

称号及び氏名	博士(獣医学) 多田 哲子
学位授与の日付	平成21年2月20日
論文名	クサガメビテロジェニンの分子生物学的性状の解析と野外における内分泌攪乱影響調査への応用
論文審査委員	主査 松尾 三郎 副査 小谷 猛夫 副査 小森 雅之 副査 稲葉 俊夫

論文要旨

緒言

ビテロジェニン (VTG) は、卵生脊椎動物における卵黄前駆タンパクであり、近年、内分泌攪乱化学物質、特に外因性エストロゲン暴露のバイオマーカーとして注目されている。VTG は、成熟雌の卵巣から放出されたエストロゲンによって肝臓で合成され、血流を介して卵巣に運ばれ、卵黄タンパクの主要成分として卵細胞内に蓄積される。VTG 遺伝子は、雄や未成熟個体の肝臓にも存在するが、エストロゲンによる刺激を受けないために、これらの個体の肝組織や血中に VTG が検出されることはない。しかし、外因性エストロゲンに暴露されると、これらの個体においても、VTG の合成が誘導される。それゆえ、雄や未成熟個体における VTG の検出は、外因性エストロゲンに暴露された可能性を示す証拠となる。

鳥類および魚類では、VTG に関する基礎的な知見が集積され、内分泌攪乱化学物質の影響に関する多くの調査研究も行われてきた。しかし、爬虫類の VTG に関する情報は乏しく、内分泌攪乱化学物質の影響による調査報告例も限られており、日本では皆無である。内分泌攪乱化学物質に対する感受性や暴露様式の動物による違いを考慮すれば、爬虫類に関しても調査が必要である。

クサガメ *Chinemys reevesii* は、日本に広く分布する淡水性のカメである。雑食性であるため、日本の淡水生態系において食物連鎖の上位に位置し、長寿である。そのため、本種は、化学物質が蓄積されやすく、これらの物質による環境汚染のモニタリング動物として適していると考えられる。さらに、人間活動に伴うさまざまな汚染が進行してい

る河川の下流域・池沼から清浄な河川・池沼まで、広く分布していることも、モニタリング動物としての要件を満たしている。

本研究は、本種を対象動物として、(1) VTG の分子生物学的性状を明らかにすること、(2) VTG を遺伝子レベルおよびタンパクレベルで検出できる測定法を確立すること、(3) 確立された測定法を用い、VTG をバイオマーカーとして、本種が環境中の内分泌攪乱化学物質 (外因性エストロゲン) による暴露影響を受けているかどうかを明らかにすることを目的とした。

第1章 クサガメ VTG の誘導と精製、cDNA クローニングと mRNA 発現の解析

エストラジオール-17 β (E₂) を連続投与したクサガメ血清を材料に、VTGの精製を行った。血清のポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 像より、VTGは分子量約 200 kDaのタンパクで、遅くとも投与 1 週間後には、血中に出現することが明らかになった。VTGの精製は、血清を EDTA-2Na と MgCl₂ で塩析 (EDTA-MgCl₂ 塩析) し、沈渣を再溶解後、Sephacrose 6Bカラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより行った。精製状況を SDS-PAGE で確認したところ、EDTA-MgCl₂ 塩析による簡便な操作のみで、大量に純度の高い VTG が得られた。

続いて、クサガメ VTG cDNA のクローニングとシーケンス解析を行い、部分塩基配列を決定した。まず、E₂ を連続投与した本種の肝臓から抽出・精製した mRNA より cDNA ライブラリーを作成した。複数の動物種で保存されている VTG cDNA の推定アミノ酸配列から設計したディジェネレートプライマーを用いて PCR を行い、クサガメ VTG cDNA フラグメントを得た。フラグメントの塩基配列よりクサガメ VTG cDNA に特異的なプライマーを設計して 5'RACE法を行い、別のフラグメントを得た。最終的に得た 5 つのフラグメントから、クサガメ VTG cDNA の 5'端から 2,229 bp の部分塩基配列 (GenBank accession no. AB442217) を解読した。クサガメ VTG の推定アミノ酸配列を既報の動物種のものと比較したところ、卵生脊椎動物の分類学上の位置関係を反映して、鳥類、魚類および両生類から独立し、両生類と鳥類の中間に位置していた。

次に、クサガメ VTG cDNA に特異的なプライマーを用いて、E₂ 投与後の肝組織のトータル RNA を材料として逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR法) を行い、VTG mRNA 発現を経時的に解析した。VTG mRNA は、E₂ 投与 6 時間後には発現し、その発現率は、24 時間後に最大に達した後、次第に減少し、投与 8 日後には投与前とほぼ同じレベルにまで減少することが明らかになった。

第2章 クサガメ VTG 定量的 ELISA 法の開発

前章により精製した VTG でウサギを免疫し、抗クサガメ VTG ポリクロナール抗体を得た。E₂ 投与したクサガメ雄血清を用いたウエスタンブロッティングの結果は、抗クサガメ VTG ポリクロナール抗体が、VTG タンパクに特異性を有することを示した。

精製クサガメ VTG、抗クサガメ VTG ポリクロナール抗体およびビオチンを結合した二次抗体を用い、クサガメ VTG 定量的 ELISA 法を開発した。本 ELISA 法は、定量下限値 0.004 μ g/ml、回収率 85.3–100%、測定内変動係数 3.4–11.5% という高感度と良好な精度を有した。また、抗クサガメ VTG ポリクロナール抗体は、ニホンイシガメ

Mauremys japonica およびミシシippアカミミガメ *Trachemys scripta elegans* VTG と強い交差反応を示し、本 ELISA 法が、これらの種にも適用できることが示唆された。

本 ELISA 法により、京都市南部の清浄な河川に生息するクサガメの血清 VTG 濃度を測定したところ、成熟雌、未成熟雌および雄の血清 VTG は、それぞれ 42–15,000 $\mu\text{g/ml}$ 、0.12–0.78 $\mu\text{g/ml}$ および 0.10–0.60 $\mu\text{g/ml}$ の濃度分布を示した。これより本種の雄および未成熟雌の血清 VTG 濃度は、1.0 $\mu\text{g/ml}$ 未満であると推察された。従って、第 1 章で得られた成績と合わせて、本種の雄あるいは未成熟雌が、1.0 $\mu\text{g/ml}$ を超える高い血清 VTG 濃度を示したときは、外因性エストロジェン暴露によると考えられ、これらの動物が、淡水生態系において、外因性エストロジェン暴露影響を観察するのに適した材料であることが示唆された。

第 3 章 VTG をバイオマーカーとした外因性エストロジェンのクサガメにおける影響調査

外因性エストロジェンによる汚染地点と非汚染地点に生息するクサガメ雄および未成熟雌の血清 VTG 濃度を第 2 章で開発した ELISA 法で測定し、外因性エストロジェンによる暴露影響を評価した。

まず、京都市南部の外因性エストロジェンによる汚染が疑われる 3 地点（小河川で、家庭雑排水が流入する地点、ゴミ焼却施設の周囲を流れている澱んだ小河川で、焼却灰由来の汚染物質が表流水に混入している地点および西高瀬川の 2 つの下水処理施設からの放流水が流入する地点）と非汚染（対照）地点を選定し、本種の捕獲とエストロジェン活性を測定するために河川水の採水を行った。河川水のエストロジェン活性は、ヒトエストロジェンレセプター α などを組み込んだ酵母を用いた酵母ツーハイブリッド法により測定した。その結果、汚染が疑われる 3 地点のエストロジェン活性は、いずれも対照地点と比べて有意に高かったが、汚染 3 地点間での有意な差は認められなかった。

次に、これらの地点で捕獲した、本種の雄 320 個体と未成熟雌 56 個体の血清 VTG 濃度を本 ELISA 法で測定した。その結果、本種の雄および未成熟雌の血清 VTG 濃度は、地点間で有意な差を示さなかった。また、1.0 $\mu\text{g/ml}$ を超える高い血清 VTG 濃度が、汚染地点で捕獲した全個体の 2.36–2.86% で観察されたが、汚染地点と対照地点の間で、出現頻度に有意な差は認められなかった。1.0 $\mu\text{g/ml}$ を超える高い血清 VTG 濃度の誘導に、外因性エストロジェンが関与している可能性を否定できないが、少数個体で観察された VTG 濃度の上昇は、偶発的もしくは個体に起因する特殊な要因が相乗的に作用して生じた一過性の上昇と考えられた。汚染地点の外因性エストロジェンによる汚染レベルは、日本の河川のほぼ平均的な汚染レベルであると考えられ、本種の血清 VTG 濃度に影響を及ぼしているとは言えないと結論づけられた。

総括

1. クサガメ VTG は分子量約 200 kDa のタンパクであった。E₂ 投与で増大した血清中の VTG は、EDTA-MgCl₂ 塩析で高度に精製され、免疫学的研究に十分耐える材料となり得た。
2. クサガメ VTG cDNA の 5' 末端から 2,229 bp の部分塩基配列解読に成功した。クサ

ガメ VTG cDNA に特異的なプライマーを用いた RT-PCR 法により、クサガメ VTG mRNA は、E₂ 投与 6 時間後には発現し、その発現率は、24 時間後に最大に達した後、次第に減少し、投与 8 日後には投与前とほぼ同じレベルにまで減少することが明らかになった。

- クサガメ VTG 定量的 ELISA 法は、高感度（定量下限値; 0.004 µg/ml）と良好な精度を有し、ニホンイシガメおよびミシシippアカミミガメにも適用できることが示唆された。また、清浄な河川に生息する本種の雄および未成熟雌における血清 VTG 濃度は 1.0 µg/ml 未満であると推察された。
- 京都府内の河川を対象とした、外因性エストロジェンのクサガメにおける影響調査で、汚染地点と対照地点の間で、本種の雄および未成熟雌の血清 VTG 濃度に有意な差は認められなかった。汚染地点における外因性エストロジェンレベルは日本の河川の一般的な汚染レベルであることから、日本の河川における環境中の外因性エストロジェンの汚染レベルは、本種の雄および未成熟雌の血清 VTG 濃度に影響を与えるには至っていないという結論に達した。

審査結果の要旨

ビテロジェニン (VTG) は、卵生脊椎動物における卵黄前駆タンパクであり、近年、内分泌攪乱化学物質、特に外因性エストロジェン暴露のバイオマーカーとして注目されている。魚類では、VTG に関する基礎的な知見が集積され、VTG を用いた内分泌攪乱化学物質の影響に関する多くの調査研究が行われてきた。しかし、爬虫類の VTG に関する情報は乏しく、これらの物質の影響による調査報告例も限られており、日本では皆無である。内分泌攪乱化学物質に対する感受性や暴露様式の動物による違いを考慮すれば、爬虫類に関しても調査が求められる。本研究は、クサガメ *Chinemys reevesii* を対象動物として、VTG の分子生物学的性状を明らかにするとともに、その高感度の測定法を確立し、確立した測定法の野生調査への応用として、京都市河川に生息する本種に見られる内分泌攪乱化学物質（外因性エストロジェン）の汚染影響を VTG をバイオマーカーに用いて検討した。

第 1 章では、まず、エストラジオール-17β (E₂) の投与により合成誘導される血漿内クサガメ VTG の精製を検討し、E₂ の投与により大量に VTG を含む血清からは、EDTA-2Na と MgCl₂ を用いた塩析による簡便な操作のみで、免疫学的研究に十分な純度

を有するVTGが得られることを明らかにするとともに、雌雄、成熟度合いにかかわらずE₂によってVTGが合成誘導されることを示した。次に、E₂を連続投与した本種の肝臓から抽出・精製したmRNAよりcDNAライブラリーを作製し、クサガメVTG cDNAのクローニングとシーケンス解析を行い、5'末端から2,229 bpのVTG cDNAの部分塩基配列を確定した。さらに、設計したクサガメVTG cDNAに特異的なプライマーを用いて、E₂投与後の肝組織のトータルRNAを材料としてRT-PCR法を行い、VTG mRNA発現を経時的に解析した結果、VTG mRNAがE₂投与6時間後には発現し、その発現率は、24時間後に最大に達した後、次第に減少し、8日後には投与前とほぼ同じレベルにまで減少することを示した。

第2章では、先ず、第1章により精製したVTGでウサギを免疫し、抗クサガメVTGポリクロナール抗体を作製し、血清VTGを高感度で測定できるELISA法を開発した。抗クサガメVTGポリクロナール抗体は、近縁種のカメVTGと強い交差反応を示し、本ELISA法が、これらの種にも適用できることを示した。次に、本ELISA法を用いて、京都市南部の清浄な河川に生息するクサガメの血清VTGの濃度分布を調べ、成熟雌、未成熟雌および雄で、それぞれ42–15,000 µg/ml、0.12–0.78 µg/mlおよび0.10–0.60 µg/mlであることを示した。これより本種の雄および未成熟雌の血清VTG濃度は、1.0 µg/ml未満であることが示され、第1章で得られた成績を考え合わせると、本種の雄あるいは未成熟雌が、1.0 µg/ml以上の高い血清VTG濃度を示したときは、外因性エストロジェンによる暴露を示唆することが示された。

第3章では、外因性エストロジェンの汚染地点と非汚染（対照）地点において、河川水のエストロジェン活性と生息するクサガメ雄および未成熟雌の血清VTG濃度を測定し、外因性エストロジェンの汚染影響を評価した。京都市南部で、外因性エストロジェンの汚染が疑われる3地点と非汚染地点を選定し、本種の捕獲と河川水の採取を行った。遺伝子組換え酵母を用いた酵母ツーハイブリッド法により測定した河川水のエストロジェン活性は、非汚染地点においては0.07 ng/l（検出限界値）であるのに対して、汚染が疑われる3地点では、0.74、0.52および1.7 ng/lと、いずれの汚染地点においても非汚染地点と比べて有意に高い値を示した。しかし、汚染3地点間での有意な差は認められなかった。次に、外因性エストロジェンの影響を第2章で開発したELISA法で測定したところ、本種の雄および未成熟雌の血清VTG濃度は、汚染と非汚染を含めた4地点間で有意な差を示さなかった。また、1.0 µg/mlを超える高い血清VTG濃度を示す固体が、汚染地点で捕獲したすべての雄および未成熟雌の2.36および2.86%で観察されたが、汚染地点と非汚染地点間で、出現頻度に有意な差は認められなかった。これらの結果により、1.0 µg/ml以上の高い血清VTG濃度の誘導に、外因性エストロジェンが関与している可能性を否定できないが、汚染地点における外因性エストロジェンのレベルは、本種の血清VTG濃度に恒常的な上昇変化を導くには至っていないことが示された。

本研究は、カメ目で初めてVTG cDNAの部分塩基配列を解読し、それより設計した遺伝子特異的プライマーを用いてRT-PCR法を行い、mRNA発現の経時変化を示した。また、VTGを高感度で測定できるELISA法を開発し、それよりエストロジェンに汚染されていない清浄な河川に生息する本種の雄および未成熟雌の血清VTG濃度が、1.0

μg/ml 未満であることを示し、エストロジェン暴露指標となる VTG 濃度のベンチマークを明らかにし、用いた RT-PCR および ELISA による検出法が、日本に広範に生息する近縁種のカメにも適用が可能であることも示した。さらに、野外調査への応用で、汚染地点のエストロジェンレベルが本種の雄および未成熟雌の血清 VTG 濃度に影響を与えるには至っていないことを示した。

これらの成果は、獣医学の発展、とりわけ分子生物学・環境毒性学の新たな展開に貢献するものであり、本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。