

and enjoyed seeing many friends and colleagues. I enjoyed the seminar, too, with the opportunity to meet so many colleagues, and younger people. The Laboratory of Structure-Function Biochemistry in Kyushu University has a good community of graduate students, and I was especially impressed with the quality of training I saw among them.

I was particularly interested to hear about the endocrine disrupter projects, which will be very important, and which I hope may be applied to the *Drosophila* steroid receptor superfamily. It would be important to develop new ligands and inhibitors for specific receptor isoforms, both for experimental purposes and for control of insect populations. The study to utilize the antibody appears excellent and the idea to detect quantitatively the ligand-induced receptor conformation change is doubtless and definitely promising. The antibody is well known as a protein that has the strict molecular recognition sites in a molecule. There is currently much debate over the health risk associated with the estrogenic activity of compounds that are either present in the environment or used industrially. Therefore, an urgent need has been recognized to establish validated screening methods to test hormonal activities of chemicals. The assay to use antibody would become absolutely a method to assess the hormonal activity of chemicals.

During a relatively short period of my visit this time, we have continuously discussed such projects as expression of

CLOCK and CYCLE proteins and their use for risk assessment, cDNA cloning of FMRamide peptide gene and its receptor in the housefly *Musca domestica*, and procedures to make slices for observation on microscopes. A successful expression of CYCLE and its biochemical analyses on SPR are tremendous progress and important for future analysis of similar nuclear receptors. CLOCK could be obtained similarly, though we reached a conclusion to try a preparation of the domain with a similar size of CYCLE. It is inherent to remember the importance of microscopically observations of such receptors perhaps including some steroid receptors like ecdysone receptor. Another important progress is, of course, a successful cloning of a series of FMRamide peptide and receptor genes. The expression of FMRamide receptor in animal cells, for example in the COS-7 cells, would allow the binding assay of endocrine disrupters and this would a nice initiation to set an assay system for *Drosophila* central nervous system to examine neural risk assessment of chemicals.

Exchange the techniques and the ideas is always a carrier of good luck for on-going research projects especially in elevation of experimental skills. The system there to prepare poly- and monoclonal antibodies is confidently powerful for both of our laboratories in Japan and Canada and I am especially hopeful to continue a collaborative cooperation. Collectively, I am confident to prove a fruitful result from

the reward of this time visit to Japan,
Kyushu University.

C. 健康危険情報

現在のところ特に、該当する情報はな
い。

**D. 研究発表
学会発表**

1. 松島綾美、横谷 聡、金木淳史、Ian A.

Meinertzhagen、下東美樹、下東康幸、
イエバエの脳神経ペプチド FMRFamide の
cDNA クローニングと筋収縮活性、平成 16
年度日本生化学会九州支部例会、
2004. 5. 29～30。

E. 知的財産権の出願・登録状況

研究開始直後であり、出願・登録する
までの成果が現在のところ特に得られて
いない。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

「化学物質リスク総合研究推進事業」

外国の研究機関等への委託研究事業研究報告

ショウジョウバエの脳神経および卵産生における継代的な化学物質応答解析

主任研究者 下東康幸 九州大学大学院理学研究院教授

委託研究者 Ian A. Meinertzhagen カナダ・ダルハウジー大学・生命科学センター

研究要旨

ショウジョウバエには、ヒトのエストロゲン受容体に非常に良く似た核内受容体（dERR）が存在している。このdERRの内在性のリガンドは未だ同定されていない。一方、体内にある生物時計が刻む概日リズムの関与する核内受容体も、ヒトとショウジョウバエの両方で非常に類似しており、共通する分子機構が推定されている。ショウジョウバエでの核内受容体を介した内分泌ホルモン作用を「卵産生」として解析し、これを遺伝子解析からの継代的な分析法に発展させることができれば、有効な内分泌かく乱作用 *in vivo* 解析法として確立できる可能性が高い。そこで本研究ではまず平成15年度に、ショウジョウバエ生体への化学物質の影響を評価できる多世代繁殖毒性試験系を確立した。専用人工飼料にイーストを加えたショウジョウバエの食餌培地に、一定濃度のノニルフェノールなどの化学物質を混合して調べる世代継代の繁殖毒性試験として、(1) 産卵数および卵の孵化率の算定、(2) オス（雄）・メス（雌）比の継代変遷、の項目について検討した。その結果、継代によって孵化の性比に大きな差はなかったものの、産卵数および孵化率にはノニルフェノールによって明確な影響が観察され、しかも継代によってそれが増幅される傾向が感知された。平成16年度には、雌生体へのノニルフェノールの影響を産卵数の変遷で検討することとした。特に、ノニルフェノールの影響が幼虫時に食餌開始する場合と、成虫になってから開始する場合でどのように異なるかを検討した。その結果、成虫開始の場合には産卵数が5～20%増加することが判明した。しかしながら、非常に興味深いことに、孵化直後の幼虫から化学物質を含む飼育培地で育った次世代のショウジョウバエの産卵数は、10～25%と著明に減少した。この傾向はその次の世代、すなわち、継代テストの第2世代で、さらに強い影響として観察された。これらはエストラジオールでも同様であった。さらに、ノニルフェノールの高濃度（ 10^{-3} mol/l）では、親世代でも産卵数の減少が観察された。今後、個体群の一生を通じての総産卵数や卵母細胞から卵への減数分裂の速度の検討の必要とともに、多様な化学物質での検討が必要と思われた。

A. 研究目的

平成15および16年度の化学物質リスク研究推進事業の「外国研究機関等への研究委託事業」（社・日本食品衛生協会）において、「ショウジョウバエの脳神経および卵産生における継代的な化学物質応答解析」の実験研究を、共同研究者であるカナダのダルハウジー大学・生命科学センターの Ian

A. Meinertzhagen（イアン アンソニー マイナーザーゲン）教授に委託した。本研究課題は、特に *in vivo* 生体系での内分泌かく乱作用の影響を評価する実際的な試験系の開発をめざすものであるが、これは女性ホルモン・エストロゲン受容体等の核内受容体に対するコンホメーション変化センシング抗体法におけるホルモン活性に対応す

る最大抗体応答性 $R_{max}(\%)$ について、生物活性の指標算定を目的とするものである。

環境ホルモン、内分泌かく乱物質としての環境化学物質の危険性（リスク）は、これまでは性腺や甲状腺を中心とした核内受容体の応答を基点とする内分泌系での異常応答が問題とされてきた。しかしながら、ごく最近になってヒトのゲノム解析の完成を受け、「核内受容体」全般（ヒトの場合は 48 種類）の問題に拡張・拡大して考えられるようになった。さらには、脳神経系受容体に対する化学物質の反応性が危惧されるようになってきた。特に、脳神経系受容体に対する化学物質の反応性を、緊要の課題と位置づける考え方もある。ところが、従来の内分泌攪乱化学物質の研究者・研究グループで、核内受容体と同時に脳神経系受容体について検討できる研究者・研究グループは、日本国内はもとより、国際的にもきわめて少ない。このため、研究の進展をはかるためには脳神経系研究に経験のある研究者間で高効率な研究展開を企画することが是非に必要である。主任研究者・下東はこの 20 数年来の脳神経系受容体の研究者であり、その研究手法や概念を新たに内分泌攪乱物質研究に導入し、新規な方法論を開拓し、成果をあげてきた。そして、現在、内分泌かく乱物質問題におけるリスク評価を脳神経系受容体、特に概日リズムに関わる脳神経系研究へ展開をはかっている。この過程で、最適な実験動物として継代が短期間で起こり、遺伝子研究が容易なショウジョウバエが有力であることが判明し、この分野での世界的な権威である Meinertzhagen 教授との共同研究が必須の要件となってきた。

内分泌攪乱物質リスク評価において、*in vivo* 解析は最も重要な要素である。しかも、継代的な評価が可能であることは緊要の要素である。化学物質リスク研究における主任研究者の研究課題はホルモン作用を誘起するコンホメーション変化をセンシングする評価法であるが、レポーター遺伝子解析

よりもより直接的な *in vivo* 解析が可能な本法は非常に有効な検証法であり、是非に必要な試験法と思われる。

本研究の最大の特徴は、内分泌かく乱化学物質の「ヒト影響モデル」としての動物実験にショウジョウバエを選び、その多世代繁殖毒性試験系の構築をめざすことにある。ショウジョウバエは昆虫でありながら、染色体構成、遺伝子組成など、遺伝学的に哺乳類に非常に近い動物であり、したがって、実験動物としてはヒトモデルとして最適な種の一つである。ショウジョウバエの最大の特徴は、世代継代がわずか 2 週間程度で進むことであり、また、乾燥酵母などからなるエサの粉末を溶解凝固させたもので飼育するため、これに化学物質を一定濃度で混合し、その影響を染色体の異常、突然変異遺伝子、行動異常として観察することが容易であることである。こうした生体での試験と並行して、試験管 (*in vitro*) での試験については、これまで受容体試験、センシング抗体試験などの構築に成功した主任研究者らの成果を基礎にはじめて展開できるものである。「ヒト影響モデル」動物実験の安定なアッセイ系の開発は緊急な課題であり、本研究ではショウジョウバエをモデルに、化学物質リスク研究事業において *in vitro* 試験系の検証試験系として *in vivo* 試験系を確立しようとするものであり、これまでにない新規な手法を提供するものである。本研究の最終目標は、こうしたアッセイ系を用いて一連の多数の化学物質の内分泌かく乱作用を評定することにある。

B. 研究方法

① ショウジョウバエ系統の選出

キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の 3 系統の Oregon R、Canton S および white について、適切な系統を選別すべく、12:12 の明暗サイクル、25℃でこれらを飼育した。羽化後 2 時間以内の 3 系統それぞれについて交配し、交配後 1 日目から 14 日目まで、産卵数を毎日数えた。卵

の数をカウントにあたっては、ショウジョウバエを炭酸ガス麻酔で新しい培地に移動させたのちに、1 cm マス目のカウント用網目を被せて、実体顕微鏡下でカウンターを用いて実数を算定した。産卵場所は均一でなく、ばらつきがあるために全産卵数を求めた (図 1)。

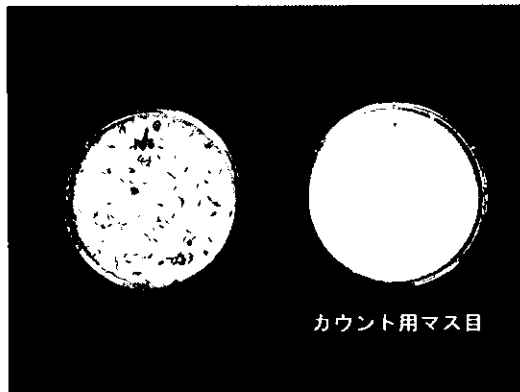


図 1 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* Canton S 雌の化学物質食餌投与試験における実験

飼育培地は次のようにして作製した。水 1 ℓ に、粉末寒天 8 g、砂糖 100 g、とうもろこし粉 40 g、乾燥酵母 60 g を入れて、強火で沸騰するまで煮込む。沸騰したのちは、さらに弱火で 20 分煮沸する。液体培地が冷めたのちに、ボーキニン 5.3 ml、プロピオン酸 2 ml、ペニシリン 6.67 万ユニット、ストレプトマイシン 16.67 万ユニットを入れて十分に攪拌する。これを直径 9.2 mm のシャーレに液体培地を 24 ml 入れて冷蔵保存する。

② 継代テストにおける産卵日の決定

キイロショウジョウバエの 3 系統のうち、最適と判断された種 Canton S について、その雌雄 10 匹ずつを交配させて、交配後 1 日目から 14 日目まで、産卵数を毎日数えた。

③ 交配に用いるショウジョウバエの数の決定

キイロショウジョウバエ Canton S をいく

つかの雌雄の組合せで交配させ、産卵数に差があるかを試験した。具体的には、雌雄 10 : 10 匹、10 : 2 匹、2 : 10 匹の 3 組の交配数で交配させた。そして、交配後 8 日目まで毎日の産卵数を数えた。

④ 化学物質のショウジョウバエ産卵数の継代テスト

キイロショウジョウバエ Canton S の継代的な飼育試験において、食餌培地に 17 β -エストラジオールとノニルフェノールを加えてその影響を評価した。用いた培地での最終濃度は、ノニルフェノールについては 10^{-3} mol/ℓ、 10^{-5} mol/ℓ、 10^{-7} mol/ℓ、17 β -エストラジオールでは 10^{-5} mol/ℓ になるように調整し、飼育培地を作製した。コントロールとしては、これらの化学物質の溶媒エタノールを用いた。

親世代 (P) は通常の培地で生育し、羽化後これらの化学物質の入った培地に移した。その成虫の産卵数をカウントした。第 1 子世代 (F1) 第 2 世代 (F2) は、培地に生みつけられた卵から孵化し、幼虫時から同じ食餌培地で育った成虫を示す。

化学物質の産卵数への影響を調べるために、3 日目卵から育ったショウジョウバエ Canton S の成虫を雌雄 10 匹ずつ、各化学物質の入った飼育培地に入れ、3 日後まで全ての産卵数を数えた。

また、上記で生まれた卵から育った成虫について、その成体数を数えた。成体数/産卵数を算定して、孵化率を求めた。また、生まれた卵から育った成虫の雌雄それぞれの数をカウントした。雄の数を雌の数で割り、性比を求めた。

⑤ 準超薄切片の作製

キイロショウジョウバエ Canton S の羽、足、伸弁を切除ののち、腹部の背側のクチクラに進展状に切り込みを入れた。これを 2.51% ホルムアルデヒド 3.1 ml、2.51% グルタルアルデヒド 3.1 ml、0.1 M カコジル酸緩衝液 3.3 ml、0.036 M 塩化カルシウ

ム 0.36 ml の合計 9.86 ml を小瓶に移して、固定のため 4℃で 1 日間インキュベートした。

この後、0.1 M カコジル酸緩衝液で 10 分間、3 回洗浄した。0.1 M カコジル酸緩衝液、4%四酸化オスミウムを混ぜて、4℃で 3 時間後固定した。さらに、0.1 M カコジル酸緩衝液で 10 分間、3 回洗浄した後、エタノール系列で脱水した。エポキシ樹脂に包埋して、超薄切片用ミクロトームで 2 ～ 3 μm の厚さの切片にした。

⑥ 化学物質食餌の開始時期による影響試験

① 継代テストの次世代に用いる卵

次世代への継代に用いる卵は、産卵された日が一定であることが望ましい。産卵数に急激な変化がなく、また、一定の数が確保できる日として、昨年の実験結果から、3 日目を選び 3 日目に産卵された個体群から次世代へ継代した。

② 交配に用いるショウジョウバエの数

昨年の実験結果から、キイロショウジョウバエ Canton S では、雌雄 10:10 で交配させると、雌の産卵能力を反映することがわかったので、1 つのプレートに雌雄各 10 匹を交配させた。交配後、4 日目まで毎日の産卵数をカウントした。

③ 化学物質のショウジョウバエ産卵数の継代テスト

キイロショウジョウバエ Canton S の継代的な飼育試験において、食餌培地に 17 β -エストラジオールとノニルフェノールを加えてその影響を評価した。用いた培地での最終濃度は、ノニルフェノールについては 10^{-3} mol/l、 10^{-5} mol/l、 10^{-7} mol/l、17 β -エストラジオールでは 10^{-5} mol/l になるように調整し、飼育培地を作製した。コントロールとしては、これらの化学物質を溶かす溶媒として用いたエタノールを使用した。

親世代 (P) は通常の培地で生育し、羽化

後これらの化学物質の入った培地に移した。その成虫の産卵数をカウントした。第 1 子世代 (F1) および第 2 世代 (F2) は、培地に生みつけられた卵から孵化し、幼虫時から同じ食餌培地で育った成虫を示す。

雄への化学物質の影響を排除し、雌への化学物質の産卵数への影響を調べるために、第 1 子世代 (F1) 以降は化学物質を含む飼育培地に羽化後 3 日目に産卵指せたプレートから育った個体群から処女雌のみを選出し、その雌 10 匹に対して通常培地で飼育した雄 10 匹を交配させた。化学物質を含む新しい培地で、4 日目まで産卵数をカウントした。本研究では、第 2 世代 (F2) まで、産卵数をカウントすることができた。

C. 研究結果

① 実験系に適したショウジョウバエ系統の選出

キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の 3 系統 (Oregon R、Canton S および white) について、適切な系統を選別すべく、12:12 の明暗サイクル、25℃でこれらを飼育し、羽化後 2 時間以内のそれぞれについて交配し、交配後 1 日目から 14 日目まで、産卵数を毎日カウントした。その結果、12 日齢までのそれぞれの産卵数の平均値は、Oregon R は 36.6、Canton S は 32.1、white は 49.8 で Canton S が一番小さかった。しかしながら、Canton S の産卵数には、ばらつきが最も少なく、試験系として安定していると判断されたため、この系統で以後の実験を行うことにした。

② 継代テストに用いる産卵日の決定

キイロショウジョウバエ Canton S の雌雄それぞれ 10 匹ずつを、シャーレ型培地に入れ、交配後 1 日目から 14 日目まで毎日産卵数を数えた。その結果、羽化後の 3 日目と 8 日目の産卵数が多いことがわかった。産卵数が適度に多く、ばらつきの少ない羽化後 3 日目に生んだ卵を使用することにした。

③ 交配に用いるショウジョウバエの数の決定

キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の Canton S 系統の雄：雌の個体数（匹）比が 10：10 および 10：2 のときの産卵数を比較すると、10：2 の組合せの場合の産卵数が減っていた。一方、10：10 と 2：10 を比較すると、両者で大きな差は見られなかった。これらの実験を通して、雄が多いと雌の産卵数が減少すること、逆に雌が多いと雌一匹あたりの産卵数が増え過ぎて正確な産卵数が数えにくくなることが判明した。このため、内分泌かく乱物質の影響以外の外的要因を含まないようにする、あるいは抑えるためには、雄雌の比が 10：10 のとき最も適正な産卵数を与えると判断された。したがって、以後の実験においては雄：雌 = 10：10 匹として検討した。

④ 化学物質のショウジョウバエ産卵数への影響

キイロショウジョウバエ Canton S の親世代 P から子第 1 世代 F1 に継代した場合、その 3 日齢成虫の産卵数をエタノール培地での食餌に対して比較すると、ノニルフェノール 10^{-3} mol/ℓ および 10^{-5} mol/ℓ、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ℓ において 10 ～ 40% 減少することが判明した。しかしながら、非常に興味深いことに、ノニルフェノール 10^{-7} mol/ℓ で食餌した場合、産卵数は逆に 80% 増加した（図 2）。

子第 1 世代 F1 から子第 2 世代 F2 に継代した場合、同様に 3 日齢成虫の産卵数を比較すると、ノニルフェノール 10^{-3} mol/ℓ および 10^{-5} mol/ℓ、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ℓ において 50 ～ 70% 減少した。この場合もノニルフェノール 10^{-7} mol/ℓ で食餌した場合、産卵数は約 50% 増加した。

P から F2 まで継代した時の産卵数の平均値を比較すると、ノニルフェノール 10^{-3} mol/ℓ および 10^{-5} mol/ℓ、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ℓ において 30 ～ 60% 減少

した。ノニルフェノール 10^{-7} mol/ℓ で食餌した場合、産卵数は約 60% 増加した。

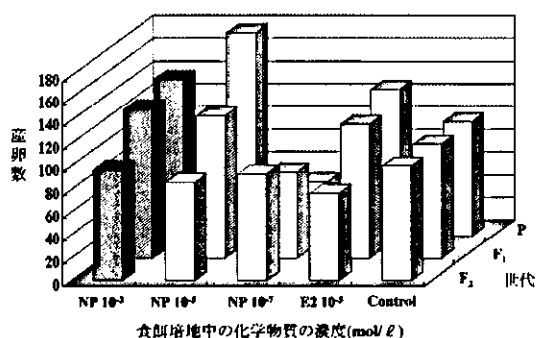


図 2 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の Canton S の産卵数の化学物質食餌投与による影響

⑤ 化学物質の孵化率および性比への影響

キイロショウジョウバエ Canton S の親世代 P から子第 1 世代 F1 に継代した場合、産卵された卵の孵化率をエタノール培地での食餌（コントロール）に対して比較すると、ノニルフェノール 10^{-3} mol/ℓ および 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ℓ において 40 ～ 80% 増加した。しかし、ノニルフェノール 10^{-5} mol/ℓ および 10^{-7} mol/ℓ で食餌した場合、孵化率は 10 ～ 60% 減少した。

F1 から F2 に継代の時、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ℓ の培地で飼育した Canton S の孵化率は、32.2% 増加した。ノニルフェノール 10^{-5} mol/ℓ において 19.4% 増加した。一方、ノニルフェノール 10^{-3} mol/ℓ および 10^{-7} mol/ℓ の培地で飼育したときの孵化率は、それぞれ 33.2%、11.8% 減少した（図 3）。

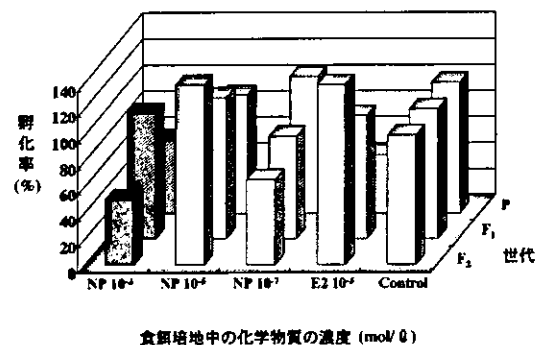


図 3 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の Canton S の産卵数の化学物質食餌投与による影響

P から F2 まで継代した時の孵化率の平均値を比較すると、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ℓ の培地で飼育した Canton S の孵化率は、約 25% 増加した。一方、ノニルフェノール 10^{-3} mol/ℓ において孵化率はほとんど変化せず、 10^{-5} mol/ℓ においては若干増加することが分かった。ノニルフェノール 10^{-7} mol/ℓ で食餌した場合、孵化率の平均値は約 15% 減少した。

なお、性比について比較したところ、P から F2 まで継代した時、ノニルフェノール 10^{-5} mol/ℓ、Canton S はオスの比率の平均値が約 10% 増加した。一方、ノニルフェノール 10^{-3} mol/ℓ および 10^{-7} mol/ℓ の培地で飼育した Canton S はメスの比率の平均値がそれぞれ 6.7%、6.3% 増加した。 β -エストラジオール 10^{-5} mol/ℓ の培地で飼育した場合はほとんど差がなかった。

⑥ 化学物質食餌の開始時期による影響試験

キイロショウジョウバエ Canton S の親世代を、化学物質を含む飼育培地で産卵させた場合、ノニルフェノール 10^{-5} mol/ℓ および 10^{-7} mol/ℓ、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ℓ において4日目までの産卵数が5～20%増加することが判明した。しかしながら、非常に興味深いことに、孵化直後の幼虫から化学物質を含む飼育培地で育った次世代のショウジョウバエの産卵数は、ノニ

ルフェノール 10^{-5} mol/ℓ および 10^{-7} mol/ℓ、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ℓ において10～25%と著明に減少した。この傾向はその次の世代、すなわち、継代テストの第2世代 (F2) で、さらに強い影響として観察された。ノニルフェノール 10^{-3} mol/ℓ では、親世代でも産卵数の減少が観察された (図4)。

D. 考察

以上のように、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の Canton S 系統を用いた食餌による化学物質の継代的な影響評価を実施したところ、産卵数と孵化率の変動について化学物質の濃度依存的な影響が顕著であり、増減の特徴的なプロフィールが得られることが判明した。現在、影響の顕著な化学物質濃度群の動物個体について、遺伝子やタンパク質の変動を調べる生化学的な測定も試みている。

ショウジョウバエのゲノムプロジェクトが完成して、その中でヒト・エストロゲン受容体と相同な遺伝子が確認され、*Drosophila* ERR (ショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体) と呼ばれている。ショウジョウバエ ERR はヒト・エストロゲン受容体と非常に類似しており、ショウジョウバエにもエストロゲン受容体があると強く示唆される。現在は、この受容体のリガンドは明らかになっていないが、*in vivo* の内分泌かく乱作用の評価法を確立する意義は高い。ショウジョウバエは、約10日で卵から成虫になる。したがって、高等動物に比べると短い期間で何代もの経過を見ることができる。例えば、我々ヒトで10代の経過を見るのに約200年かかるのに比べ、ショウジョウバエは約100日で経過を見ることができる。このため、ショウジョウバエによる評価法を確立することは重要な意味があると考えられる。

現在、F2 までの実験を実施したが、興味

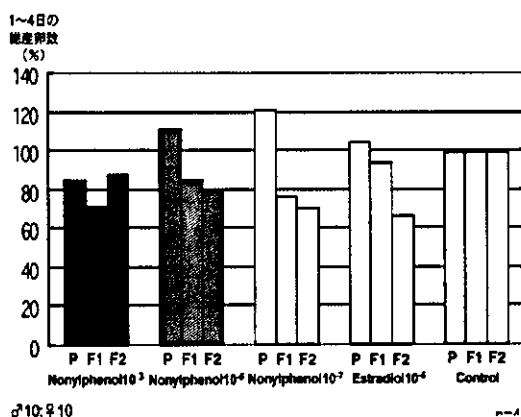


図4 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* Canton S 雌の産卵数に及ぼす化学物質食餌投与による影響

深い結果とともに、いくつかの問題点も明らかとなった。結果をまとめると、コントロールと比較して、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ ℓ とノニルフェノール 10^{-3} mol/ ℓ 、 10^{-5} mol/ ℓ で育てた個体群は産卵数が増加する傾向がある。逆に、ノニルフェノール 10^{-7} mol/ ℓ で育てた個体群は産卵数が減少する傾向にある。

孵化率について見ると、コントロールに比べて 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ ℓ とノニルフェノール 10^{-5} mol/ ℓ で育てた個体は、世代を重ねるごとに孵化率が高くなる傾向がある。ノニルフェノール 10^{-7} mol/ ℓ で育てた個体群は孵化率が世代を重ねるごとに減少する傾向がある。しかし、この傾向は産卵数の減少のためなのか、雄の生殖能力によるものなのかは判然としない。雄の生殖能力に及ぼす内分泌かく乱作用の影響の評価法を確立して、両者を比較して解析する必要もあると考えられる。例えば、雌、あるいは雄のどちらかのみを化学物質に暴露させた個体群を用い、正常培地で飼育した個体群と交配して、継代実験を行うことが考えられる。

一方、雌について暴露させた食餌開始時期を変えての試験では、非常に興味深い結果が得られた。結果をまとめると、コントロールと比較して、羽化後に、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ ℓ とノニルフェノール 10^{-5} mol/ ℓ 、 10^{-7} mol/ ℓ を摂取した個体群は羽化後 4 日までの産卵数が増加する傾向がある。逆に、ノニルフェノール 10^{-3} mol/ ℓ を摂取した個体群は産卵数が減少していた。孵化直後から、化学物質を含む飼育培地で生育した第 1 世代、第 2 世代の雌の産卵数は減少していた。親世代では幼虫時の卵巣における卵母細胞が正常に分化し、羽化後はじめて化学物質を摂取するのに対して、第 1 世代、第 2 世代の雌は幼虫時から化学物質を摂取しているので、幼虫時における卵巣の発達、そこで進行する卵母細胞の分化に化学物質が影響を及ぼした可能性が高いと考えられた。しかし、濃度の濃い

ノニルフェノール (10^{-3} mol/ ℓ) では、成虫になってからの暴露でも産卵数の減少が観察された。これは、薄い濃度のノニルフェノール (10^{-5} mol/ ℓ 、 10^{-7} mol/ ℓ) と 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ ℓ による影響とはまったく逆の現象である。この結果を説明するためには、化学物質を暴露した個体群の一生を通じての総産卵数を調べる必要がある。本研究では、羽化後 4 日目までの産卵数をカウントしたので、産卵数の減少が、これらの個体群の一生を通しての全産卵数が減少しているのか、あるいは、卵母細胞から卵への減数分裂の速度に変化が起こったのかを特定することができない。個体群の総産卵能力を評価するための方法として、例えば、組織学的な評価法の検討が求められる。

本研究ではまず、ノニルフェノールとエストラジオールを用いて検討した。一方、最近になって、主任研究者らはショウジョウバエ・ERR に果実ホルモンであるフラボン、イソフラボン誘導体に強く応答することが判明した。こうした化学物質も含め、多種多様な化学物質について検討することも重要と思われる

E. 結論

本研究により、ショウジョウバエ雌の産卵能力に及ぼす化学物質の影響についての評価法を確立した。野生型 Canton S は、産卵数にばらつきが少ないため、継代飼育による評価法に適している。雌 10 匹：雄 10 匹の交配数は、雌の産卵能力を反映している。 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ ℓ とノニルフェノール 10^{-3} mol/ ℓ 、 10^{-5} mol/ ℓ を含む培地で飼育すると世代を重ねるごとに産卵数が減少する傾向が顕著であった。

また、本研究ではショウジョウバエ雌の初期の産卵能力に及ぼす化学物質の影響についての評価法を確立した。野生型 Canton S は、産卵数にばらつきが少ないため、継代飼育による評価法に適している。雌 10 匹：

雄 10 匹の交配数は、雌の産卵能力を反映している。17 β -エストラジオール 10^{-5} mol/ ℓ とノニルフェノール 10^{-5} mol/ ℓ 、 10^{-7} mol/ ℓ を含む培地で飼育すると世代を重ねるごとに産卵数が減少する傾向が顕著であった。今後の課題として、個体群の総産卵能力を評価する方法、そして、雄の生殖能力を反映する交配数を決定する方法の検討が必要である。今後の課題として、雄の生殖能力を反映する交配数を決定する必要がある。

F. 健康危険情報

現在のところ特に、該当する情報は無い。

G. 研究発表

研究開始直後であり、発表するまでの成果が現在のところ特に得られていない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

研究開始直後であり、出願・登録するまでの成果が現在のところ特に得られていない。

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
H. Urushitani, M. Nakai, H. Inanaga, Y. Shimohigashi, A. Shimizu, Y. Katsu, and T. Uiguchi	Cloning and characterization of estrogen receptor a in mummichog, <i>Fundulus heteroclitus</i>	<i>Mol. Cell. Endocrinol</i>	203(1-2),	41-50	2003
T. Nose	Structure-function studies on the ligand-receptor π interactions	<i>Peptide Science 2002</i>	2002	9-12	2003
D. Asai, O. Koizumi, S. Mohri, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Tokunaga, T. Nose, Y. Shimohigashi	Biochemical evaluation of hormonal activity of endocrine disruptors by sensing the estrogen receptor conformation changes	<i>Peptide Science 2002</i>	2002	127-130	2003
T. Tokunaga, M. Otani, A. Matsushima, T. Nose, M. Shimohigashi, S. Aimoto, Y. Shimohigashi	The structure-activity studies of <i>Drosophila</i> FMRFamide-related peptides	<i>Peptide Science 2002</i>	2002	265-268	2003
H. Ishimori, D. Asai, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Nose, Y. Shimohigashi	The effect of the peptide corresponding to the No. 12 α -helix on the conformation change in the estrogen receptor activation	<i>Peptide Science 2002</i>	2002	437-438	2003

A. Matsushima, S. Sato, Y. Chuman, Y. Takeda, S. Yokotani, T. Nose, Y. Tominaga, Y. Shimohigashi, M. Shimohigashi	cDNA Cloning of the Housefly Pigment- dispersing Factor (PDF) Precursor Protein and Its Peptide Comparison among the Insect Circadian Neuropeptides	<i>Journal of Peptide Science</i>	10	82-91	2004
X.H. Liu, A. Matsushima, N. Shirasu, Y. Tominaga, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi, T. Nose	Structural Characteristics of <i>Drosophila</i> Estrogen-related Receptor Ligand Binding Domain to Capture the Peptide and Non-peptide Ligands	<i>Peptide Science 2004</i>	2004	303-304	2005
O. Kuwata, T. Honda, D. Asai, T. Tokunaga, A. Shibuya, N. Shirasu, T. Nose, Y. Shimohigashi	Highly Sensitive Monoclonal Antibodies to Distinguish Conformational Changes Induced by Endocrine Disrupting Chemicals in the Estrogen Receptor.	<i>Peptide Science 2004</i>	2004	333-334	2005
A. Shibuya, T. Tokunaga, D. Asai, O. Koizumi, S. Mohri, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Nose, Y. Shimohigashi	Ligand-inducing Conformation Changes in the Estrogen Receptor C- Terminal Tail Moiety and Their Sensing by Polyclonal Antibodies	<i>Peptide Science 2004</i>	2004	351-354	2005

研究成果の刊行物・別刷り

Cloning and characterization of estrogen receptor α in mummichog, *Fundulus heteroclitus*

Hiroshi Urushitani^{a,b,c}, Makoto Nakai^d, Hideko Inanaga^e, Yasuyuki Shimohigashi^f,
Akio Shimizu^g, Yoshinao Katsu^{b,c}, Taisen Iguchi^{a,b,c,*}

^a Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, 22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0027, Japan

^b Department of Molecular Biomechanics, Center for Integrative Bioscience, Okazaki National Research Institutes, School of Life Science, The Graduate University for Advanced Studies, 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki 444-8585, Japan

^c Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation, Kawaguchi 332-0012, Japan

^d Chemicals Assessment Center, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan (CERI), 1600 Shimo-Takano, Sugito-machi, Kitakatsushika-gun, Saitama 345-0043, Japan

^e Kurume Laboratory, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan (CERI), 19-14 Chuo-machi, Kurume, Fukuoka 830-0023, Japan

^f Laboratory of Structure-Function Biochemistry, Department of Molecular Chemistry, Graduate School of Science, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan

^g National Research Institute of Fisheries Science, 2-12-4 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-8643, Japan

Received 9 December 2002; accepted 20 February 2003

Abstract

Developmental exposure to 17 β -estradiol (E₂) induced the death of embryos and fry, malformations, sex reversal, and incomplete ossification of vertebrae and cranial bones in the cyprinodont fish, the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). To clarify the mechanism by which exogenous estrogens caused these developmental effects, we determined the sequence of an estrogen receptor (ER) coding region, encoded by 620 amino acid residues. This region shared 80% identity to that of ER α of medaka (*Oryzias latipes*). Northern blot analysis showed that two ER α mRNAs with 5.5 and 4 kb were expressed in the liver. These mRNAs were strongly induced by E₂ stimulation. The 4 kb mRNA was expressed 8 h after treatment, whereas the 5.5 kb mRNA was not induced until 12 h after E₂ stimulation. Vitellogenin (VTG) was expressed 8 h after E₂ stimulation in the male liver. Receptor binding assays using the protein of *F. heteroclitus* ER α (fhER α) ligand binding domain showed that alkylphenols bind to fhER α with a higher affinity (50 times or more) as compared with the human ER α . The present results demonstrate that the fhER α has a sequence very similar to that of medaka, and the mRNA for this receptor was induced by E₂-stimulation, followed subsequently by VTG expression. Furthermore, alkylphenols bind to fhER α more efficiently than to human ER α .

© 2003 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Estrogen receptor α ; Cloning; Receptor binding assay; Vitellogenin; *Fundulus heteroclitus*

1. Introduction

Many chemicals released into the environment have been reported to have the potential to disrupt the endocrine system of wildlife and humans (Colborn and Clement, 1992; Guillelte et al., 1995; Guillelte, 2000; McLachlan, 2001). Many of these chemicals have estrogenic activities as they can bind to the estrogen

receptor (ER) found in various wildlife, humans and various cell lines (Guzelian, 1982; Gray et al., 1989; Soto et al., 1991; White et al., 1994; Flouriot et al., 1995; Guillelte, 2000). Many chemicals released into aquatic environment have been suspected to play a causative role in alterations of endocrine and sexual development in aquatic wildlife (Guillelte et al., 1995; Crain and Guillelte, 1998; Van Der Kraak et al., 2001). In order to establish a model for analyzing the possible influence of estrogenic compounds on marine fish, effects of 17 β -estradiol (E₂) on the development of mummichog was examined. We found that exogenous estrogen induced

* Corresponding author. Tel.: +81-564-59-5235; fax: +81-564-59-5236.

E-mail address: taisen@nibb.ac.jp (T. Iguchi).

death of embryos and fry, malformations, sex reversal, and incomplete ossification of vertebrae and cranial bones (Urushitani et al., 1997, 2002).

In vertebrates, steroid hormone actions are mediated by specific receptors. The ER is a member of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily of ligand-activated transcription factors (Evans, 1988; Beato, 1989; Beato et al., 1995; Truss and Beato, 1993; Laudet, 1997). Recently, two types of ERs (ER α and ER β) have been identified by cloning of ER complementary DNA (cDNA) in various vertebrates (Green et al., 1986; Krust et al., 1986; Koike et al., 1987; Weiler et al., 1987; Pakdel et al., 1990; Mosselman et al., 1996; Kuiper et al., 1996; Todo et al., 1996; Tremblay et al., 1997; Xia et al., 1999; Tchoudakova et al., 1999; Socorro et al., 2000; Menuet et al., 2002). ER proteins are divided into six domains, termed A to F from the amino to carboxyl terminus (Krust et al., 1986). The A/B domain at the N-terminal region of ER protein has been demonstrated to contain a ligand-independent transcriptional activation function (AF-1) (Tora et al., 1989; Beato et al., 1995). The C domain (DNA-binding domain) lying in the middle region is most highly conserved among species, and regulates various target genes by binding to an estrogen response element (ERE) (Kumar et al., 1987). The D domain (hinge region) acts as a flexible hinge between the C and E domains. The E domain (ligand binding domain (LBD)) is important for ligand-binding, dimerization and ligand-dependent transcriptional activation function (AF-2) (Danielian et al., 1992). In oviparous vertebrates, one of the target genes for estrogens is the hepatic ER that in turn induces the transcription of vitellogenin (VTG), a precursor of yolk protein. VTG synthesis is stimulated by natural estrogens from the ovary. Exogenous estrogenic chemicals also stimulate the liver of male fish, resulting in VTG synthesis.

In contrast to its normal functions, exposure to estrogens during embryonic development can have major disruptive effects. Fish fry or embryos exposed to exogenous estrogens show abnormal gonads, alterations in sex steroid hormone levels, and or sex reversal (Nakamura, 1984; Crain et al., 1997; Guillette et al., 1999; Willingham and Crews, 1999). ER is present at early developmental stages in mouse embryos, even as early as the two-cell stage (Gorski and Hou, 1995). In *Xenopus laevis* embryos, ER mRNAs are also present in unfertilized eggs, and expression patterns of ER mRNAs change throughout the developmental stages and following E₂-treatment (Nishimura et al., 1997). These results suggest that exogenous estrogenic xenobiotics could directly affect early embryonic development of many species.

In order to clarify the developmental effects of exogenous estrogenic chemicals on fish embryos, we need to further understand the relationship between the

ER from fish and suspected environmental estrogens. We, therefore, determined the sequence of the *Fundulus heteroclitus* estrogen receptor α (fhER α) and compared the binding affinities of various estrogenic chemicals with the LBD of the fhER α .

2. Materials and methods

2.1. Animals

Mummichog was maintained under natural condition as previously described (see Urushitani et al., 2002). Mummichog (Arasaki Strain) originating from Chesapeake Bay (USA) were introduced to the National Research Institute of Fisheries Science (Yokosuka, Kanagawa, Japan) from the Ocean Research Institute of the University of Tokyo (Tokyo, Japan) in 1985. These fish, which maintained under Natural condition, spawn eggs daily from April through August (Shimizu, 1997). Mature male and female fish were given an intra peritoneal injection of 17 β -estradiol (E₂) (0.01 mg/g body weight) dissolved in sesame oil. Fish were killed before injections began (time 0) and 2, 4, 6, 8, 12 and 24 h after injection; the liver was removed from all fish. Tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for RNA isolation. Materials otherwise mentioned were purchased from Wako Pure Chemical, Osaka, Japan.

2.2. RNA isolation

Total RNA was isolated from liver and ovary using a RNeasy total RNA isolation kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) according to the manufacturer's protocol. The concentrations and quality of isolated RNA were estimated by spectrophotometric measurement at 260 nm and checked by formaldehyde gel electrophoresis, then stored at -80°C until used. Total RNAs were used for Northern blot analysis and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Each RNA samples for RT-PCR were treated with ribonuclease-free deoxyribonuclease I (Nippongene, Tokyo, Japan).

2.3. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification and complementary DNA (cDNA) cloning

RT-PCR was performed using a Takara RNA PCR kit (Takara, Ohtsu, Japan) according to the manufacturer's protocol with minor modifications. Total RNA (1 $\mu\text{g}/100\text{ }\mu\text{l}$ of PCR reaction) from female liver was reverse transcribed with Avian Myeloblastomas Virus (AMV) reverse transcriptase and oligo(dT)_{12–18} (Gibco-BRL, Gland Island, NY) at 42°C for 50 min, and PCR was subsequently performed with the Program Temp

Control System PC-700 (ASTEC, Fukuoka, Japan) with the following profile: 30 s at 94 °C, 1 min at 54 °C, 2 min at 72 °C; 30 cycles. Finally the reaction mixtures were kept at 72 °C for 10 min to achieve complete extension. Primers were also kept at 72 °C for 10 min to achieve complete extension. Primers were designed according to the *Oryzias* sp. ER (D28954) (see Table 1).

Major RT-PCR products resolved on a low melting point agarose gel, NuSieve GTG (FMC BioProducts, Rockland, ME), were purified by the standard phenol extraction method. Purified RT-PCR products were ligated to the TA cloning site of the pCR II vector using the TA Cloning Kit Dual Promoter (Invitrogen, San Diego, CA), and then transfected into INVaF cells (Invitrogen).

Nucleotide sequence analysis was performed by the dideoxy chain terminating method using the Sequi-Therm Long-Read Cycle Sequencing Kit-LC (Epicentre Technologies, Madison, WI) according to the manufacturer's protocol. The reaction was carried out by cycling the reactions 30 times for 30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C and 1 min at 70 °C with Program Temp Control System PC-700 (ASTEC), then heat-denatured products were separated on a poly acrylamide/urea gel using DNA Sequencer Model 400L (LI-COR, Lincoln, NE). The sequence alignments and phylogenetic trees were carried out using GENE WORKS software (Oxford Molecular Group, Campbell, CA) containing the CLUSTAL V computer program for multiple sequence alignment and construction of phylogenetic tree. The computer program constructs phylogenetic trees according to the UPGMA method.

2.4. Digoxigenin (DIG)-dUTP labeled probe synthesis

DIG-dUTP labeled probe synthesis was performed using a PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's protocol. Cloned plasmid DNA (Primer No. ER-1 and ER-2; 100 pg/50 µl of PCR reaction) was used as the template DNA. After heat-denaturation (4 min at

95 °C) of the template DNA, PCR was carried out by cycling the reactions 30 times for 45 s at 94 °C, 1 min at 56 °C and 2 min at 72 °C with Program Temp Control System PC-700 (ASTEC). Finally the reaction mixtures were kept at 72 °C for 10 min to achieve complete extension.

2.5. Construction of a cDNA library

Poly(A)⁺ RNA was prepared total RNA from female liver using Oligotex-dT30 super (Takara) according to the manufacturer's protocol. cDNA was synthesized from 5 µg of poly(A)⁺ RNA with oligo (dT)18-*Xho*I linker primer as a primer using SuperScript II RNase H⁻ reverse transcriptase (Gibco-BRL), followed by addition of *Eco*RI adaptor according to the manufacturer's protocol. The cDNA was ligated into *Eco*RI and *Xho*I restriction sites of lamda ZAP II vector (Stratagene, La Jolla, CA) and then packaged at 22 °C for 2 h using Gigapack III GOLD phage extract (Stratagene).

For screening of the cDNA library, approximately 5×10^5 plaques were screened by plaque hybridization with a DIG-dUTP labeled cDNA probe prepared by the manufacturer's protocol. Hybridization was carried out in a solution containing 5 × SSC, 1% blocking reagent (Roche Diagnostics), 0.1% sodium *N*-lauroylsarcosine, 0.02% SDS and the probe (10 ng/ml) at 50 °C overnight. The membranes were washed with 2 × SSC–0.1% SDS at room temperature and 0.1 × SSC–0.1% SDS at 65 °C for 15 min twice, and then positive clones were detected immunologically with anti-DIG-AP and nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) according to the manufacturer's protocol. Two cDNA clones, 4-1 and 12-2, were chosen, subcloned into plasmids and sequenced.

2.6. Northern blot analysis

Poly(A)⁺ RNA was isolated from total RNA of control and E₂-stimulated male liver using Oligotex-dT30 super (Takara) according to the manufacturer's protocol. Poly(A)⁺ RNA (1 or 0.5 µg) was denatured in 1 × 3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) loading buffer (0.04 M MOPS, 0.01 mM sodium acetate, 1 mM EDTA), 2.2 M formaldehyde, 50% formamide by heating at 65 °C for 10 min and electrophoresed in 2.2 M formaldehyde–1.0% agarose gel. After electrophoresis, the RNA was transferred to a nylon membrane, Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) by capillary blot with 10 × SSC (0.15 M NaCl, 15 mM sodium citrate) and was cross-linked to the membrane by UV irradiation. These membranes were hybridized with DIG-dUTP labeled probes (10 ng/ml) at 50 °C in 5 × SSC, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 50% formamide, 2% blocking reagent

Table 1
PCR primers for the cloning of fhER mRNA

Name	Position of 5' residues	Sequences (5'–3')
ER-1	709–729	CTTCAAGAGGAGCATCCAGG
ER-2	1542–1562	CCGACGCTCTCATACATCAT
ER-3	1010–1030	TCTGTGACCAAGCATACCTCC
ER-4	1708–1730	CCTCCTACTGGAGATGCTCGAT
ER-5	799–821	GGCTTGTCTGCTTAGGAAGTGC
ER-6	1101–1123	CCTACACCGAGGTCACCATGAT
ER-7	133–153	ACTCAGATCCAGGATCAGCC
ER-8	752–772	GCGACCAATCAGTGCACTAT

*Numbers of besides the primer sequences indicated the most 5'-end nucleotide of the primer corresponding to the sequence for which the GenBank accession number (*Oryzias* sp. ER: D28954) is given.

(Roche Molecular Biochemicals), 0.1% sodium *N*-laur-
oyl sarcosinate and 7% SDS. They were washed to a
final stringency of $0.1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS at 65 °C. Then
detected immunologically with anti-DIG-AP and CDP-
Star (Roche Molecular Biochemicals) according to the
manufacturer's protocol. These signals were exposed to
X-ray film, X-OMAT AR (Kodak, Rochester, NY).
After detection, these membranes were stripped at 68 °C
in 1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 50%
formamide, and then were hybridized again.

2.6.1. Chemicals

4-*t*-Octylphenol, benzophenone, di-*n*-butyl phthalate,
dicyclohexyl phthalate, di-2-ethylhexyl phthalate, octa-
chlorostyrene, and tributyltin chloride were obtained
from Wako Pure Chemical Industries. 4-Nonylphenol
was purchased from Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.
(Tokyo, Japan).

2.6.2. Construction of receptor expression plasmid and expression of the fusion protein

The LBD of fhER α was ligated with the prokaryotic
expression vector pGEX-4T1 (Amersham Pharmacia
Biotech) in *Bam*H I and *Not* I sites. *Escherichia coli*
DH5 α transformed with the expression plasmid was
cultured in 250 ml of L-broth containing 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of
ampicillin and protein expression was induced in the
presence of isopropyl 1-thio- β -D-galactoside. The cells
were harvested by centrifugation and resuspended in 4
ml of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 50 mM
NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM DTT. After sonication
and centrifugation, a soluble fraction was loaded to the
affinity resin, Glutathione-Sepharose 4B (Amersham
Pharmacia Biotech). After incubation for 30 min at
4 °C, the resin was washed three times with phosphate
buffered saline containing 0.5% (v/v) Triton X-100
(PBST) and the fusion protein was eluted with PBST
containing 16 mM of reduced glutathione.

2.6.3. Receptor binding assay

The receptor binding assay was carried out as
reported previously (Nakai et al., 1999). A solution (10
 μl) of recombinant fhER α LBD fusion protein was
dissolved in Tris-HCl (pH 7.4, 70 μl) containing 1 mM
EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO $_3$, 10% glycerol, 10
mg/ml bovine serum albumin, 0.5 mM phenylmethyl-
sulfonyl fluoride, and 0.2 mM leupeptin. After a test
solution (10 μl) of various concentration (1×10^{-4} – $1 \times$
 10^{-11} M) and 5 nM [2,4,6,7,16,17- ^3H] 17 β -estradiol (10
 μl) were added, the solution was incubated for 1 h at
25 °C. Free radiolabelled ligand was removed by in-
cubation with 0.2% activated charcoal and 0.02%
dextran in PBS (pH 7.4) for 10 min at 4 °C and
centrifugation for 10 min at 15000 rpm. The residual
radioactivity of radioligand bound to the receptor was
measured by liquid scintillation counting. The receptor

binding assay was repeated three times and data were
analyzed by the computer program GRAPHPAD PRISM
Ver. 3 (GraphPad Software, Inc.).

3. Results

3.1. Screening of the cDNA library

Using RT-PCR, one PCR product (ca. 850 base pairs)
was isolated, cloned and sequenced. The nucleotide
sequences of this clone indicated high homology with
medaka ER α (data not shown). This PCR product was
used to screen the cDNA library made from the liver of
a mature female mummichog. Two positive cDNA
clones, clone 4-1 and 12-2, were obtained. These
fragments containing about 2000 nucleotides were
cloned, and found to encoded 620 amino acid residues
(Fig. 1) (DDBJ/EMBL/GenBank accession number
AB097197).

3.2. Sequence homology with other species' ERs

To infer a phylogeny of ER subtypes, the deduced
amino acid sequence of fhER cDNA was compared with
other species' ERs (human, mouse rat, chicken, *X.*
laevis, channel catfish, goldfish, tilapia, red sea bream,
gilthead seabream, rainbow trout, medaka, Atlantic
croaker and Japanese eel) (Fig. 2). As previously
reported, the analysis indicates that there are two major
groups of ERs: ER α and ER β clusters. The ER α and
ER β clusters shared about 45–80 and 40–43%, respec-
tively, the overall identity of their amino acid residues
when compared with fhER. The fhER shared about 80,
74 and 72% overall identity to amino acid residues of
medaka (*Oryzias latipes*) ER α , tilapia (*Oreochromis*
aureus) type 1 ER and red seabream (*Chrysophirus*)
ER α , respectively.

The deduced amino acid residues of fhER contained a
highly conserved region (Fig. 3). Using the nomencla-
ture for domain structure by Krust et al. (1986), the
DNA binding domain (C domain) and LBD (E domain)
showed high homology with other ERs. The homology
with the C domain of medaka ER is 95%, and it is
conserved among other species' ER, exhibiting 90%
homology. In the C domain of the fhER, two zinc finger
motifs with eight cysteine residues were conserved. The
homology with the E domain of the medaka ER was
most conserved (92%).

3.3. Northern blot analysis

Northern blot analysis showed that two ER mRNA
transcripts of 5.5 and 4 kb were expressed in male and
female liver (Fig. 4). Northern blot analysis of time
course showed that the both mRNA transcripts were

GCCCCGAGGATGATTTCATGTATAAAGGGCAGAACCCGGTGCAGAGCAAGGAGGCGTTCCGGACCGCGCTCAGACCC	75
M Y K G Q N P V Q S K E A F G P A L R P	20
AGGTTAAGCCAGCCTCCTCAGAGCTGGAGACCCTCTCCCGCCACGTCTCCACCCCTACCCCGTGCCTCCCTC	150
R L S P A S S E L E T L S P P R L P P S P R A S L	45
GGTGACATGTACCCTGAAGAGAGCCGGGGCTCTGGAGGGGTAGCTGCTGTGGACTTCTGGAAGGACGTACGAC	225
G D M Y P E E S R G S G G V A A V D F L E G T Y D	70
TATGCCACCCACCCCTGCCCAACGCCTCTTTACAGCCACTCTACCACTGGCTACTACTCTGCTCCTCTGGAC	300
Y A T P T P A P T P L Y S H S T T G Y Y S A P L D	95
GCCCAGGGACCGCGTCTGATGGCAGTCTTCATTCTCTGGGGAGTGGGCCGACCACTCTCTGTTTGTGCC	375
A Q G P P S D G S L H S L G S G P T S P L V F V P	120
ACCAGCCGAGGCTCAGCCTCTTTATGACAGCTCCGAGCCAACACTATCTGGAACCTGCCTCAACGCCGTTTAC	450
T S P R L S L F M H A P S Q H Y L E T A S T P V Y	145
AGATCCAGTCACAGCCGGCTCCAGAGAGGACCACTGTGACACCCGTGACGAGGCATGCAGCGTGGGGGAGCTG	525
R S S H Q P A S R E D Q C D T R D E A C S V G E L	170
GGCGCTGGAGCCGGCTGGAGCCGACGCGGGGATTTGAGATGGCCAAAGAGACGCGCTTCTGTCTGTGTGC	600
G A G A G A A A G F E M A K E T R F A V Q	195
AGCGACTATGCCTCCGGGTACCACTACGGGTGTGGTCTCGAGGGGTGCAAGGCCCTTCTCAAGAGGAGCATT	675
S D Y A S G Y H Y G V W S E G K A F F K R S I	220
CAGGGTCACAATGACTATATGTGCCAGCGACAATCAGTGTACTATTGACAGGAACAGGAGGAAGAGCTGCCAG	750
Q G H N D Y M P A T N Q T I D R N R R K S Q	245
GCTTGCCGTCTTAGGAAGTGCTATGAAGTTGGAATGATGAAAGGAGGTGTGCGCAAGAGCGCGTCTGCTCTG	825
A R L R K C Y E V G M M K G G V R K E R G R V L	270
CGGCGCGACAAACGACGGACGGCCATCAGTGACAGAGAAAGGCCGTCAAAGGCCCTGGAGCCCAAAACGTACCCC	900
G D R K R T A I S D R E K A V K G L E P K T S P	295
CATCAGGACAAGAGGAAACGCGGACGCCCTCGGAGGGGACAGATCTCAGTGGCCAGCCTGCCGTCTGAGCAG	975
H Q D K R K R G S A L G G D R S S V A S L P S E Q	320
GTTCGTCTCTCTTCAAGGCGTGAACCGCGGATACTCTGTTCCCGTCAAAAACCTAGCCGACCTACACCGAG	1050
V L L L F Q G A E P P I L F C S R Q K L S R P Y T E	345
GTCACCATGATGACCCTGCTCACCAGCATGGCCGACAAGGAGCTGGTCCACATGATCGCTGGGCAAGAAGCTC	1125
V T M M T L L T S M A D K E L V H M I A W A K K L	370
CCAGGTTTTCTGCAACTCGCCCTCCACGACAGGTCTCTCTCTGGAGAGTTCATGGCTGGAGGTGCTGATGATC	1200
P G F L Q L H A L H D S V A V Q N M L L A T A S R F R M L K	395
GGGCTAATCTGGAGGTCTATCCACTGCCCTGGAAAGCTCATCTTCGCACAGGACCTGATACTGGACAGGAACGAA	1275
G L I W R S I H C P G K L I F A Q D L I L D R N E	420
GGGACTGCGTTGAAGGCATGACGGAGATCTTCGACATGCTGTGGCCACCGCTTCCCGCTTCCGCATGCTCAAG	1350
G D C V E G M T E I F D M L L A T A S R F R M L K	445
CTCAAAACCGAGGAATTTGTCTGCCTTAAAGCTATTATCTGCTCAACTCTGGCGCCTTTCTTTCTGCACCGGC	1425
L K P E E F V C L K A I I L L N S G A F S F C T G	470
ACAATGGAGCCCTTCACGACAGCGTGGCCGTACAGAACATGCTGGACACCATCACCGACGCTCTCATACATCAT	1500
T M E P L H D S V A V Q N M L L A T A S R F R M L K	495
ATCAGCCAATCAGGATTCTCGTTTCAGCAGCAGGCGAGACGGCAGGCCAGCTGCTGCTACTGCTCTCCACATC	1575
I S Q S G F S V Q Q Q A R R Q A Q L L L L L S H I	520
CGGCACATGAGCAACAAAGGCATGGAGCACTCTACAGCATGAAATGCAAGAACAAAGTGCCTCTGTACGACCTG	1650
R H M S N K G M E H L Y S M K C K N K V P L Y D L	545
CTGTGAGGATGCTTGACGCTCACCGCCACCCAGTCAAACCGTCTCAGGACGGAAAAAGCCCCCTCCACC	1725
L L E M L D A H R H H P V K P S Q D G K S P P S T	570
AGCAGCTTTGGCGCGGCTGTGAAGCGGCTCCTCTCGCGGGTTCAGCTCAGGACCCGAGGCAGCGGCGAC	1800
S S F G A G C E G S S A G S G P R G S G D	595
AACCTGATGAGAATCCCTCGGCTCCAGGCGTCTGCAGTACGGAGGTCCCGCTCGGACTGTGCCAGGTCTG	1875
N L M R I P S A P G V L Q Y G G S R S D C A Q V L	620
TGAGTCGGAGCGCTGAACGTCATTTTTATGAATGAGCACATGCAGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1941

Fig. 1. The nucleotide and deduced amino acid sequence of the clone 12-2. The numbers on the right refer to the nucleotide and amino acid sequences. The eight cysteine residues within zinc-finger motifs in C domain are boxed.

expressed at 0 h following treatment of males with exogenous estrogen (Fig. 5). Then, only 4 kb transcript was expressed from 2 to 8 h after E₂-stimulation. The 5.5 kb transcript was observed from 12 h, and seemed to be expressed strongly at 24 h after E₂ stimulation. VTG mRNA expression was observed from 8 h after E₂ stimulation. It seemed to be expressed strongly 24 h after E₂-stimulation.

3.4. Receptor binding assay

FhERα binding affinities to 4-*t*-octylphenol, 4-non-ylphenol, benzophenone, di-*n*-butyl phthalate, dicyclohexyl phthalate, di-2-ethylhexyl phthalate, octachlorostyrene, and tributyltin chloride were measured. The chemicals were tested as they were designated priority substances for risk assessments by the Japanese

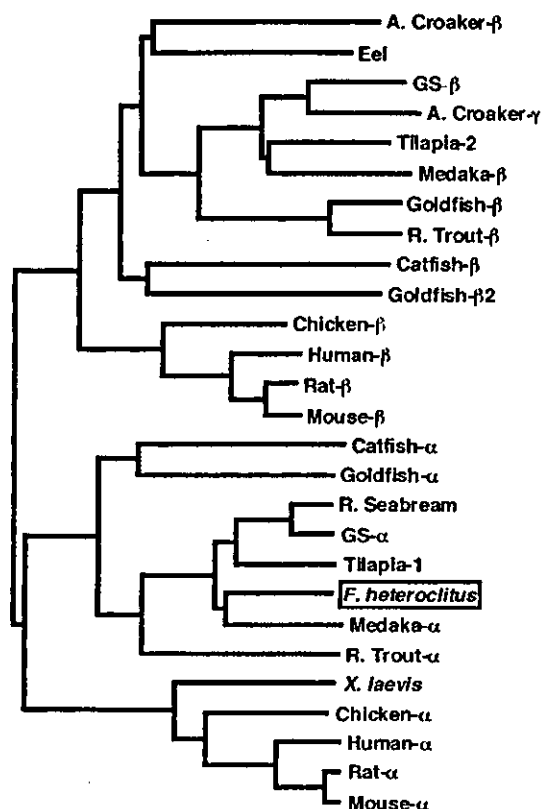


Fig. 2. Phylogenetic analysis of ER amino acid sequences including *F. heteroclitus* ER. This tree was constructed according to the clustal W method. The lengths of the vertical lines indicate reciprocal sequence similarities. NCBI BLAST identification numbers for each sequence are Atlantic croaker (A. Croaker) beta, Gi-10312208; A. Croaker gamma, Gi-10312210; catfish alpha, Gi-10945423; catfish beta, Gi-7527468; chicken alpha, Gi-119597; chicken beta, Gi-13124227; Japanese eel, Gi-2073113; goldfish alpha, Gi-16118451; goldfish beta1, Gi-4666318; goldfish beta2, 7012683; gilthead seabream (GS) alpha, Gi-12643248; GS beta, Gi-13124245; human alpha, Gi-544257; human beta, Gi-1518263; medaka alpha, Gi-3915675; medaka beta, Gi-18143643; mouse alpha, Gi-119599; mouse beta, Gi-1912468; rainbow trout (R. Trout) alpha, Gi-12643267; R. Trout beta, Gi-13124194; rat alpha, Gi-119600; rat beta, Gi-1373281; red seabream, Gi-2447038; tilapia type1, Gi-4098199; tilapia type2, Gi-4098201; *X. laevis*, Gi-625330.

government in the "Strategic Programs on Environmental Endocrine Disrupters '98 (SPEED'98)". The binding curves of chemicals are illustrated in Fig. 6. E_2 bound to fhER α with an IC_{50} value of 5.5×10^{-9} M. The binding affinities of the other chemicals are represented as relative binding affinity (RBA), which was calculated as a percent ratio of the IC_{50} values of test substances relative to E_2 . Table 2 shows the mean of RBA values of chemicals for fhER α . RBA values of 4-*t*-octylphenol and 4-nonylphenol for fhER α were approximately 0.0067- and 0.0042-fold of E_2 , respectively. Benzophenone exhibited weak binding affinity, approximately 0.008% of E_2 . Phthalates also showed weak binding affinities (0.01–0.02% of E_2). Di-*n*-butyl phtha-

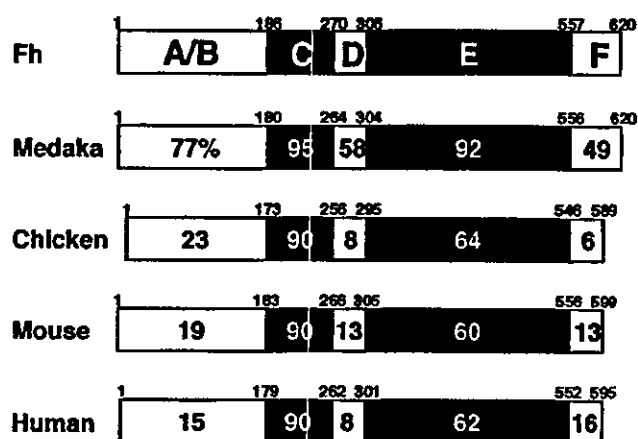


Fig. 3. Domain structure of Fh (*F. heteroclitus*) ER. Using the nomenclature of Krust et al. (1986), the five to six domains of ER (A-F domains) are indicated. Sequence identity with Medaka (NCBI BLAST identification number: Gi-1706707), chicken (Krust et al., 1986), mouse (White et al., 1987), human (Green et al., 1986) ERs. The overall identity of each region is shown as a percentage compared with the clone.

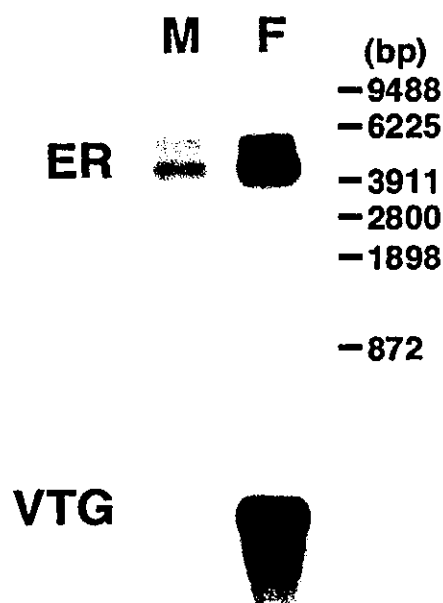


Fig. 4. Transcriptional sizes and expressions of ER and VTG mRNA as analyzed by Northern blot analysis. The poly(A)⁺ RNA (1 μ g each lanes), isolated from male (M) and female (F) livers, were separated on a denaturing formaldehyde agarose gel (1%).

late showed slightly higher receptor binding ability for the fhER α . Binding potency of octachlorostyrene to fhER α was estimated as 0.02% of E_2 .

4. Discussion

Man-made chemicals have the potential to health and reproduction problems in human and wildlife (Colborn

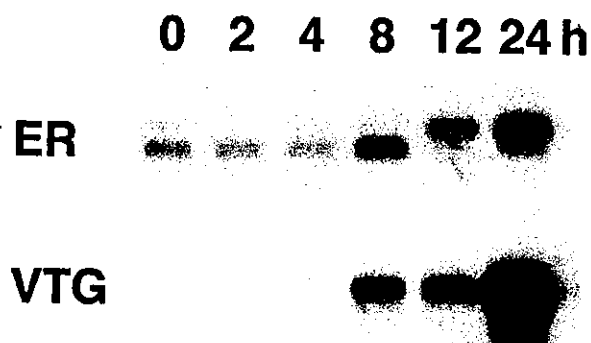


Fig. 5. Northern blot analysis of ER and VTG mRNA expressions in time series. The poly(A)⁺ RNA isolated from male liver at 0, 2, 4, 8, 12 and 24 h after E₂ stimulation. Amounts of poly(A)⁺ RNA loaded on a denaturing formaldehyde agarose gel (1%) were 0.5 µg each lanes.

Table 2
IC₅₀ and RBA values of each chemical to fhERα

Chemicals	IC ₅₀ (M)	RBA (%)
17β-Estradiol	5.5×10^{-9}	100
Dibutyl phthalate	5.3×10^{-5}	0.010
Di(2-ethylhexyl) halate	3.2×10^{-5}	0.017
Dicyclohexyl phthalate	3.8×10^{-5}	0.014
4- <i>t</i> -Octylphenol	8.5×10^{-7}	0.65
4-Nonylphenol	1.3×10^{-6}	0.42
Benzophenone	7.3×10^{-5}	0.0075
Octachlorostyrene	2.9×10^{-5}	0.019
Tributyltin chloride	3.3×10^{-6}	0.17

et al., 1993). These chemicals, can act as hormonal agonists or antagonists, and have been called endocrine-disrupting chemicals (EDCs). Recent surveys have reported that many chemicals exhibiting ER affinity are widely distributed in the aquatic environment. It is the widespread nature of these contaminants and reports documenting that exposure to ecologically relevant concentrations of EDCs and or exogenous hormones early in development can cause permanent alterations of the reproductive, immune, and neurological systems that require further studies on the mechanisms by which these changes occur (Guillette et al., 1995; Iguchi et al., 2002a). A number of studies have revealed a risk of exposure of estrogens or estrogenic compounds during their early development (Crain et al., 1997; Willingham and Crews, 1999; Guillette et al., 1999; McLachlan, 2001; Iguchi et al., 2002a). We reported that exposure to estrogen early in the development of the mummichog (*F. heteroclitus*), caused malformations, growth retardation, incomplete ossification, sex reversal and death of fry (Urushitani et al., 2002). In *X. laevis*, similar results have been reported by Nishimura et al. (1997). Furthermore, they demonstrated there was an effect of estrogen on ER mRNA expression during development. In mice, ER was expressed in the oocytes and fertilized eggs (Gorski and Hou, 1995). These findings suggested that estrogen can affect early development, and may have a specific direct effect on early osteogenesis through an ER-mediated mechanism. In the present study, fhER cDNA was isolated to further

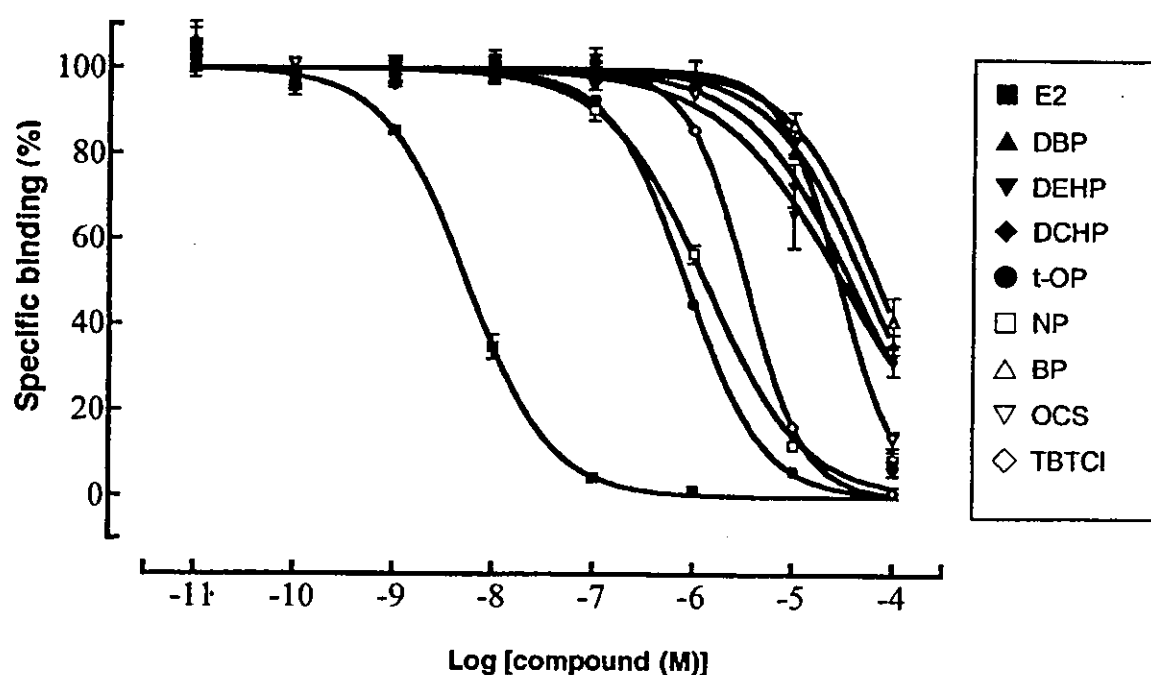


Fig. 6. Concentration-dependent curves of chemicals in the receptor binding assay to measure the abilities to displace [³H]17β-estradiol. Abbreviations of chemicals were as follows; DBP, dibutyl phthalate; DEHP, di(2-ethylhexyl) phthalate; DCHP, dicyclohexyl phthalate; *t*-OP, 4-*t*-octylphenol; NP, 4-nonylphenol; BP, benzophenone; OCS, octachlorostyrene; TBTCI, tributyltin chloride.