

メダカの生殖内分泌系に及ぼす化学物質の内分泌かく乱作用の  
作用メカニズムに関する研究

長濱嘉孝

自然科学研究機構・基礎生物学研究所・特任教授

生殖生物学研究部門



# 脊椎動物における性決定と生殖腺の性分化

哺乳類 (XX / XY)

鳥類・爬虫類・  
両生類

雄XY



雌XX

1990年  
性(精巣)  
決定遺伝子

SRY

性(精巣)  
決定遺伝子

メダカを用いることのメリット

性決定/分化の基本的メカニズムの理解が必要

DM-W

精巣

アンドロゲン  
(男性ホルモン)



卵巣

エストロゲン  
(女性ホルモン)

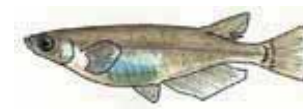


↓  
個体(脳)の性分化

爬虫類  
温度依存性決定



# メダカのもス、オスの決まり方

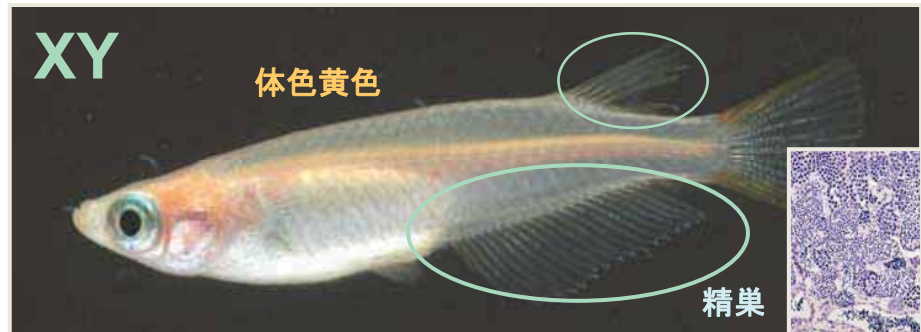


ヒトと同じように遺伝的に決まる。

**XX / XY**

**メス**

**オス**

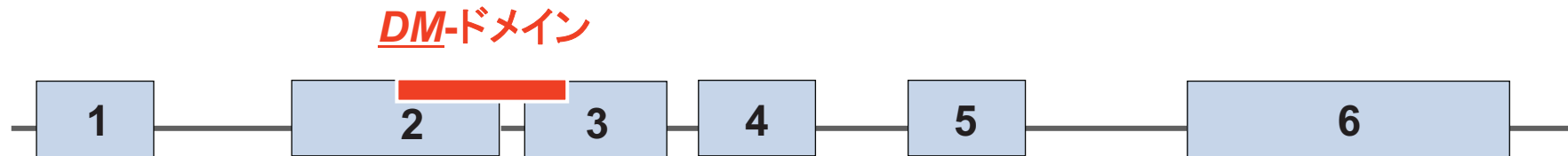


*Hd-rR* (南日本集団由来近交系)

# メダカの性決定遺伝子

- 脊椎動物で2番目の性決定遺伝子 (2002年) -

## メダカの性決定遺伝子の構造



cDNA全長: 1356塩基 アミノ酸数: 267 ゲノムサイズ: 5594

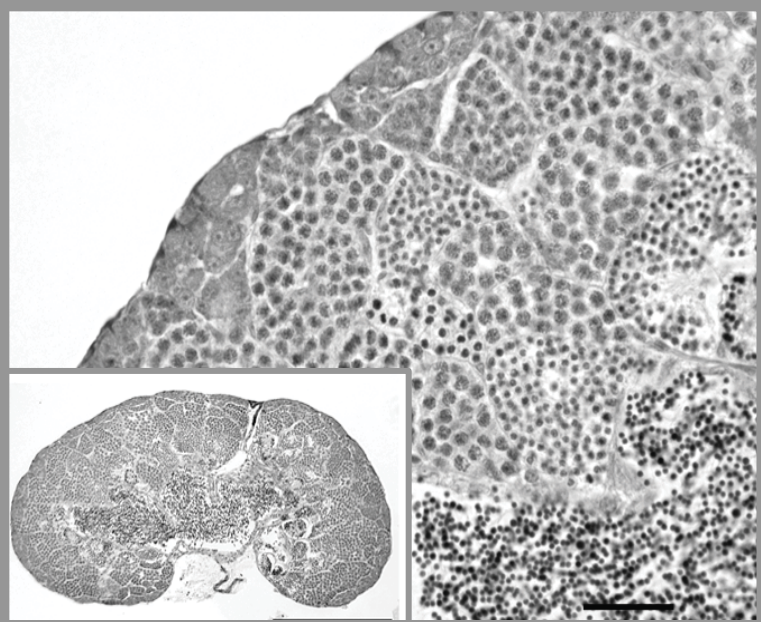
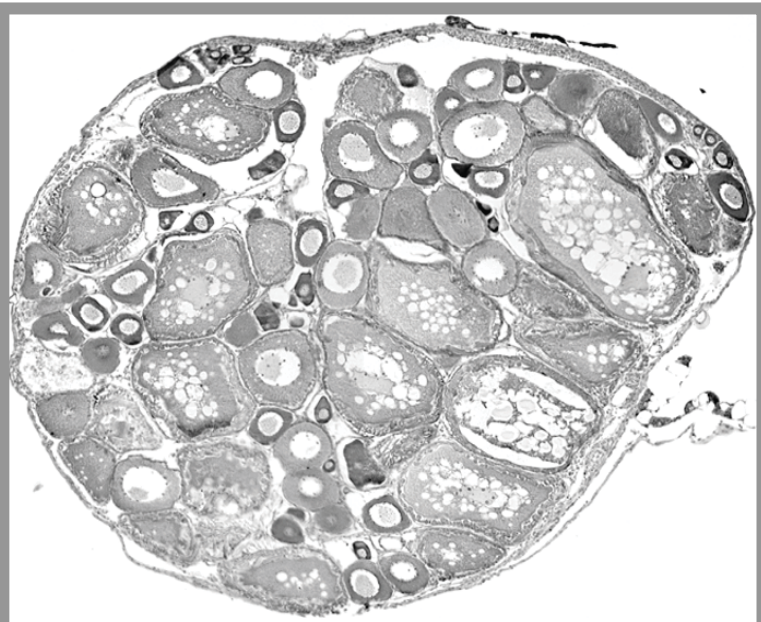
ヒトの性決定遺伝子 *SRY* とは遺伝子構造が全く異なる

### DM-ドメイン

ショウジョウバエの *doublesex* と線虫の *mab-3* に共通なDNA結合配列  
無脊椎動物と脊椎動物の性発達に関わる

***Dmy* (DM-domain gene on the Y chromosome)**

# 機能獲得実験 (Gain-of-function)



# Loss-of-function

- 機能欠失実験 -

## *RNAi*

「XY」でも — *Dmy*が なければ — 「メス」になる。



メス?



# XY - Dmy ノックダウン (RNAi)

D144 RNAi  
12/7.

遺伝的には雄 (XY) のメダカ



XYメダカ

(4ヶ月間飼育)



XY

性決定遺伝子

*Dmy*



?

*Sox9a2* *Dmrt1*

*Amh*



精巢

KT

精子形成



XX

*Rspo1*

*Foxl2*

*Cyp19a1*

*Ad4BP/SF1*

E2

→ 卵巣分化

エストロゲン受容体



卵巣

E2

卵形成



孵化後10日の

**XY**生殖腺 と **XX**生殖腺

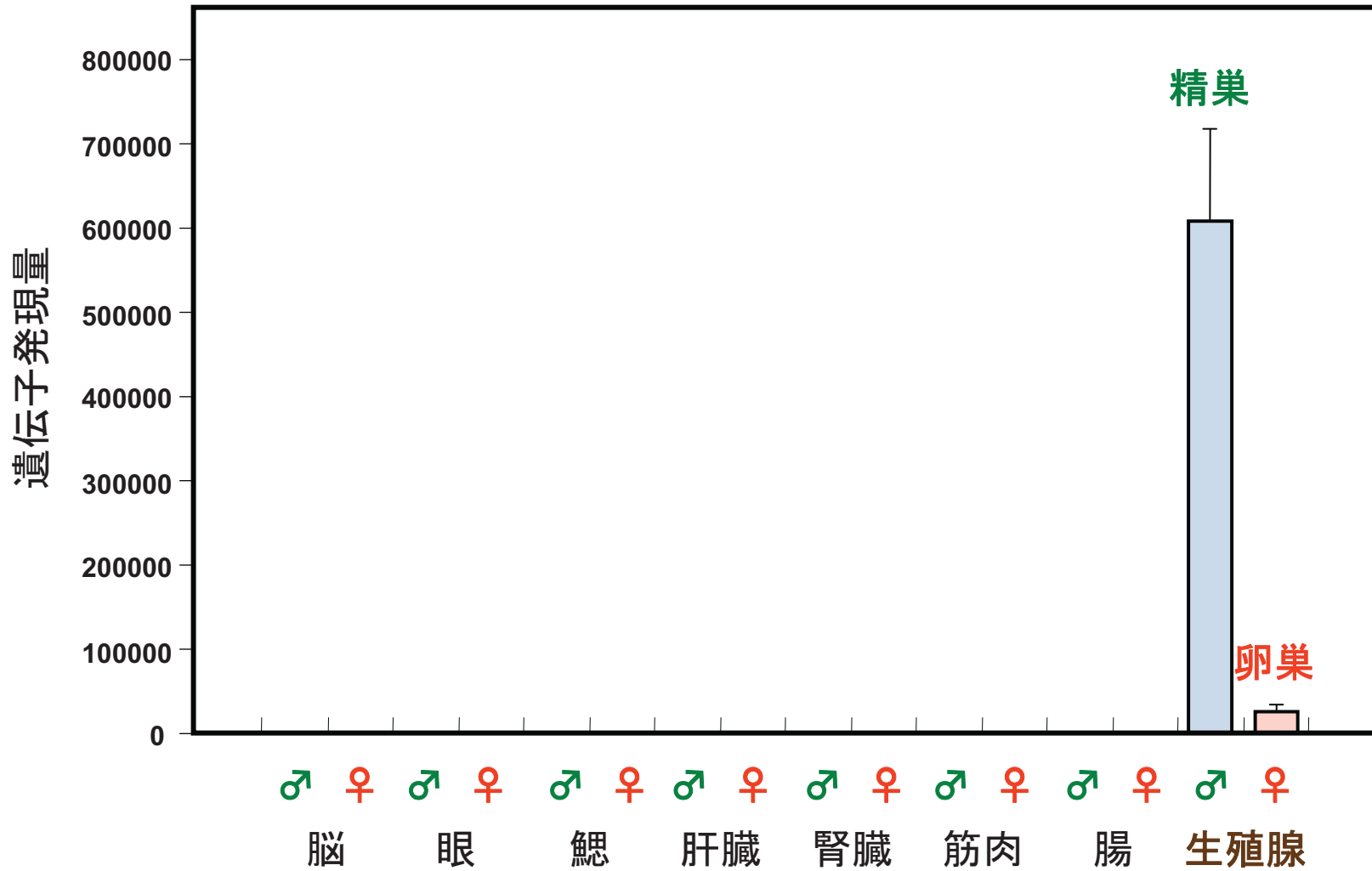
に特異的に発現する遺伝子のスクリーニング

精巣で強く発現する遺伝子

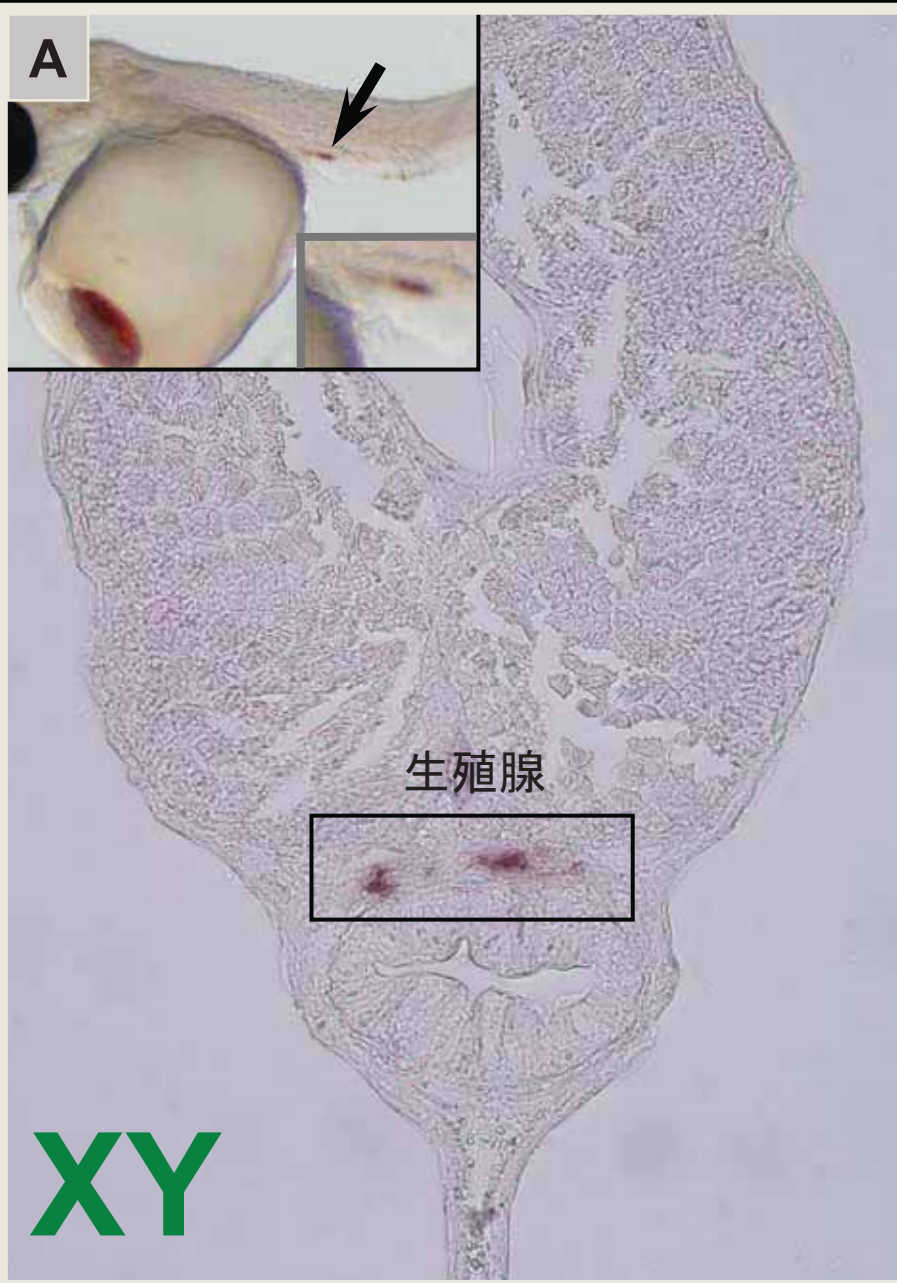
*Gonadal Soma Derived Factor*

*Gsdf*

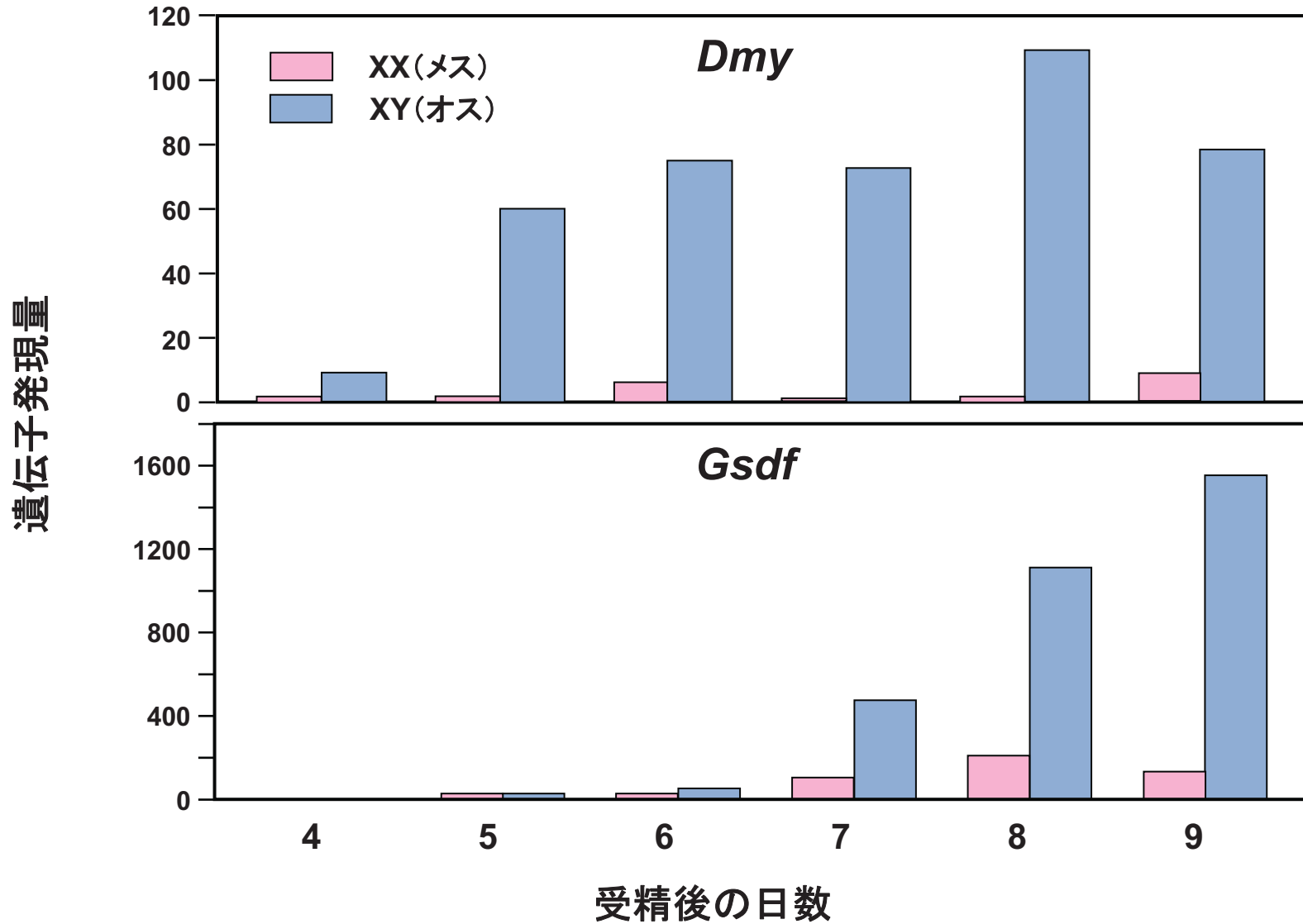
# メダカ成魚における *gsdf* 遺伝子発現の組織分布



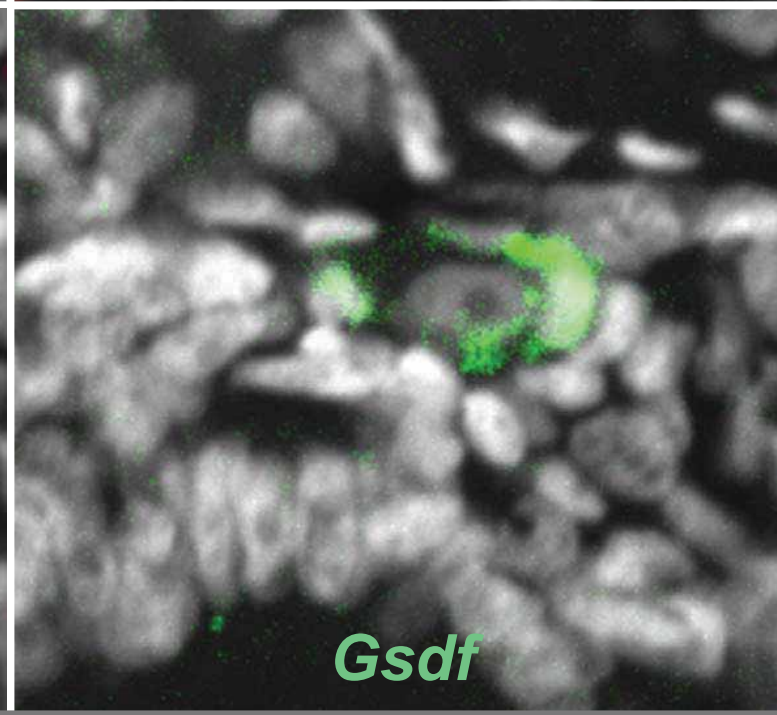
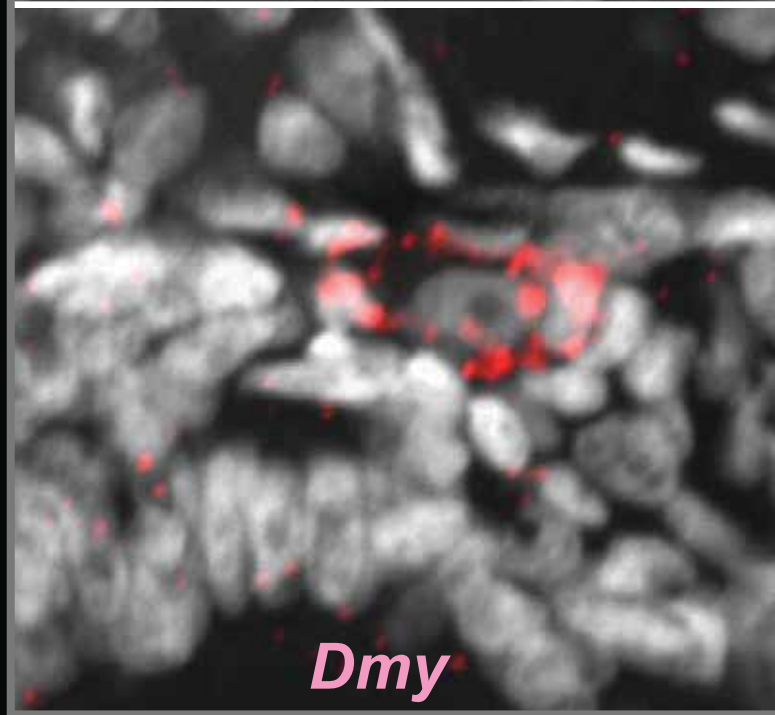
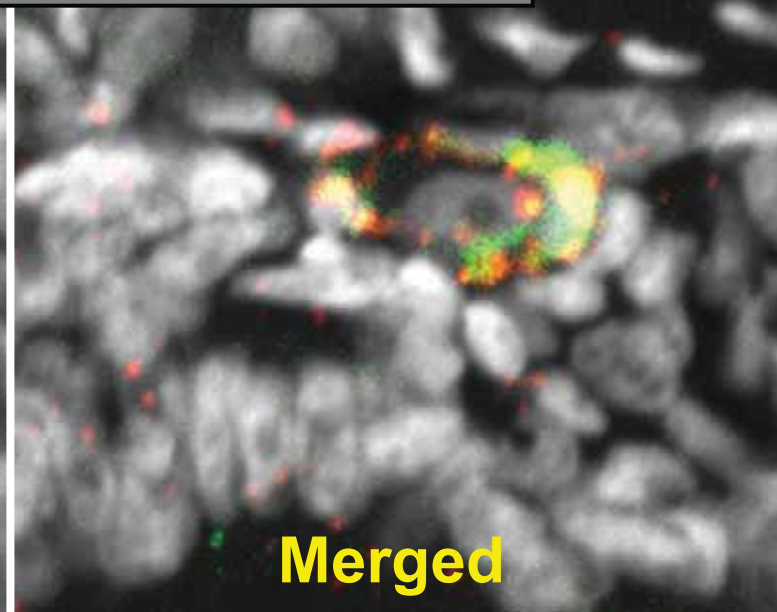
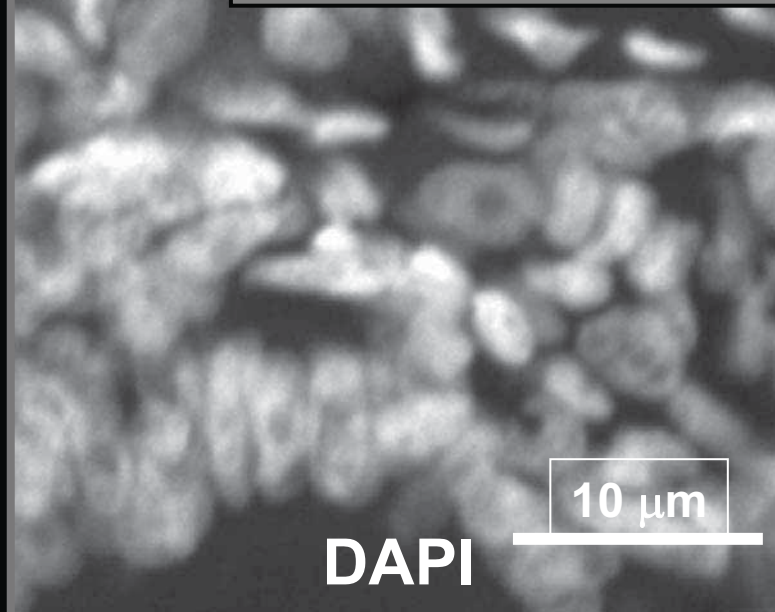
# 孵化直後における*gsdf* 遺伝子の発現



# 受精後のメダカ胚における *Dmy* と *Gsdf* の発現量の変動



セルトリ細胞における *Dmy* と *Gsdf* の共局在



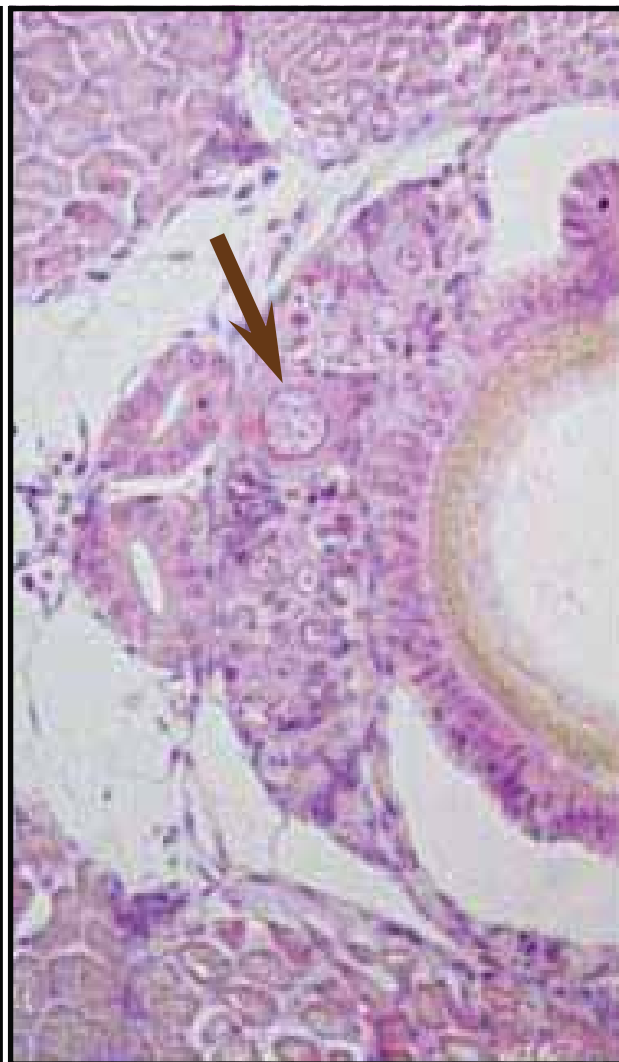
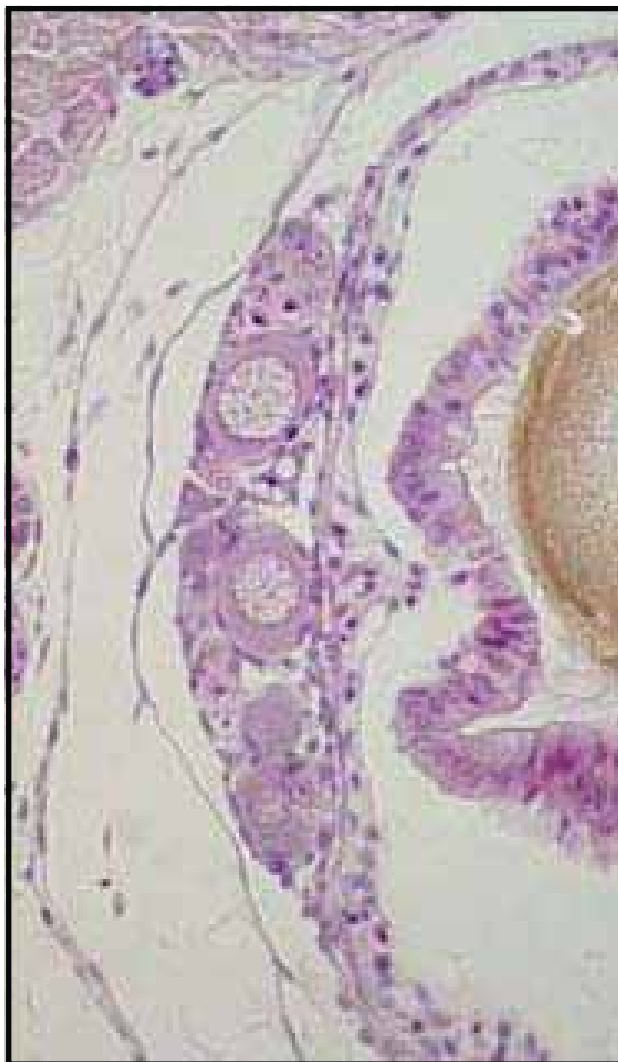
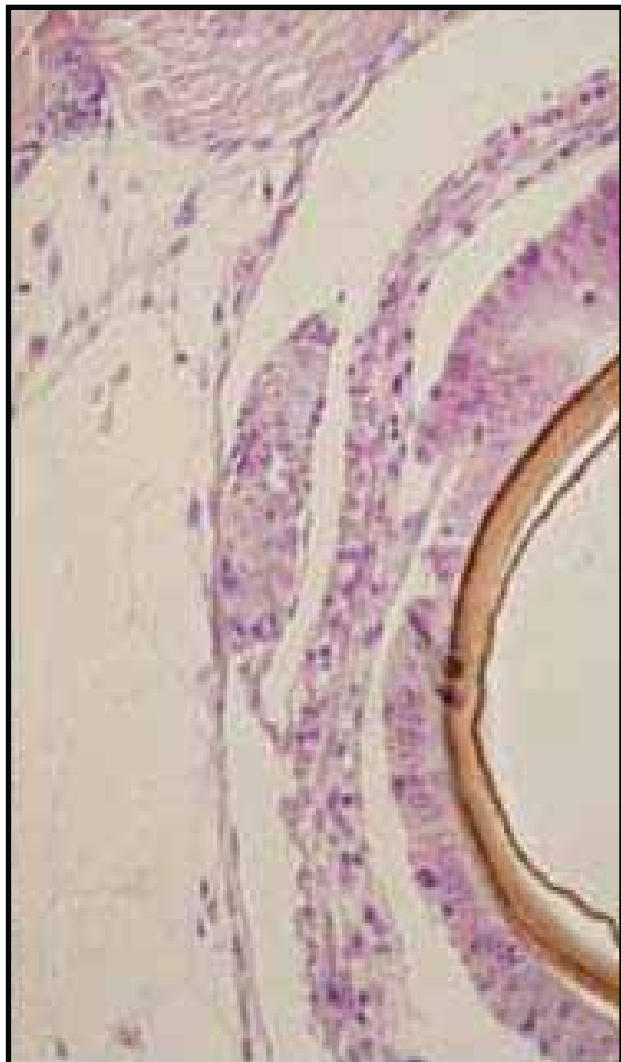
# 孵化後20日

XY

XX

XY

(GSDFノックダウン)



# GSDF

- 1) DMYの標的遺伝子か？
- 2) GSDFの機能は？



XY  
DMY

XX

性決定遺伝子

生殖腺の体細胞

GSDF

Rspon1  
Foxl2 Cyp19a1

性ホルモンや内分泌かく乱化学物質の作用点(ターゲット)は  
性分化期の生殖腺体細胞である

AMH

ERβ2

精巢

卵巢

KT

E2

精子形成

卵形成





XY

性決定遺伝子

DMY

Gsdf

Sox9a2 DMRT1

AMH

精巢

KT

精子形成



XX

Rspn1

Foxl2 Cyp19a1

Ad4BPISF-1

E2

卵巢分化

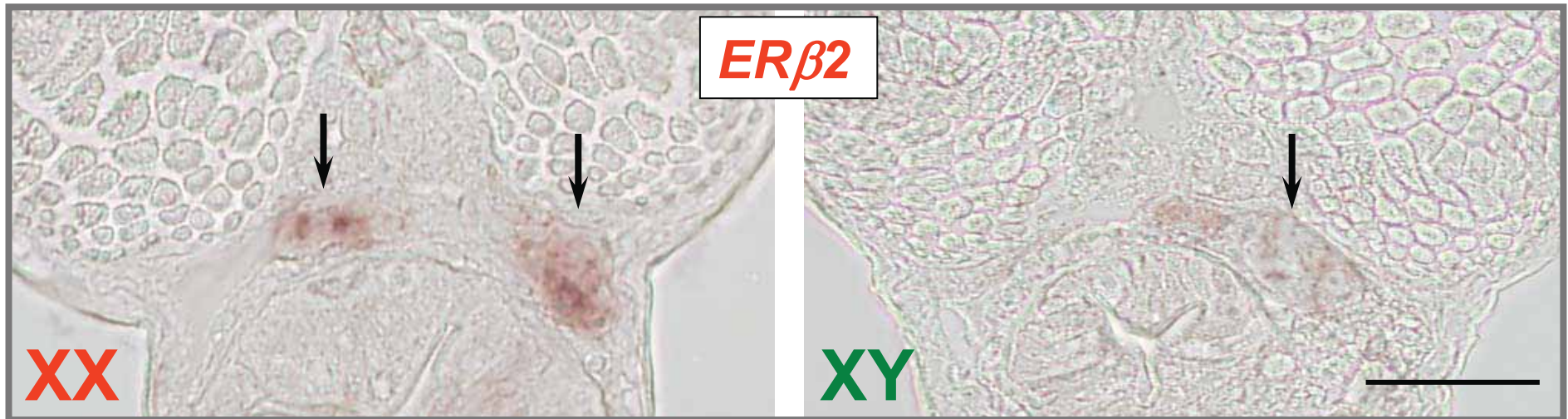
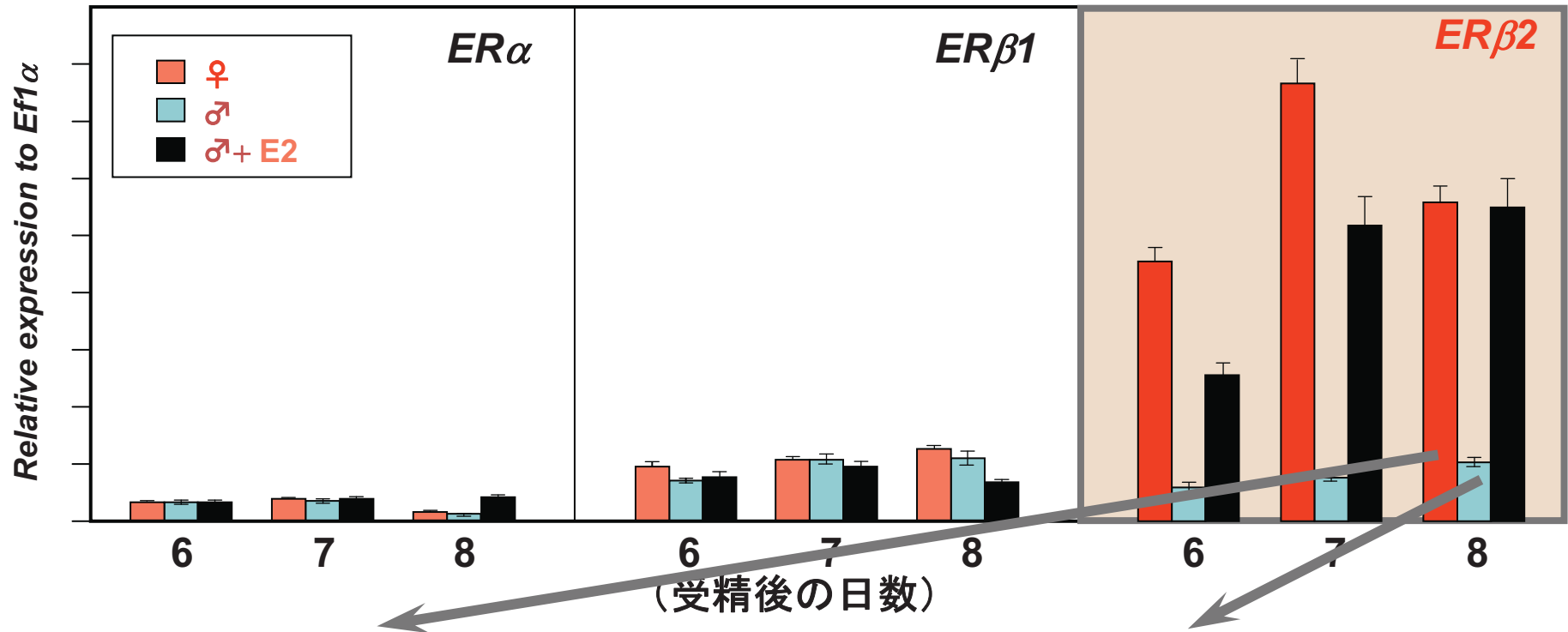
ERβ2

卵巢

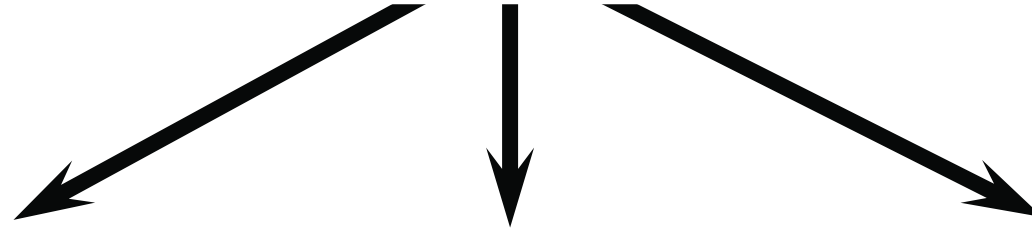
E2

卵形成

# 性分化期におけるエストロゲン受容体遺伝子の発現変動 (エストロゲン処理の影響)

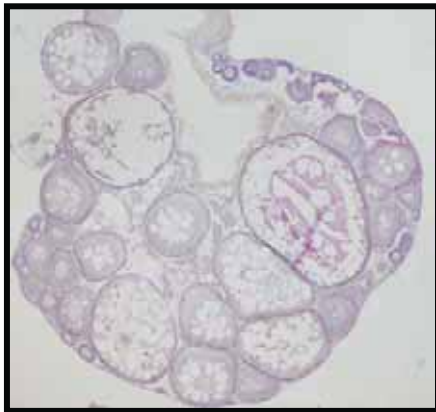


# メダカのERs



*ER $\alpha$*

ノックダウン



卵巢

*ER $\beta$ 1*

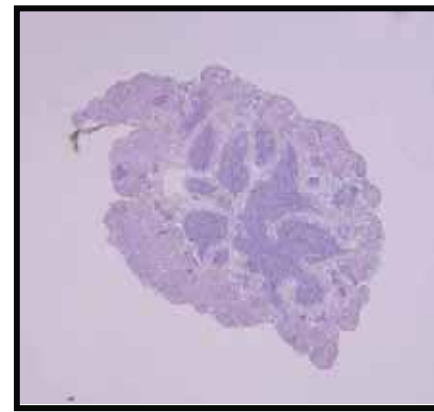
ノックダウン



卵巢

*ER $\beta$ 2*

ノックダウン



精巢

**XX**

**E2 (体細胞)**



**ERβ2 (体細胞)**



**卵巢分化**



**卵巢形成**

**XX**

**E2 (体細胞)**



~~**ERβ2 (体細胞)**~~



**精巢分化**

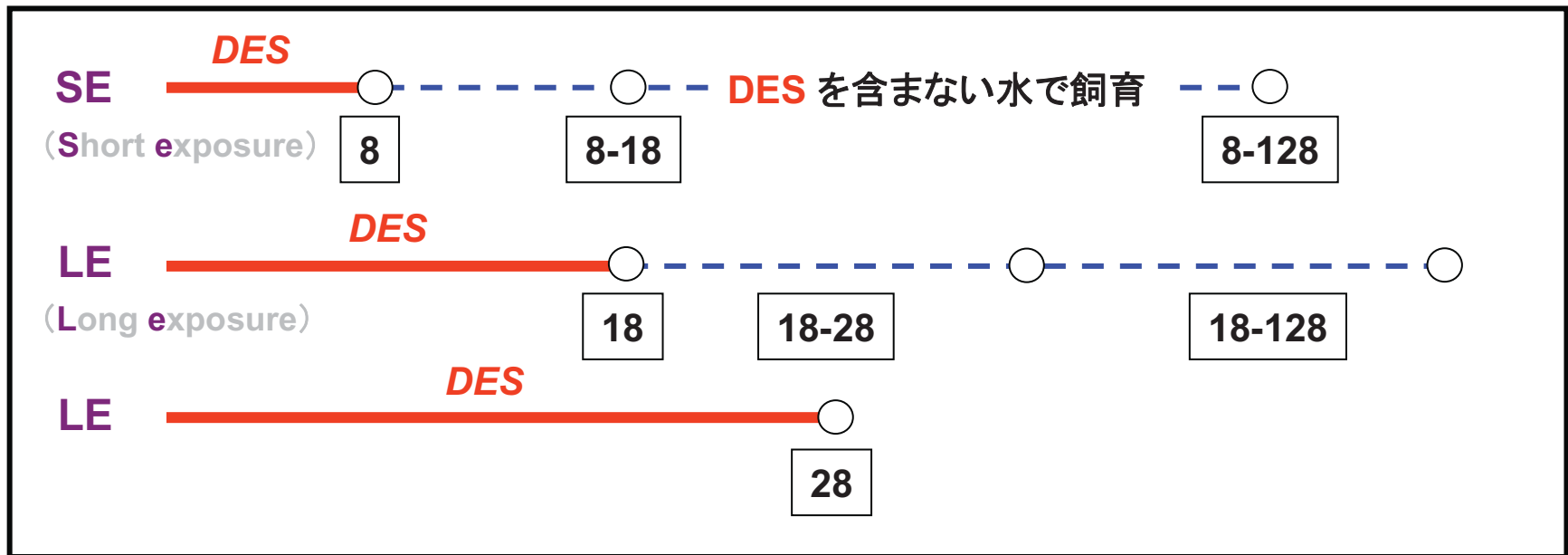
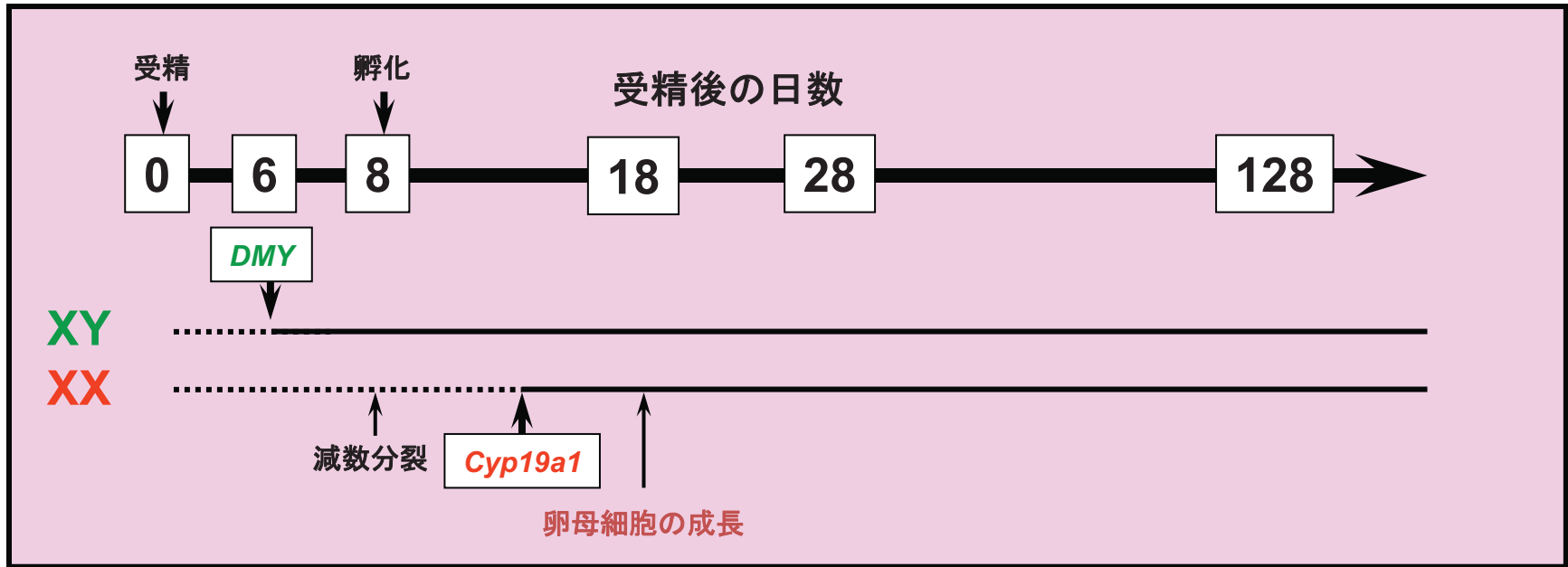


**精巢形成**

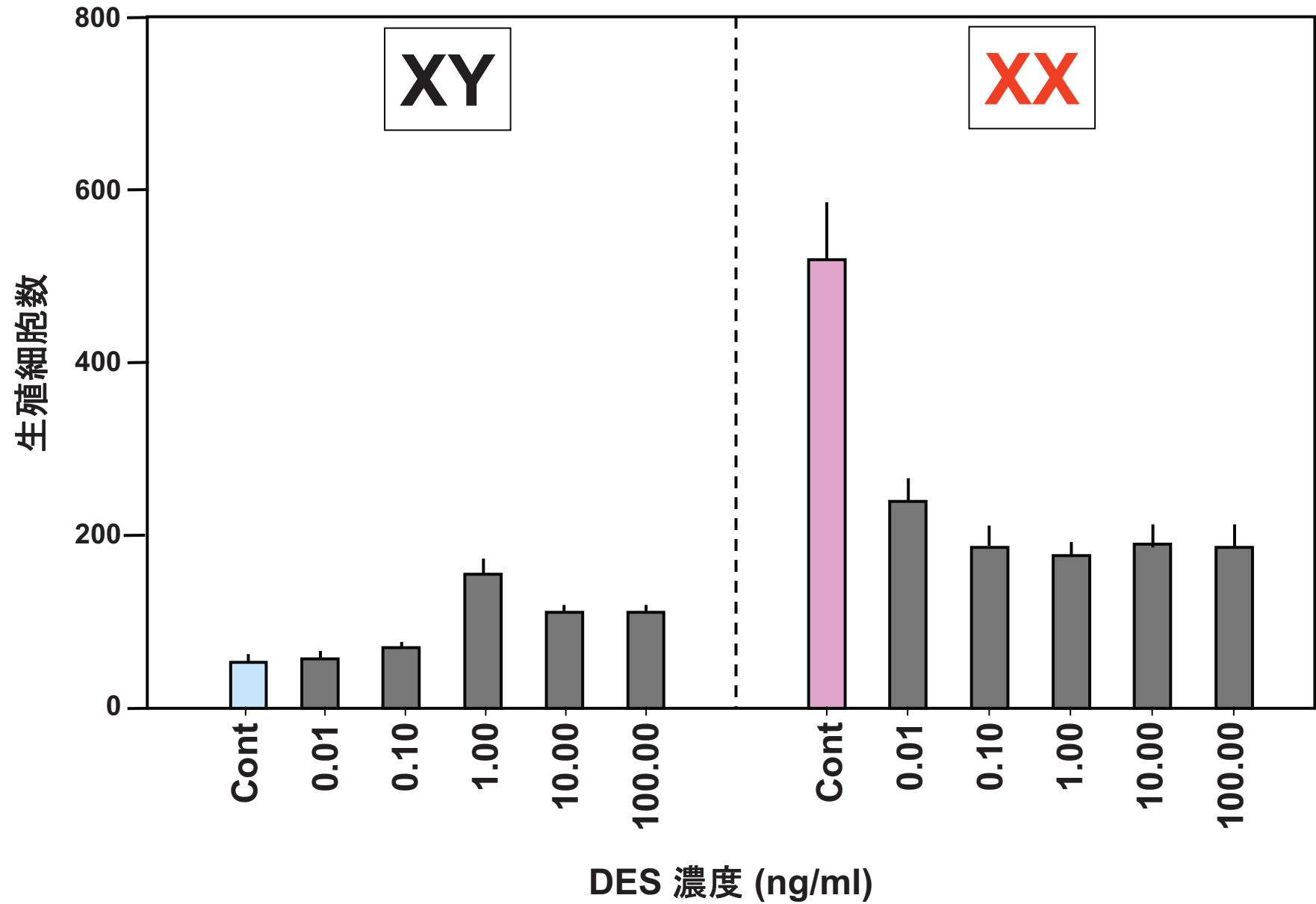
***Exposure to **Diethylstilbestrol** During Embryonic and Larval Stages  
Medaka Fish (*Oryzias latipes*) Leads to  
Sex Reversal in Genetic Males and Reduced Gonad Weight  
In Genetic Females***

**Bindhu Paul-Prasanth, Yasushi Shibata, Ryo Horiguchi, and Yoshitaka Nagahama**

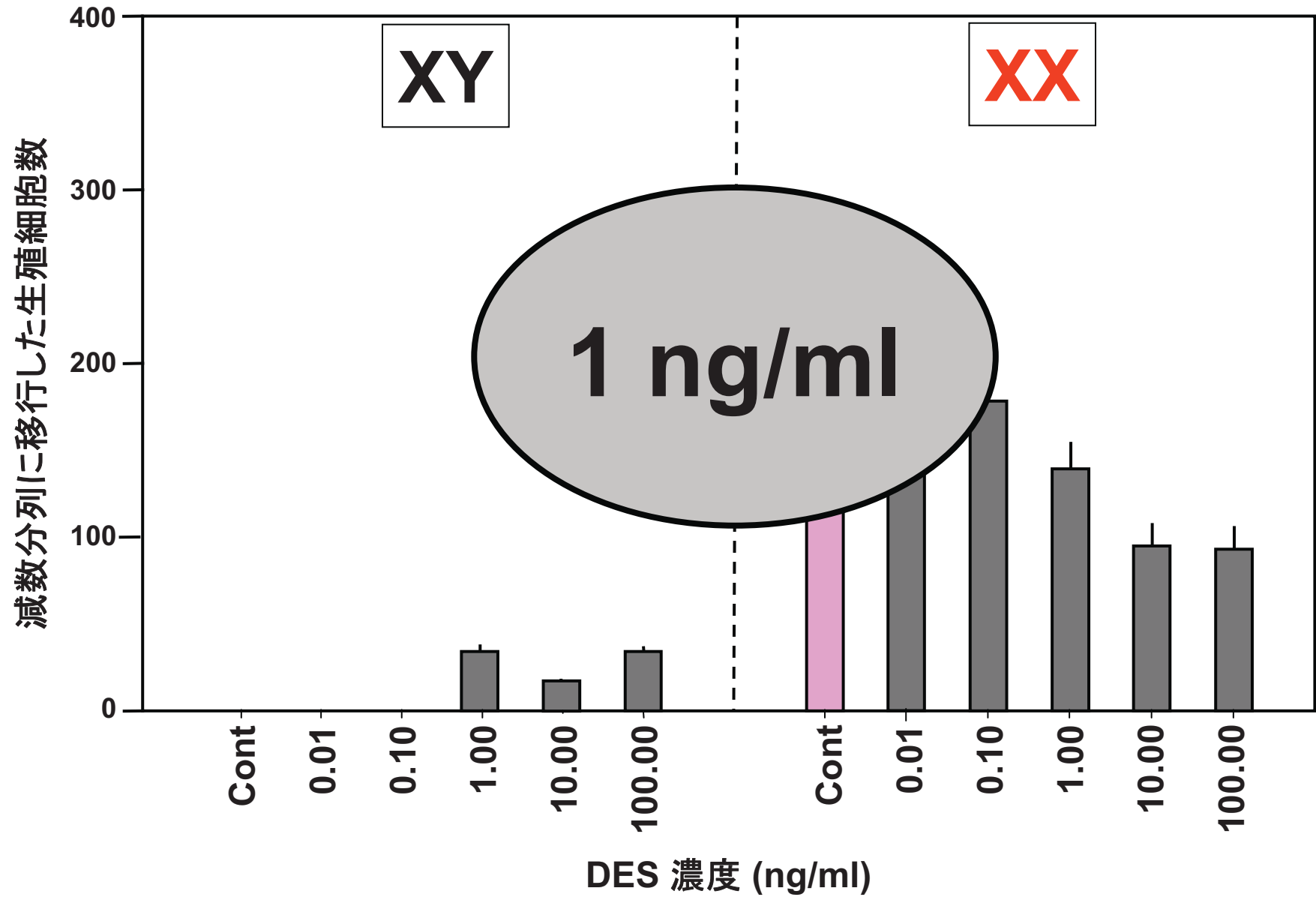
***Endocrinology (in press)***



# DESの生殖細胞数に及ぼす影響

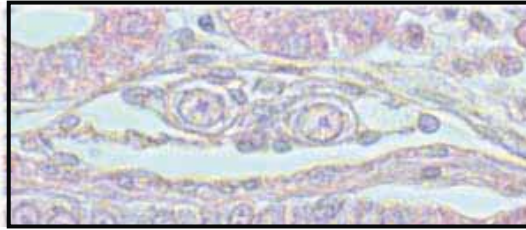


# DESの減数分裂以降に及ぼす影響





**Bipotential gonad**

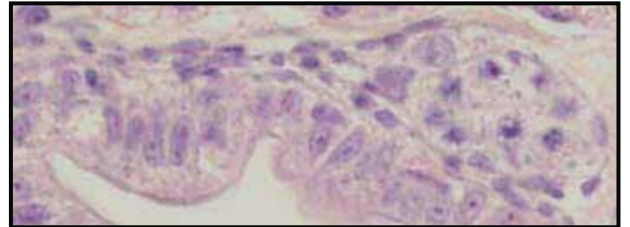
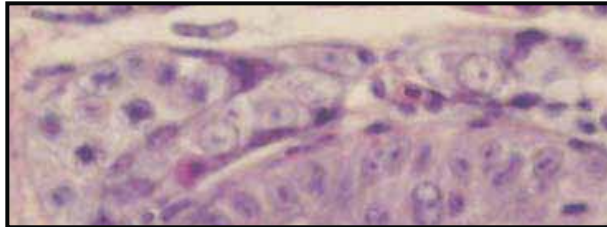
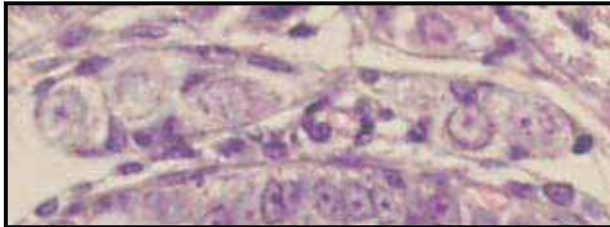


**XY**

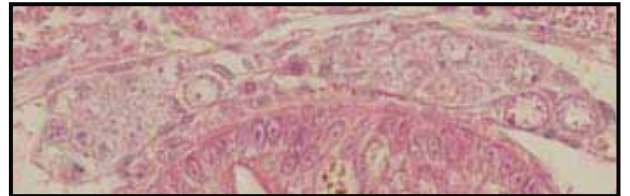
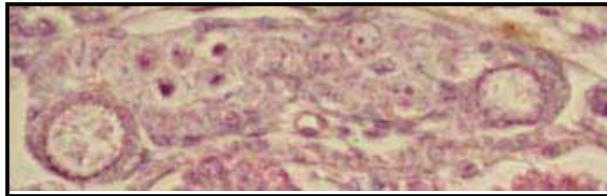
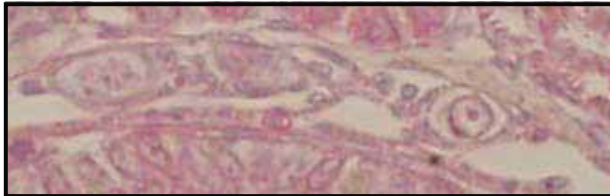
**XX**

**DESXY**

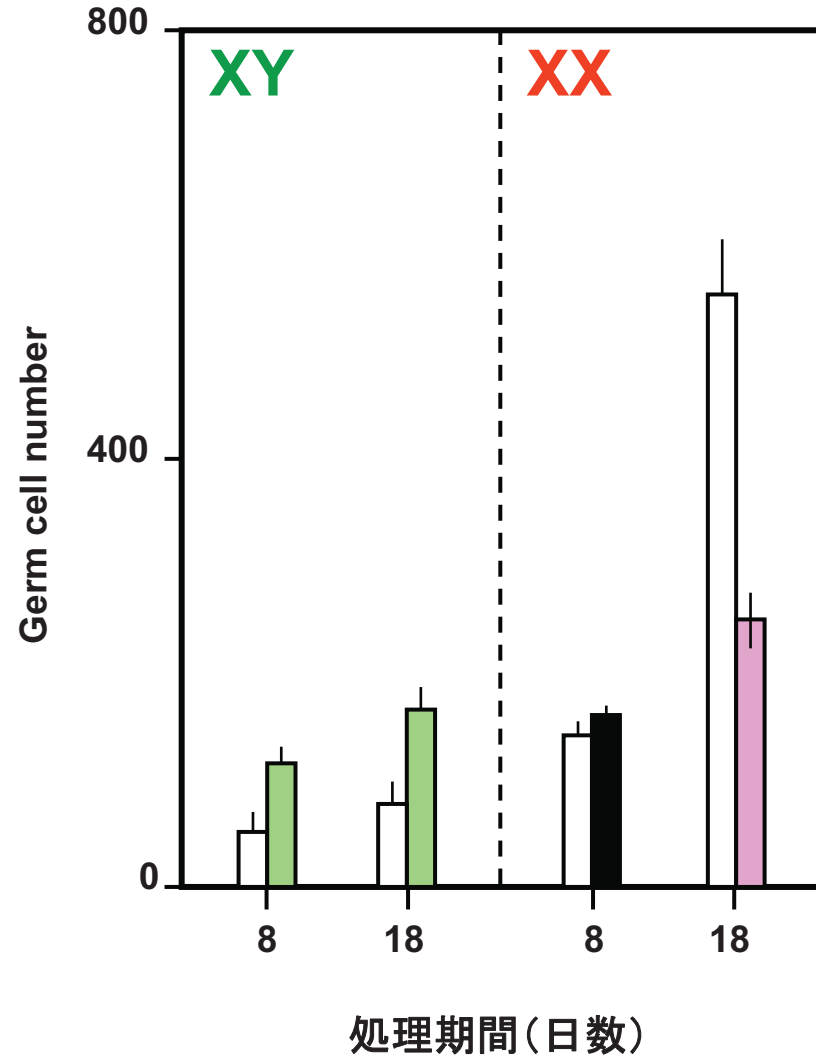
**8 dpf**



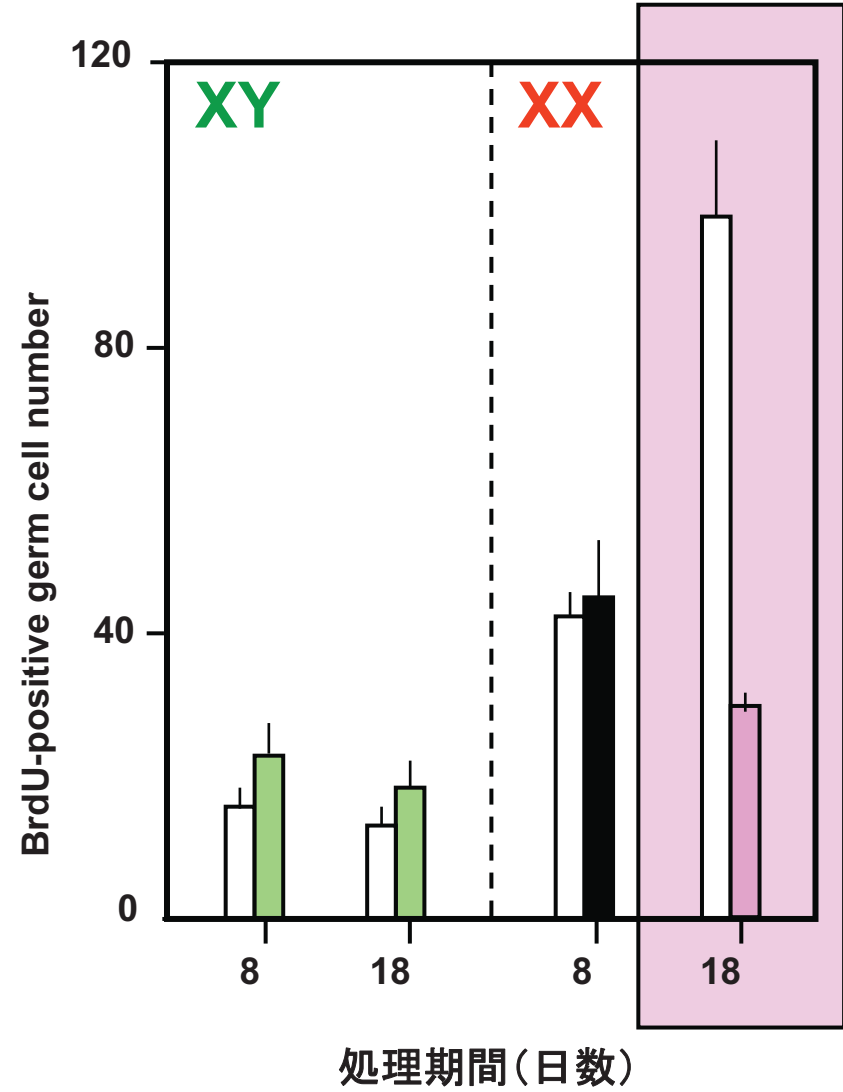
**18 dpf**



生殖細胞数

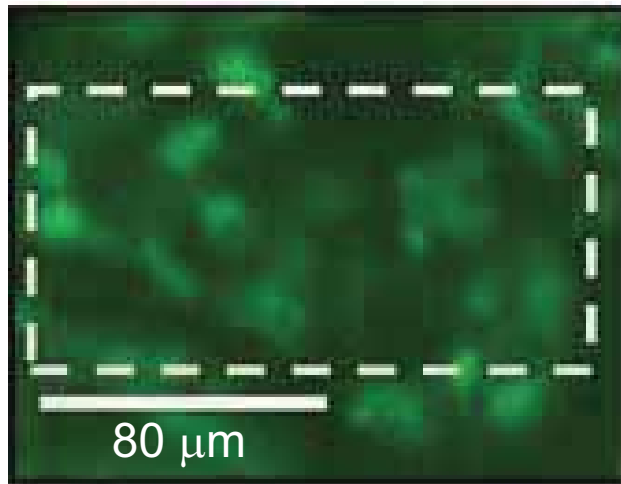


細胞分裂活性

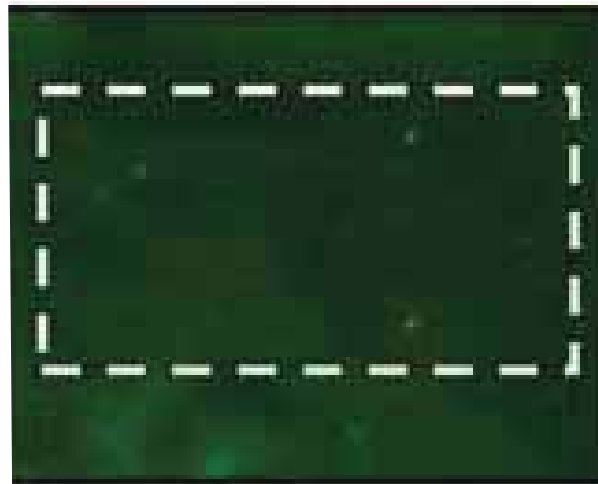


*Effects of **DES** on germ cell apoptosis (TUNEL technology)*

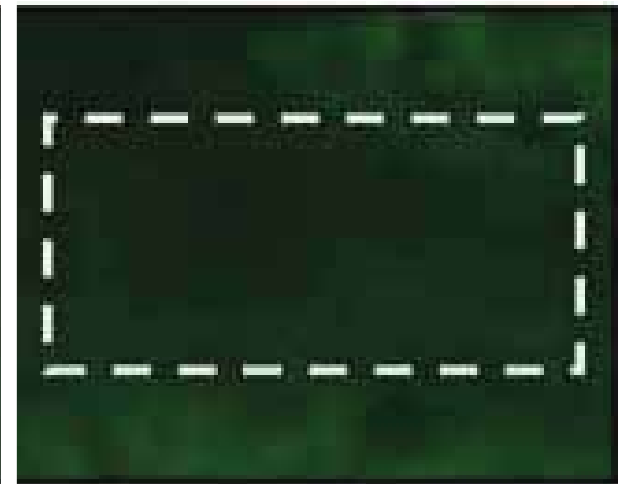
**XX** (18 days after fertilization)



**Positive control**

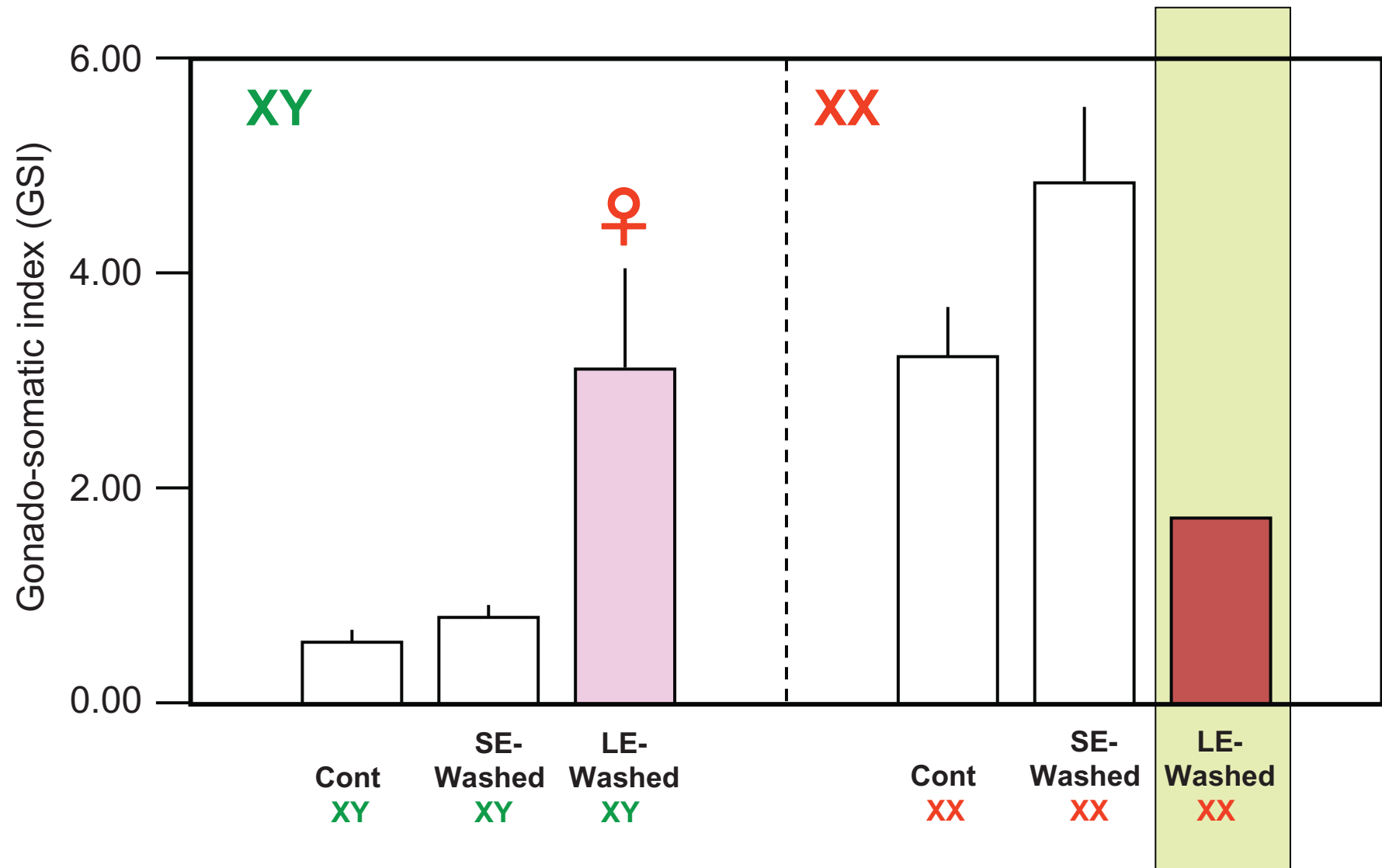


**Control**



**DES**

## Effect of *DES* on gonado-somatic index (GSI)



# XY

SE **DES** ○  
8

雌の方向に少し進行している

8 dpf *Gsdf*

8 dpf *Scp3*

SE **DES** ○ — DES を含まない水で飼育 — ○

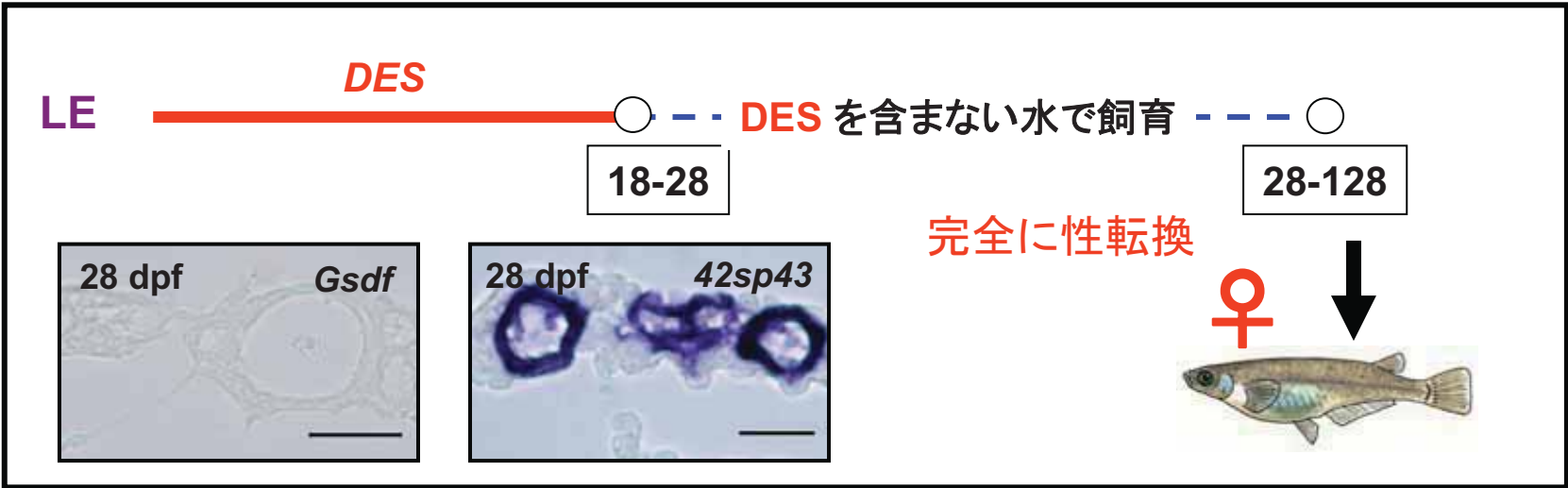
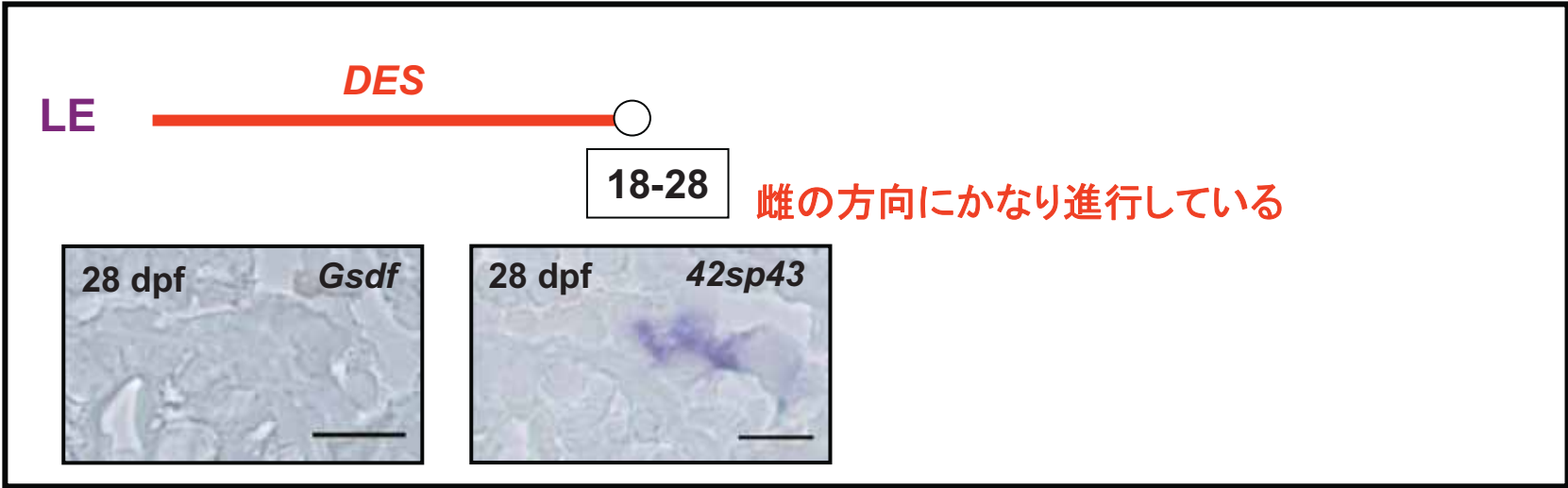
8

雄に戻る

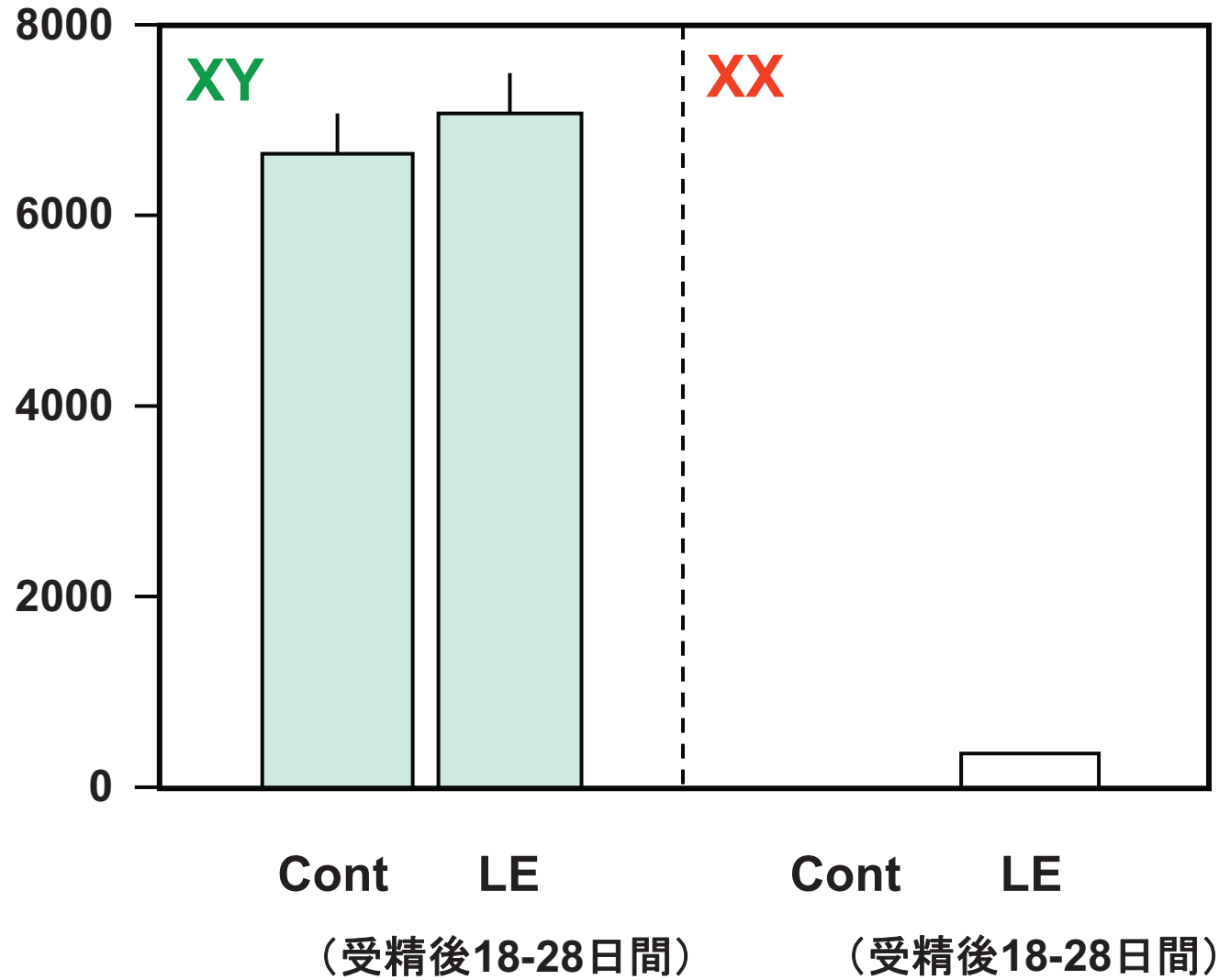
18 dpf *Gsdf*

18 dpf *Scp3*

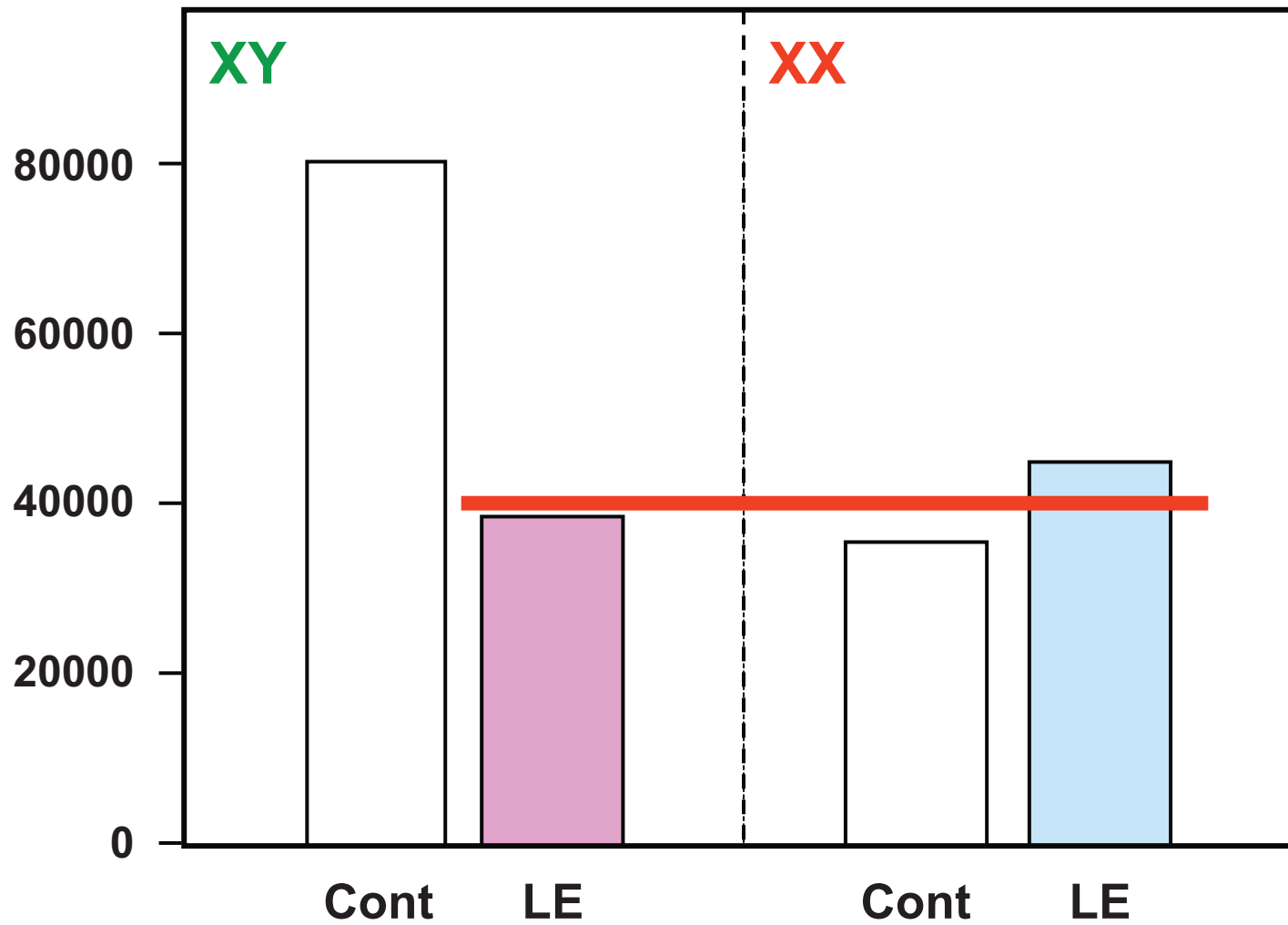
XY



*Effect of **DES** on **Dmy** expression*



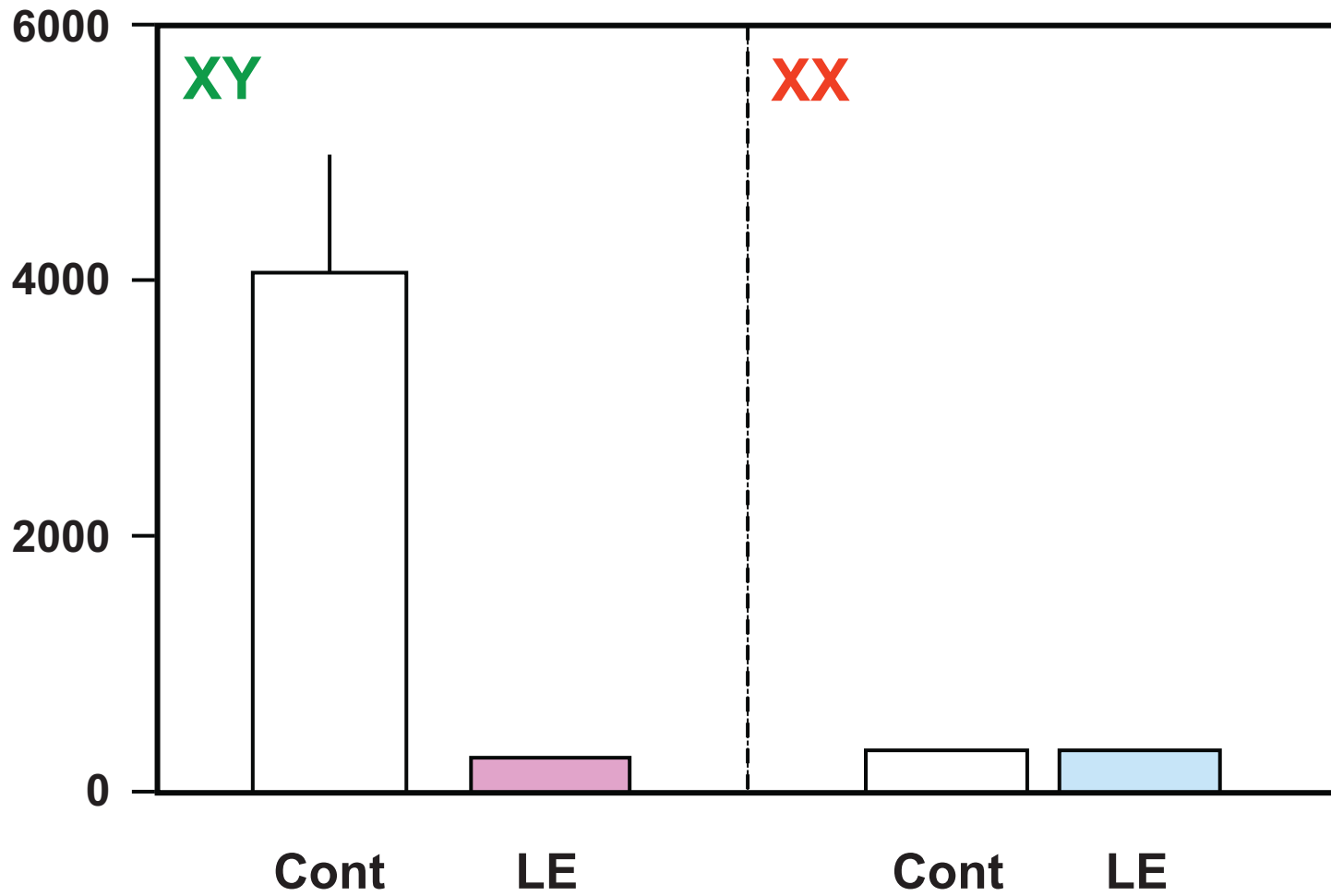
## Effect of *DES* on *Gsdf* expression



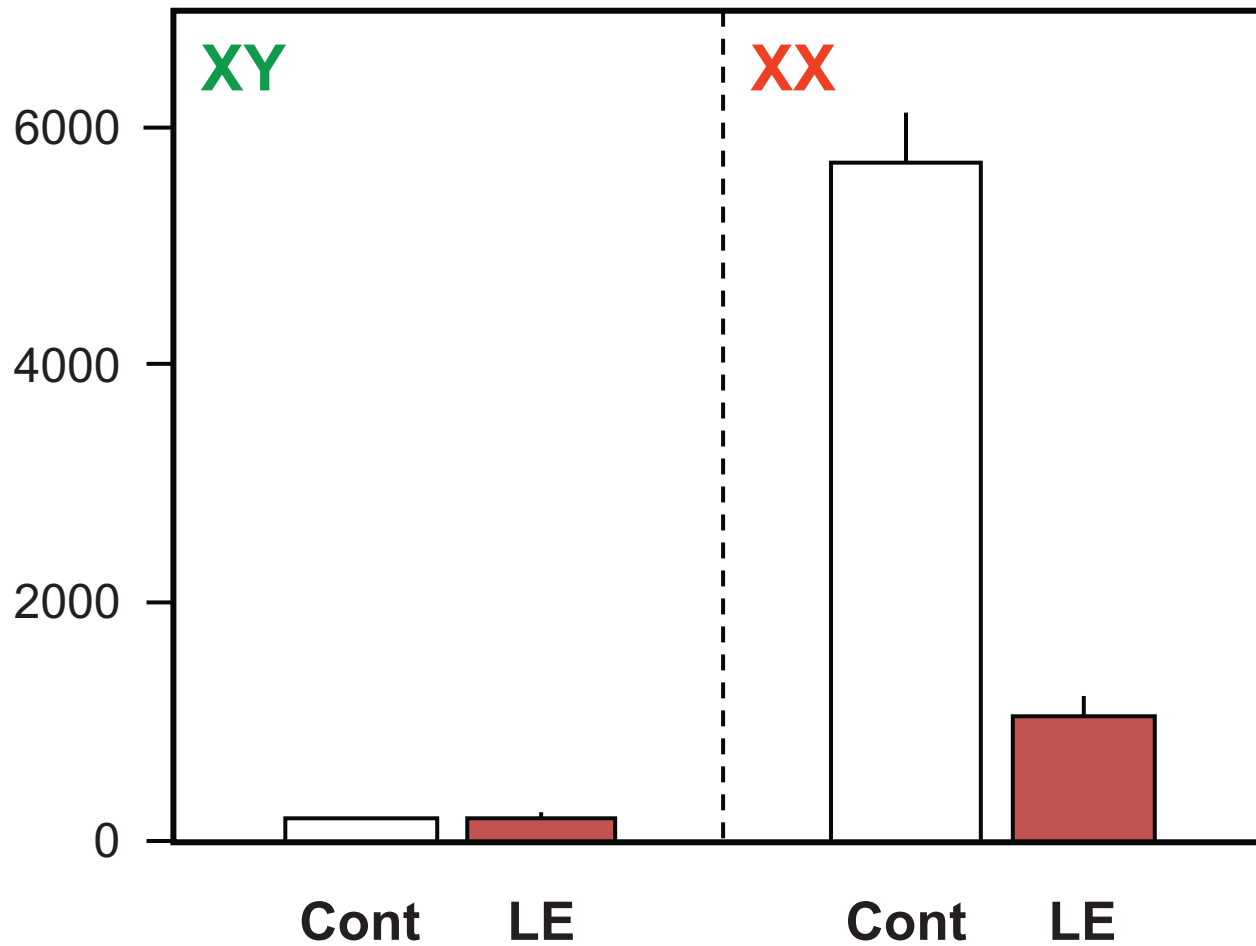
*Gsdf* の発現は長期間処理では♀ (XX) のレベルまで下がっている



*Effect of DES on Dmrt1 expression*

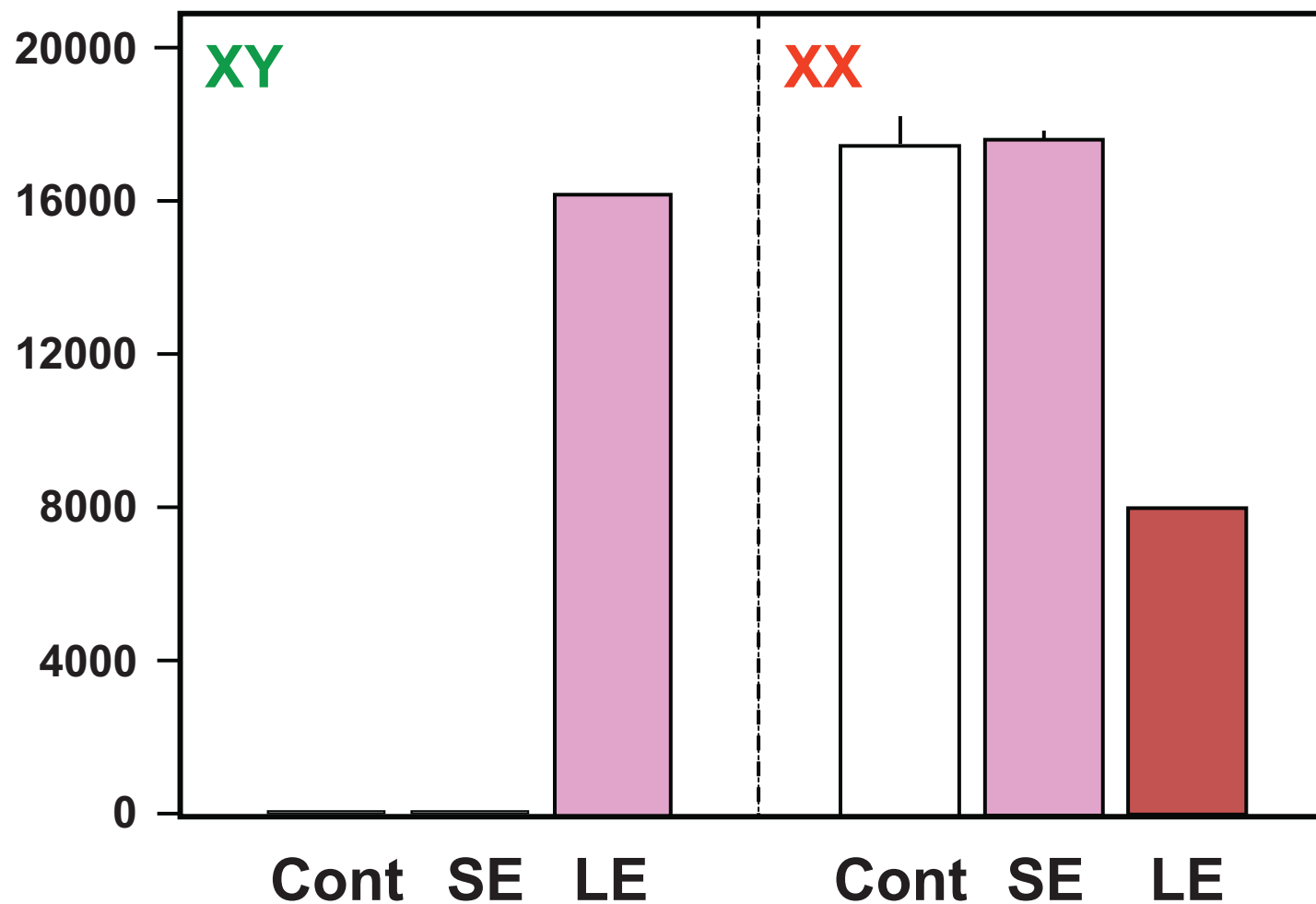


Effect of *DES* on *Cyp19a1* expression



DESの処理期間は 内因性の *Cyp19a1* の発現は抑制されている  
したがって、この時期の生殖腺の雌性化はDESの直接的作用による？

## *Cyp19a1* expression after withdrawal of DES



DESを含まない飼育水に移すと *Cyp19a1* の発現はすぐに高まる

しかし、DESの長期間処理ではその発現が対照群に比して低い

## メダカの雌雄稚魚の生殖腺におよぼすDES処理の影響(まとめ)

### 1) XY稚魚に及ぼす影響:

まず、雄型特異的遺伝子の発現を抑制すること、  
次いで、雌型特異的遺伝子を誘導することにより、  
生殖腺は**卵巣**となり、雌として機能する。  
ただ、短期間のDES処理では、DESを含まない飼育水に移した後に、  
精巣に戻る。 **Gsdf** の発現量が重要である。

### 2) XX稚魚に及ぼす影響:

長期間処理したグループでは、生殖細胞数が50%であった。  
さらに、このグループでは、DESに含まない飼育水に移行して後もGSIは  
有意に低かった。したがって、稚魚期のDES長期処理の影響は成魚まで  
継続する可能性が示唆される。

### 3) XY稚魚、XX稚魚のいずれにおいても、

DES処理期間中は **Cyp19a1** の発現は抑制されている。  
したがって、この期間の生殖腺の雌雄化はDESの直接的作用？

DES(ジエチルスチルベストール) 処理による遺伝的雄から機能的雌への性転換

