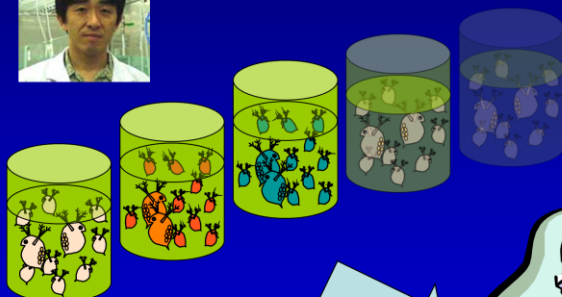
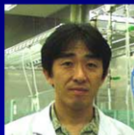
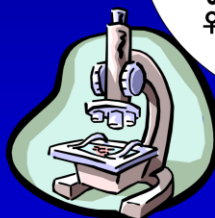


## Pre-validation Tests for TG211 Annex 7

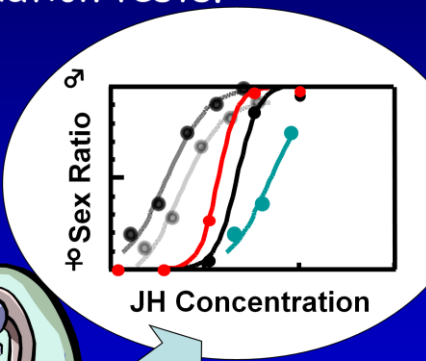
- Strains used in validation tests were evaluated in the sensitivity to JH analogs in our laboratory prior to the validation tests.



Different Strains



NIES



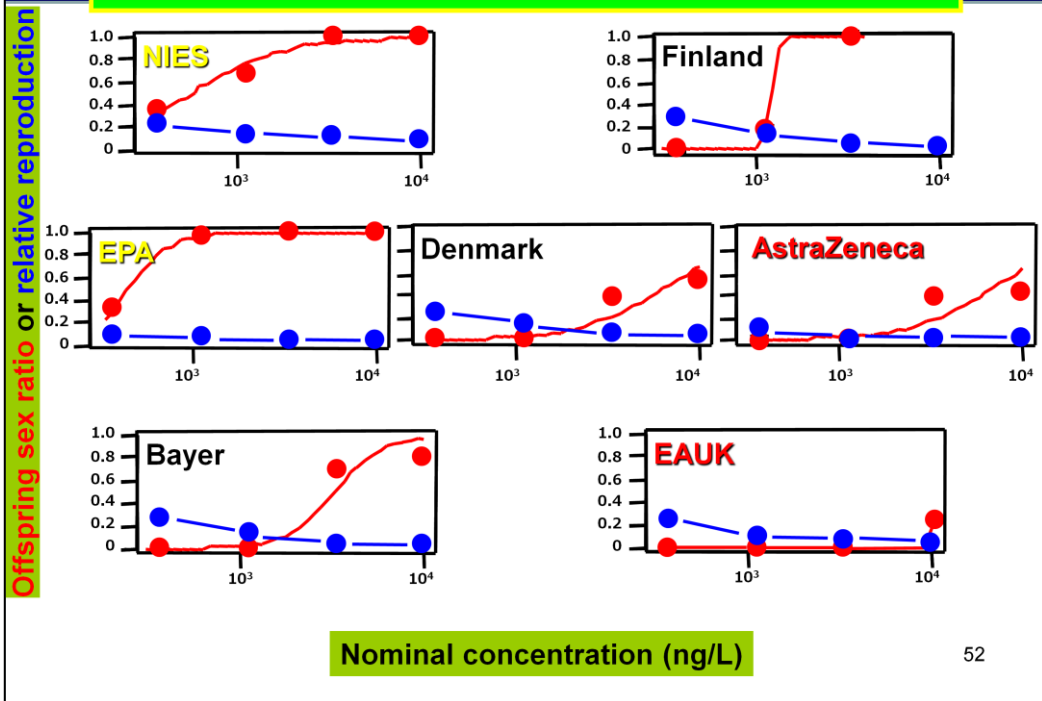
Oda et al., Chemosphere, 2006.

Oda et al., Ecotoxicol. Environ. Safety, 2007.

51

こういったふうに世界から集めたミジンコを使って幼若ホルモン様物質を入れてやると、赤いのがそうなのですが、1というのは、100%雄だけになる。そうすると、NIESというのは環境研のもの、EPAはEPAのものというふうに、イギリスのアストラゼネカとか、濃度がちょっと高くなると雄を産んできます。反応性はだいぶ違います。

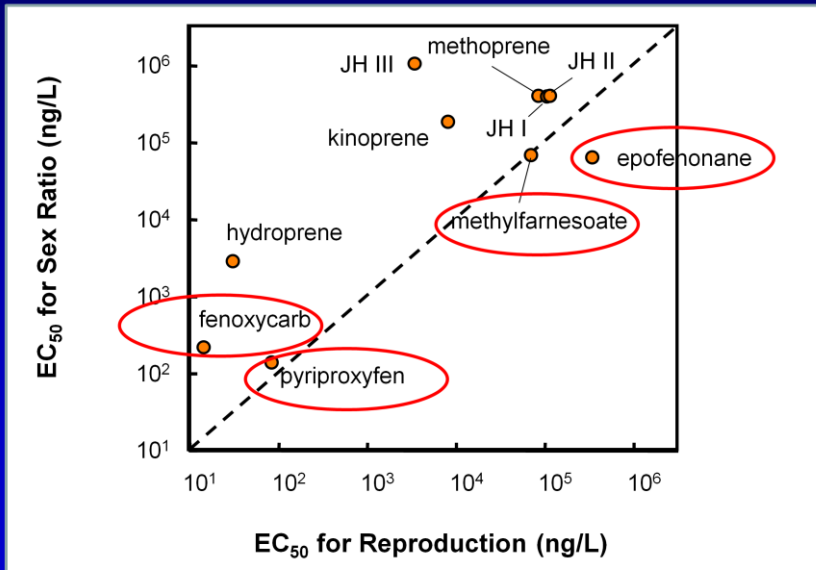
## Fenoxycarb (産仔数と性比)



52

ということは、世界で使っているオオミジンコは同じオオミジンコと言っても、化学物質に対する応答性は相当違います。実際の毒性試験をみても、10倍なんていい方で、それぐらい違いがある。

## 性比と生殖影響のEC<sub>50</sub>値の比較



53

(説明を省略)

**Hormonal induction of undescribed males resolves cryptic species of cladocerans**

Keonho Kim<sup>1</sup>, Alexey A. Kotov<sup>2</sup> and Derek J. Taylor<sup>1,\*</sup>

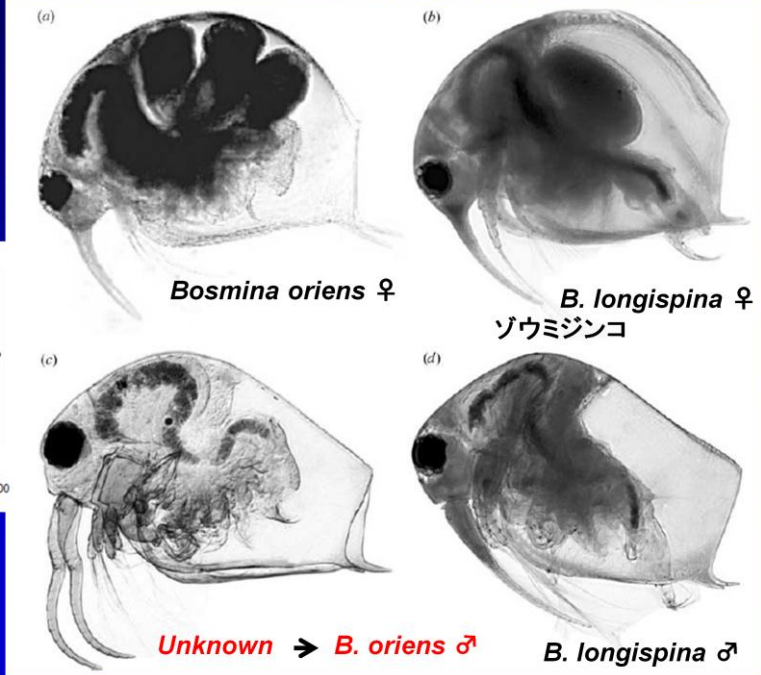
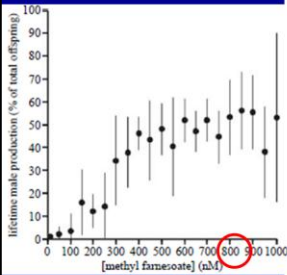
Proc. R. Soc. B., 273: 141-147, 2006.

**Water-flea males from the netherworld**

Alessandro Minelli and Giuseppe Fusco

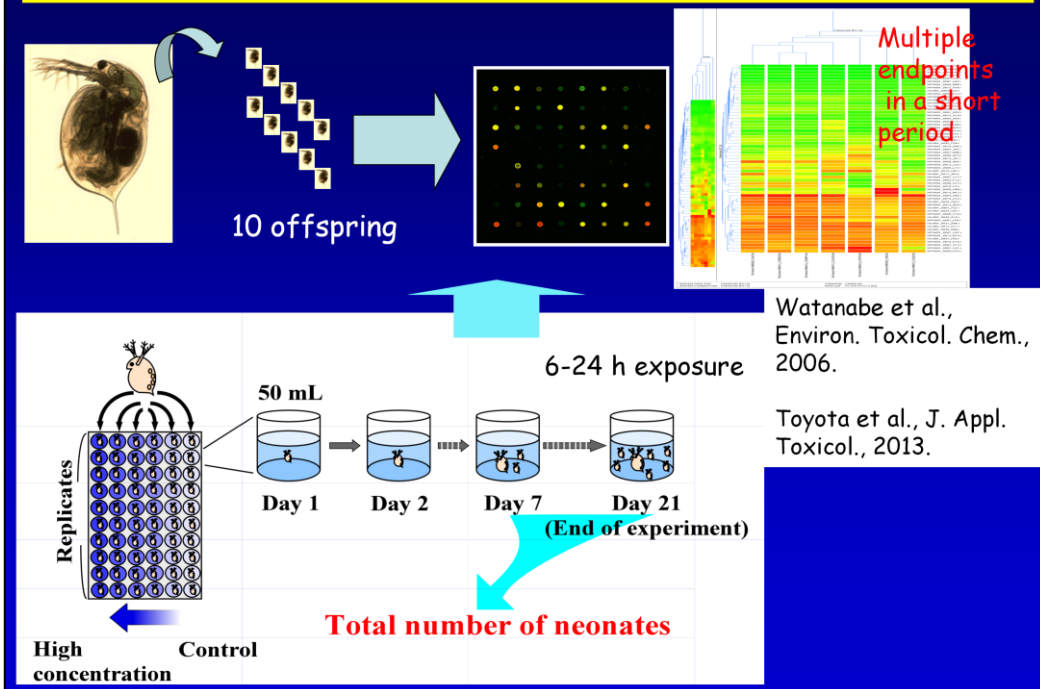
Trends in Ecology and Evolution 21:474-476, 2006.

幼若ホルモン(MF)  
による  
オス誘導の応用例



こういったことをやって何の役に立つのか。学術的には左下のミジンコが一体何かわからなかったのです。我々がやっていた方法を使って、この研究者は、左上の*Bosmina oriens*に幼若ホルモン様物質を入れて産んだ卵が雄になったときに、下のが出てきたのです。今までわからなかった種が、実は左上の種の雄だったということがつい最近明らかになりました。で、ちょっと役に立っているということが言えます。

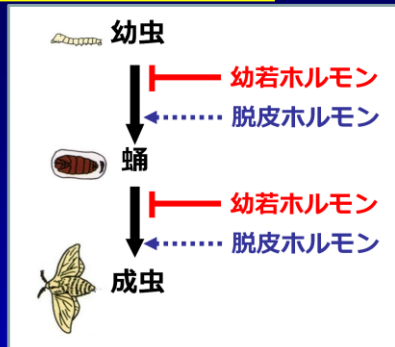
## Comparison between DNA Microarray and Standard Protocol



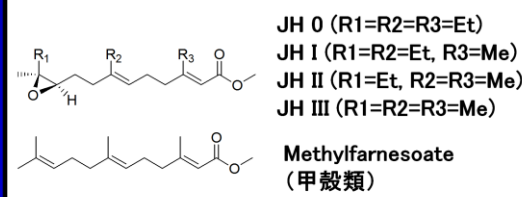
マイクロアレイを開発して、今では産まれたばかりの子どもが10匹いれば、遺伝子発現はみられるようになりました。

## 幼若ホルモン…(昆虫における役割)

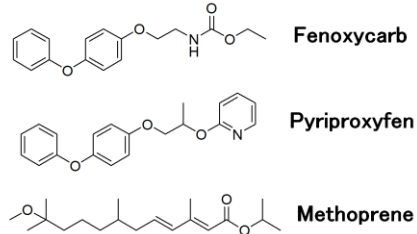
- ・脱皮ホルモンによって引き起こされる脱皮、変態を抑制する働きがある
- ・殺虫剤として幼若ホルモン類似物質が使用されている  
⇒ ミジンコを含めた様々な標的外の生物に悪影響を及ぼす



### 幼若ホルモン



### 幼若ホルモン類似物質



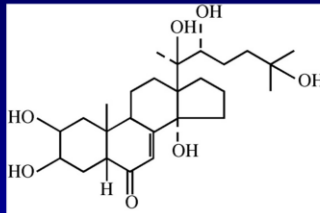
幼若ホルモンと脱皮ホルモンがあって、昆虫とほとんど同じなので、幼若ホルモンはあまり先に分化しないように、大きく大きくする方に働きます。



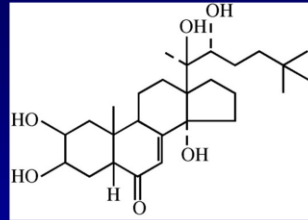
## 脱皮ホルモン Ecdysteroids

### Major hormone

- development
- molting
- metamorphosis
- Reproduction



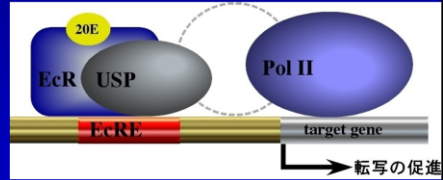
20-hydroxyecdysone (20E)



Ponasterone A (PoA)

### Act through EcR

- Nuclear receptor superfamily
  - Heterodimer with ultraspiracle (USP)
- ← essential for ligand-dependent gene activation



脱皮ホルモン受容体、USPのクローニング  
レポーターアッセイ系の確立

Kato et al., J. Endocrinol., 2007.

脱皮ホルモンは、大きくなったところでぽんと出て、サナギになったりという働きがある。脱皮ホルモンの受容体をクローニングしてレポーターアッセイができたとか。

## 4. オオミジンコの環境依存性 性決定のメカニズム



Photographed by Norihisa Tatarazako

ここからが今日の本論なんですが、オオミジンコの環境依存性 性決定のメカニズム。



## 実験動物としてのオオミジンコの特徴



OECD TG211  
21 日間生殖試験 (産仔数)  
急性毒性試験

水質の調査  
、化学物質の毒性

1. 飼育が簡単
2. 繁殖力が強い(生後5日で成熟、その後3日ごとに産仔)
3. 単為生殖(遺伝的にクローンの個体を得られる)
4. 透明なので外から体内の様子が観察できる
5. シャーレの中で卵を発生させることができるので、顕微鏡下で発生を観察が可能
6. 遺伝子断片およびゲノムデータベースの利用が可能
7. RNAi (RNA干渉法)を開発したので、遺伝子操作が可能

オオミジンコは透明ですので、体の中で何個卵があるかというのわかりますし、飼育が簡単だったり、卵をあそこで産んだばかりのやつを取り出してシャーレに入れておいても発生します。私たちが追加したのは6と7で、遺伝子断片を読んで、いくらか遺伝子セットを作った。それからRNA干渉法を作ったという話をします。

## ミジンコを用いて解析を行う上での問題点

研究開始当時から ー

- 1) 遺伝子情報が大きく欠如している
- 2) 遺伝子導入法が開発されていない
- 3) 内分泌系が脊椎動物とは大きく異なる



私たちが研究を始めた頃は、オオミジンコの遺伝子は3つぐらいしか報告されていませんでした。

## 遺伝子情報の欠如

NCBIに登録されている転写、翻訳制御に関わるミジンコ類の遺伝子の全て  
(検索に用いたデータベース: Entrez Nucleotide - mRNA)

登録された年	遺伝子数	遺伝子名
2007	4	<b>Ecdysone receptor</b> , <b>Ultraspiracle</b> , Fts-like protein, Hox-like protein (Kato et al., J. Endocrinol., 193: 187-194, 2007.)
2006	5	Ubx protein, Antp protein, Pax-6, Arnt1, Arnt2
2005	1	Vasa

- ・当研究室では、オオミジンコ(*Daphnia magna*)から約5万の EST の解析を終了している。
- ・アメリカでミジンコ (*Daphnia pulex*) のゲノムの配列決定が終了している。

EST 及びゲノムデータベースを利用して、まず、ミジンコの性分化に関与する遺伝子群について整理する必要がある。

2007年、エクダイソンレセプターとか、Ultraspiracle、あれは私たちがクローニングしたものです。そのときにはFts-like protein、こんなものが1つあった。これをどんどん研究していったわけです。

一番最初、Vasaという生殖細胞に発現するのが2005年に報告されていて、これが今どんどん増えていっています。

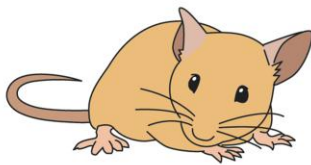
## 遺伝子機能解析法がない

- ・モデル生物のオーソログを単離 ⇒ 配列、遺伝子発現を比較  
進化の過程での遺伝子重複、発現パターンの変化、アミノ酸配列の変化についての情報を得ることができる

ミジンコ体内における機能を明らかにするためには

遺伝子機能抑制実験(RNA 干渉法)、遺伝子機能欠失、  
獲得実験(トランスジェニック個体作製法)を開発する必要がある。

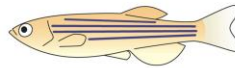
### モデル生物



マウス



アフリカツメガエル



ゼブラフィッシュ



線虫



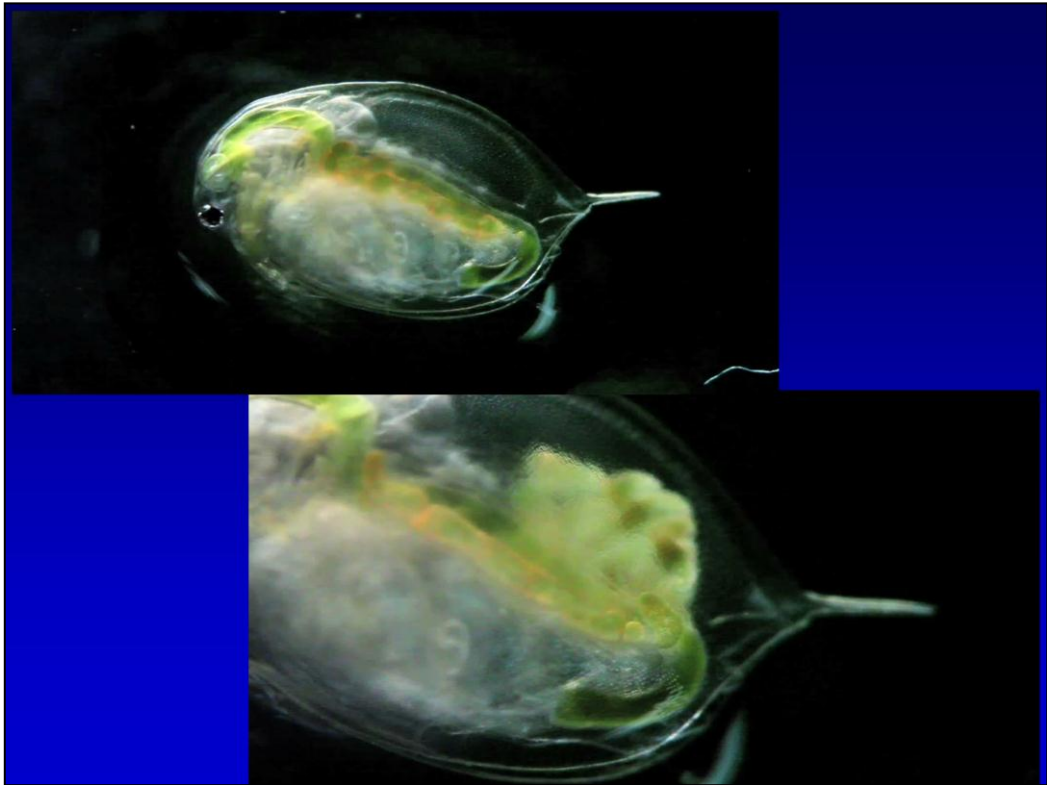
ショウジョウバエ

(説明を省略)

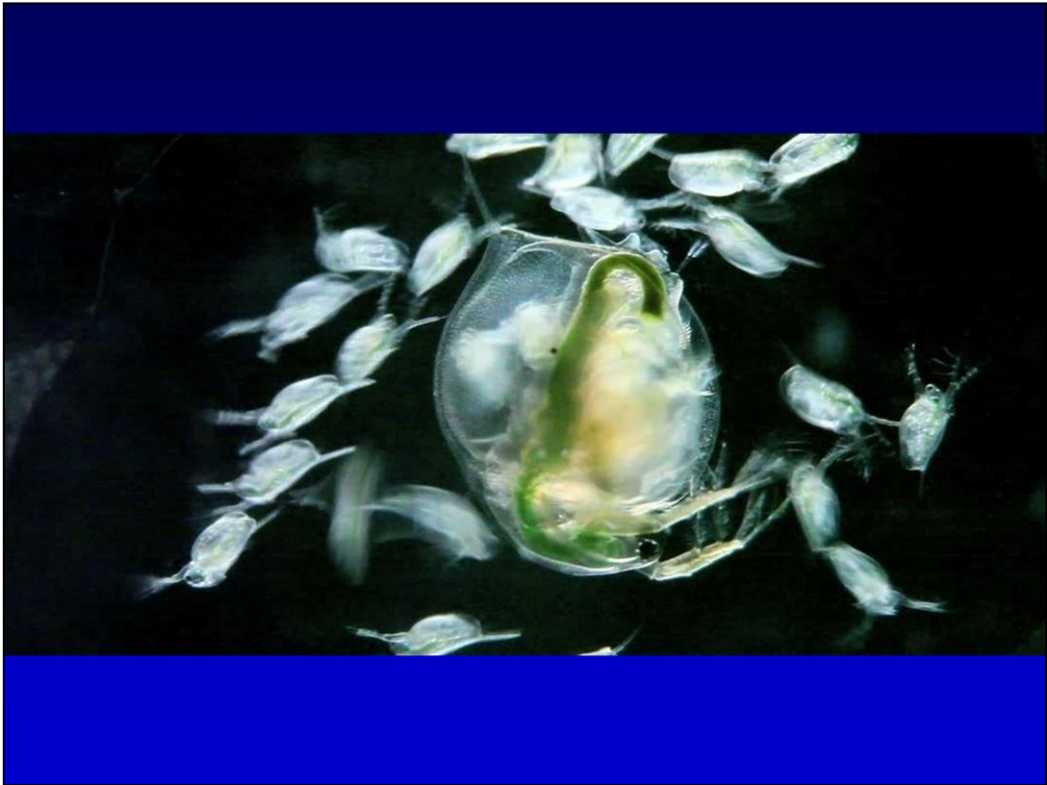
## OECDで開発中の無脊椎動物試験の比較

	ミジンコ類 (オオミジンコ)	カイアシ類 (ケンミジンコ)	ユスリカ (セスジユスリカ)	マキガイ (コモチカワツボ)
<b>分類</b>	節足動物 (甲殻類) 	節足動物 (甲殻類) 	節足動物 (昆虫類) 	軟体動物 
<b>試験法</b>	TG211繁殖+性比	繁殖	繁殖	産卵数
<b>開発国</b>	日本	USA, Sweden	BIAC, Germany	UK, Germany
<b>生息場所</b>	淡水	海水 (底質)	底質 (幼虫、蛹) 陸上 (成虫)	淡水、汽水
<b>世代時間</b>	約 1 週間	約 2 週間	約 5 週間	1 年
<b>生殖</b>	単為生殖 有性生殖	有性生殖	有性生殖	単為生殖 有性生殖
<b>性決定</b>	環境性決定	環境性決定?	遺伝性決定?	?
<b>染色体</b>	2n = 20	2n = 24	2n = 8 ?	2n = 34, 52, 46
<b>EST</b>	50k	26k	×	×
<b>ゲノム</b>	解読中 (120M)	未読 (570M)	未読	未読
<b>microarray</b>	○	○	×	×
<b>RNAi</b>	○	×	×	×

OECDが使っている無脊椎動物は、左からミジンコ、ケンミジンコ、ユスリカ、マキガイとこれだけ並べましたが、ミジンコが勝っているよということをお願いだけなんです。ミジンコの場合には、左のピンクっぽいところにありますように、ESTというのは、遺伝子情報を全部ではないですがだいぶ読んでいます。それからマイクロアレイができています。RNA干渉法ができているということが、他のところではそろっていないので、今ミジンコが一番先端になります。



実はここで動画が動けば、どうやって卵を産んでいるかとか、中で育ったやつがどうやって出てくるかというのが見られるのですが。

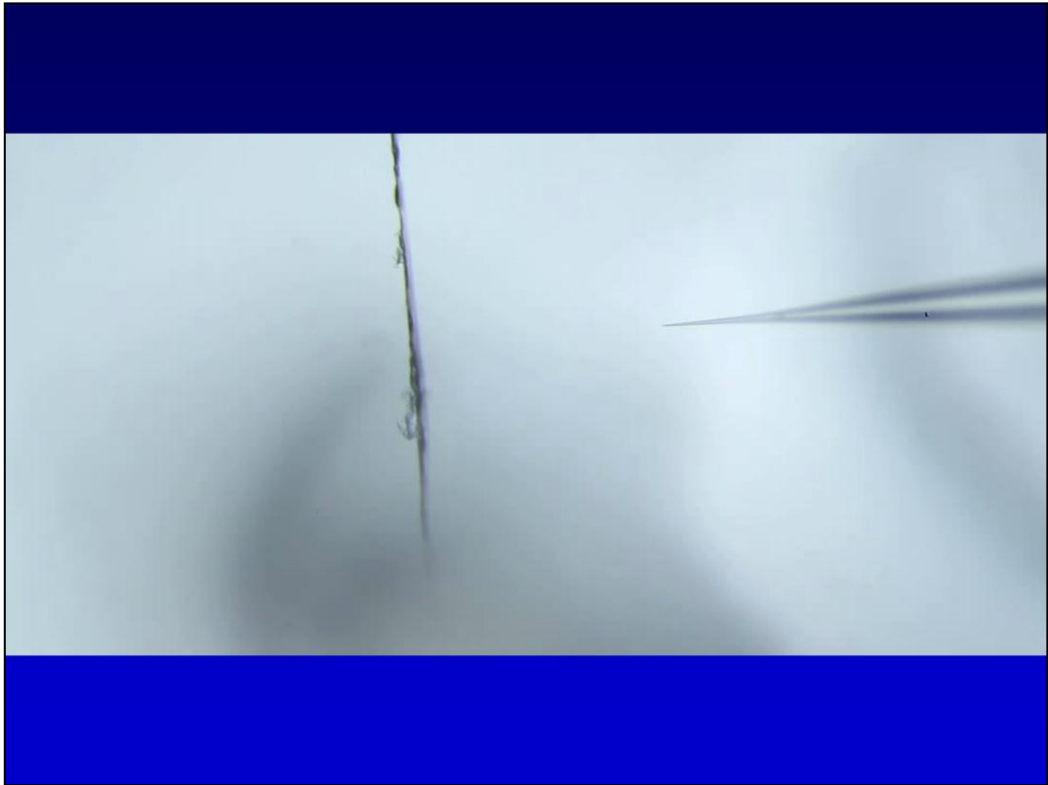


(説明を省略)



(説明を省略)





(説明を省略)

**オオミジンコのRNAi 干渉法**

**Microinjection of Morpholino Oligo into Ovum**

**Expression of Distal-less (Dll) gene**  
Shiga et al., *Development*, 129: 3555-3561, 2002.

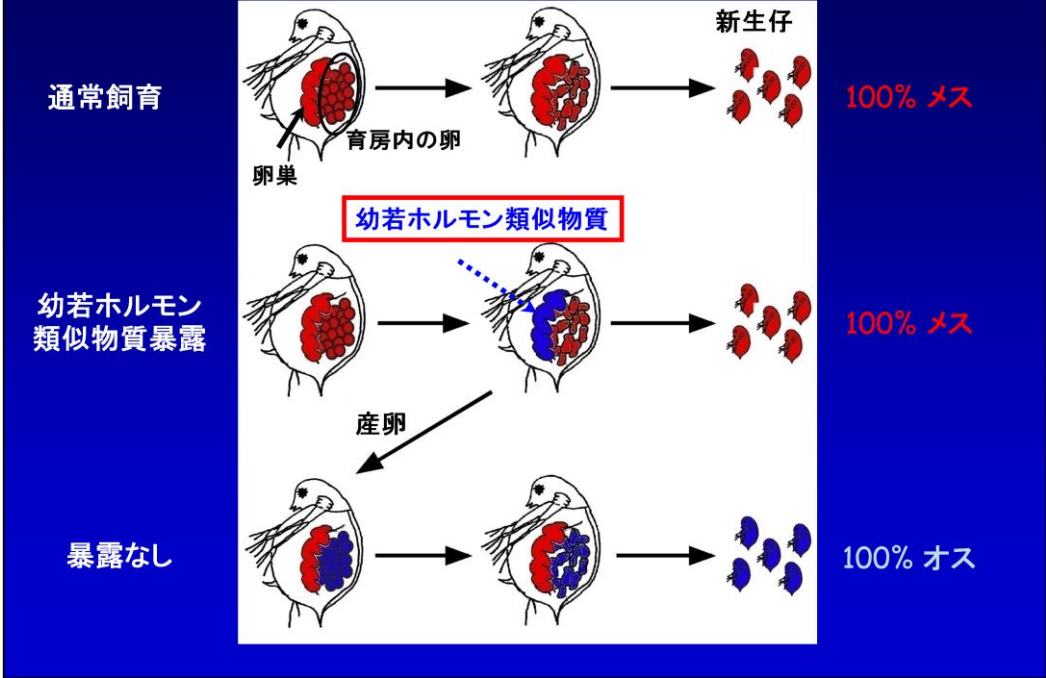
**MalE RNAi**  
*Devel. Genes Evol.*, 220: 337-345, 2011.

**Dll RNAi**

オオミジンコのRNA干渉法というのは、mRNAのダブルストランド、二重鎖のRNAを作って卵の中に打ち込みます。いろんなことをしましたが、産まれたばかりの卵に注射して入れるのが一番いいということがわかりました。

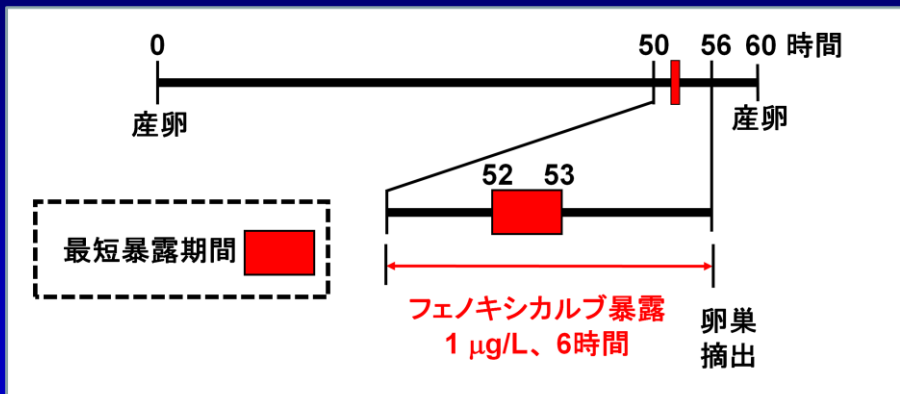
左の方で、DllというのはDistal-lessという遺伝子で、足の先とか触覚の先端の辺が黒く染まっていますが、ここに発現するのです。この遺伝子が発現しないようにしてやると、触覚の先端が切れてないですね。別にはさみを使って切っているわけではないのですが、遺伝子でその先端の遺伝子が働かなくしているので、こういうふうになります。私たちのやり方がうまくいっているだろうということ——

# 幼若ホルモン類似物質によるオス誘導



どんどん進めていきますが。

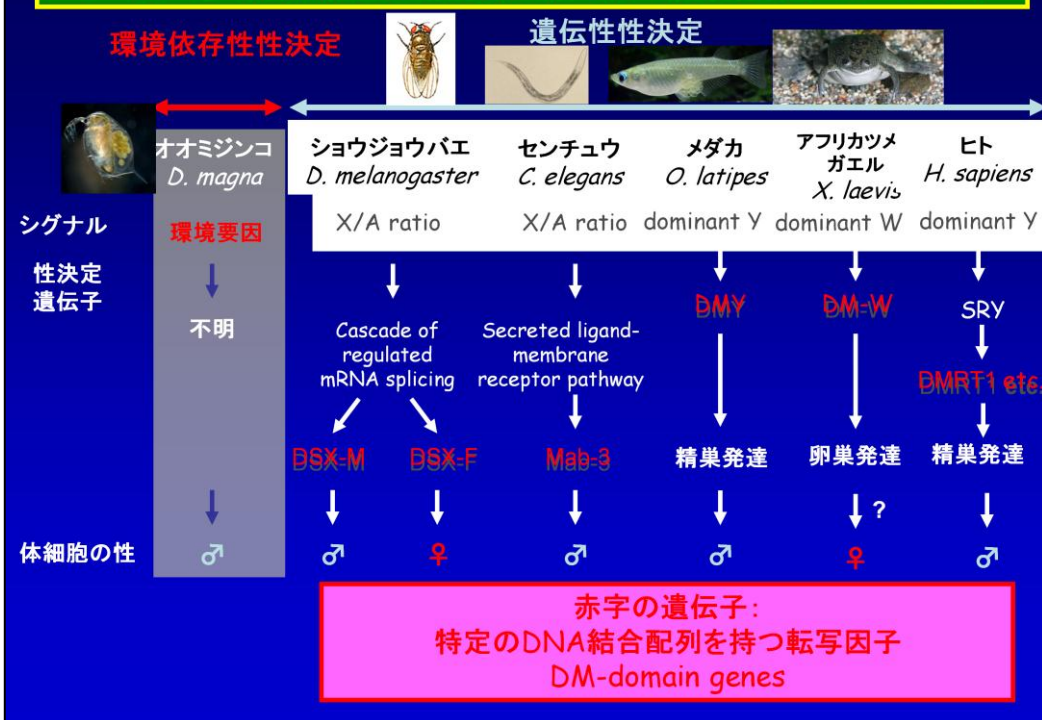
## 幼若ホルモン類似物質暴露によるオス誘導の臨界期



産卵前8—7時間のあいだの1時間が、  
幼若ホルモン類似物質によるオス誘導の臨界期

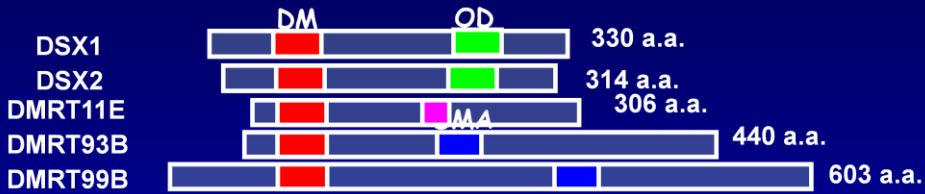
幼若ホルモン様物質はどこかに効くかというのと、産卵する前の卵巣にある卵に1時間作用すると、その卵は雄になるようになります。だから、ずっと時間を短く短くして行って、産卵の7～8時間前、このところに幼若ホルモンあるいは幼若ホルモン様物質があると、その卵は雄になるということがわかりました。

# いろいろな動物種で解明されている性決定メカニズム

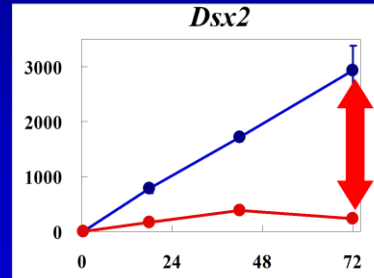
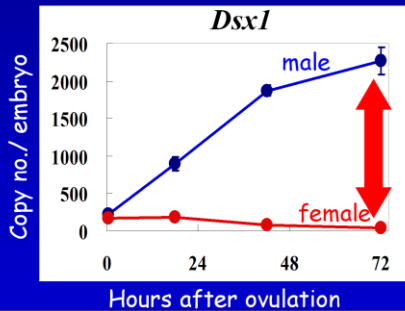


ここから先は、その遺伝子は何かというのをみるために、ヒト、カエル、メダカ、センチュウ、この辺は雄を作る遺伝子がわかっています。これを全部並べてみると、DM、DM、DM、Mab、DSX。この赤いやつは全部DMドメインという特定の配列を持った遺伝子が性決定に関与している。

## オオミジンコのDMファミリー遺伝子



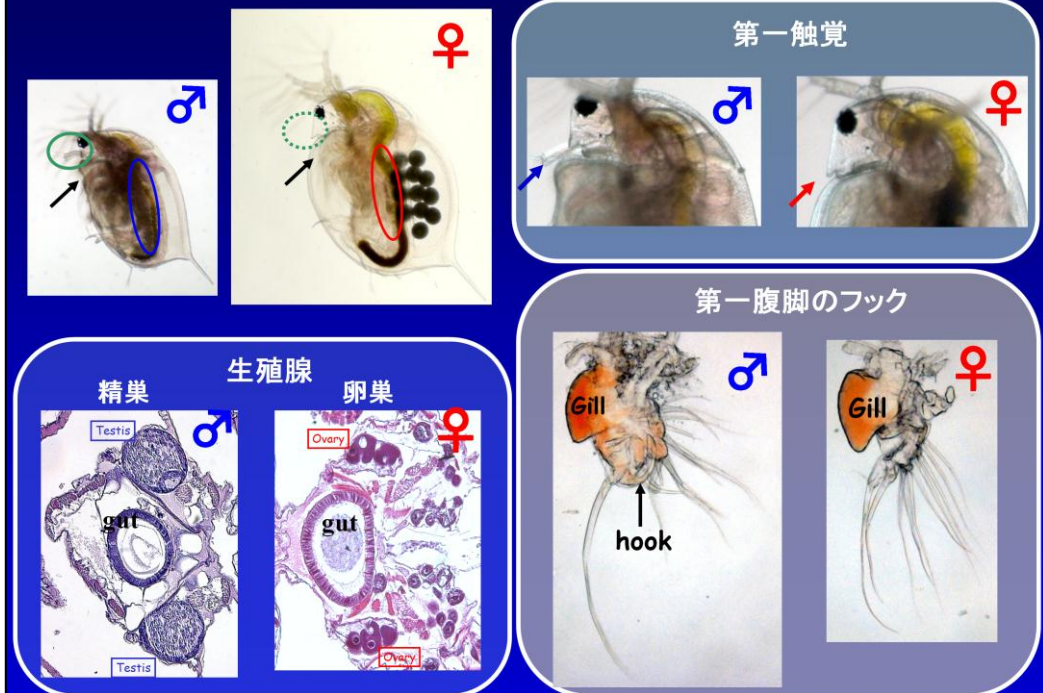
Containing Insect DM Domain Orthologs



発現に性差があるので  
DSX1 および DSX2 のみが性決定および性分化に関与していると考えられる

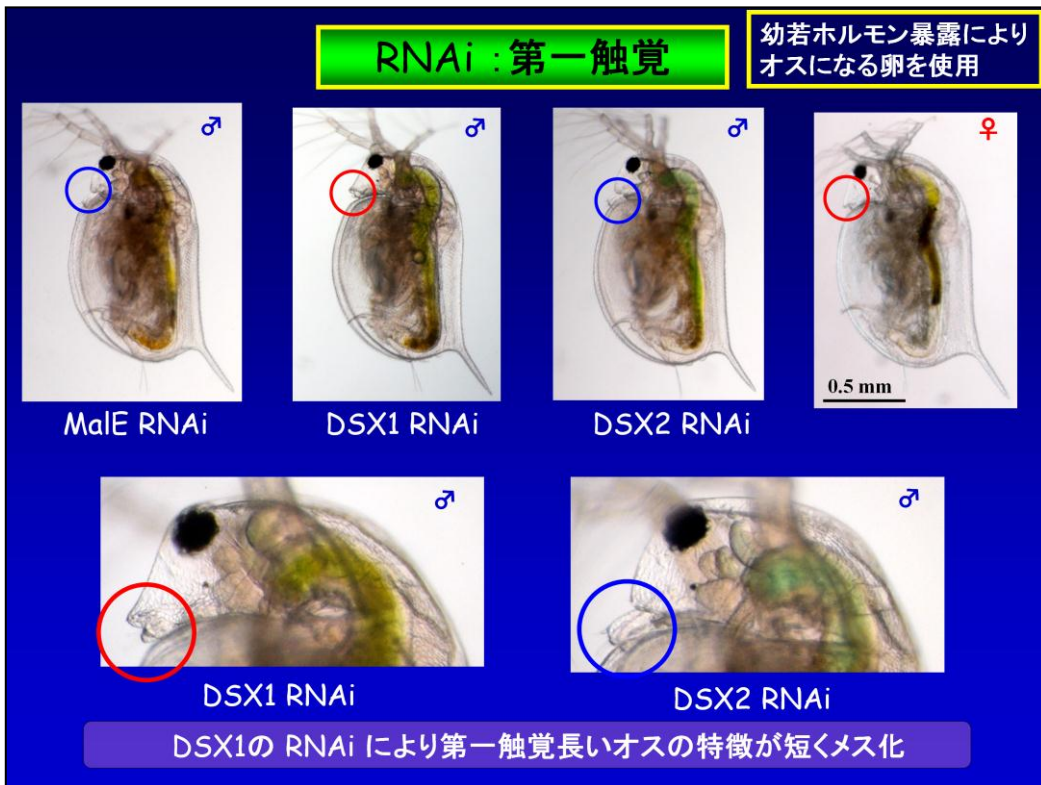
一番楽な方法は、私たちが持っていた遺伝子のセットから、DMドメインという特定の配列を持った遺伝子を探すと、5つある。これの発現をみると、この2つだけが雄で発現していて雌は非常に発現が低い。この2つがわかりましたので、さっきのRNA干渉法を使ってこの遺伝子の発現を止めるということをしました。

## オオミジンコの雌雄での形態の特徴(性差)



雄は触覚が長く、雌は第一触覚が短い。雄の特徴は、顔つきでわかります。そのほかにも、雌を抱えるフックがあるのが雄で、雌はない。切片を切れば、卵巣を持っているか、精巣を持っているかで雄雌がわかります。

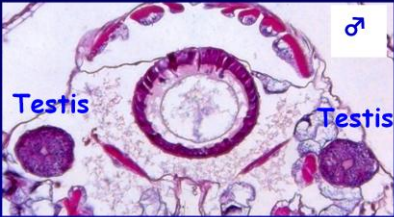




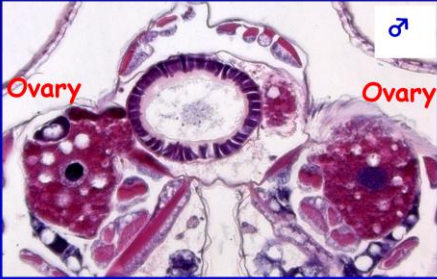
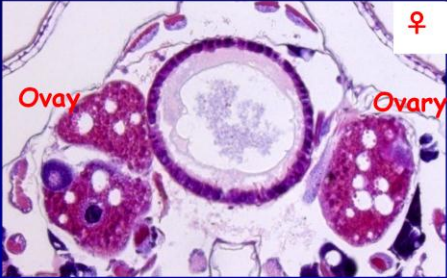
幼若ホルモン物質を与えて産ませて必ず雄になる卵を使っています。それにRNA干渉法をやっています。ここを見ていただくと、ダブルセックスの1 (DSX1) と名前を付けたこの発現を止めてしまうと、この触覚は伸びない。DSX2の方はこっちを止めても伸びています。ということは、DSX1という遺伝子が雄を作るのに重要だと。



RNAi : 生殖腺



Male RNAi



DSX1 RNAi



DSX2 RNAi

DSX1の RNAi により精巣になるべき生殖腺が卵巣に発達

同じようにDSX1を発現させないと卵巣ができる。DSX2は発現しなくても精巣はそのままできるということがわかりました。