

課題 2 . 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

代表研究者：長濱嘉孝（自然科学研究機構 基礎生物学研究所）

【ExTEND2005 との対応】

環境省は、生態系への内分泌かく乱作用による影響の評価手法として、魚類（メダカ）を用いた試験を実施してきている。魚類試験体系においては、成魚におけるビテロジェニン産生をエンドポイントとするビテロジェニンアッセイはあくまでスクリーニング試験であり、より詳細に内分泌かく乱作用について検討するためには、受精卵から暴露を行う試験が用いられている。受精卵に対する暴露では、これまで、精巣卵出現のような組織レベルの変化やオスの二次性徴を含めた全メス化といった個体レベルでの変化が観察された。こういった生殖腺が未発達の稚魚期における影響について評価するためには、生殖腺の性分化についての基礎的知見の集積が必須である。

【具体的研究計画】

1) 研究の背景と目的

本研究では、日本に広く生息する水生生物メダカを研究対象として、生殖メカニズムに関する基礎的知見を集積するとともに、それらの知見を駆使して化学物質の内分泌かく乱作用の影響と作用メカニズムを分子、細胞レベルで明らかにすることを目指す。特に、胚・稚魚期（臨界期）と成体（魚）の生殖腺における性ホルモンや合成化学物質に対する感受性の違いを生じさせる分子メカニズムに注目する。メダカは、哺乳類以外で唯一性決定遺伝子（DMY）が明らかにされており、これをマーカーとして遺伝的性を正確に判定できる。

2) 研究概要

生殖腺の性分化メカニズム、特に性決定遺伝子の作用メカニズムと性分化に及ぼすエストラジオール-17 の影響と作用メカニズムの解明

成魚の生殖腺に及ぼすエストラジオール-17 の影響と作用メカニズムの解明

マイクロアレイ、EST、Differential hybridization 等の分子生物学的研究手法を駆使して魚類の生殖内分泌系、特に生殖腺の性分化、性転換、雌雄差を生じさせる遺伝子群と基本的メカニズムを明らかにする。さらに、これらの基礎的知見をもとに、Whole mount *in situ* hybridization、*In situ* hybridization、定量的 RT-PCR、GFP-トランスジェニックメダカ（Vasa、Nanos、DMY、DMRT1、

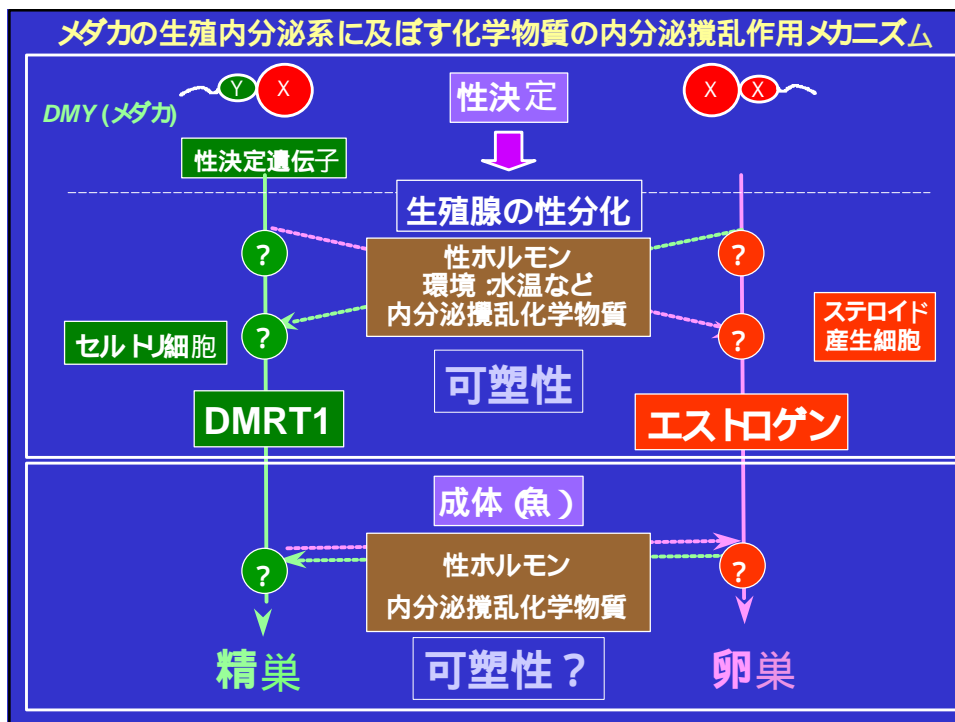
芳香化酵素、等) 器官培養(卵巣、精巣)などを駆使して魚類の生殖内分泌系、特に生殖腺に及ぼす性ホルモンや合成化学物質の影響と作用メカニズムの解明を目指す。

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

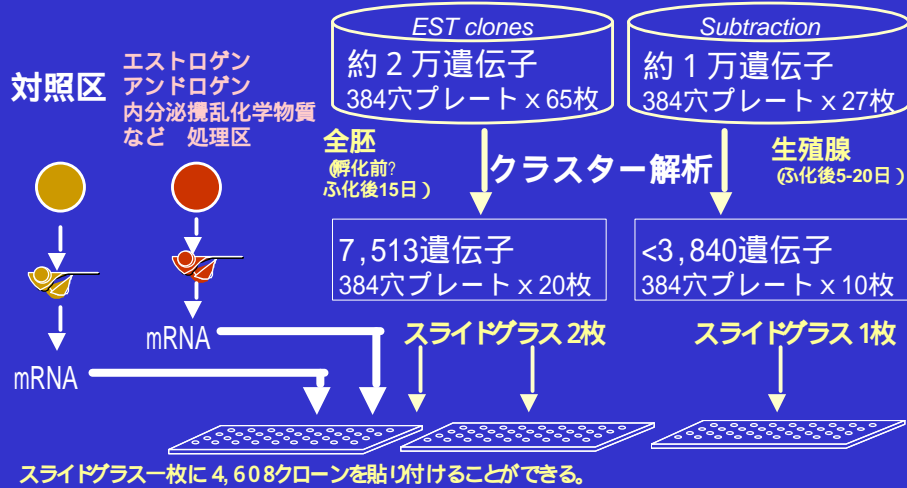
平成17年度 検討会

松田 勝・長濱嘉孝

自然科学研究機構 基礎生物学研究所



マイクロアレイを用いた解析



マイクロアレイを用いた解析から、雌雄で発現量が異なる遺伝子群、さらには、エストロゲン処理、アンドロゲン処理、内分泌攪乱化学物質処理、などにより発現量の変動する遺伝子群を同定する。

研究計画

年度 17 18 19 20 21

(1)生殖腺の性分化

基本的制御メカニズムの解析

性ホルモンの影響 (性転換) と作用メカニズム

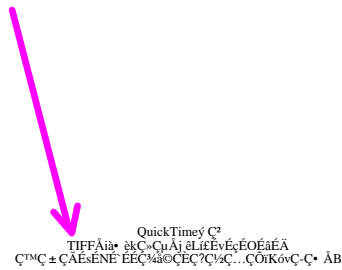
内分泌攪乱化学物質の影響 (性転換) と作用メカニズム

(2)成魚の生殖腺 (卵巣と精巣)

性ホルモンの影響と作用メカニズム

内分泌攪乱化学物質の影響と作用メカニズム

計画 (1) 生殖腺の性分化メカニズム、特に性決定遺伝子の作用メカニズムと性分化に及ぼすエストラジオール-17 の影響と作用メカニズムの解明

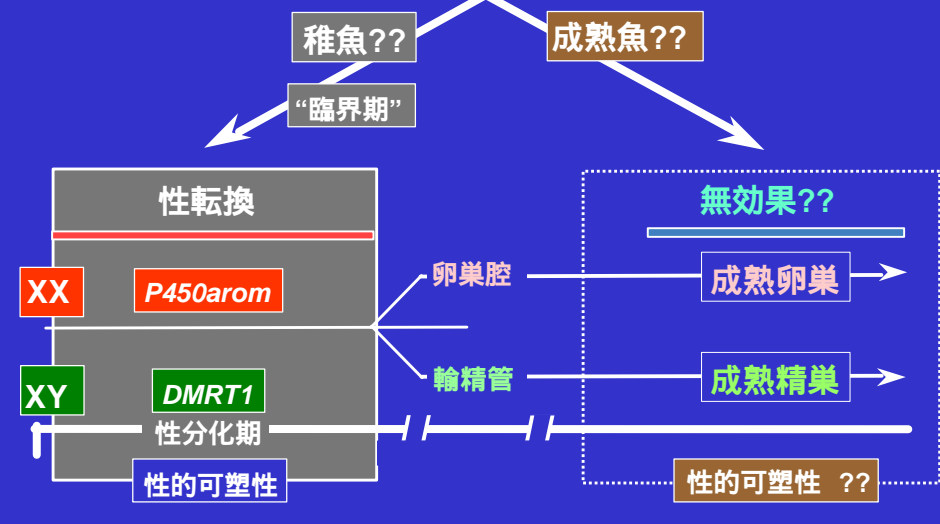


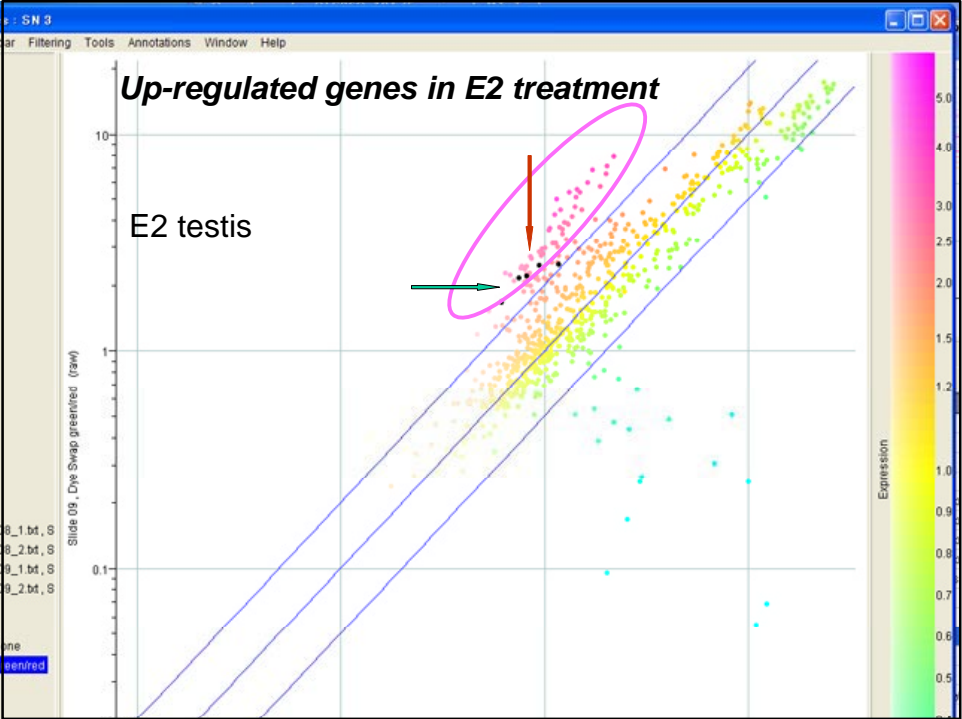
- XX胚-XY胚の比較
- XX生殖腺-XY生殖腺
- XX生殖腺分化過程
- XY生殖腺分化過程
- XY生殖腺 (エストロゲン処理)

計画 (2) 成魚の生殖腺に及ぼすエストラジオール-17 の影響と作用メカニズムの解明

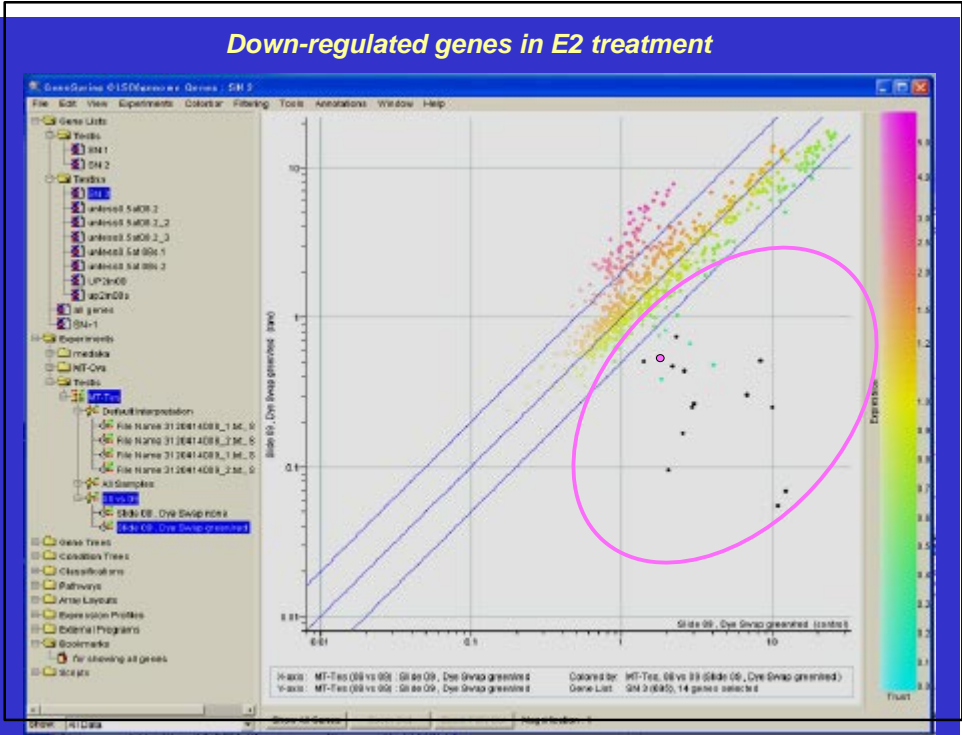
メダカ生殖腺の性的可塑性

性ステロイドホルモン (アンドロゲン、エストロゲン、内分泌攪乱化学物質)





Gene Name	Description
OLS06F-267	[AB0008372] alpha 2 type I collagen [Oncorhynchus mykiss]
OLS06F-378	[AB041930] trypsinogen II [Engraulis japonicus]
OLS06C-317	[AB045645] tropomyosin [Pennahia argentata]
OLS06C-257	[AB045645] tropomyosin [Pennahia argentata]
OLS06D-357	[AB052836] collagen a3(I) [Oncorhynchus mykiss]
OLS06E-374	[AB052837] Collagen alpha 2(I) chain precursor collagen a2(I) [Oncorhynchus mykiss]
OLS06C-174	[AB086413] tropomyosin [Theragra chalcogramma]
OLS06B-60	[AF128810] ZPC domain containing protein 2 [Oryzias latipes]
OLS06C-82	[AF128814] RNA binding protein 42Sp43 [Oryzias latipes]
OLS06B-87	[AF128815] 42Sp50 [Oryzias latipes]
OLS06B-288	[AF128817] Unknown [Oryzias latipes]
OLS06B-156	[AF128818] Unknown [Oryzias latipes]
OLS06B-143	[AF128819] Unknown [Oryzias latipes]
OLS06D-28	[AF128821] Unknown [Oryzias latipes]
OLS06B-62	[AF128823] Unknown [Oryzias latipes]
OLS06A-380	[AF128824] Unknown [Oryzias latipes]
OLS06D-138	[AF281358] putative serum albumin-related protein [Oncorhynchus mykiss]
OLS06B-113	[AF331670] ZPAX [Oryzias latipes]
OLS06B-241	[AF331675] ZPC5 [Oryzias latipes]
OLS06D-169	[AK029137] Mus musculus 10 days neonate skin cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4732496L10 pro
OLS06B-37	[AL035250] prepro-endothelin 3 - Homo sapiens
OLS06E-81	[BC044160] Similar to neuronal protein [Danio rerio]
OLS06C-135	[BC045423] Unknown (protein for MGC:55673) [Danio rerio]
OLS06C-138	[BC045472] Similar to PC2 (positive cofactor 2, multiprotein complex) glutamine/Q-rich-associated protein
OLS06F-216	[BC049974] Myl9 protein [Mus musculus]
OLS06F-164	11-F-4 fatty acid-binding protein ISOTYPE-H6 - Chaenocephalus aceratus
OLS06B-155	10-B-11 No Hits
OLS06B-125	8-B-13 No Hits
OLS06C-145	10-C-1 No Hits
OLS06A-373	12-A-21 No Hits
OLS06C-121	8-C-9 No Hits
OLS06B-281	6-B-25 No Hits
OLS06B-14	1-B-14 No Hits
OLS06B-51	4-B-3 No Hits
OLS06A-381	12-A-29 No Hits
OLS06A-370	12-A-18 No Hits
OLS06B-141	9-B-13 No Hits
OLS06D-126	8-D-14 No Hits
OLS06D-383	12-D-31 No Hits
OLS06F-45	3-F-13 No Hits
OLS06F-235	3-F-27 No Hits



List of genes down-regulated in E2 treatment

1. OLS06C-144-[AF492003] Synaptonemal complex protein 3 [*Homo sapiens*]
2. OLS06F-303-[AK021811] *Homo sapiens* cDNA FLJ11749, weakly similar to NUCLEAR PROTEIN SNF
3. OLS06E-383-[BC008947] Similar to RIKEN cDNA 1200008012 gene [*Homo sapiens*]
4. OLS06F-281-[BC010108] Hypothetical protein FLJ11749 [*Homo sapiens*]
5. OLS06E-373-[BC049536] Unknown (protein for MGC: 56709) [*Danio rerio*]
6. OLS06F-222-[BC049536] Unknown (protein for MGC: 56709) [*Danio rerio*]
7. OLS06D-104-No hits
8. OLS06D-112-No hits
9. OLS06D-118-No hits
10. OLS06D-256-No hits
11. OLS06D-162-No hits
12. OLS06E-375-No hits
13. OLS06F-4 -No hits

本年度の研究計画

- 1) 受精後からE2とMT処理、孵化前、ふ化後、ふ化後の生殖腺
- 2) 親の生殖腺にE2とMT処理、遺伝子プロファイルのタイムコース

メダカの生殖内分泌系に及ぼす化学物質の内分秘攪乱作用メカニズム

