

女性ホルモンにより誘導合成される魚類のタンパク質に関する研究

環境システム工学専攻 環境生物化学講座 五十嵐 啓明

指導教官 山田 良平

解良 芳夫

高橋 祥司

1. 研究の背景・目的

女性ホルモン作用を示す内分泌攪乱化学物質の水環境中における影響を魚類を用いて評価する際に、卵黄タンパク質前駆体であるビテロジェニン(Vtg)がバイオマーカーとしても知られている。ビテロジェニンは、一般に、天然の代表的な女性ホルモンの一種であるエストラジオール-17 β が肝細胞内のエストロジェンレセプターと結合することにより誘導合成される雌特異的なタンパク質であるが、雄や未成熟な雌でもエストラジオール-17 β を投与することにより血中に誘導されることが確認されている。また、内分泌攪乱化学物質の多くは女性ホルモン作用を示すものであり、それら化学物質が肝細胞内のエストロジェンレセプターと結合することによってもビテロジェニンは誘導される。そのため、魚類の血中ビテロジェニン濃度を測定することにより、外因性の女性ホルモン作用を示す化学物質の影響を評価することができる。人間と、その他脊椎動物は全く同じ構造のステロイドホルモンを使用している。そのため、魚類において、内分泌攪乱物質の影響があると評価された場合、それは、将来、人間にも影響をあたえる可能性があることを意味している。

Hamazaki *et al.* (1987)は、餌に天然の代表的な女性ホルモンの一種であるエストラジオール-17 β を含有させ、10~14日間飼育した雄のメダカの腹水からビテロジェニンを精製している。その報告によると、メダカのビテロジェニンの分子質量は、約 420 kDa であり、そのビテロジェニンを Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)により変性させて行われた電気泳動による分析の結果、ビテロジェニンは主に分子質量 200 kDa のポリペプチド鎖(サブユニット)を含んでいることが確認されている。また、Tabata *et al.* (2000)によると、100 μ g/L エストラジオール-17 β で 10 日間曝露した雄のメダカの腹水からビテロジェニンを精製した際に、ビテロジェニンのほかに 2 つのタンパク質がエストラジオール-17 β により誘導され、雄のメダカの腹水に存在することが、Native-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)による分析で明らかとなっている。また、ビテロジェニンを含む他の誘導合成されたタンパク質が、抗メダカ卵黄抽出液抗血清に対して交差反応を示す雌特異的なタンパク質であることが確認されている。

2000年3月に行われた第34回水環境学会では、女性ホルモン作用を示すとされるノニルフェノール(界面活性剤の原料)とビスフェノール A(ポリカーボネイト樹脂の原料)を雄メダカに対して曝露した場合、10 μ g/L では、ビテロジェニンのほかに、ビテロジェニンよりも高分子量のタンパク質が 2 つ、ビテロジェニンよりも低分子量のタンパク質が 1 つ誘導され、それよりも低濃度、0.1 μ g/L では、ビテロジェニンは誘導されず、ビテロジェニンよりも高分子量のタンパク質が 2 つ誘導され、更に、それらのタンパク質は、エストラジオール-17 β を曝露された雄メダカの腹水から精製されたビテロジェニンを抗原として作製した抗メダカ Vtg ポリクローナル抗体(雌特異的なタンパク質と特異的に結合する)に対して交差反応を示すという報告がある。これらの報告で興味深いところは、低濃度の女性ホルモン作用を示す化学物質曝露の場合、バイオマーカーとして用いられてるビテロジェニンよりも、優先的に誘導合成されているタンパク質が存在するという点である。これらの報告が真実であるならば、これらのタンパク質が、更に低濃度曝露の影響をより早

期に検出できる新規のバイオマーカーとなりうる可能性があると考えられる。低濃度の影響評価が重要性を帯びているのは、生体内で濃縮されやすく、ホルモンシステムを介するために微量で作用する内分泌攪乱化学物質に対しては、可能な限り早急に対処し、潜在的な危険性を特定し、排除することが要求されているためである。

エストラジオール-17 β で雄メダカを曝露した際に、ビテロジェニンのほかに誘導合成されるタンパク質が存在することや、低濃度の女性ホルモン作用を示す化学物質を曝露した際に、ビテロジェニンよりも優先的に誘導合成されるタンパク質が存在するという報告に興味を抱き、本研究では、初めに、エストラジオール-17 β で曝露した雄メダカの体内に誘導合成されるタンパク質が、バイオマーカーであるビテロジェニンのほかに、それよりも高分子量のタンパク質が本当に存在するか否かの確認を行った。その結果、ビテロジェニンよりも高分子量のタンパク質の存在を確認したために、それらのタンパク質のビテロジェニンとの関連性を検討する研究を行った。

2. エストラジオール-17 β により誘導合成されるタンパク質の確認

100 μ g/L エストラジオール-17 β を曝露された雄メダカから得られた腹水(提供: 国土環境株)を Native-gradient PAGE、ウェスタンブロッティングによって分析することにより、ビテロジェニンよりも高分子量のタンパク質がエストラジオール-17 β により誘導され、それらが抗メダカ Vtg ポリクローナル抗体に対して抗原と認識されるタンパク質であるか否かの確認を行った。その結果を Fig. 1 に示す。曝露された雄メダカの腹水には、主に3つの分子質量のタンパク質(613 kDa、449 kDa、396 kDa)が存在し、それら3つのタンパク質が抗メダカ Vtg ポリクローナル抗体に対して抗原として認識される雌特異的なタンパク質であることを確認した。そのうち、396 kDa のタンパク質は、精製 Vtg と同じ分子質量であることからビテロジェニンであるものと思われる。また、449 kDa のタンパク質は検出されているが、613 kDa のタンパク質やビテロジェニンほど強く発色しておらず、抗メダカ Vtg ポリクローナル抗体に対する反応性は低い。このことは、抗原として認識される部位が、613 kDa と 396 kDa のタンパク質に比べて 449 kDa のタンパク質では少ないこと、若しくはサブユニットが異なる可能性を示している。

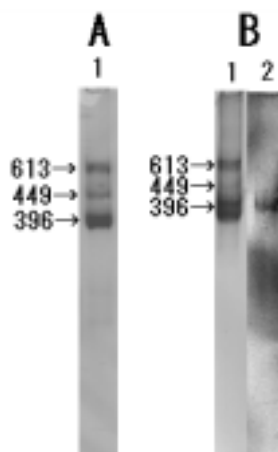


Fig. 1 曝露オス腹水の Native-gradient PAGE による分析 (A) CBB 染色, (B) ウェスタンブロッティング

※レーン1: エストラジオール-17 β を曝露された雄メダカの腹水 (10 μ l), 2: 精製 Vtg (10 μ l), 括弧内はウェルへの添加量。
※Fig. 中の数字は分子質量 (kDa) である。

3. ビテロジェニンよりも高分子質量のタンパク質の抽出・サブユニットの検討

エストラジオール-17 β により雄メダカの体内に誘導合成されるタンパク質は、ビテロジェニンのほかに、それよりも高分子質量のタンパク質が2つ存在 (613 kDa、449 kDa)し、さらにそれらのタンパク質が、抗メダカ Vtg ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、抗原として認識されるタンパク質であることが確認された。しかし、ビテロジェニンよりも高分子量のタンパク質のビテロジェニンとの関連は明確

ではない。そこで、誘導されたビテロジェニンよりも高分子量のタンパク質を Native-gradient PAGE 後のポリアクリルアミドゲルからそれぞれ抽出し、SDS-gradient PAGE、ウェスタンブロットリングで分析し、サブユニット構造を検討した。抽出し得られた 613 kDa 画分、449 kDa 画分、ビテロジェニン画分を SDS-gradient PAGE で分析した結果を Fig. 2 に示す。613 kDa 画分、449 kDa 画分、ビテロジェニン画分は同じようなタンパク質の挙動を示した。精製 Vtg は分解されているが、分解されたタンパク質と同じ分子質量のタンパク質が 613 kDa 画分、449 kDa 画分の中に存在している。その中で、204 kDa のタンパク質は、Hamazaki *et al.* (1987) でメダカのビテロジェニンは主に 200 kDa のサブユニットからなると報告されていることや、抗メダカ Vtg ポリクローナル抗体に抗原として認識され検出されたタンパク質であることから、ビテロジェニンの 200 kDa サブユニットであると思われる。これらのことはビテロジェニンとの関連性を更に強める結果となったが、ホモジナイズ、その他の抽出操作がもたらす影響で、タンパク質の分解が進み、613 kDa 画分、449 kDa 画分中において、200 kDa のサブユニット以外のサブユニットを検討するには困難である。

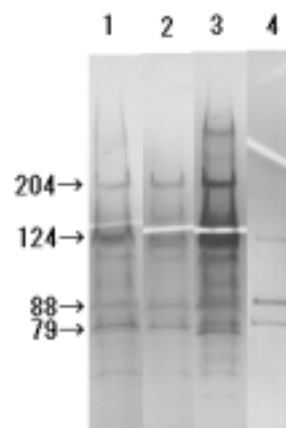


Fig. 2 613 kDa 画分、449 画分、ビテロジェニン画分、の SDS-gradient PAGE による分析 (ウェスタンブロットリング)

※レーン1: 613 kDa 画分 (20 μ l), 2; 449 kDa 画分 (20 μ l), 3; ビテロジェニン画分 (20 μ l), 4; 精製 Vtg (10 μ l), 括弧内はウェルへの添加量.
※Fig. 中の数字は分子質量 (kDa) である。

4. メダカに対するエストラジオール-17 β 曝露により精製試料の準備

ゲルからの抽出操作後の画分に対する検討では、雄メダカの体内で、エストラジオール-17 β によって誘導合成されるビテロジェニン以外のタンパク質のサブユニットを検討するには不十分である。そのために誘導合成されたタンパク質の精製を試みた。しかし、提供して頂いた試料の残量では精製が困難であると判断したために、実際にメダカを購入し、エストラジオールを 100 μ g/L になるように添加した飼育水で雄メダカを 25 日間飼育することで、エストラジオール-17 β を曝露し、精製を行う際に必要量の試料を確保した。雄メダカの腹部が期待するほどの膨らみが得られなかったために、血液を採取し、その遠心上清を精製の試料とした。得られた試料は 100 μ g/L エストラジオール-17 β で曝露された雄メダカの腹水(提供: 国土環境株)に存在するタンパク質とほぼ同じような挙動を示し、かつ、抗メダカ Vtg ポリクローナル抗体と交差反応を示す雌特異的なタンパク質が含まれていることを確認されたので、ここで得られた 100 μ g/L エストラジオール-17 β を曝露された雄メダカの血清を精製の試料として使用とした。

5. 誘導合成されたタンパク質の精製

エストラジオール-17 β を曝露された雄メダカの血清を精製の試料とし、ゲルろ過クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーにより、ビテロジェニン以外に誘導合成された雌特異的なタンパク質の精製を試み、誘導合成されたタンパク質を構成するビテロジェニンの 200 kDa サブユニット以外のサブユニットを検討した。

ゲルろ過クロマトグラフィー(Fig. 3)で得られたフラクションを SDS-PAGE により分析した結果を Fig. 4 に示す。誘導合成されたタンパク質の中で約 600 kDa のタンパク質を含んでいるフラクション No. 21 であるが、142 kDa、119 kDa、97 kDa のタンパク質は存在せず、200 kDa のタンパク質のみが存在した。フラクション No. 20~22 を回収(合計6 ml)後に、約6倍濃縮した試料を SDS-PAGE で分析した結果でも、同様に 200 kDa のタンパク質のみが存在した。このタンパク質は抗メダカ Vtg ポリクローナル抗体と交差反応を示している。この結果から、誘導合成されたタンパク質の中で約 600 kDa のタンパク質は、ビテロジェニンを構成する 200 kDa サブユニットの三量体であると考えられた。

約 450 kDa のタンパク質を含んでいるフラクション No. 25~28 であるが、200 kDa、142 kDa、119 kDa、97 kDa の4つのタンパク質を含んでいた。そして、その中で 200 kDa、142 kDa、119 kDa のタンパク質は抗メダカ Vtg ポリクローナル抗体と交差反応を示している。フラクション No. 25(高分子質量側)から No. 28 側(低分子質量側)に向かうに従い、200 kDa、142 kDa、119 kDa のタンパク質は増加、97 kDa のタンパク質は減少する傾向がみられる。これらのことから、誘導合成されたタンパク質のなかで約 450 kDa に相当するタンパク質は、200 kDa、97 kDa のサブユニットからなる可能性が考えられる。

ビテロジェニン以外のエストラジオール-17 β によって誘導合成されたタンパク質(約 600 kDa、約 450 kDa)は共にビテロジェニンのサブユニット(200 kDa)を含み、ビテロジェニンと関連性のあるタンパク質である。

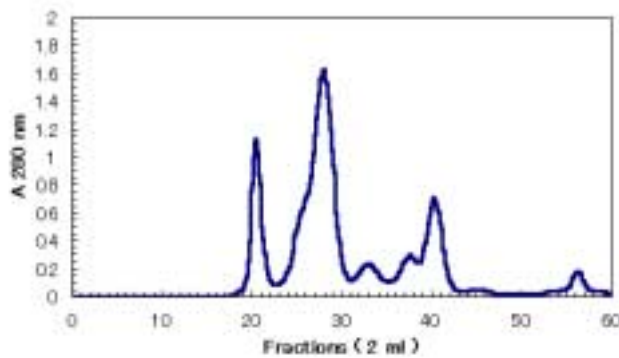


Fig. 3 ゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex 200 prep grade)

※100 μ g/L エストラジオール-17 β を曝露された雄メダカの血清を試料としている。

※カラムへの添加量は 300 μ l である。

※誘導合成されたタンパク質の中で約 600 kDa のタンパク質のサブユニットを検討するため Fraction No. 20~22 を回収し、約 450 kDa のタンパク質のサブユニットを検討するため No. 24~30 を回収した。回収した画分試料は、液量が約1 ml になるまで限外濃縮を行い、陰イオン交換クロマトグラフィーの試料とした。

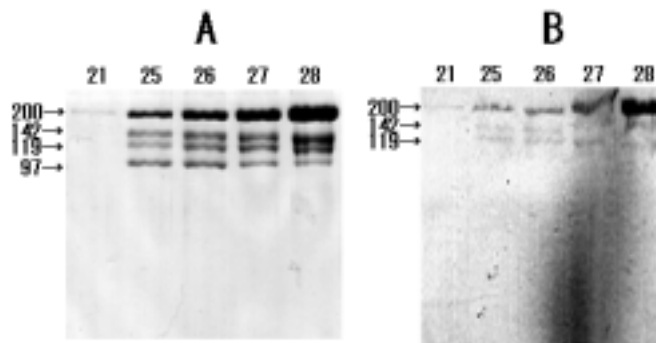


Fig. 4 ゲルろ過クロマトグラフィー後のフラクションの SDS-PAGE による分析 (A) CBB 染色, (B) ウェスタンブロットティング

※レーンの No. はゲルろ過クロマトグラフィー(Fig. 3)のフラクション No. に対応している。

※ウェルへの添加量は全て 10 μ l である。

※Fig. 中の数字は分子質量 (kDa) である。