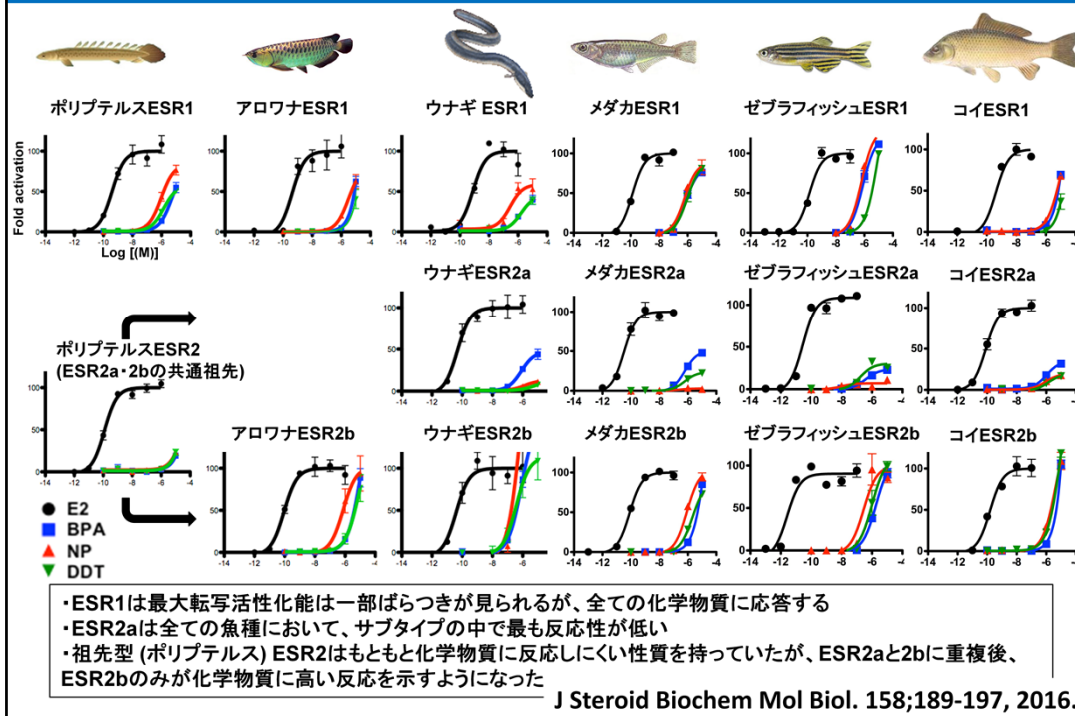


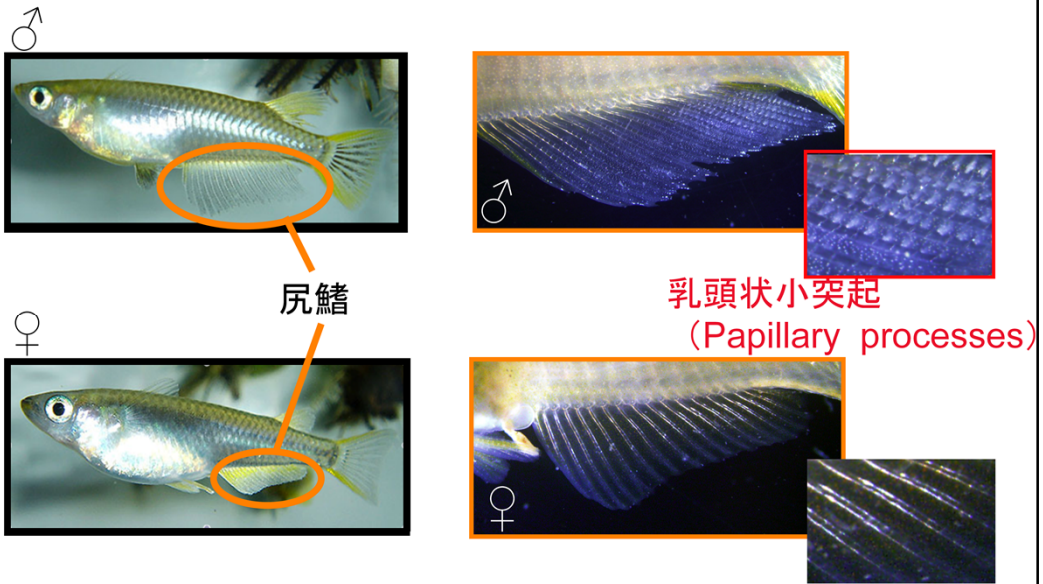
魚類は進化の過程で、遺伝子重複起こっています。ですから、本来1種類しかない遺伝子が、遺伝子重複により2種類になり、2種類が4種類になります。4種類できたうちの1つがなくなっているのので、女性ホルモンの受容体は、真骨魚類では3種類あります。

Variation in ligand sensitivity of ESRs in ray-finned fish aligns with differences in the phylogeny of different taxonomic groups



ポリプテルスは非常に原始的な魚で、エストロゲン受容体は1種類しかありません。アロワナには2種類あります。さらに、メダカなどの真骨魚類は3種類あって、それぞれ応答性が違います。これらの進化的な研究と、其々のエストロゲン受容体サブタイプの機能を明らかにする必要があります。

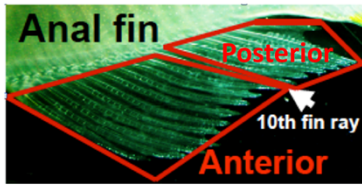
## アンドロゲン応答遺伝子の同定



メダカの尻鰭や乳頭状小突起の性的二型形質は、アンドロゲンシグナルの指標としての形質として利用可能か

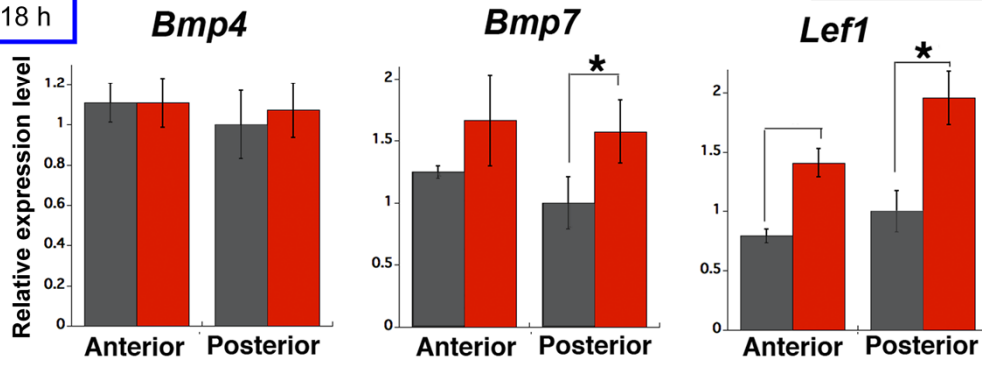
尻鰭の乳頭状小突起です。雄の尻鰭は平行四辺形で大きくて、白いつぶつぶが見えているのが乳頭状小突起です。雌の尻鰭は小さく乳頭状小突起はありません。男性ホルモンが作用すると、雌の尻鰭にも乳頭状小突起ができますが、乳頭上小突起が形成されるメカニズムを調べてみると――

## 乳頭状小突起形成時のアンドロゲン応答遺伝子の同定

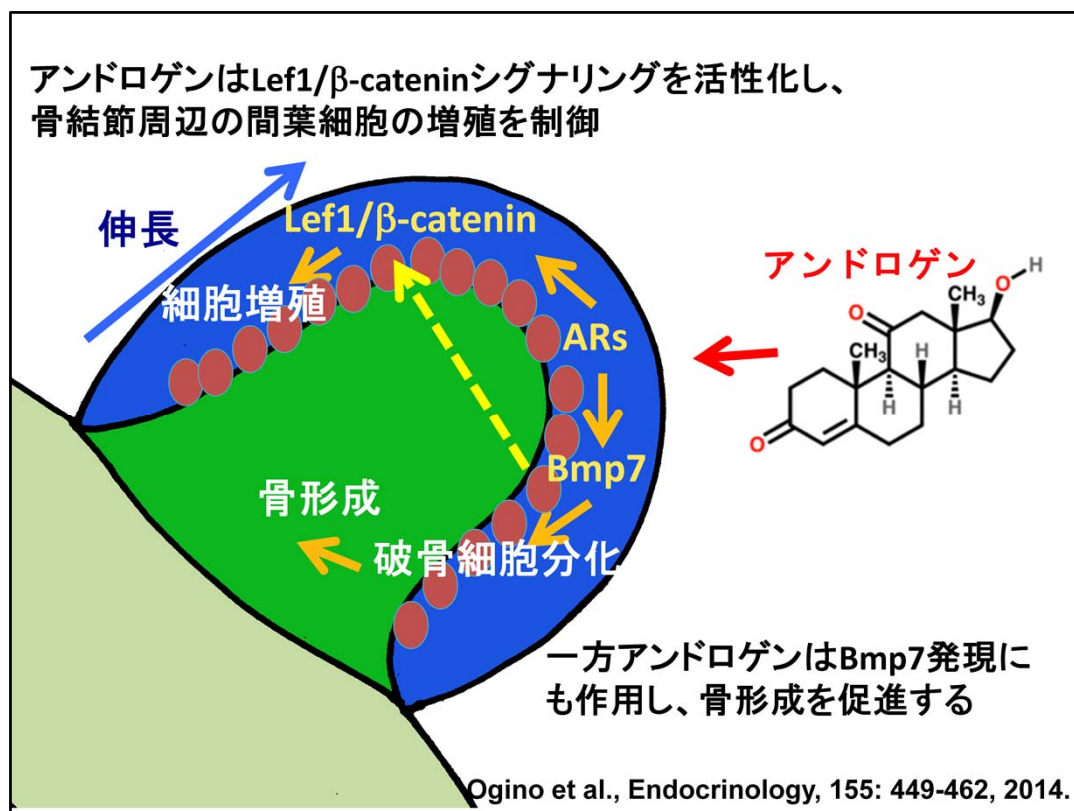


Bmp7 及び Lef1 はアンドロゲンによって  
(形態的な表現型が顕れる前に) 発現誘導される。

18 h



Ogino et al., Endocrinology, 155: 449-462, 2014.



Lef1とBmp7という2つの遺伝子に関係しています。男性ホルモンによってこれらの遺伝子が発現し、細胞が増殖して中心部はカルシウムが沈着した骨ができます。骨ですから、一旦形成された乳頭状小突起は消えません。

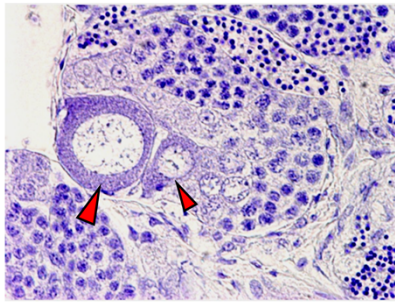
## 実験デザイン

精巣卵は、エストロゲン(様類似物質)によって誘導される代表的なエンドポイントの一つだが、生殖腺全てを組織学的に網羅的に解析するのは難しい

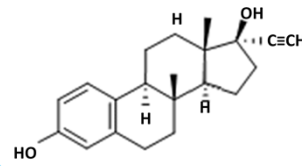
高感度なマーカー遺伝子はないだろうか？

Experiment 1・・・100 ng/L EE2(高濃度曝露)

精巣卵の検出には、精巣すべてを組織切片で解析する必要があり、煩雑で時間もかかるため、マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析で、精巣卵形成に関わる遺伝子マーカーを見つける



EE2 (17 $\alpha$ -ethinylestradiol)  
合成エストロゲン  
排卵抑制のピル



一連の研究から、精巣卵と関連する遺伝子を探索して、*zona pellucida*という遺伝子の発現があると、精巣卵ができていることを見出し、精巣卵のマーカー遺伝子として使えることを示しています。

精巣卵マーカー遺伝子同定のためのトランスクリプトーム解析

Category	Gene Name	Fold change	
		EE2	EB
Egg-related	<i>ZPC domain containing protein 3</i>	25.65	2.30
	<i>ZPA domain containing protein</i>	25.37	3.06
	<i>ZPC domain containing protein 2</i>	11.20	3.54
	<i>ZPB domain containing protein</i>	8.90	-
	<i>ZPC domain containing protein 1</i>	7.47	-
	<i>ZPC domain containing protein 5</i>	6.38	2.63
	<i>zona pellucida protein C [Danio rerio]</i>	4.42	-
	<i>ZPC domain containing protein 4</i>	4.32	2.85
	<i>zona pellucida protein X [Sparus aurata]</i>	2.83	2.15
	<i>vitellogenin 1</i>	2.82	2.41
	<i>zona pellucida glycoprotein 4 [Bos taurus]</i>	2.15	2.03
	Ovary-related	<i>42Sp50</i>	17.13
<i>quinone reductase</i>		7.06	2.74
<i>fig<math>\alpha</math></i>		2.57	4.31
<i>eukaryotic translation initiation factor 4E family member 3 [Danio rerio]</i>		2.05	2.48



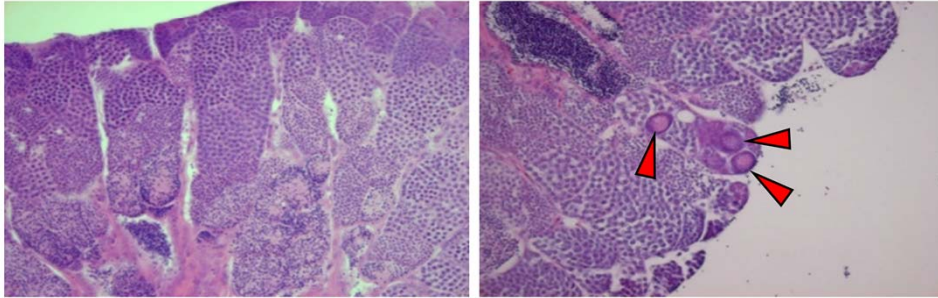


## Experimental design

Experiment 2 ··· 20 ng/L EE2 (低濃度曝露)

精巢卵を誘導する最小限の低濃度曝露

片側の生殖腺を組織学的に解析し、6個体中2個体において少数の精巢卵を確認  
→もう片方の精巣を使って遺伝子発現解析



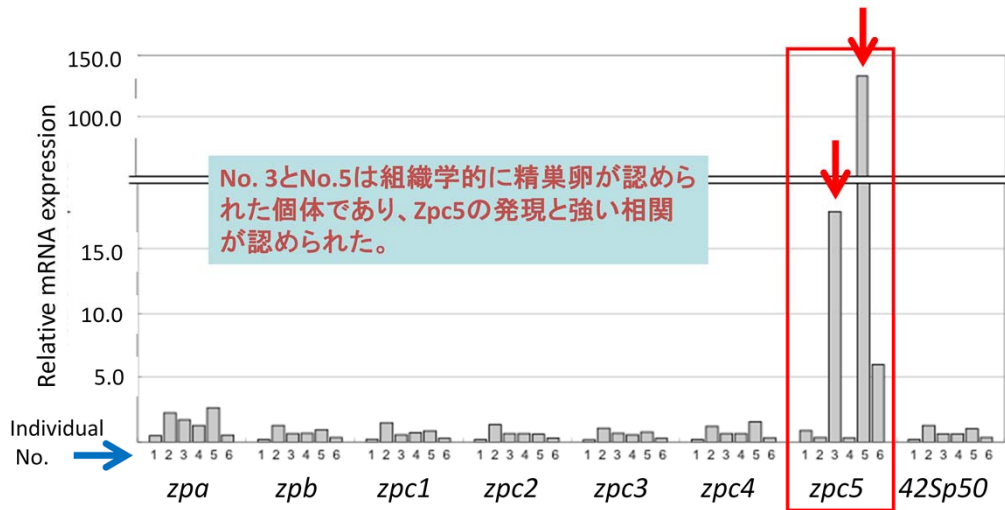
コントロール

20 ng/L EE2-曝露群

Hirakawa et al., Chemosphere, 87, 668-674, 2012.



## 精巣卵マーカ－遺伝子の発現解析



精巣卵のマーカ－遺伝子として、Zpc5 (メダカ) /Zpc (カエル) を同定した。精巣卵のメカニズム解明のためにも重要な知見となる

Hirakawa et al., Chemosphere, 87, 668-674, 2012.

Hirakawa et al., J. Appl. Toxicol., 33, 1001-1010, 2013.

## まとめ

- エストロゲン受容体の応答性に種差、およびエストロゲン受容体のサブタイプに差がある。
- メダカの尻鰭の乳頭状小突起形成の分子メカニズムを明らかにした。
- 精巣卵のバイオマーカーとして Zpc5 (メダカ) /Zpc (アフリカツメガエル) 遺伝子を同定した。
- この結果は、精巣卵形成の分子メカニズムの理解に役立つ。
- これらの遺伝子が精巣卵の誘導に関連していることを決定するために、さらなる研究が必要である。