

Eukaryotic Model Systems モデル生物

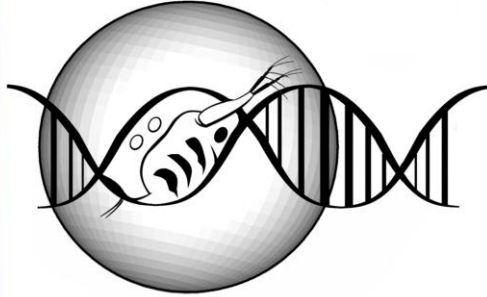


ゲノム情報
遺伝子操作: トランスジェニック個体、ノックアウト個体
突然変異体

研究というのは大体モデル生物を使います。遺伝子情報がわかっている、遺伝子操作もできるという利点があって、ショウジョウバエとか、センチュウとか、マウスとかありますが、オオミジンコは、モデル生物にしたいなということで入れていますが、未だモデル生物ではありません。

生態・進化・遺伝学の研究のためのモデル動物化

The *Daphnia* Genomics Consortium
ミジンコゲノムコンソーシアム



遺伝子数	ミジンコ	31,000
	ヒト	23,000



Daphnia pulex
Genome,
Science, 2011

目的

ミジンコでも、他のモデル生物と同じように、分子、細胞、発生を理解し、
生態学的な研究の利点を付け加える

2011年にジョン・コルボーンさんがリードして、*Daphnia pulex*、これは和名だとミジンコ。環境省やOECDで試験法に使っているのは*Daphnia magna*、オオミジンコ、これは大きいミジンコです。この小さいミジンコの遺伝子が全部読まれて、大体31,000遺伝子がある。ヒトは30,000とか言っていました、実際には23,000ぐらいで、ヒトの遺伝子よりもミジンコの方が多い。重複が非常にたくさんあるんですね。ということは、研究もしにくいということなのですが、2011年にこの遺伝子がわかってきたということです。

ミジンコを研究する利点

- ・ ミジンコは水系環境の中で、**食物連鎖の主要な構成要素**となっており、藻類、バクテリア、原生動物と同じく、魚類の**主要な餌**となっている。
- ・ ミジンコの集団を用いれば、**湖や池**の自然の境界を示すことができる。
- ・ **すべての生活環に当たるステージ**を簡単に取得することができる。
- ・ ミジンコの**生殖サイクル**は5－10日で完了するため、真核生物の世代を超えた実験遺伝学の研究には理想的なモデル系となる。
- ・ **単為生殖**は**クローン**でもあり、**有性生殖**も行う。
- ・ 生涯を通して**透明**なので、組織特異的な遺伝子発現などの研究や、寄生物の研究に有用である。
- ・ ミジンコの生活の歴史、すなわち100－200年間にわたる**主要な生活環**を含む、を過去から現在までの**進化の歴史**を研究することが可能である。

ミジンコは、食物連鎖のちょうど中間ぐらいに当たります。藻類を食べて増えます。増えたミジンコは小魚の餌になる。生態系を支えているということとか、非常に離れた池あるいは湖の集団ごとに比べて、遺伝子をみながら、この集団とこっちの集団は地理的にいくと、何百万年前に離れたはずだと。そこで遺伝子がどれだけ変わっているかということを生態学的な観点で調べるといのがヨーロッパのメジャーな研究になっています。

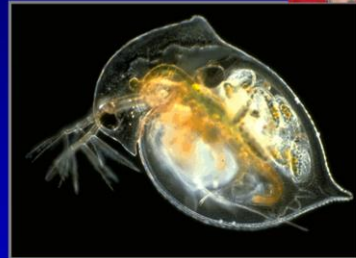
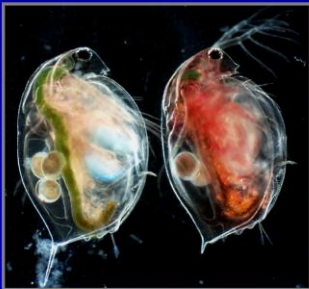
ミジンコを用いた生態学ゲノミック研究

表現系の可塑性の分子的な基礎は何か？

環境からのシグナルはどのように表現系の可塑性に翻訳されるのか？



- ✓捕食者に対する**防御形態**
- ✓酸素低下ストレスによる**ヘモグロビン産生**
- ✓**環境依存性**性決定
- ✓**無性生殖 vs 有性生殖**
- ✓**直接発生 vs 休眠**
- ✓病原体に対する**免疫応答**...



ミジンコは一方、フサカというユスリカの幼虫に食われるのです。フサカのおいを嗅ぐと、頭がとんがってフサカの口よりもちょっと大きくなって、カプツときたときに口に入らないので、ずるっと脱げられるということで、防御形態といいます。ある研究者は防御形態はどうやってできるのかに非常に興味を持っています。だけど、ここにメダカを持ってくると、頭がとんがったような卵子をみんな食っちゃうので、非常に近い間の防御形態というか、敵に対する防御というのはわかるのですが、もう少し大きいのが来ると、それもままならないのですが。不思議なことに、このところにぽっかりと出るだけで食われにくくなるのです。

ミジンコを用いた生態学ゲノミック研究

自然界の集団では環境特異的にどのくらいの遺伝子変異が起こっているか？
環境ストレスに反応する遺伝子と同じ遺伝子群が地理的適応(種分化)に主要な働きをしているか？

Why is convergence the general rule when independent lineages invade habitats with similar selective regimes? And, are convergent evolved traits governed by the same sets of genes?



非常に特徴的なのは、こんなヘルメットみたいなのがボーンと伸びるので。これは強烈ですね。防御形態もちょっと出ると強烈に大きくなるのとあります。

環境ゲノミクス、生態ゲノミクス、集団ゲノミクス



Rock pools with *Daphnia* populations on four islands in the Tvärminne archipelago in southern Finland. These pools are part of a metapopulation of *D. magna*, *D. pulex*, and *D. longispina*. In the background, the Baltic Sea is visible.

Dead *D. magna* carrying a resting egg.

ヨーロッパの方は、これはスウェーデンだったと思いますが、湖のところにある岩場に水が張っていて、ミジンコがわいているのですが、夏になって水が枯れてくると、死骸がいっぱいありますが、ここに耐久卵が残っているので、次にまた雨が降って水が戻ってくると、またミジンコはわきます。イタリアのこういう湖のところにいるミジンコとスウェーデンにいるのとどれぐらい遺伝子的に違うのか同じなのかという研究が盛んです。

2. ミジンコ研究の歴史

約350年

ミジンコの研究の歴史は350年というのは、こういうことです。

Branchiopod crustaceans (甲殻亜門、鰓脚綱) Order: Anomopoda (異脚下目)
Most species: 2-3 mm in length, *Daphnia magna* > 5 mm, female > male
(ほとんどの種は2-3 mm、オオミジンコは5 mm以上、オスよりメスが大きい)

J. Goedart (1662) : first to mention, illustrated *Daphnia*: incorrect.
(ミジンコの最初の記載、スケッチであるが不正確)

Henry Power (1664): occurrence in ponds in summer, move up and down,
two little horns and legs, take out water it is perfectly dead
Description fits *Daphnia*, but cyclopoid copepods cannot be
ruled out. (夏に池で見られ、2本の角と肢があり、上下運動し、
水から出すと死ぬ。記載内容はミジンコだが、コペポッドかも?)

Jan Swammerdam (1669): the earliest illustrations of *Daphnia*.
sharp beak, a hollow structure, limbs lay free within the carapace,
two eyes---misinterpret. (もっとも初期のスケッチ、とがった嘴、
内腔構造、殻の内側に肢、2つの目)

Francesco Redi (1684): less informative. (情報量が少ない)

Antoni van Leeuwenhoek (1699): removed embryos from the brood pouch,
probably a *Daphnia*, observed beating heart, no anatomy.
(育房から胚を摘出、心臓の鼓動)

ミジンコの絵がいつ頃から残っているかといいますと、一番古いスケッチは1662年。でも、あまり正確ではないということで、何人か分書いておきました。下から3つ目の1669年のSwammerdam、この辺から少しミジンコに似ています。これは後でお見せします。ちょうどその頃は、一番下に書いておきましたが、Leeuwenhoekが顕微鏡を発明した、ちょうどその頃にミジンコらしい絵が描いてある。その頃は「ミジンコ」という名前はありませんでした。

Abraham Trembley (1744): memoir on *Hydra*, illustration of *Daphnia*. food for polyps. Revealed certain reactions to light. But unremarked. (Lenhoff and Lenhoff regard Trembley's work on *Hydra* as making the beginning of experimental zoology)
(ヒドラの研究者、ポリプの餌としてミジンコのスケッチを残す。
光に対する反応について記載)

Henry Baker (1753): illustration of *Daphnia*. Two eyes. (two eyes fuse in the embryos).
(ミジンコのスケッチ、2つの目：胚期に2つの目が癒合する)

L. Joblot (1754): crude illustration of *Daphnia*. (大雑把なスケッチ)

J.C. Schäffer (1755): die geschwänzten zackigen Wasserflöh (the tailed, branched waterflea). (最も正確なスケッチを残す)

1758: introduction of binominal nomenclature to zoology
(動物に2命名法が導入された)

Strauss (1820): *Daphnia magna* (オオミジンコの学名を作った)

赤字で書いているSchafferさん、1755年、この辺の絵が非常に正確です。その頃の絵には必ずヒドラが描いてあります。ですから、ヒドラが研究の中心で、ミジンコはたぶん餌にしていたのではないかと思います。

1820年に*Daphnia magna*と、動物の二命名法という学名を付けるときにホモサピエンスとか、そういった方式がミジンコに使われて、*Daphnia magna*というのが生まれたのが1820年です。

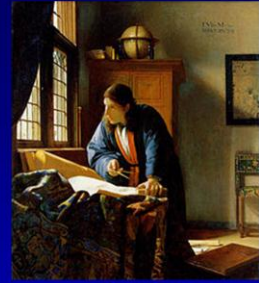
Antoni van Leeuwenhoek (Oct. 24, 1632-Aug. 26, 1723)



レーウエンフックはフェルメールの
絵のモデルとも言われている



100-266倍



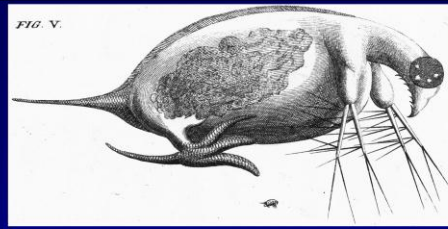
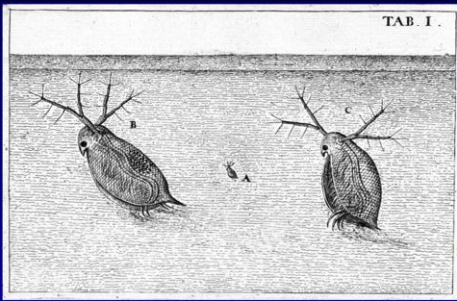
「地理学者」



「天文学者」

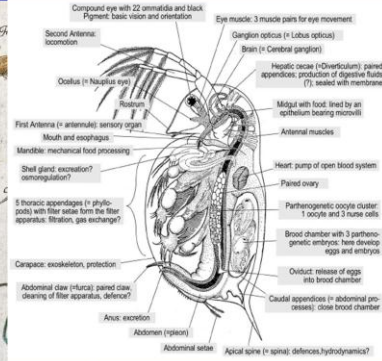
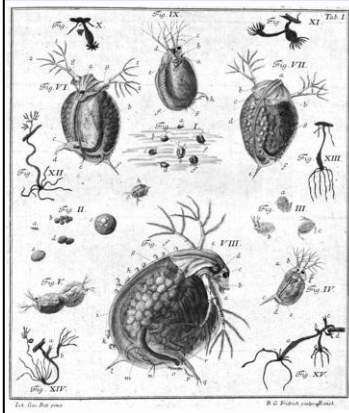
左がレーウエンフックさんの肖像画です。彼が作った顕微鏡は実際には10cmぐらいです。

彼がモデルになってフェルメールがこんな絵を描いています。「地理学者」とか「天文学者」という名前になっています。



Richard Bradley (1721)

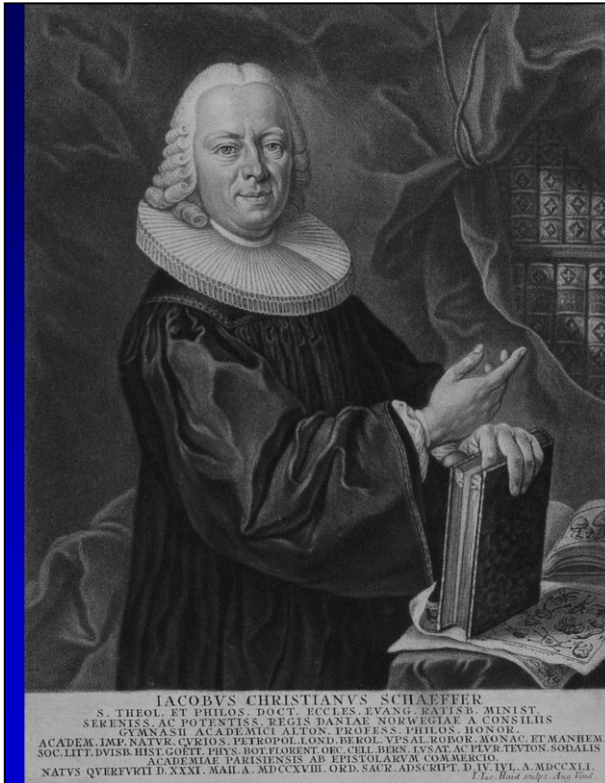
The first illustration of *Daphnia* (Jan Swammerdam, 1669)



Jacob Christian Schäffer (1755)

実際の古い絵です。1669年が左上です。

1755年が下にあるように、左の方を見ていただくと、小さいヒドラがいくつか描いてあります。



Jacob Christian Schäffer
(1718-1790)

Morphological complexity of
the microscopic crustacean
Daphnia (1755).

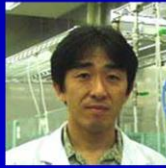
Daphnia is a hermaphrodite.
(ミジンコは雌雄同体)
Wasserflöh=waterflea (水蚤)



この人がミジンコをちゃんと研究したということになっています。ただ間違いもありまして、ドイツ語ですが、「ミジンコは雌雄同体である」と書いてあったりしますが、これは間違いです。それから「waterflea」という英語名、「Wasserflöh」というドイツ語で「水蚤」とか作ったのは彼です。

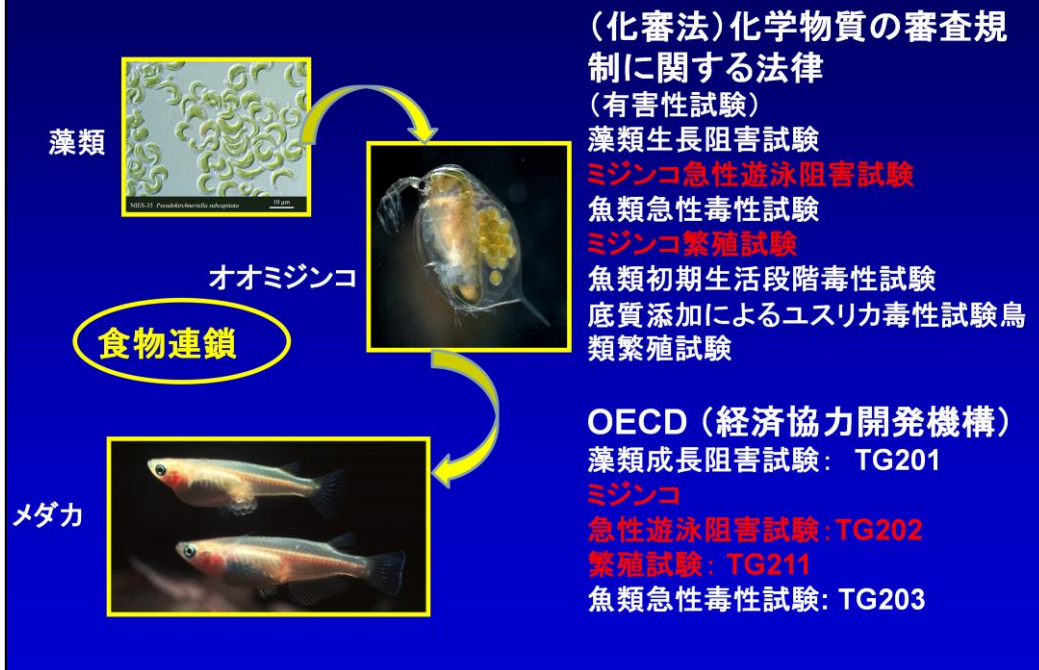
3. OECDのオオミジンコの 試験法開発について

OECD TG211 Annex



OECDのテストガイドラインの211、これは鑑迫先生を中心に、これを改定しようということになりました。

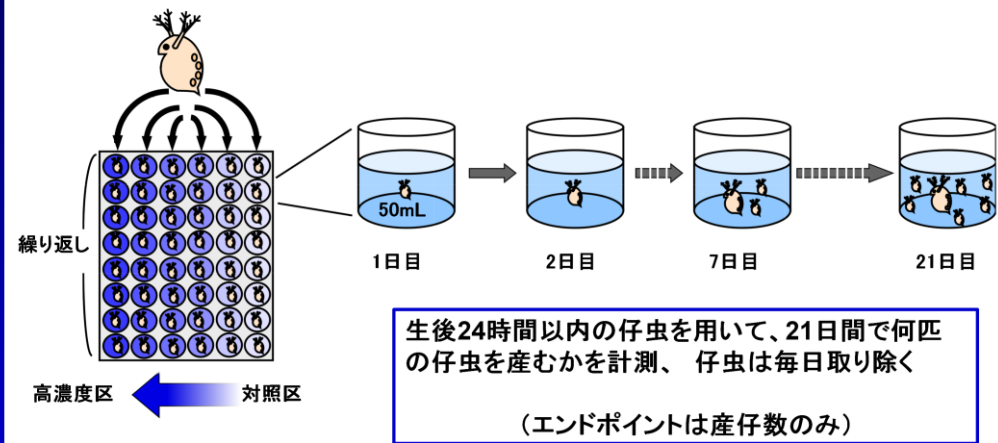
化学物質の安全性試験(有害性試験)



ミジンコは化審法の中でも使われています。藻類、ミジンコ、メダカ、この3つで急性毒性をみましようということになっていますが、ちょうど食物連鎖を表しまして、藻類を餌にしてミジンコが増え、これを魚が食べる。

ミジンコのテストガイドラインとしては、急性毒性試験と繁殖試験の2つがあります。

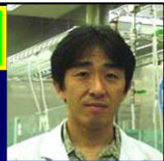
オオミジンコの繁殖試験 OECD TG211



問題点: 化学物質の作用メカニズムや毒性メカニズムを調べる手段がない: 遺伝子情報 (Ests)

産まれて24時間以内の個体を50ccのビーカーに1匹入れて、3週間何匹子どもを産むかというのをみていくというのがテストガイドラインの211です。

オオミジンコの生殖試験へのエンドポイントの追加

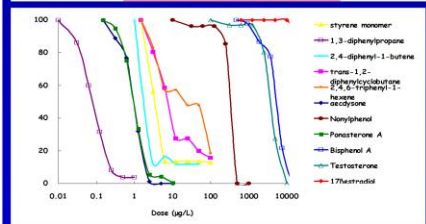
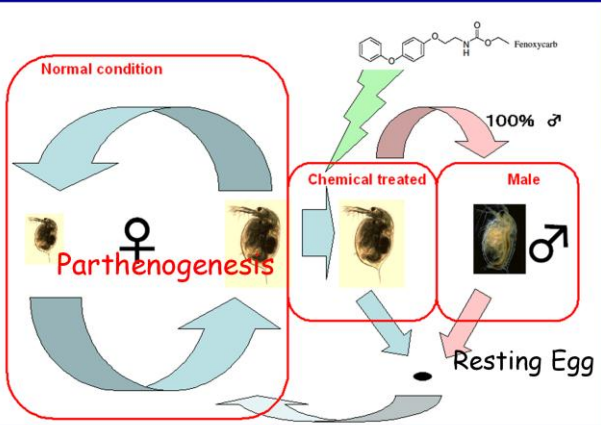
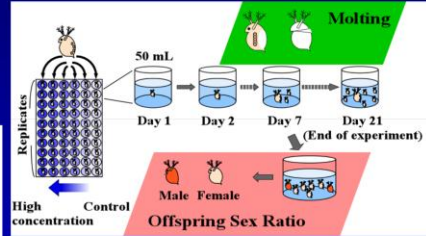


甲殻類-肢角目



環境ストレス
混雑
短日
餌不足

OECD
環境省



Tatarazako et al. Chemosphere, 53: 827-833, 2003.

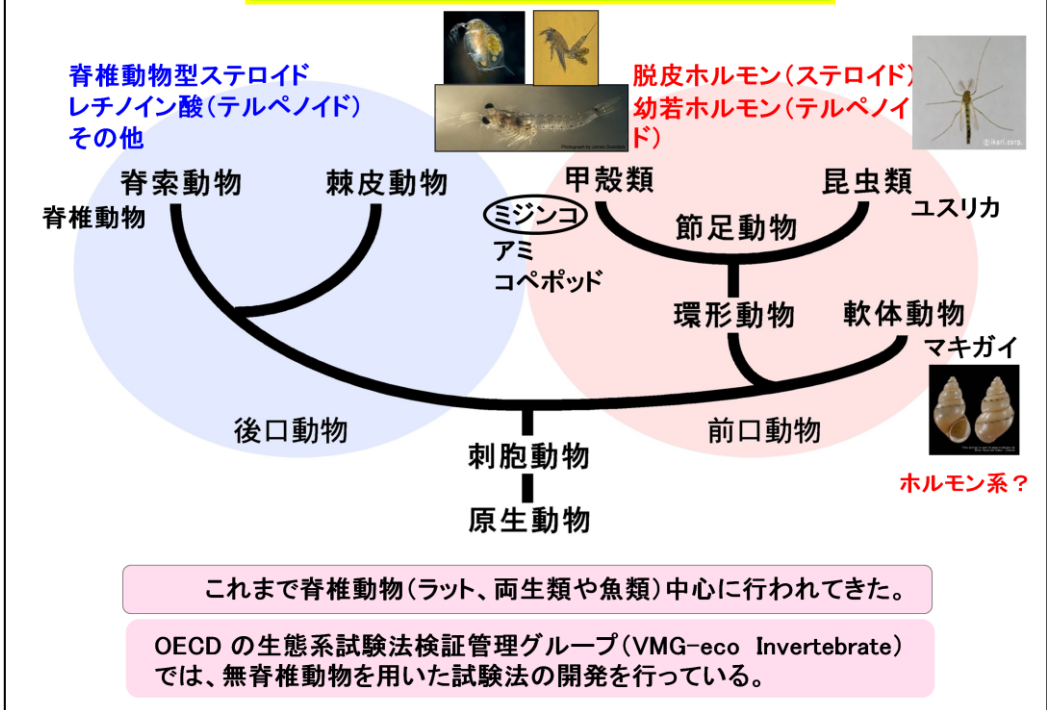
この中で、環境ストレス、混雑していたり、短日になったり、餌不足になったりすると、雄を産みますと書いたのですが、これを人工気象器を使っているいろいろやってみました。どれもこれもうまくいきません。いろんな組み合わせもし、学生さんが大変な目に遭っていましたが、うまくいかない。

その中で、鑓迫先生たちは、幼若ホルモン様物質をここに入れると雄を産むということを見つけました。それが2003年の論文です。



ちょうどその頃にOECDでは、無脊椎動物も内分泌かく乱に入れるべきであるという話がありまして、日本からはオオミジンコを内分泌かく乱の試験法の一つとして提案しました。

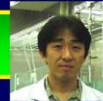
内分泌かく乱作用のメカニズムの解析



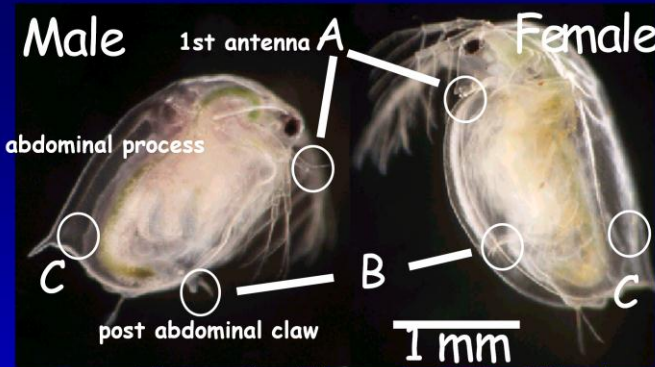
ほとんど脊椎動物だけが使われていました。魚もそうですし、ラット、両生類。ここにアミ、コペポッド、ミジンコ、ユスリカ、マキガイとか、いろんな国が、これがいいのではないかと提案をしてきました。

脊椎動物はホルモンの受容体とわかっていますが、こちらの方は、昆虫と同じだとすれば、脱皮ホルモン、幼若ホルモンがある。だけど、ミジンコは昆虫の脱皮ホルモンとは若干違うということもわかってきています。

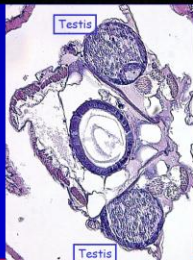
幼若ホルモン類似物質による雄産仔



Chemosphere, 2003.



Exterminator of fleas and ticks for pets



Pyriproxifen

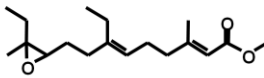
Induce male offspring in *Daphnia magna*.

鑑迫先生が見つけたのがこれです。ペットの首に1滴塗っておくと、ノミやダニが1カ月ぐらいわきませんというのがスーパーマーケットでも売っていますが、この中にはピリプロキシフェンが入っていますよと書いてあります。これが非常に微量で雄を産む。

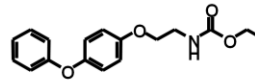
幼若ホルモンと幼若ホルモン類似物質の構造

幼若ホルモン

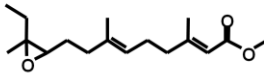
幼若ホルモン類似物質



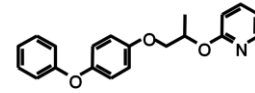
Juvenile Hormone I



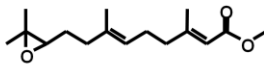
Fenoxycarb



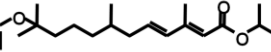
Juvenile Hormone II



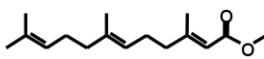
Pyriproxyfen



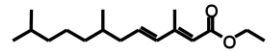
Juvenile Hormone III



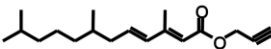
Methoprene



Methylfarnesoate

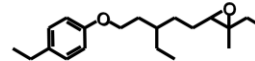


Hydroprene



Kinoprene

Sex Determination of Daphnia

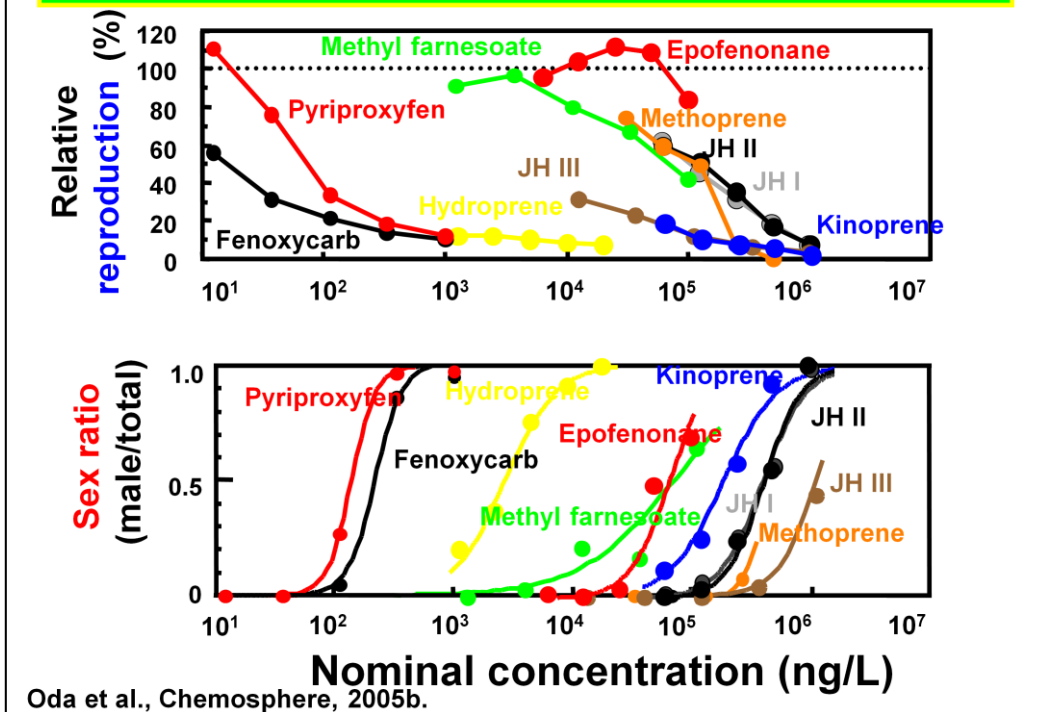


Epofenonane

さらに20種類以上(未発表)

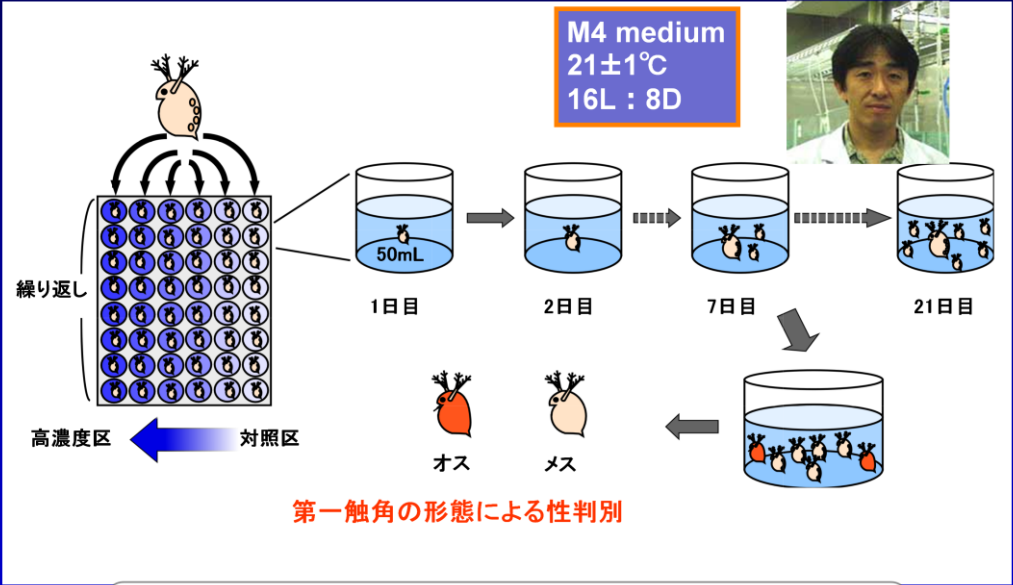
それに似たものをずっと探すと、フェノキシカルブとかその他、今朝の環境ホルモン学会で鑪迫先生のグループが20種類ぐらいまだ更にあると発表されていましたが、雄を産ませる作用がある物質がたくさん見つかってきます。

幼若ホルモン類似物質による産仔数の低下と雄の産生



これは雄を産むだけではなくて、生殖は落ちます。だから産卵数がすごく落ちるのですが、落ちて産まれてくるものはみんな雄になるということです。ですから、ちょっと覚えておいていただきたいのは、こういう物質を特定の濃度使うと、雄になる卵を100%採れるということです。

TG211 生殖試験への性比を見るエンドポイントの追加

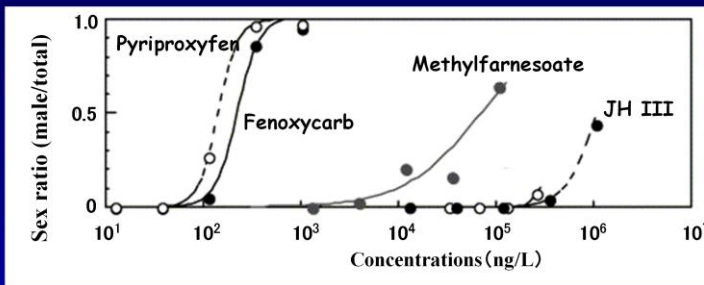


エンドポイントが国際的に妥当であるかを検証するために、オス産生の誘導のメカニズムを遺伝子レベルで明らかにする研究を開始

Watanabe et al., Genome, 2005. Watanabe and Iguchi, Ecotoxicology, 2006.

(説明を省略)

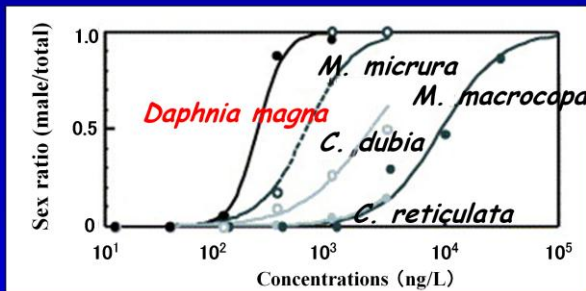
幼若ホルモンおよびその類似物質によるオス誘導



Fenoxycarb induces male offspring production at ppb levels

Tatarazako et al. *Chemosphere* 53: 827-833, 2003.

Sex ratio change induced by juvenile hormone agonists

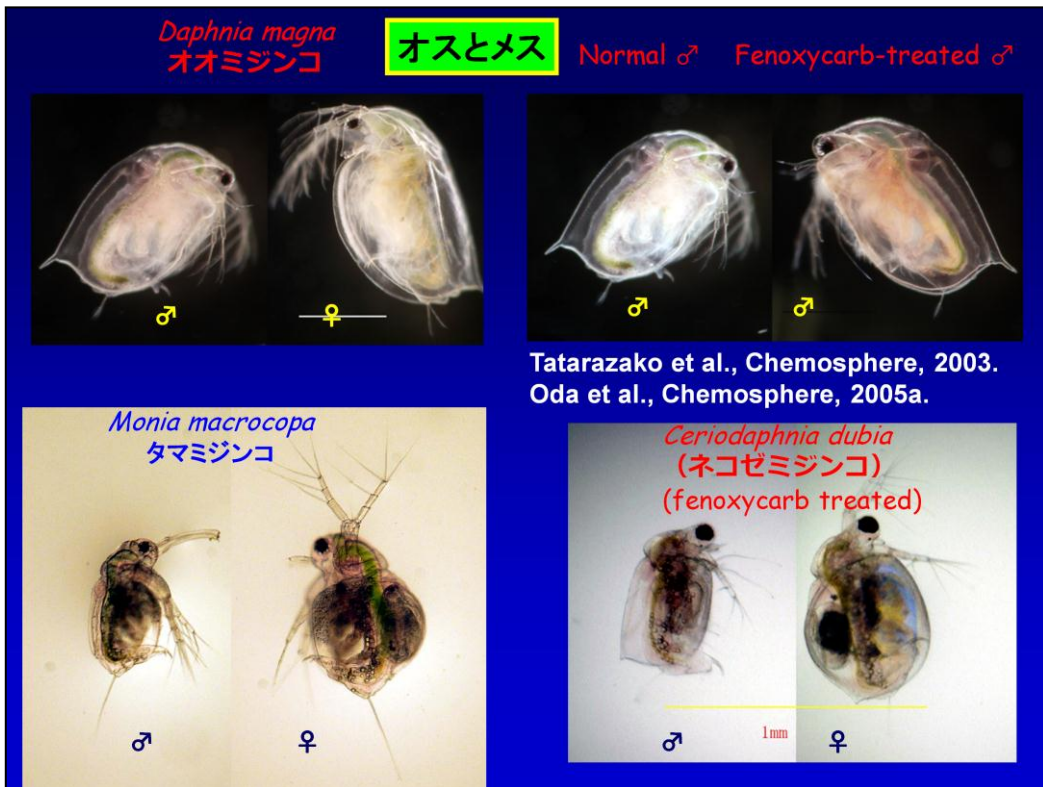


JH agonists induces male offspring production in various daphnids

Oda et al. *Chemosphere* 60: 74-78, 2005.

Sex ratio change in various daphnids induced by fenoxycarb

他のミジンコはどうか。これはオオミジンコなんですが、ほかにも学名で書いてありますが、日本のミジンコでもこういった物質は雄を産ませます。



ここにタマミジンコとネコゼミジンがありますが、幼若ホルモン様物質を入れてやると雄が産まれてきますので、大体一般化されたことである。

世界の研究室から送付されたオオミジンコの 急性毒性試験結果

Strain	3,4 DCA 48 h EC ₅₀ (µg/L)	Fenoxycarb 48 h EC ₅₀ (µg/L)
EPA	454	214
Bayer	636	520
Denmark	312	480
EAUK	556	652
AstraZeneca	423	485
Finland	632	861
NIES	307	264

50

ということで、今度はオオミジンコを飼って試験法をやっている世界中の研究所から国立環境研にオオミジンコを送ってもらって、それぞれのところが持っているオオミジンコで雄を産ませることができるかということ調べました。

ここで言いたいのは、アメリカのEPA、環境保護庁のミジンコを20年ぐらい前に持って来ているわけです。だから、姉妹なんです。これを見ていただくと、EC50は、20年以上別れていても同じような反応を示すという、ちょっと驚異的な話です。