).

T. Chakraborty, Y. Shibata, L.Y. Zhou, Y. Katsu, T. Iguchi and Y. Nagahama, “Differential expression of three estrogen receptor subtype mRNAs in gonads and liver from embryos to adults of the medaka, *Oryzias latipes*” *Mol. Cell. Endocrinol.*, (in press).

A. Lange, G.C. Paull, P.B. Hamilton, T. Iguchi and C.R. Tyler, “Implications of persistent exposure to treated wastewater effluent for breeding in wild roach (*Rutilus rutilus*) populations” *Environ. Sci. Technol.*, (in press).

H. Urushitani, Y. Katsu, S. Miyagawa, S. Kohno, Y. Ohta, L.J.Jr. Guillette and T. Iguchi, “Molecular cloning of anti-Mullerian hormone from the American alligator, *Alligator mississippiensis*” *Mol. Cell. Endocrinol.*, (in press).

5) 著書, 総説

G. Van Aggelen, G.T. Ankley, W.S. Baldwin, D.W. Bearden, W.H. Benson, J.K. Chipman, T.W. Collette, J.A. Craft, N.D. Denslow, M.R. Embry, F. Falciani, S.G. George, C.C. Helbing, P.F. Hoekstra, T. Iguchi, Y. Kagami, I. Katsiadaki, P. Kille, L. Liu, P.G. Lord, T. McIntyre, A. O’Neill, H. Osachoff, E.J. Perkins, E.M. Santos, R.C. Skirrow, J.R. Snape, C.R. Tyler, D. Versteeg, M.R. Viant, D.C. Volz, T.D. Williams and L. Yu, “Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: hurdles, achievements and future outlook” *Environ. Health Perspect.*, **118**, 1-5 (2010).

T. Iguchi, S. Miyagawa and T. Sudo, “Modern genetics of reproductive biology”. In: Environmental Impacts on Reproductive Health and Fertility, Cambridge University Press, Woodruff, T., Janssen, S.J., Guillette, L.J.Jr., and Giudice, L.C. (Eds.), 60-71 (2010).

M. Halder, M.A. Leonard, T. Iguchi, J.T. Oris, K. Ryder, S.E. Belanger, T.A. Braunbeck, M.R. Embry, G. Whale, T. Norberg-King and A. Lillicrap, “Regulatory aspects on the use of fish embryos in environmental toxicology” *Integ. Environ. Assess. Manage.*, **6**, 484-491 (2010).

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

M.C. Celander, J.V. Goldstone, N.D. Denslow, T. Iguchi, P. Kille, R.D. Meyerhoff, B.A. Smith, T.H. Hutchinson and J.R. Wheeler, “Species extrapolation for the 21st century” *Environ. Toxicol. Chem.*, (in press).

H. Watanabe, Y. Kato and T. Iguchi, “Application of ecotoxicogenomics for understanding mode of action of chemicals and species extrapolation” In: Handbook of Systems Toxicology. Eds. Casciano, D.A. and Sahu, S.C., John Wiley &

Sons, Ltd. (in press).

井口泰泉, “化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究 (第2期) の成果” 環境ホルモン学会ニューズレター, 13 (2) :2, 2010.

宮川信一, 勝義直, 井口泰泉, “両生類女性ホルモン受容体の種特異性及びリガンド特異性” 比較内分泌学会ニューズレター, 36 (139), 283-285, 2010.

6) 国際会議発表リスト

Y. Kato, K. Kobayashi, S. Oda, N. Tatarazako, H. Watanabe and T. Iguchi, “Sequence divergence and expression of a transformer gene in the branchiopod crustaceans, *Daphnia magna*” Daphnia Genomics Consortium 2010, Leuven University, (Belgium), March 26-30, 2010.

T. Iguchi, Y. Kato, S. Miyagawa, K. Kobayashi, S. Oda, N. Tatarazako and H. Watanabe, “Molecular impact of juvenile hormone agonists on neonatal *Daphnia magna*” Daphnia Genomics Consortium 2010, Leuven University, (Belgium), March 26-30, 2010.

S. Miyagawa, K. Toyota, Y. Kato, S. Oda, N. Tatarazako, H. Watanabe and T. Iguchi, “Gene expression analysis of *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone agonists” 11th e. hormone Symposium, Tulane University, New Orleans, (USA), October 19-23, 2010.

Y. Ohta, T. Takeuchi, C. Park, Y. Yasunaga, M. Sugiyama, I. Hirakawa, S. Miyagawa and T. Iguchi, “Morphometric study on external genitalia development in male rats given flutamide during pregnancy” e. hormone Symposium, Tulane University, New Orleans, (USA), October 19-23, 2010.

T. Iguchi, “Overview of the 11th UK-Japan Workshop at Osaka in 2009 and the future plan from Japan’s point of view” 12th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Matfen Hall, Northumberland, (UK), November 2-4, 2010.

A. Lange, S. Miyagawa, T. Iguchi and C.R. Tyler, “Development and application of molecular approaches for advancing our understanding on the responses of test and sentinel fish (and other species) to xenohormones” Matfen Hall, Northumberland, (UK), November 2-4, 2010.

R.M. Goodhead, B.D. Johnston, P. Cole, M. Baalousha, T. Iguchi, J.R. Lead and C.R. Tyler, “Bioavailability in fish of cerium oxide nanomaterials exposed via the water in combination with natural organic matter” Matfen Hall, Northumberland, (UK), November 2-4, 2010.

C.R. Tyler, A. Lange, P. Hamilton, A.L. Filby, O. Lee, T. Kudoh, A. Takesano, G.C. Paul, R.M. Goodhead, O. Osborne, E. Santos, R. van Aerle and T. Iguchi, “Applying ‘Systems biology’ for establishing the mechanisms and functional consequences of exposure to endocrine disrupting chemicals and other emerging contaminants of the aquatic environment” Matfen Hall, Northumberland, (UK), November 2-4, 2010.

7) 招待講演

T. Iguchi, “Sex determination mechanisms of water flea, *Daphnia magna*” Howard Bern Symposium: Recent Advances in Comparative Endocrinology, University of California at Berkeley (USA), March 2-3, 2010.

T. Iguchi, “Endocrine disruption in invertebrates: sex determination of *Daphnia magna*” 11th e. hormone Symposium,

Tulane University, New Orleans (USA), October 19-23, 2010.

T. Iguchi, “Current status of the endocrine disruptor research in Japan and OECD” 2010 Symposium What’s in Our Water? CSIRO Discovery Centre, Black Mountain, Canberra, (Australia), November 10-11, 2010.

井口泰泉「欧米の化学物質と生物影響・内分泌かく乱物質」, 第19回環境化学討論会市民学生講座中部大学, 2010年6月23日.

井口泰泉「内分泌かく乱化学物質と環境」, 環境と水, 岩手大学, 2010年8月1日.

井口泰泉「オオミジンコの性決定機構」, シンポジウム, 脊椎動物の性決定及び性分化機構—“性転換研究”の最前線—, (社)日本動物学会第81回大会, 東京大学駒場キャンパス, 2010年9月23-25日.

井口泰泉「オオミジンコの性分化機構」岡崎高校, スーパーサイエンスハイスクール, 2010年10月28日.

井口泰泉「生物に対する内分泌かく乱作用に関する調査研究の動向と対応の方向性」環境省主催平成22年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー, 東京大学山上会館, 2010年12月15日.

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

内閣府食品安全委員

会容器包装部会委員

OECD Validation 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

Journal of Applied Toxicology 編集長 (アジア地区)

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 特集号編集長

Biology of Reproduction 編集委員

Journal of Biomedical Research 編集委員

Ecotoxicology and Environmental Safety 編集委員

横浜雙葉中学・高等学校土曜講座講師

9) 他大学での非常勤講師, 客員教授

フロリダ大学客員教授

東京工業大学非常勤講師

東京薬科大学非常勤講師

横浜市立大学非常勤講師

横浜雙葉中学・高校土曜講座講師

11) 外部獲得資金

環境省日英共同研究「魚類精巣卵の発症機構」宮川信一, 井口泰泉 (代表)

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」井口泰泉

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」宮川信一

環境省「トキシコゲノミクスを応用した化学物質の内分泌かく乱作用スクリーニング手法の開発」井口泰泉
科学研究費挑戦的萌芽研究「環境指標生物であるミジンコの逆遺伝学的手法の開発：エコゲノミクスの新規アプローチ」(2010年—2011年) 井口泰泉 (代表)

科学研究費基盤研究 (A)「有機スズによる腹側類のインポセックス誘導：レチノイド X 受容体関与説の高度化」(2009年—2011年) 井口泰泉 (分担)

科学研究費若手研究 (B)「発生過程における“突出・伸長”現象のメカニズム解析」(2009年—2010年) 宮川信一 (代表)

日本化学工業協会長期自主的研究「ミジンコ (*Daphnia magna*) の性決定機構の解明」井口泰泉