

助成年度：平成 10 年度

[所属] 東北大学大学院 農学研究科 応用生命科学専攻 分子細胞科学講座 分子生物学分野
[役職] 教授
[氏名] 水野 重樹 (他計 3 名)

[課題]

ニワトリ胚の生殖腺文化系を利用した環境ホルモン物質の活性検定と作用機構の分子レベルの研究

[内容]

雌ヘテロ型(雄 ZZ、雌 ZW)の性染色体構成を持つ鳥類の性決定や性分化に関わる性染色体遺伝子の働きは殆ど解明されていない。一方、鳥類初期胚の生殖腺分化は卵の中という閉鎖系で進行すること、胚の性ステロイドホルモン合成に依存した系である上、外部から注入された性ステロイドホルモンや性ステロイドホルモン合成系遺伝子の阻害剤に感受性の高い系であることから、内分泌攪乱環境ホルモン物質の活性検定に適した実験系であると思われる。そこで、先ず、ビスフェノール A、ノニルフェノール、フタル酸ジエチル、フタル酸ジエチルヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジ-n-ブチル、p-オクチルフェノールの 7 種類の化合物の影響を、ニワトリ胚を用いて解析した。

(1) 孵卵開始前または開始後 5 日目の受精卵の気室に 20 μ l の 70% エタノールに溶解した 0.001mg, 0.01mg または 1mg の各環境ホルモン物質、あるいは 0.001mg または 0.01mg のエストラジオール-17 β を注入した場合、14 日胚あるいは 20 日胚の段階で、雄胚(性染色体レベルの性は W 染色体特異的 XhoI-ファミリー配列の有無を PCR 法で検出)ではいずれも、エストラジオール注入により左生殖腺が肥大して卵精巢の分化が生じたが、7 種類の環境ホルモン物質の注入によっては、いずれの濃度においても生殖腺分化の異常は観察されなかった。これは、ニワトリ雌雄胚の初期左生殖腺で発現するエストロゲンレセプター(ER)のリガンド特異性が厳密であるためか、初期胚では環境ホルモン物質の代謝が行われず、性ステロイドホルモン様の活性をもつ化合物に変換されないためかと思われる。逆に、性ステロイドホルモン様活性を示す化合物の検定にはよい実験系であると思われる。

(2) ニワトリ精巢の cDNA ライブラリーからエストロゲンレセプター β (ER- β) の cDNA クローンを取得した。ニワトリの 5-10 日胚では ER- α は雌雄とも左側の未分化生殖腺の皮質で発現するが、雄胚では孵卵開始後 12 日目から発現が低下し、18 日以降は殆ど検出されなくなった。この時、ER- β の発見は殆ど検出されなかった。また、ニワトリの雌雄 5 日胚の cDNA ライブラリーから W 染色体上の新規遺伝子 Wpkci の cDNA クローンを取得した。

Wpkci は哺乳類の PKCI (protein kinase C interacting protein) と約 60% の相同性を示すが、PKCI 活性に必須の HIT ドメインを持たず、PKCI には存在しない、Leu, Arg 残基に富む領域をもつなど PKCI とは異なった機能をもつことが推定された。