

課題名 RF-1003 環境ストレスが及ぼす生物影響の評価手法の開発

課題代表者名 北野 健（熊本大学 大学院自然科学研究科 理学専攻生命科学講座准教授）

研究実施期間 平成22～24年度

累計予算額 14,089千円（うち24年度3,951千円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード（5～10個
以下程度）

研究体制

(1) 環境ストレスが及ぼす生物影響の評価手法の開発（熊本大学 大学院自然科学研究科）

研究概要

1. はじめに（研究背景等）

近年、多くの化学物質が及ぼす生物への影響メカニズムが明らかとなってきている。特に、ビスフェノールAやノニルフェノール等のエストロゲン様物質については、生物の雌化を引き起こす分子機構等、多くの情報が蓄積されつつある(Crain et al., 2007)。一方、トリブチルスズ(TBT)のように、イボニシ(Horiguchi et al., 1997)やヒラメ(Shimasaki et al., 2003)の雄化を誘導する物質については、詳細な分子機構の全貌は未だに解明されていない。

課題代表者らは、魚類において、高水温飼育などの環境要因の影響が雄化を引き起こすことを明らかにしている(Kitano et al., 1999; 2000; 2001; 2007)。魚類は、化学物質処理などにより容易に性転換が誘導されるため、モニタリング生物としての有効性が知られている。その中でもメダカは、小型で飼育易く、ライフサイクルが短い上に、遺伝子導入などの機能解析システムが確立されているため、様々な基礎研究でのモデル生物として扱われており、多くの研究情報が集まっているというメリットを有している。

最近、課題代表者らは、高温ストレス等で誘導されるストレスホルモン(コルチゾル)が魚類の雄化を引き起こすことを初めて見出した(Yamaguchi et al., 2010)。一方、ラットにおいては、TBTがコルチゾルの分泌を促進することも報告されている(Funahashi et al., 1980)。このように、TBTなどの化学物質の作用の一つとして、ストレス誘起によるコルチゾル量増加の影響も無視できない可能性がある。そこで、すでに作製されたストレス応答性トランスジェニック(Tg)メダカ系統(Oda et al., 2010)等を利用して、化学物質、ストレス、雄化の相互関係を明らかにするとともに、化学物質が保持する生物に対するストレス作用を評価するための新たな手法を確立することを目的としてこの研究を行う。

2. 研究開発目的

本研究では、すでに作製されたTgメダカの特徴を生かして、化学物質、ストレス、雄化等の生物影響の相互関係を明らかにして、化学物質が及ぼす生物のストレス作用の全貌を解明することを目的とする。さらに、この研究成果を生かして、様々な化学物質が保持する生物に対するストレス作用を評価するための新たな手法を確立する。年度ごとの具体的な研究テーマは以下の3つであり、これらの達成をめざして研究を実施する。

- (1) 高温ストレスが及ぼすストレス及び雄化誘導機構の解明
- (2) TBTが及ぼすストレス及び雄化誘導機構の解明
- (3) 化学物質が及ぼすストレス作用の評価手法の確立

3. 研究開発の方法

(1) 高温ストレスが及ぼすストレス及び雄化誘導機構の解明

高温ストレスによるコルチゾル量の増加は、下垂体での副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の分泌により引き起こされ、ACTH量の増加は、視床下部での副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)により誘導されることが分かっている。したがって、視床下部内でCRHを制御する因子を解析することにより、高温ストレスと雄化との相互関係を明らかにできるのではないかと考えられる。そこで、視床下部領域を緑色蛍光タンパク質(GFP)蛍光で可視化した *neurogenin3-GFP* Tgメダカ系統を用いて、受精後0日目から受精後4日目まで高水温(33°C)または通常水温(26°C)処理したメダカ胚から視床下部領域を取り出し、これらをサンプルとしてDNAマイクロアレイ解析を実施し、高温ストレスで変動する遺伝子を探索した。DNAマイクロアレイ解析後、高温処理により発現変動した遺伝子について定量的リアルタイムPCR解析により発現量の確認を行った。

高温ストレスによるメダカ雄化の分子機構を明らかにするため、生殖細胞を赤色蛍光タンパク質(DsRed)蛍光により可視化した *olvas-DsRed* Tgメダカ系統(Hayashi et al., 2010)を用いて、孵化後0日目から5日目(性分化後)まで、水温26°Cでコルチゾル(5×10^{-6} M)、エストラジオール-17 β (E2; 1×10^{-7} M)処理、または33°C(高水温)でE2処理を行い、これらの処理による雄化の割合を、孵化約2ヶ月後の成魚個体の生殖腺の組織学的観察により調査した。また、これら処理が及ぼすメダカ性分化への影響を詳細に解析するため、孵化後5日目において生殖細胞数の計数及び性分化関連遺伝子の発現をRT-PCRにより解析した。

(2) TBTが及ぼすストレス作用とメダカ性分化への影響

トリブチルスズオキシド(TBTO)が及ぼす生物へのストレス影響を明らかにするため、すでに作製した *heat shock protein 70 (hsp70)* の発現を緑色蛍光タンパク質(Venus)蛍光で、生殖細胞をDsRed蛍光で可視化した *hsp70-Venus/olvas-DsRed* Tgメダカ系統を用いて、孵化後0日目からコルチゾルまたはTBTO処理を行い、孵化後0日目、1日目、5日目でのVenus蛍光を蛍光実体顕微鏡下で観察した。また、TBTO処理が及ぼすメダカ性分化への影響を解析するため、孵化後5日目において生殖細胞数の計数を行った。

(3) 化学物質が及ぼすストレス作用の評価

化学物質が及ぼす生物へのストレス影響を明らかにするため、*hsp70-Venus/olvas-DsRed* Tgメダカ系統を用いて、孵化後0日目から高温(33°C)、ジクロロボス(DDVP)(10^{-5} M)、ビスフェノールA(10^{-5} M)またはビスフェノールS(10^{-5} M)処理を行い、処理後0日目、1日目、5日目での体全体のVenus蛍光を蛍光実体顕微鏡下で観察した。

4. 結果及び考察

(1) 高温ストレスが及ぼすストレス及び雄化誘導機構の解明

高温ストレスと雄化との相互関係を明らかにするためにDNAマイクロアレイ解析を行った結果、コントロールと比較して発現量が10倍以上上昇した遺伝子は、メダカ44,000遺伝子中65遺伝子であり、その中には *hsp70*、*hsp30* 等が含まれていた。また、*crhl*については、発現量が約5倍上昇していることが確認された。さらに、これらの遺伝子発現パターンを定量的リアルタイムPCRで確認したところ、DNAマイクロアレイ解析と同様な発現パターンであったことから、今回のDNAマイクロアレイ解析結果は十分信頼できると考えられた。

一方、高温ストレスがどのような分子機構で雄化を誘導するのかを解明するため、メダカ性分化時期の生殖細胞数及び性分化関連遺伝子の発現パターンを調べた。その結果、高温ストレスまたはコルチゾル処理したXX個体では、コントロールXX個体に比べて生殖細胞数が有意に減少しているのに対し、これらの処理下でエストロゲン(E2)を投与したXX個体においては、生殖細胞数の減少が抑制されていた。一方、高温ストレスまたはコルチゾル処理したXX個体では、エストロゲン合成酵素 *cyp19a1* や卵母細胞マーカー *42sp50* の発現が抑制されていたが、これらの処理下でE2を投与したXX個体においては、これらの発現が回復していた。さらに、メダカ成魚での性比を調べたところ、これらの処理下でE2を投与したXX個体においては、完全に雄化が抑制されていることが明らかとなった。これらのことから、高温ストレスまたはコルチゾル処理によるメダカの雄化は、*cyp19a1* 発現の抑制によるエストロゲン量の減少が原因であると考えられた。

(2) TBTが及ぼすストレス作用とメダカ性分化への影響

TBTOが及ぼす生物へのストレス影響を明らかにするため、*hsp70-Venus/olvas-DsRed* Tgメダカ系統を用いて孵化後0日目からコルチゾルまたはTBTO処理を行い、孵化後0日目、1日目、5日目でのVenus蛍光を観察した。その結果、両処理ともに、処理期間が長くなるにつれてVenus蛍光を持つ個体が増える傾向が認められた。次に、TBTOが及ぼす生殖細胞数への影響を解析したところ、XY個体においては、TBTO処理の影響は認められなかったが、XX個体においては、コントロールXX個体と比べて生殖細胞数が有意に減少し、XX個体の雌化が抑制されている可能性が示唆された。

(3) 化学物質が及ぼすストレス作用の評価

化学物質が及ぼす生物へのストレス影響を明らかにするため、*hsp70-Venus/olvas-DsRed* Tgメダカ系統を用いて孵化後0日目から高温(33°C)、DDVP(10^{-5} M)、ビスフェノールA(10^{-5} M)またはビスフェノールS(10^{-5} M)処理を行い、処理後0日目、1日目、5日目での体全体のVenus蛍光を観察した。その結果、高温処理では、処理後1日目からほとんどの個体で強い蛍光が観察された。一方、化学物質処理においても処理後1日目から蛍光を持つ個体が観察され、ビスフェノールA処理ではより多くの個体で強い蛍光が認められた。このように、エストロゲン様物質として知られているビスフェノールAにおいては、メダカに対してストレス作用も有していることが初めて明らかとなった。また、有害化学物質であるDDVPやビスフェノールSにおいても、弱いストレス作用があることが示唆された。今後は、これらの化学物質が実際に雄化作用を持っているかどうかを詳細に解析する必要があるだろう。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

課題代表者らは、高温ストレスによる雄化にはコルチゾルというステロイドホルモンが深く関与していることを初めて証明し、この基礎的研究での発見を足がかりとして、DNAマイクロアレイ解析等を駆使してコルチゾル誘導因子(HSP70等)を見出した。また、これら因子を使ってストレス応答性の*in vivo*評価系である*hsp70-Venus* Tgメダカ系統を確立した。このオリジナルなメダカ系統は、今まで調べられなかった環境水のストレス作用を総合的に評価するための大変優れた生物センサーであると考えられる。さらに課題代表者らは、基礎的研究として、すでに単離したコルチゾル誘導因子や雄化誘導因子の機能解析にも着手し、新規な生理的機能を解明することができた。これらの成果は、生物が普遍的に保持している新たな仕組みの発見にも繋がる可能性を十分秘めているため、さらなる研究の発展が期待される場所である。このように、課題代表者らは基礎から応用まで幅広く研究成果を挙げることができた。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究の進展により、化学物質の新たなストレス作用を発見することができた。今後は、本研究により確立したストレス応答性Tgメダカ系統を用いて、より多くの化学物質を調査する必要があるだろう。さらに、この生物センサーは、実際の環境水に存在する複数の化学物質の複合ストレス作用を簡便に高感度で評価できる可能性を秘めており、今後の環境ストレス調査に利用できるのではないかと考えられる。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) Y. Hayashi, H. Kobira, T. Yamaguchi, E. Shiraishi, T. Yazawa, T. Hirai, Y. Kamei and T. Kitano: *Molecular Reproduction and Development*, 77, 679-686 (2010)

“High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol”

- 2) T. Yamaguchi and T. Kitano: Biochemical and Biophysical Research Communications, 419, 287–292 (2012) “High temperature induces *cyp26b1* mRNA expression and delays meiotic initiation of germ cells by increasing cortisol levels during gonadal sex differentiation in Japanese flounder”
- 3) T. Kitano, Y. Hayashi, E. Shiraishi and Y. Kamei: Molecular Reproduction and Development, 79, 719–726 (2012) “Estrogen rescues masculinization of genetically female medaka by exposure to cortisol or high temperature”

<査読付論文に準ずる成果発表> (「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可)
特に記載すべき事項はない

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) T. Uchikawa, H. Kobira, T. Hirai and T. Kitano: 第43回日本発生生物学会大会(2010)
“Regulatory mechanism of follicle-stimulating hormone receptor expression in medaka (*Oryzias latipes*)”
- 2) T. Uchimura, Y. Hayashi, E. Shiraishi and T. Kitano: 第43回日本発生生物学会大会(2010)
“Gene expression profiling induced by high temperature treatment in medaka (*Oryzias latipes*)”
- 3) E. Shiraishi, D.K. Kang, T. Kitano, S. Nakamitsu, H. Hosseini and H. Akiyama: 7th International Bioelectrics Symposium, USA, 2010
“Effects of pulsed powers on the embryonic development in medaka (*Oryzias latipes*)”
- 4) T. Kitano: The 4th Bilateral Seminar Japan-Italy: Physical and Chemical Impacts on Marine Organisms, Nagoya, Japan, 2010 (招待講演)
“Molecular mechanism of environmental sex determination in fish”
- 5) 亀井保博、浦和博子、木村英二、出口友則、伊藤真理子、北野健、尾田正二等: 第33回日本分子生物学会年会(2010)
「赤外レーザーによる遺伝子発現システム(IR-LEGO)の様々なモデル生物への応用」
- 6) 小幡晋平、関大亮、北野健、斉藤寿仁.: 第33回日本分子生物学会年会(2010)
「メダカ*Senp1*酵素活性部位のHeLa細胞における過剰発現系の解析」
- 7) 林裕輝、白石絵吏、北野健: 平成23年度日本水産学会大会(2011)
「メダカの温度依存性性決定におけるエストロゲンの関与」
- 8) 内村友哉、林裕輝、田代真也、白石絵吏、北野健: 平成23年度日本水産学会大会(2011)
「メダカにおいて高水温により発現変動する遺伝子の解析」
- 9) T. Kitano, Y. Hayashi, T. Yamaguchi and E. Shiraishi: 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, India, 2011
“High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol level”
- 10) T. Uchikawa, H. Kobira, T. Hirai and T. Kitano: 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, India, 2011
“Analysis of regulatory mechanism of follicle-stimulating hormone receptor (*fshr*) expression using *fshr-GFP* transgenic medaka”
- 11) T. Uchimura, Y. Hayashi, S. Tashiro, E. Shiraishi and T. Kitano: 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, India, 2011
“Analysis of genes regulated by high temperature in medaka”
- 12) 北野健: 平成23年度温熱生理研究会(2011)「温度依存性性決定の分子メカニズム」
- 13) 北野健、林裕輝、白石絵吏: 第36回日本比較内分泌学会大会(2011)
「コルチゾルは高温によるメダカの雄化に関与する」
- 14) 木寺智則、白石絵吏、松田勝、井尻成保、北野健: 第36回日本比較内分泌学会大会(2011)
「メダカにおけるGonadal Soma-Derived Factor(GSDF)の機能解析」
- 15) 亀井保博、浦和博子、山本和彦、金子拓也、木村英二、出口友則、弓場俊輔、北野健、尾田正二等: 第34回日本分子生物学会年会(2011)
「赤外レーザーによる遺伝子発現システム(IR-LEGO)の様々なモデル生物への応用」
- 16) S. Ansai, Y. Gou, T. Kitano, H. Ochiai, Y. Kamei, T. Yamamoto and M. Kinoshita: 第34回日本分子生物学会年会(2011)
“Targeted gene disruption in medaka using zinc-finger nucleases-knock out of GFP gene”
- 17) 内川拓、小平博史、平井俊朗、北野健: 平成24年度日本水産学会大会(2012)
「メダカ濾胞刺激ホルモン受容体の発現制御機構の解析」

- 18) 木寺智則、内川拓、松田勝、井尻成保、北野健:平成24年度日本水産学会大会(2012)
「GSDF(gonadal soma-derived growth factor)はメダカ遺伝的雌の雄化を引き起こす」
- 19) 山口寿哉、平井俊朗、北野健:平成24年度日本水産学会大会(2012)
「高水温によるcsf-1受容体の発現誘導とコルチゾールとの関係」
- 20) E. Shiraishi, H. Hosseini, D.K. Kang, T. Kitano and H. Akiyama: Bioelectrics 2012, Kumamoto, Japan, 2012 “Effects of nanosecond pulsed power on gene expression in medaka”
- 21) 北野健:第37回日本比較内分泌学会大会シンポジウム(2012)
「魚類における温度依存性性決定の分子機構」
- 22) 内村友哉、田代真也、矢澤隆志、北野健:第37回日本比較内分泌学会大会(2012)
「メダカにおける副腎皮質ホルモン放出ホルモンの発現制御機構の解析」
- 23) 室積典和、中島良、平井敏朗、亀井保博、石川智子、藤堂剛、北野健:第37回日本比較内分泌学会大会(2012)「濾胞刺激ホルモン受容体の機能欠損メダカの表現型解析」
- 24) T. Kawabe and T. Kitano: 3rd GelK International Symposium, Kumamoto, Japan, 2013
“Developments of *in vitro* culture of primordial germ cells and cryopreservation of early embryos in medaka”
- 25) T. Uchikawa, H. Kobira and T. Kitano: 3rd GelK International Symposium, Kumamoto, Japan, 2013
“Analysis of follicle-stimulating hormone receptor (fshr)-GFP transgenic medaka”
- 26) T. Uchimura, Y. Hayashi, S. Tashiro, E. Shiraishi and T. Kitano: 3rd GelK International Symposium, Kumamoto, Japan, 2013
“Analysis of genes regulated by heat stress in medaka (*Oryzias latipes*)”
- 27) 内村友哉、田代真也、白石絵吏、矢澤隆志、北野健:平成25年度日本水産学会大会(2013)
「メダカ副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンの発現制御におけるHSPの関与」
- 28) 室積典和、中島良、平井敏朗、亀井保博、石川智子、藤堂剛、北野健:平成25年度日本水産学会大会(2013)「濾胞刺激ホルモン受容体の機能欠損はメダカ雌の性成熟を阻害する」
- 29) 乙木百合香、太田陽子、北野健、伊藤直樹、高橋計介、尾定誠:平成25年度日本水産学会大会(2013)
「ホタテガイにおけるエストロゲン受容体の発現様式と機能」
- 30) 川辺敏晃、江祐紀、白石絵吏、宮崎誠生、柳美穂、井上聖也、北野健:平成25年度日本水産学会大会(2013)「メダカ始原生殖細胞の体外培養法の検討」

7. 研究者略歴

課題代表者:北野 健

熊本大学大学院自然科学研究科卒業、博士(理学)、現在 熊本大学大学院自然科学研究科
准教授

研究参画者

(1):北野 健 (同上)

RF-1003 環境ストレスが及ぼす生物影響の評価手法の開発

(1) 環境ストレスが及ぼす生物影響の評価手法の開発

熊本大学 大学院自然科学研究科 理学専攻生命科学講座 北野 健

平成22～24年度累計予算額：14,089千円

(うち、平成24年度予算額：3,951千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

高温ストレスは、副腎から分泌されるコルチゾルの量を増加させてメダカの雄化を誘導することが明らかとなっている。このコルチゾル量の増加は、下垂体での副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の分泌により引き起こされ、ACTH量の増加は、視床下部での副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) により誘導される。したがって、視床下部内でCRHを制御する因子を解析することにより、環境ストレスと雄化との相互関係を解明でき、さらには環境ストレスが及ぼす生物影響も明らかにできるのではないかと考えられる。そこで、視床下部領域を緑色蛍光タンパク質 (GFP) 蛍光で可視化した *neurogenin3-GFP* トランスジェニック (Tg) メダカ系統を利用し、視床下部領域において高水温 (33° C) 処理により変化する遺伝子をDNAマイクロアレイ解析により探索した。その結果、コントロールと比較して発現量が10倍以上上昇した遺伝子は、メダカ44,000遺伝子中65遺伝子であり、その中には *heat shock protein 70 (hsp70)* 等が含まれていた。

次に、ストレス応答性の *in vivo* 評価系の確立を目指して、メダカ *hsp70* 遺伝子の発現を緑色蛍光タンパク質 (Venus) 蛍光で可視化した *hsp70-Venus* Tgメダカ系統を確立し、この系統における高温ストレスに対する応答性を解析した。その結果、通常水温 (26° C) 個体においては、Venus蛍光が全身では観察されず、レンズにおいてのみ確認された。一方、高水温処理個体においては、Venus蛍光がレンズだけでなく、頭部から尾部にかけて確認され、尾部においてはより強いVenus蛍光が観察された。さらに、酸性ストレス、コルチゾル、トリブチルスズオキシド等の処理個体においても、全身でVenus蛍光が観察された。このように、*hsp70-Venus* Tgメダカ系統は、高温ストレスだけでなく、様々な環境ストレスに対して強い応答性を示すことが分かった。このオリジナルなメダカ系統は、今まで調べられなかった環境水のストレス作用を総合的に評価するための大変優れた生物センサーとなりうると考えられる。

[キーワード]

ストレス、高温、コルチゾル、モニタリング、メダカ

1. はじめに

近年、多くの化学物質が及ぼす生物への影響メカニズムが明らかとなってきている。特に、

ビスフェノールAやノニルフェノール等のエストロゲン様物質については、生物の雌化を引き起こす分子機構等、多くの情報が蓄積されつつある¹⁾。一方、TBT(トリブチルスズ)のように、イボニシ²⁾やヒラメ³⁾の雄化を誘導する物質については、詳細な分子機構の全貌は未だに解明されていない。

課題代表者らは、魚類において、高水温飼育などの環境要因の影響が雄化を引き起こすことを明らかにしている⁴⁻⁷⁾。魚類は、化学物質処理などにより容易に性転換が誘導されるため、モニタリング生物としての有効性が知られている。その中でもメダカは、小型で飼育易く、ライフサイクルが短い上に、遺伝子導入などの機能解析システムが確立されているため、様々な基礎研究でのモデル生物として扱われており、多くの研究情報が集まっているというメリットを有している。

最近、課題代表者らは、高温ストレス等で誘導されるストレスホルモン(コルチゾル)が魚類の雄化を引き起こすことを初めて見出した⁸⁾。一方、ラットにおいては、TBTがコルチゾルの分泌を促進することも報告されている⁹⁾。このように、TBTなどの化学物質の作用の一つとして、ストレス誘起によるコルチゾル量増加の影響も無視できない可能性がある。そこで、すでに作製されたストレス応答性トランスジェニック(Tg)メダカ系統¹⁰⁾等を利用して、化学物質、ストレス、雄化の相互関係を明らかにするとともに、化学物質が保持する生物に対するストレス作用を評価するための新たな手法を確立することを目的としてこの研究を行う。

2. 研究開発目的

本研究では、すでに作製されたTgメダカの特徴を生かして、化学物質、ストレス、雄化等の生物影響の相互関係を明らかにして、化学物質が及ぼす生物のストレス作用の全貌を解明することを目的とする。さらに、この研究成果を生かして、様々な化学物質が保持する生物に対するストレス作用を評価するための新たな手法を確立する。年度ごとの具体的な研究テーマは以下の3つであり、これらの達成をめざして研究を実施する。

- (1) 高温ストレスが及ぼすストレス及び雄化誘導機構の解明
- (2) TBTが及ぼすストレス及び雄化誘導機構の解明
- (3) 化学物質が及ぼすストレス作用の評価手法の確立

3. 研究開発方法

(1) 高温ストレスが及ぼすストレス及び雄化誘導機構の解明

1) DNAマイクロアレイ解析を用いた高温ストレス応答遺伝子の探索

高温ストレスによるコルチゾル量の増加は、下垂体での副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の分泌により引き起こされ、ACTH量の増加は、視床下部での副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)により誘導されることが分かっている。したがって、視床下部内でCRHを制御する因子を解析することにより、高温ストレスと雄化との相互関係を明らかにできるのではないかと考えられる。そこで、視床下部領域を緑色蛍光タンパク質(GFP)蛍光で可視化した *nurogenin3(ngn3)-GFP* Tgメダカ系統(北野ら、未発表)を用いて、受精後0日目から受精後4日目まで高水温(33°C)または通常水温(26°C)処理したメダカ胚から視床下部領域を取り出し、これらをサンプルとしてDNAマイクロアレイ解

析を実施し、高温ストレスで変動する遺伝子を探索した。さらに、DNAマイクロアレイ解析において、高温処理により発現変動した遺伝子である *crh*、*heat shock protein 70-kDa (hsp70)*、*hsp30*、*keratin*、*choriolyisin H* に関しては、LightCycler 480 (Roche) を用いて定量的リアルタイムPCR解析により発現量の確認を行った。内部標準としては、*elongation factor-1 α (ef-1 α)* を用いた。PCRに使用したプライマーは表1のとおりであり、PCRの条件は、95°C5分間のインキュベート後、95°C10秒間の熱変性、59°C10秒間のアニーリング、72°C10秒間の伸長反応を45サイクル行った。

表1 定量的リアルタイムPCRに用いたプライマー

<i>ef-1α</i> (sense)	5' - TGAGATGGGCAGGGCTCCT -3'
<i>ef-1α</i> (antisense)	5' - GCTGGGTTGTAGCCGATCTT -3'
<i>hsp70</i> (sense)	5' - AAGCCGAGGACGAGCAGCA -3'
<i>hsp70</i> (antisense)	5' - TTGCAGACCTTCTCCAGCTC -3'
<i>hsp30</i> (sense)	5' - TCCTACTCTTACAGACTCCA -3'
<i>hsp30</i> (antisense)	5' - GATGTATTGGGAGTCTGCAC -3'
<i>crh</i> (sense)	5' - TGGTACCACCGTGATTCTGC -3'
<i>crh</i> (antisense)	5' - AAGCCGCTTAGAAGCGCTCT -3'
<i>keratin</i> (sense)	5' - CAGTCGTCCTCACAACCTC -3'
<i>keratin</i> (antisense)	5' - TACGAATATCTCCAGGTCAC -3'
<i>choriolyisin H</i> (sense)	5' - AGCTCTTGCTAGAAGGAGAC -3'
<i>choriolyisin H</i> (antisense)	5' - ATAGACAGCTCCTGTAGTCC -3'

2) *hsp70-Venus* Tgメダカにおける高温ストレス応答性の確認

ストレス応答性の *in vivo* 評価系の確立を目指して、メダカ *hsp70* 遺伝子の発現を緑色蛍光タンパク質 (*Venus*) 蛍光で可視化した *hsp70-Venus* Tgメダカ系統¹⁰⁾ を用い、この系統における高温ストレスに対する応答性を調査した。方法としては、受精後0日目から高水温処理を行い、受精後4日目 (Stage 33) 及び孵化0日目 (Stage 39) のメダカ胚における *Venus* 蛍光を蛍光実体顕微鏡 (Leica) 下で観察した。

3) 酸性ストレスが及ぼすメダカ性分化への影響

すでに作製した *hsp70* 遺伝子の発現を緑色蛍光タンパク質 (*Venus*) 蛍光で、生殖細胞を *DsRed* 蛍光で可視化した *hsp70-Venus/oIvas-DsRed* Tgメダカ系統¹⁰⁾ を用いて、受精後0日目から水温26°Cで酸性ストレス (pH5.4、pH4.4) 処理を行い、受精後9日目 (孵化後0日目) のメダカ胚での *Venus* 蛍光を蛍光実体顕微鏡下で観察した。また、酸性ストレス処理が及ぼすメダカ性分化への影響を解析するため、孵化後5日目において生殖細胞数の計数及び性分化関連遺伝子の発現をRT-PCRにより解析し

た。性分化関連遺伝子としては、メダカ性決定遺伝子 *dmy* に加えて、雄化マーカーである *gonadal soma-derived growth factor (gsdf)*、雌化マーカーである *follicle-stimulating hormone receptor (fshr)*、エストロゲン合成酵素遺伝子 (*cyp19a1*)、卵母細胞特異的遺伝子 (*42sp50*) を用いた。PCR に使用したプライマーは表2のとおりであり、PCRの条件は、95°C10分間のインキュベート後、95°C30秒間の熱変性、59°C30秒間のアニーリング、72°C60秒間の伸長反応を行った。

表2 RT-PCRに用いたプライマー

<i>ef-1α</i> (sense)	5' - TGAGATGGGCAGGGCTCCT -3'
<i>ef-1α</i> (antisense)	5' - GCTGGGTTGTAGCCGATCTT -3'
<i>fshr</i> (sense)	5' - GGTGGTAATGATACAGATGATGC -3'
<i>fshr</i> (antisense)	5' - AAGAGCCGAGGGAGGTTTGC -3'
<i>42sp50</i> (sense)	5' - CAACGTGGTCGTCATCGGTC -3'
<i>42sp50</i> (antisense)	5' - GGCTTCATACTCCCCTTTGG -3'
<i>cyp19a1</i> (sense)	5' - ATGGATCTGATCCCTGCTTG -3'
<i>cyp19a1</i> (antisense)	5' - GTCTGGTAAGAACGTCATG -3'
<i>gsdf</i> (sense)	5' - ATGTCTTTGGCACTCATTGTC -3'
<i>gsdf</i> (antisense)	5' - CTACTTTTTGCAGGGCTGCTG -3'
<i>dmy</i> (sense)	5' - GTCAAGGCAGAGTTTGAGAG -3'
<i>dmy</i> (antisense)	5' - CATTGTGACCAACATCTTCTG -3'

4) メダカにおけるHSPの役割

高温ストレス環境下のメダカにおける熱ショックタンパク質 (HSP) の役割を解明するため、*hsp70-Venus/olvas-DsRed* Tgメダカ系統を用いて、HSP発現阻害剤の影響を解析した。メダカ仔魚を孵化後0-5日目までHSP発現阻害剤で処理した後、孵化後5日目の仔魚における生残率を調査し、*Venus*発現を蛍光実体顕微鏡で観察した。また、*Venus*及び*hsp70* mRNAの発現量を解析するため、LightCycler 480を用いて定量的リアルタイムPCR解析を実施した。PCRに使用したプライマーは表3のとおりであり、PCRの条件は、95°C5分間のインキュベート後、95°C10秒間の熱変性、59°C10秒間のアニーリング、72°C10秒間の伸長反応を45サイクル行った。さらに、孵化後5日目の仔魚における生殖細胞数を計数した。

表3 定量的リアルタイムPCRに用いたプライマー

<i>ef-1α</i> (sense)	5' - TGAGATGGGCAGGGCTCCT -3'
<i>ef-1α</i> (antisense)	5' - GCTGGGTTGTAGCCGATCTT -3'
<i>hsp70</i> (sense)	5' - AAGCCGAGGACGAGCAGCA -3'
<i>hsp70</i> (antisense)	5' - TTGCAGACCTTCTCCAGCTC -3'

<i>Venus</i> (sense)	5' -AACGGCCACAAGTTCAGGGT-3'
<i>Venus</i> (antisense)	5' -GTCCTCCTTGAAGTCGATGC-3'

5) メダカ性分化におけるコルチゾルの影響

メダカ性分化において、高温ストレス及びコルチゾルが及ぼす生物影響を明らかにするため、まず、受精後0日目から孵化0日目までコルチゾル、高水温(33°C)、メチラポン(コルチゾル合成阻害剤)処理を行い、コルチゾルEIAキット(Cayman)を用いて孵化0日目のコルチゾル量を測定した。また、これらの処理による雄化への影響を把握するため、孵化2-3ヶ月後の成魚個体の性比調査を生殖腺の組織学的観察により行った。さらに、これら処理が及ぼすメダカ性分化への影響を詳細に解析するため、生殖細胞を赤色蛍光タンパク質(DsRed) 蛍光により可視化した *oIvas-DsRed Tg* メダカ系統¹¹⁾を用い、受精後4日目(性分化前)、孵化0日目(性分化時期)、孵化後5日目(性分化後)において生殖細胞数のカウントを行い、孵化0日目、孵化後5日目においては、性分化関連遺伝子の発現をRT-PCRにより解析した。性分化関連遺伝子としては、*dmy*、*gsdf*、*fshr*、*cyp19a1*、*42sp50*に加えて、*glucocorticoid receptor (gr)*、*Müllerian inhibiting substance (mis)*、*luteinizing hormone receptor (lhr)*を用いた。PCRに使用したプライマーは表4のとおりであり、PCRの条件は、95°C10分間のインキュベート後、95°C30秒間の熱変性、59°C30秒間のアニーリング、72°C60秒間の伸長反応を行った。

表4 RT-PCRに用いたプライマー

<i>ef-1α</i> (sense)	5' - TGAGATGGGCAGGGCTCCT -3'
<i>ef-1α</i> (antisense)	5' - GCTGGGTGTAGCCGATCTT -3'
<i>gr</i> (sense)	5' - ATGGATCAAGGGGAAGTGAAGC -3'
<i>gr</i> (antisense)	5' - TTAAGTGGAAAAGCTGGCAG -3'
<i>mis</i> (sense)	5' - GAGTCACTTCTGTGCCTTTC -3'
<i>mis</i> (antisense)	5' - CACATGGAAACATCCGACTC -3'
<i>fshr</i> (sense)	5' - GGTGGTAATGATACAGATGATGC -3'
<i>fshr</i> (antisense)	5' - AAGAGCCGAGGGAGGTTTGC -3'
<i>lhr</i> (sense)	5' - ACCGCATCACGGCCATACAG -3'
<i>lhr</i> (antisense)	5' - TTCCGCCAGGCTTTGTAACG -3'
<i>42sp50</i> (sense)	5' - CAACGTGGTCGTCATCGGTC -3'
<i>42sp50</i> (antisense)	5' - GGCTTCATACTCCCCTTTGG -3'
<i>cyp19a1</i> (sense)	5' - ATGGATCTGATCCCTGCTTG -3'
<i>cyp19a1</i> (antisense)	5' - GTCTGGTAAGAACGTCATG -3'
<i>gsdf</i> (sense)	5' - ATGTCTTTGGCACTCATTGTC -3'
<i>gsdf</i> (antisense)	5' - CTAAGTTTTGCAGGGCTGCTG -3'

<i>dmy</i> (sense)	5' - GTCAAGGCAGAGTTTGAGAG -3'
<i>dmy</i> (antisense)	5' - CATTGTGACCAACATCTTCTG -3'

6) 高温ストレスによるメダカの雄化機構

高温ストレスによるメダカ雄化の分子機構を明らかにするため、生殖細胞を赤色蛍光タンパク質 (DsRed) 蛍光により可視化した *olvas-DsRed* Tgメダカ系統を用いて、孵化後0日目から5日目(性分化後)まで、水温26°Cでコルチゾル (5×10^{-6} M)、エストラジオール-17 β (E2; 1×10^{-7} M) 処理、または33°C(高水温)でE2処理を行い、これらの処理による雄化の割合を、孵化約2ヶ月後の成魚個体の生殖腺の組織学的観察により調査した。また、これら処理が及ぼすメダカ性分化への影響を詳細に解析するため、孵化後5日目において生殖細胞数の計数及び性分化関連遺伝子の発現をRT-PCRにより解析した。性分化関連遺伝子としては、*dmy*、*gsdf*、*fshr*、*cyp19a1*、*42sp50*、*gr*、*mis*、*lhr*を用いた。PCRに使用したプライマーは表5のとおりであり、PCRの条件は、95°C10分間のインキュベート後、95°C30秒間の熱変性、59°C30秒間のアニーリング、72°C60秒間の伸長反応を行った。

表5 RT-PCRに用いたプライマー

<i>ef-1α</i> (sense)	5' - TGAGATGGGCAGGGCTCCT -3'
<i>ef-1α</i> (antisense)	5' - GCTGGGTTGTAGCCGATCTT -3'
<i>gr</i> (sense)	5' - ATGGATCAAGGGGAACGAAGC -3'
<i>gr</i> (antisense)	5' - TTAAGTGGAAAAGCTGGCAG -3'
<i>mis</i> (sense)	5' - GAGTCACTTCTGTGCCTTTC -3'
<i>mis</i> (antisense)	5' - CACATGGAAACATCCGACTC -3'
<i>fshr</i> (sense)	5' - GGTGGTAATGATACAGATGATGC -3'
<i>fshr</i> (antisense)	5' - AAGAGCCGAGGGAGGTTTGC -3'
<i>lhr</i> (sense)	5' - ACCGCATCACGGCCATACAG -3'
<i>lhr</i> (antisense)	5' - TTCCGCCAGGCTTTGTAACG -3'
<i>42sp50</i> (sense)	5' - CAACGTGGTCGTCATCGGTC -3'
<i>42sp50</i> (antisense)	5' - GGCTTCATACTCCCCTTGG -3'
<i>cyp19a1</i> (sense)	5' - ATGGATCTGATCCCTGCTTG -3'
<i>cyp19a1</i> (antisense)	5' - GTCTGGTAAGAACGTCATG -3'
<i>gsdf</i> (sense)	5' - ATGTCTTTGGCACTCATTGTC -3'
<i>gsdf</i> (antisense)	5' - CTAATTTTTGCAGGGCTGCTG -3'
<i>dmy</i> (sense)	5' - GTCAAGGCAGAGTTTGAGAG -3'
<i>dmy</i> (antisense)	5' - CATTGTGACCAACATCTTCTG -3'

7) 細胞増殖因子GSDFの過剰発現が及ぼすメダカ性分化への影響

高温ストレスがどのような分子機構で雄化を誘導するのかを解明するため、雄化に伴い発現量が増加する分泌性の細胞増殖因子GSDFの機能解析を行った。生殖腺体細胞特異的にGSDFを発現し、かつ生殖細胞をDsRedで可視化した*mis-gsdf/olvas-DsRed* Tgメダカ系統を作製し、その表現型解析を行った。表現型解析として、孵化後約2ヶ月間飼育したF2世代の成魚の生殖腺を組織学的に観察して性比を調査した。さらに、孵化後0日目の仔魚における生殖細胞数を計数し、孵化後0日目及び5日目の仔魚における性分化関連遺伝子の発現を定量的リアルタイムPCRにより解析した。PCRに使用したプライマーは表6のとおりであり、PCRの条件は、95°C5分間のインキュベート後、95°C10秒間の熱変性、59°C10秒間のアニーリング、72°C10秒間の伸長反応を45サイクル行った。

表6 定量的リアルタイムPCRに用いたプライマー

<i>ef-1α</i> (sense)	5' - TGAGATGGGCAGGGCTCCT -3'
<i>ef-1α</i> (antisense)	5' - GCTGGGTTGTAGCCGATCTT -3'
<i>dmy</i> (sense)	5' - GTCAAGGCAGAGTTTGAGAG -3'
<i>dmy</i> (antisense)	5' - CATTGTGACCAACATCTTCTG -3'
<i>gsdf</i> (sense)	5' - ATGTCTTTGGCACTCATTGTC -3'
<i>gsdf</i> (antisense)	5' - ACTGTCGCATGACACAGAGG -3'
<i>fshr</i> (sense)	5' - GGTGGTAATGATACAGATGATGC -3'
<i>fshr</i> (antisense)	5' - AAGAGCCGAGGGAGGTTTGC -3'

(2) TBTが及ぼすストレス作用とメダカ性分化への影響

トリブチルスズオキシド (TBTO) が及ぼす生物へのストレス影響を明らかにするため、*hsp70-Venus/olvas-DsRed* Tgメダカ系統を用いて、孵化後0日目からコルチゾルまたはTBTO処理を行い、孵化後0日目、1日目、5日目でのVenus蛍光を蛍光実体顕微鏡下で観察した。また、TBTO処理が及ぼすメダカ性分化への影響を解析するため、孵化後5日目において生殖細胞数の計数を行った。

(3) 化学物質が及ぼすストレス作用の評価

化学物質が及ぼす生物へのストレス影響を明らかにするため、*hsp70-Venus/olvas-DsRed* Tgメダカ系統を用いて、孵化後0日目から高温(33°C)、ジクロロボス (DDVP) (10^{-5} M)、ビスフェノールA (10^{-5} M) またはビスフェノールS (10^{-5} M) 処理を行い、処理後0日目、1日目、5日目での体全体のVenus蛍光を蛍光実体顕微鏡下で観察した。

4. 結果及び考察

(1) 高温ストレスが及ぼすストレス及び雄化誘導機構の解明

1) DNAマイクロアレイ解析を用いた高温ストレス応答遺伝子の探索

a メダカ視床下部における高温ストレス応答遺伝子の探索

視床下部領域をGFP蛍光で可視化した*ngn3-GFP* Tgメダカ系統(北野ら、未発表)を利用して、視床下部領域において高温ストレスにより変化する遺伝子をDNAマイクロアレイ解析により探索した。その結果、コントロールと比較して発現量が2倍以上上昇した遺伝子は、メダカ44,000遺伝子中2,512遺伝子、その内、10倍以上上昇した遺伝子は65遺伝子であり、その中には*hsp70*、*hsp30*等が含まれていた(図1a)。また、*crhl*については、発現量が約5倍上昇していることが確認された。

一方、コントロールと比較して発現量が1/2倍以下に減少した遺伝子は44,000遺伝子中1,981遺伝子、その内、1/10倍以下に減少した遺伝子は58遺伝子であり、その中には*keratin*、*choriolyisin H*等が含まれていた(図1b)

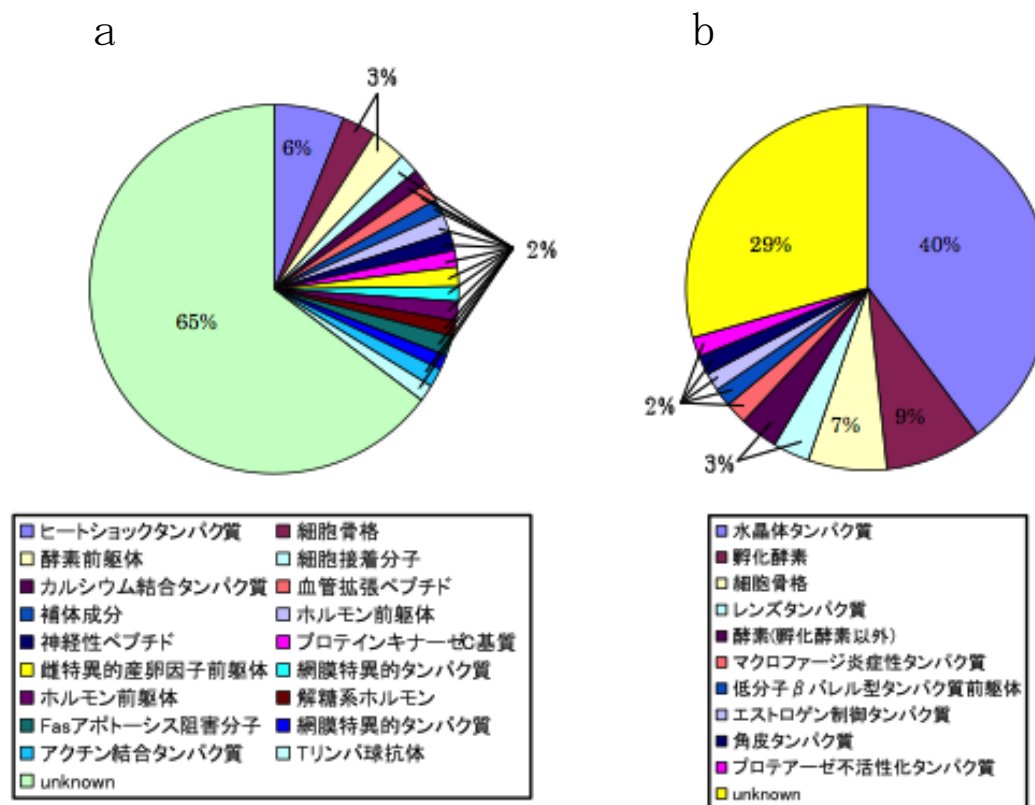


図1 DNAマイクロアレイ解析の結果

(a) 高水温処理により、コントロールと比較して発現量が10倍以上上昇した遺伝子

(b) 高水温処理により、コントロールと比較して発現量が1/10倍以下に減少した遺伝子

b メダカにおける高温ストレス応答遺伝子の定量的発現解析

DNAマイクロアレイ解析において、高温処理による発現変動が見出された *crh*、*hsp70*、*hsp30*、*keratin*、*choriolyisin H* 遺伝子に関して、定量的リアルタイムPCR解析を行った。その結果、高温処理個体における *crh*、*hsp70*、*hsp30* 遺伝子の発現は、コントロール個体と比較して4倍以上の誘導が観察された(図2)。一方、高温処理個体における *keratin*、*choriolyisin H* 遺伝子の発現は、コントロール個体と比較して1/10倍以下に減少していた(図2)。これらの発現パターンは、DNAマイクロアレイ解析の結果と同様であったことから、今回のDNAマイクロアレイ解析結果は、十分に信頼できると考えられた。

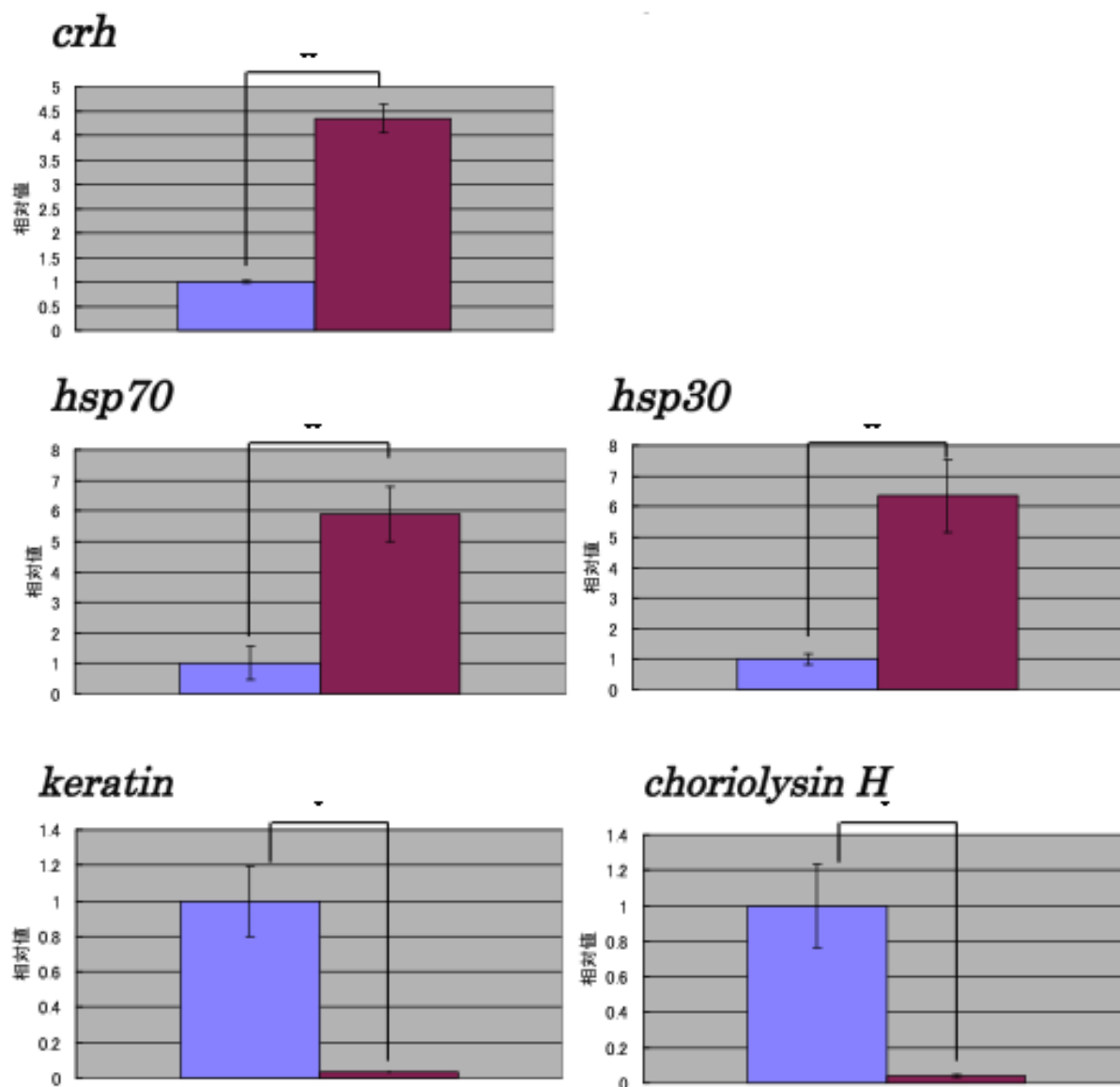


図2 定量的リアルタイムPCRの結果

■ : コントロール ■ : 高水温処理個体

(** : $p < 0.01$ 、* : $p < 0.05$)

2) *hsp70-Venus* Tgメダカにおける高温ストレス応答性の確認

hsp70-Venus TgメダカにおけるVenus蛍光を蛍光実体顕微鏡下で観察した結果、通常水温(26°C)で飼育したTg個体においては、Venus蛍光が全身では観察されず、レンズにおいてのみ確認された(図3a、a'、c、c')。一方、高水温処理したTg個体においては、Venus蛍光がレンズだけでなく、頭部から尾部にかけて確認され、尾部においてはより強いVenus蛍光が観察された(図3b、b'、d、d')。このように、*hsp70-Venus* Tgメダカ系統は、高温ストレスに対して強い応答性を示すことが確認された。

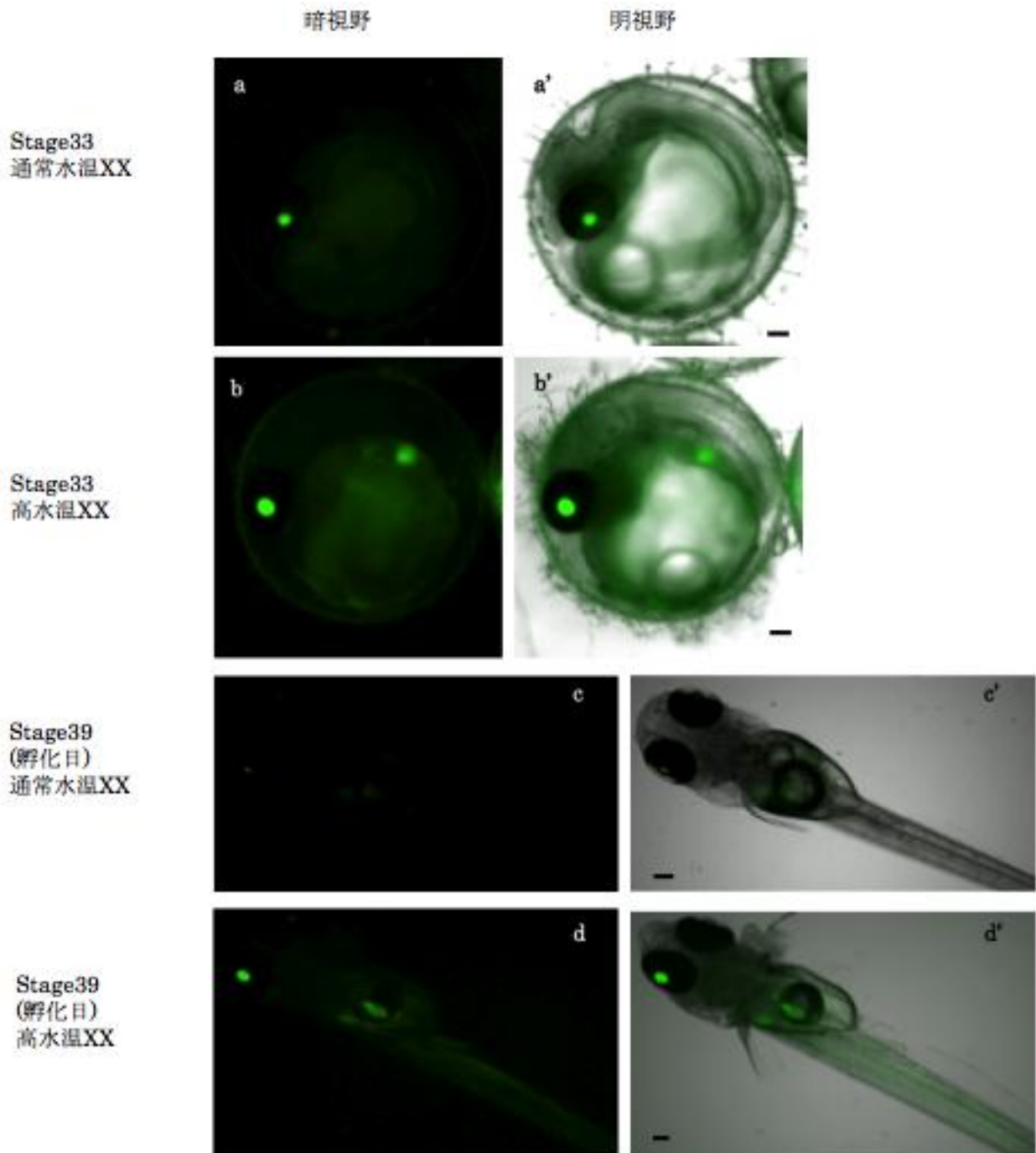


図3 実体蛍光顕微鏡下での *hsp70-Venus* Tg系統におけるVenus蛍光の観察

- (a) 26° C 飼育した XX 個体 (stage33)。レンズにおいて Venus 蛍光が確認された。
- (b) 33° C 飼育した XX 個体 (stage33)。全身及びレンズにおいて Venus 蛍光が確認された。尾部ではより強い蛍光が観察された。
- (c) 26° C 飼育した XX 個体 (孵化日)。レンズにおいて Venus 蛍光が確認された。
- (d) 33° C 飼育した XX 個体 (孵化日)。全身及びレンズにおいて Venus 蛍光が確認された。尾部ではより強い蛍光が観察された。 (スケールバー：100 μ m)

3) 酸性ストレスが及ぼすメダカ性分化への影響

高温以外の環境ストレスが及ぼす生物への影響を明らかにするため、酸性ストレスに着目して研究を行った。まず、*hsp70*の発現をVenus蛍光で可視化した*hsp70-Venus/olvas-DsRed* Tgメダカ系統¹⁰⁾を用い、この系統における酸性ストレスに対する応答性を解析した。方法としては、受精後0日目から酸性処理を行った受精後9日目のメダカ胚を使用し、実体蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、通常水 (pH7) で飼育した個体においては、Venus蛍光が全身では観察されず、レンズにおいてのみ確認された (図4a, b; 図5a)。一方、酸性水で飼育した個体においては、Venus蛍光がレンズだけでなく頭部から尾部にかけて確認され、尾部においてはより強いVenus蛍光が観察された (図4c, d, e, f; 図5b, c)。このように、*hsp70-Venus/olvas-DsRed* Tgメダカ系統は、高温ストレスだけでなく酸性ストレスに対しても強い応答性を示すことが確認された。

さらに、酸性ストレスが及ぼす生殖細胞数及び性分化関連遺伝子発現への影響を解析した。その結果、XY個体においては、酸性ストレスの影響が認められなかったが、XX個体においては、酸性ストレスにより生殖細胞数の有意な減少、卵母細胞マーカー*42sp50*発現の低下が観察され (図6a, b)、XX個体の雌化が抑制されている可能性が示唆された。今後は、これらが実際に雄化しているかどうかを確認する必要があると考えられる。

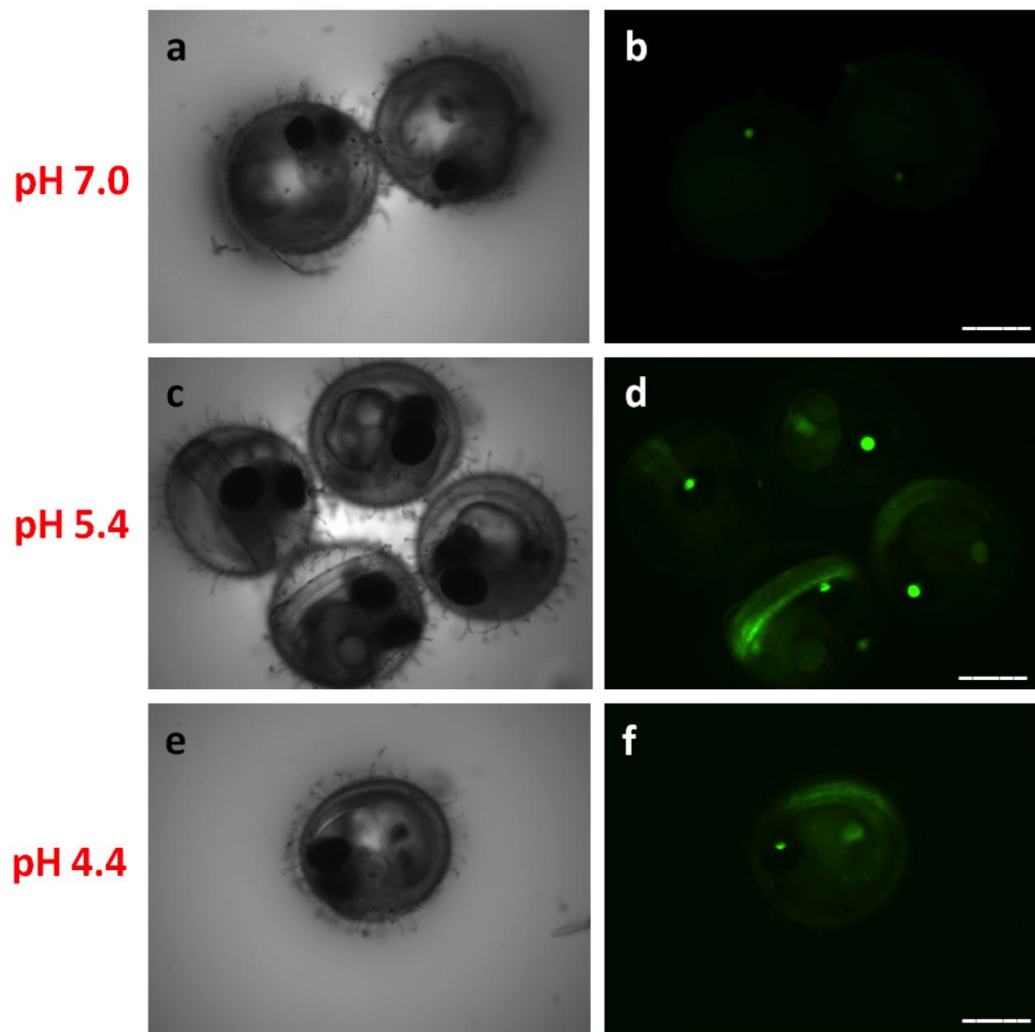


図4 *hsp70-Venus / olvas-DsRed* TgメダカにおけるVenus蛍光の観察

hsp70-Venus / olvas-DsRed Tgメダカにおいて、pH処理によるVenus発現を蛍光で観察した。a, bはpH 7で飼育したコントロールXX個体、c, dはpH 5.4で飼育したXX個体、e, fはpH 4.4で飼育したXX個体を、受精後9日目において実体蛍光顕微鏡下で観察したものである。a, c, eは明視野、b, d, fは蛍光下で観察した様子を示している。スケールバーは500 μ mを示す。

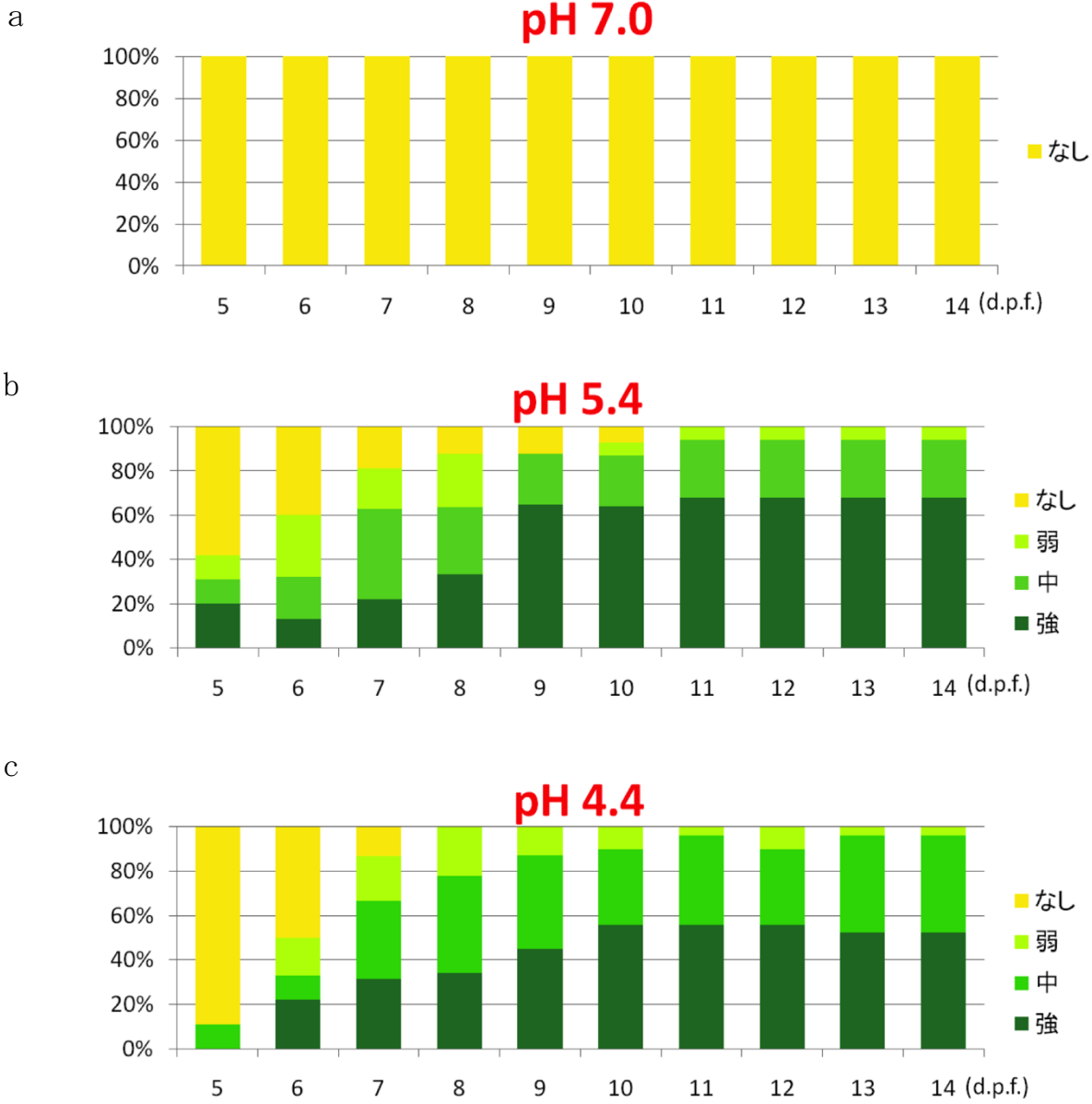


図5 *hsp70-Venus / olvas-DsRed* TgメダカにおけるVenus蛍光を持つ個体の割合
hsp70-Venus / olvas-DsRed Tgメダカにおいて、pH処理によりVenus蛍光を発現する個体の割合を調べた。aはpH 7で飼育したコントロールのメダカ胚の蛍光割合、bはpH 5.4で飼育したメダカ胚の蛍光割合、cはpH 4.4で飼育したメダカ胚の蛍光割合を示す。d. p. f. は、メダカ胚の受精後からの日数を表す。

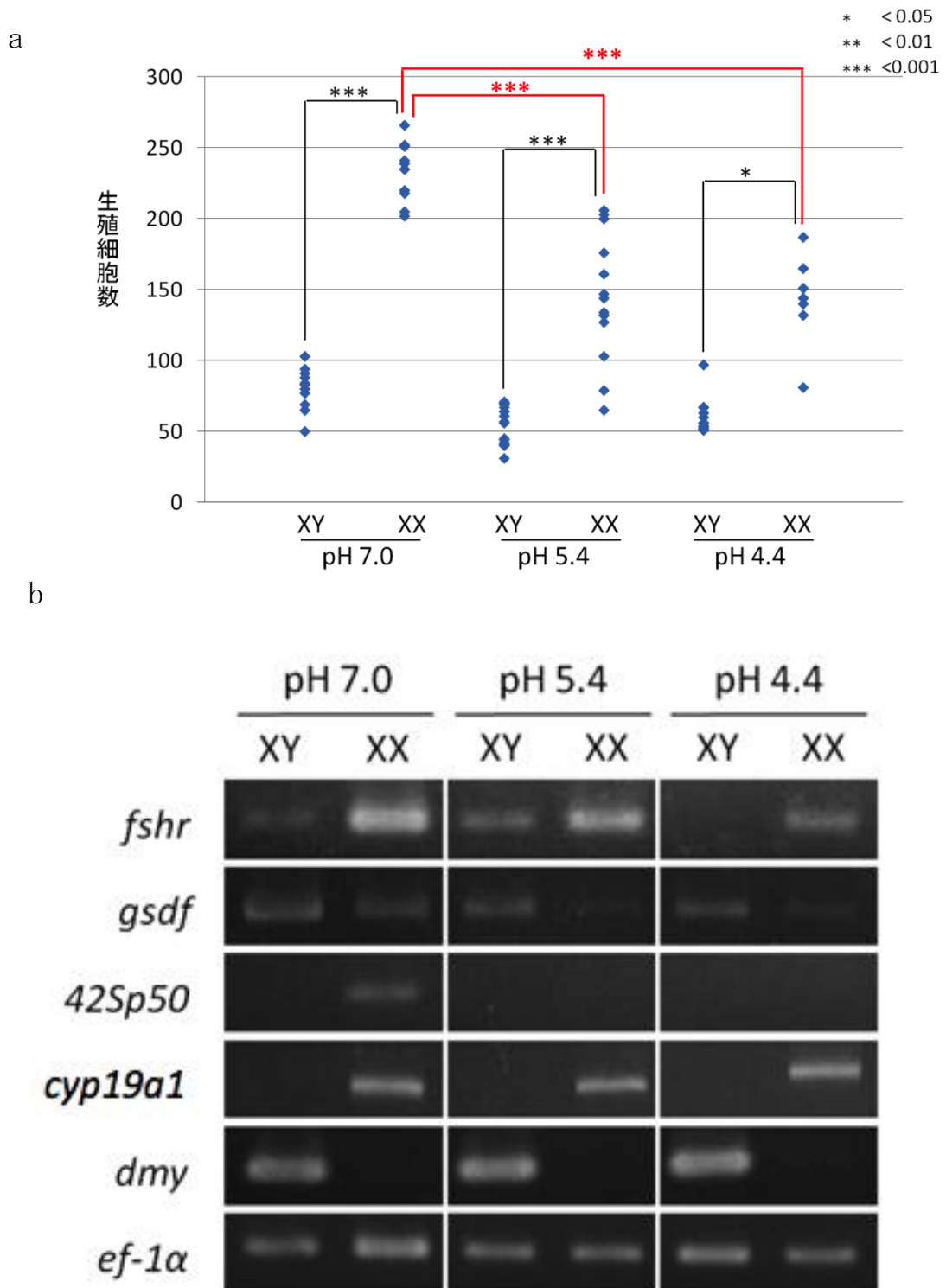


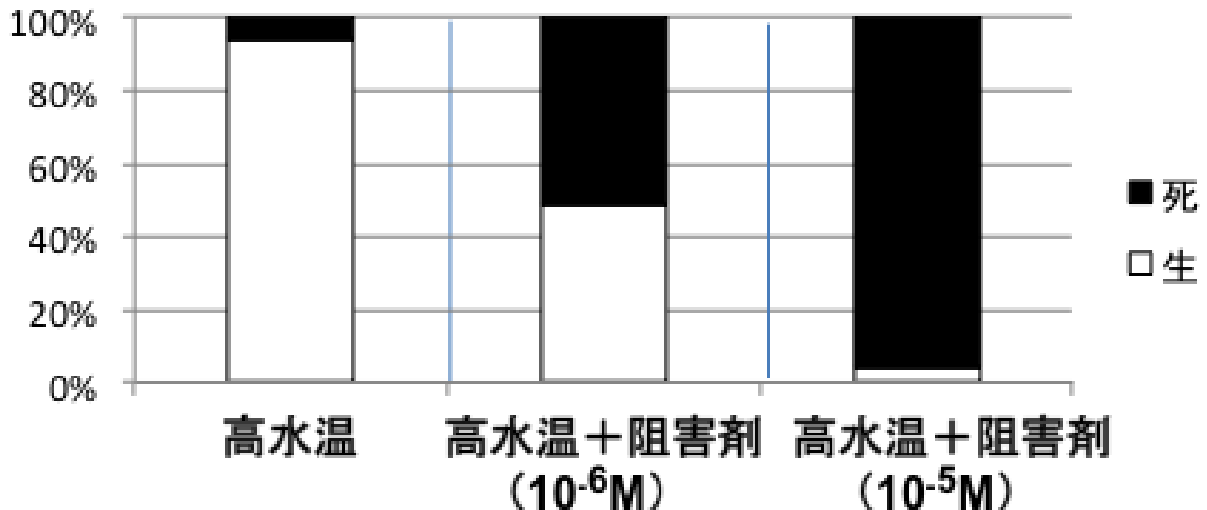
図6 酸性ストレスが及ぼす生殖細胞数(a)及び性分化関連遺伝子発現(b)への影響

孵化後5日目のメダカ仔魚を用いて、生殖細胞数の計数を行った。また、性分化関連遺伝子(*fshr*、*gsdf*、*42Sp50*、*cyp19a1*)の発現パターンをRT-PCRにより解析した。RT-PCRにおいては、XY個体のマーカーとして*dmy*を用い、内部標準として*ef-1α*を用いた。

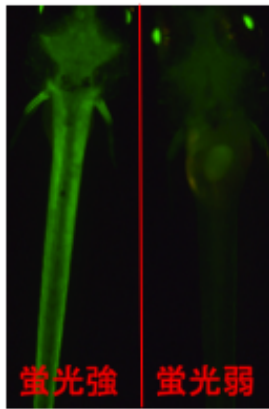
4) メダカにおけるHSPの役割

高温ストレスは、副腎から分泌されるコルチゾルの量を増加させてメダカの雄化を引き起こすことが明らかとなっている¹¹⁾。このコルチゾル量の増加は、下垂体での副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の分泌により引き起こされ、ACTH量の増加は、視床下部での副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) により誘導されることが分かっている。最近、我々は、DNAマイクロアレイ解析により、メダカ視床下部内で高温により誘導される因子としてHSP70やHSP30を同定している。そこで、高温ストレス環境下のメダカにおけるHSPの役割を解明するため、*hsp70-Venus/oIvas-DsRed Tg*メダカ系統を用いてHSP発現阻害剤の影響を解析した。その結果、HSP発現阻害剤の濃度依存的に生存率が減少した(図7a)。また、高温ストレス環境下のメダカにおけるHSP発現阻害剤の影響を調べたところ、影響には個体差が認められることが分かった(図7b, c, d)。さらに、性分化時期の生殖細胞数を計数した結果、高温処理したXX個体では、コントロールXX個体に比べて生殖細胞数が有意に減少していたが、高温処理下でHSP発現阻害剤を投与したXX個体においては、生殖細胞数の減少が抑制されていた(図7e)。一方、これらの処理と同時にコルチゾルを投与したXX個体では、コントロールXX個体に比べて生殖細胞数が有意に減少した(図7e)。これらのことから、高温ストレスによる生殖細胞数の減少は、HSPの発現上昇によるコルチゾル量の増加が原因である可能性が考えられた。

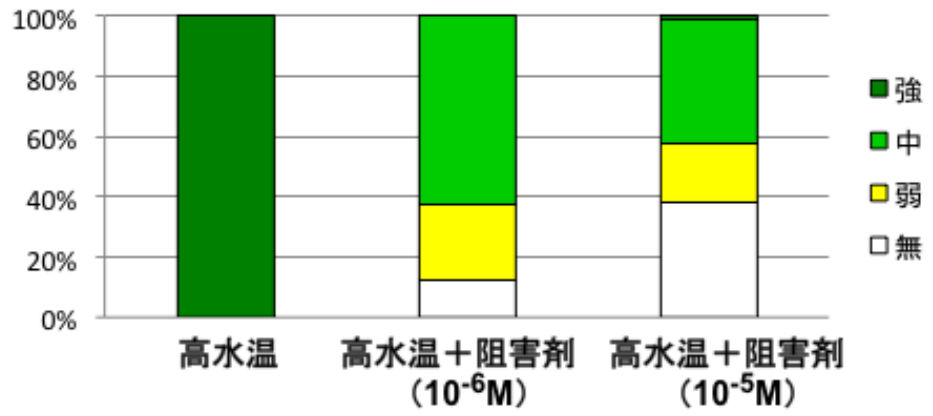
a



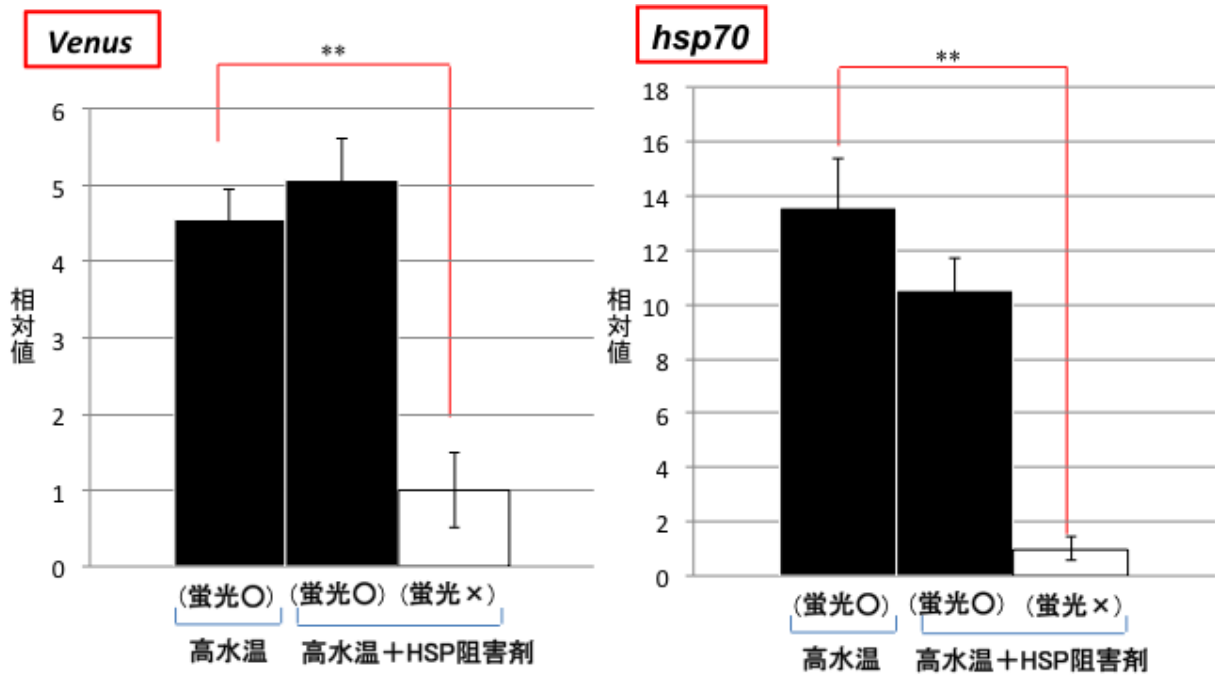
b



c



d



e

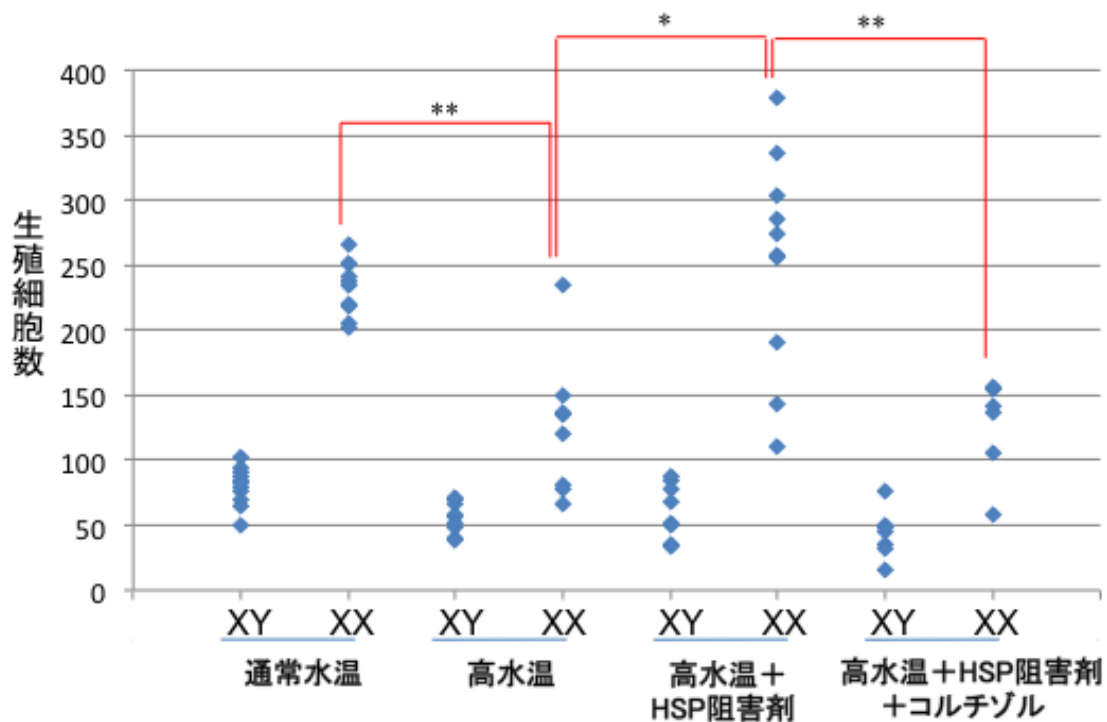


図7 *hsp70-Venus / olvas-DsRed* TgメダカにおけるHSP発現阻害剤の影響

孵化後0-5日目まで通常水温(26°C)または高水温(33°C)で飼育してHSP発現阻害剤処理を行い、孵化後5日目のメダカ仔魚を用いて生残率(a)、Venus蛍光(b, c)、*Venus*及び*hsp70* mRNAの発現パターン(d)、生殖細胞数(e)を調べた(**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$)。

5) メダカ性分化におけるコルチゾルの影響

a コルチゾル、高水温、メチラポン処理個体におけるコルチゾル量の測定

コルチゾル、高水温、メチラポン(コルチゾル合成阻害剤)処理がメダカ生体内のコルチゾル量に及ぼす影響を調べるため、受精後0日目から孵化0日目まで処理を行い、EIA法を用いて孵化0日目のコルチゾル量を測定した。その結果、コルチゾル(5×10^{-6} M)処理を行った個体のコルチゾル量は、コントロールと比較してXY個体で約18倍、XX個体で約15倍上昇していた(図8)。また、高水温処理によりXY個体、XX個体のコルチゾル量が有意に上昇することも確認できた。一方、高水温条件下でメチラポン(5×10^{-6} M)処理を行った結果、コルチゾル量は上昇せず、著しく低い値を示すことが分かった(図8)。

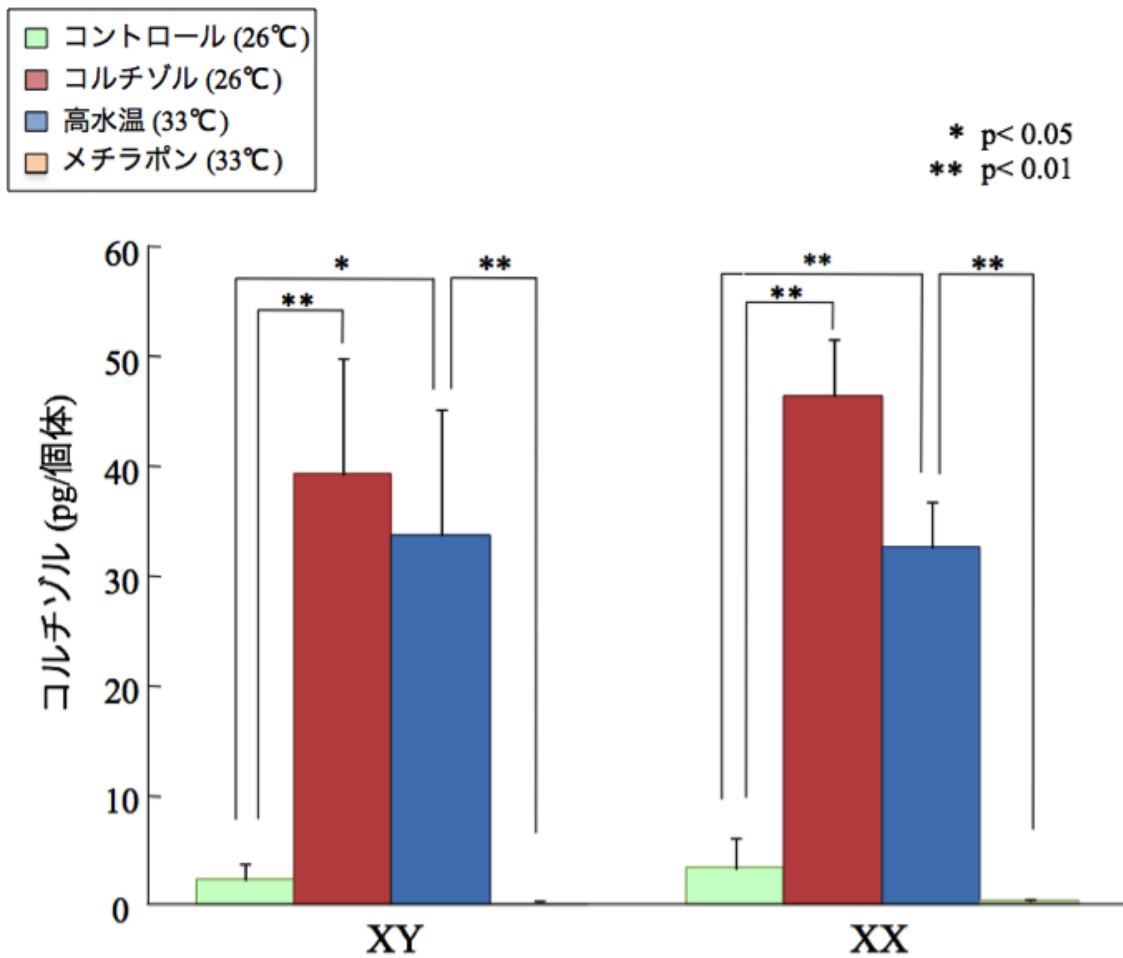


図8 メダカ生体内のコルチゾル量

受精後0日目から孵化0日目までコルチゾル処理、高水温処理、高水温条件下でメチラポン処理を行い、孵化0日目のコルチゾル量をEIA法により測定した。

b コルチゾル、高水温、メチラポン処理個体における性比調査

コルチゾルが高水温処理による雄化に関与しているかどうかを調べるために、受精後0日目から孵化後5日目までコルチゾル、高水温、メチラポン処理を行い、孵化2-3ヶ月後の成魚個体の組織学的観察により性比を調査した。その結果、コルチゾル処理個体では、25個体中12個体のXX個体で、コントロールXY個体と同様の精巣が観察され、約半数の個体が雄化していることが確認された(図9a、b、表7)。また、高水温処理個体では、12個体中3個体のXX個体が雄化していた(図9c、表1)。一方、高水温条件下でメチラポン処理したXX個体では、全てコントロールXX個体と同様の卵巣構造を持っていたことから(図9d、表7)、高水温条件下でのメチラポン処理により、雄化が抑制されることが分かった。このように、コルチゾルは高水温処理によるメダカの雄化に関与していることが明らかとなった。

表7 コルチゾル、高水温、メチラポン処理したメダカにおける性転換率

	XY♂	XY♀	XX♂	XX♀	性転換率 (雄化)
コントロール (26°C)	15	0	0	14	0%
コルチゾル (26°C)	17	0	12	13	48%
高水温 (33°C)	10	0	3	9	25%
メチラポン (33°C)	11	0	0	9	0%

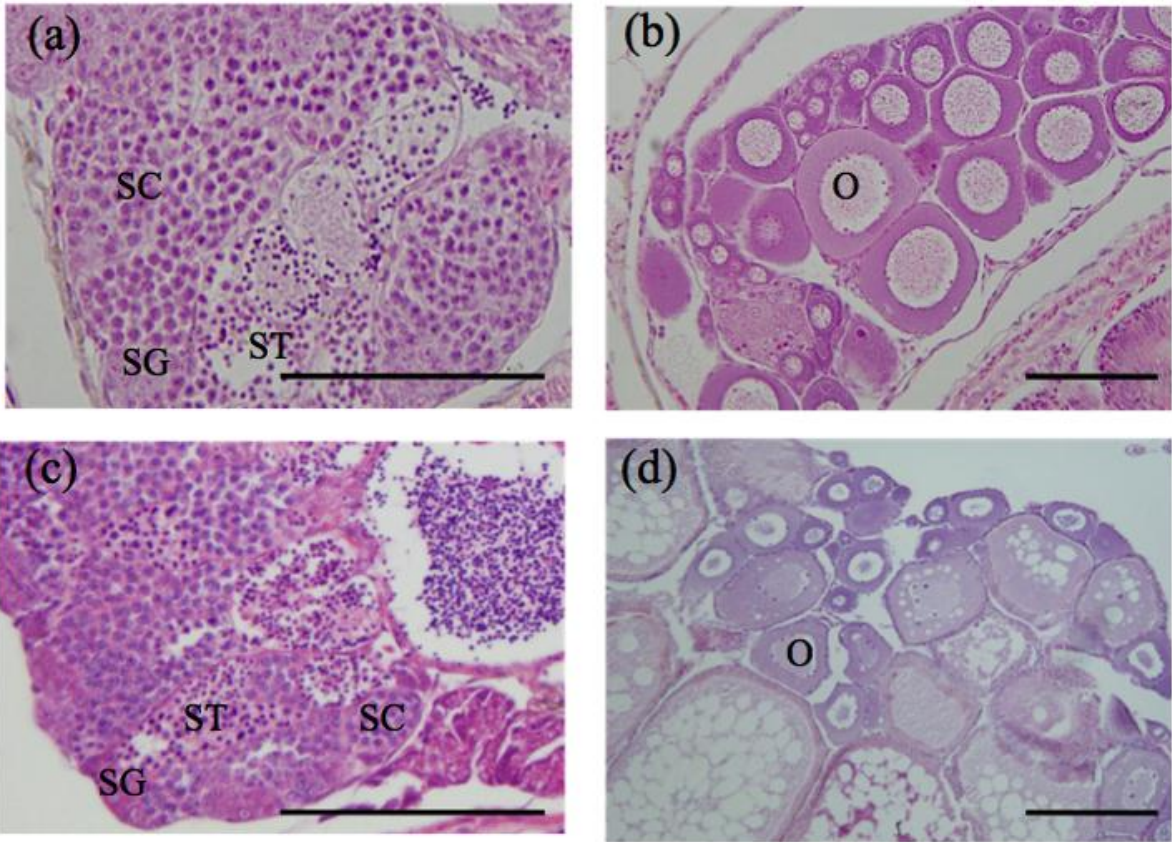


図9 高水温処理個体、メチラポン処理個体（処理後3ヶ月）における生殖腺の組織学的観察

(a) コントロールXY個体 (b) コントロールXX個体 (c) 高水温処理により性転換したXX個体
(d) 高水温条件下でメチラポン処理したXX個体

O, 卵母細胞 ; SG, 精原細胞 ; SC, 精母細胞 ; ST, 精細胞、スケールバーは100 μ mを示す。

c コルチゾル、高水温、メチラポンが及ぼす生殖細胞数への影響

生殖細胞をDsRed 蛍光により可視化した*oIvas-DsRed* Tgメダカ系統¹¹⁾を用いて、受精後0日からコルチゾル、高水温、メチラポン処理を行い、受精後4日目、孵化0日目、孵化後5日目においてそ

それぞれ生殖細胞数のカウントを行った。その結果、受精後4日目では、すべての処理のXY個体とXX個体との間で生殖細胞数に有意な差はなく、処理を行っても生殖細胞数に変化は見られなかった(図10)。一方、孵化0日目におけるコントロールXX個体は、コントロールXY個体に比べて約2倍の生殖細胞数を有していたが、コルチゾル処理を行うことで有意に生殖細胞数が少なくなり、XY個体と同程度の生殖細胞数を示すことが確認できた(図10)。また、高水温処理したXX個体でも、コントロールXX個体に比べて生殖細胞数の少ない個体が現れたが、高水温条件下でメチラポンを加えたXX個体では、すべてコントロールXX個体と同程度の生殖細胞数を示すようになり、生殖細胞数の少ない個体は観察されなかった。さらに、孵化後5日目においては、コントロールXX個体は、コントロールXY個体に比べて約3倍の生殖細胞数を有していたが、コルチゾル処理や高水温処理を行ったXX個体では、コントロールに比べて生殖細胞数の少ない個体が観察された(図10)。また、高水温条件下でメチラポン処理を行うと、ほぼすべてのXX個体がコントロールと同程度の生殖細胞数を示すようになり、生殖細胞数の少ない個体は観察されなかった。一方、XY個体については、孵化0日目、孵化後5日目まで処理を行っても生殖細胞数に著しい変化は認められなかった。このように、高温ストレスによるコルチゾル量の上昇は、メダカ性分化時期において、XX個体の生殖細胞の増殖を抑制している可能性が示唆された。

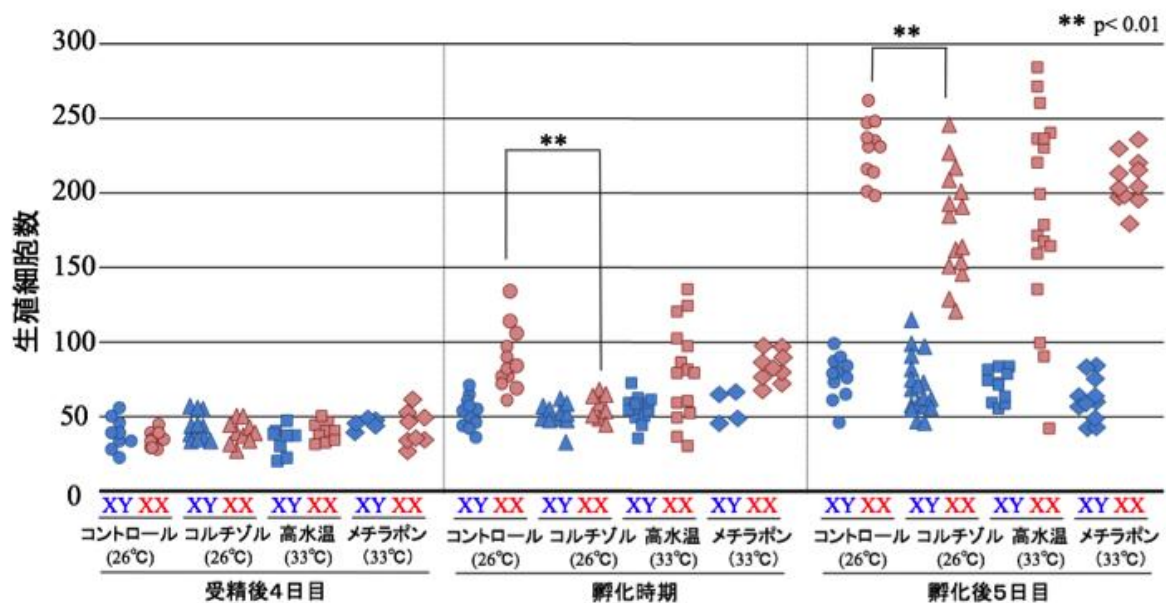


図10 コルチゾル、高水温、メチラポンが及ぼす生殖細胞数への影響

DsRed 蛍光により生殖細胞を可視化した *oIvas-DsRed Tg* メダカ系統を用いて、受精後0日からコルチゾル処理、高水温処理、高水温条件下でメチラポン処理を行い、受精後4日目、孵化0日目、孵化後5日目においてそれぞれ生殖細胞数のカウントを行った。

d コルチゾル、高水温、メチラポンが及ぼす性分化関連遺伝子発現への影響

コルチゾル、高水温、メチラポン処理が性分化関連遺伝子の発現へ与える影響を調べるため、孵化0日目、孵化後5日目において、それぞれの処理個体の生殖腺領域を用いてRT-PCRを行った。

その結果、まず、孵化0日目においては、グルココルチコイド受容体 *gr*、黄体形成ホルモン受容体 *lhr*、ミューラー管抑制因子 *mis* はXY個体、XX個体の両性で発現しており¹²⁾、どの処理を行ってもその発現に変化は認められなかった(図11)。一方、濾胞刺激ホルモン受容体 *fshr* mRNAは、XY個体よりXX個体で高い発現を示していたが、コルチゾル処理、高水温処理によりその発現がXX個体で抑制されることが確認された。また、高水温条件下でメチラポン処理を行うと、*fshr* mRNAの発現が回復することが分かった。さらに、生殖腺体細胞由来成長因子である *gsdf* mRNAは、XX個体よりもXY個体で高い発現をしており、処理を行ってもその発現に変化は見られなかった。

一方、孵化後5日目では、*gr*、*lhr*、*mis*、*dmy* mRNAの発現パターンは孵化時期と同様であり、処理を行ってもその発現に変化は認められなかった(図11)。一方、*fshr* mRNAは、孵化時期ではコルチゾル処理、高水温処理によりXX個体の発現が抑制されたが、孵化後5日目では処理を行ってもXX個体の発現は抑制されなかった。さらに、*gsdf* mRNAに関しては、コントロールXX個体よりもコントロールXY個体で高く発現していたが、コルチゾル処理や高水温処理を行うことでXX個体でも高い発現を示し、XY個体と同程度まで発現するようになった。一方、卵母細胞マーカーである *42sp50* mRNAやエストロゲン合成酵素である *cyp19a1* mRNAは、コントロールXX個体で特異的に発現していたが、コルチゾル処理や高水温処理によりその発現が抑制され、メチラポン処理により回復することが分かった。今後は、どの因子が高温ストレスによる雄化に関与しているかを詳細に解析する必要がある。

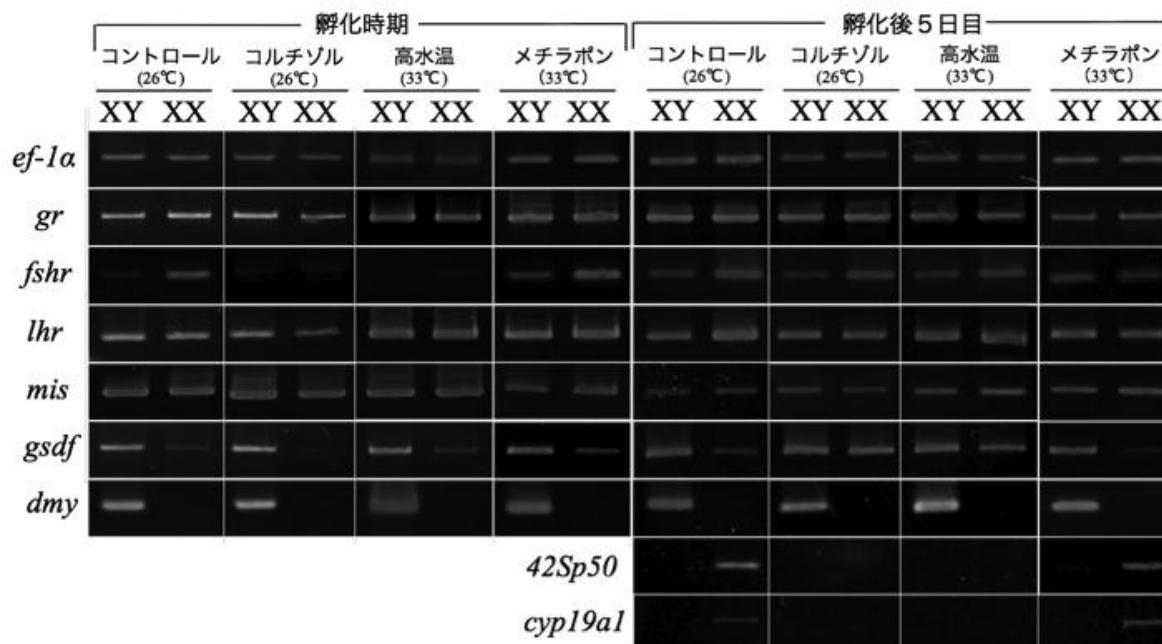


図11 コルチゾル、高水温、メチラポンが及ぼす性分化関連遺伝子への影響

受精後0日目からコルチゾル処理、高水温処理、高水温条件下でメチラポン処理を行い、孵化0日目、孵化後5日目において生殖腺領域を切り出してcDNA合成を行った。合成したcDNAを鋳型にPCRを行い、性分化関連遺伝子(*dmy*、*gr*、*fshr*、*lhr*、*mis*、*gsdf*、*42sp50*、*cyp19a1*)の発現への影響を解析した。内部標準として *ef-1α* を用いた。

6) 高温ストレスによるメダカの雄化機構

高温ストレスは、副腎から分泌されるコルチゾルの量を増加させてメダカの雄化を引き起こすことが明らかとなっている¹¹⁾。そこで、コルチゾルはどのような分子機構で雄化を誘導するのかを解明するため、メダカ性分化時期の生殖細胞数及び性分化関連遺伝子の発現パターンを調べた。その結果、高温ストレスまたはコルチゾル処理したXX個体では、コントロールXX個体に比べて生殖細胞数が有意に減少しているのに対し、これらの処理下でエストロゲン(E2)を投与したXX個体においては、生殖細胞数の減少が抑制されていた(図12a)。一方、高温ストレスまたはコルチゾル処理したXX個体では、エストロゲン合成酵素 *cyp19a1* や卵母細胞マーカー *42sp50* の発現が抑制されていたが、これらの処理下でE2を投与したXX個体においては、これらの発現が回復していた(図12b)。さらに、メダカ成魚での性比を調べたところ、これらの処理下でE2を投与したXX個体においては、完全に雄化が抑制されていることが明らかとなった(表8)。これらのことから、高温ストレスまたはコルチゾル処理によるメダカの雄化は、*cyp19a1* 発現の抑制によるエストロゲン量の減少が原因であると考えられた。

表8 成魚生殖腺の組織学的観察による性比調査結果

	No. of adult fish				% of XX sex-reversal
	XY ♂	XY ♀	XX ♂	XX ♀	
Control (26°C)	15	0	0	14	0
Cortisol (26°C)	9	0	24	6	80
Cortisol (GC<150)	—	—	10	0	100
Cortisol (GC>200)	—	—	8	4	67
Cortisol+E2 (26°C)	8	0	0	5	0
HT (33°C)	8	0	3	12	20
HT+E2 (33°C)	12	0	0	8	0
E2 (26°C)	9	0	0	10	0

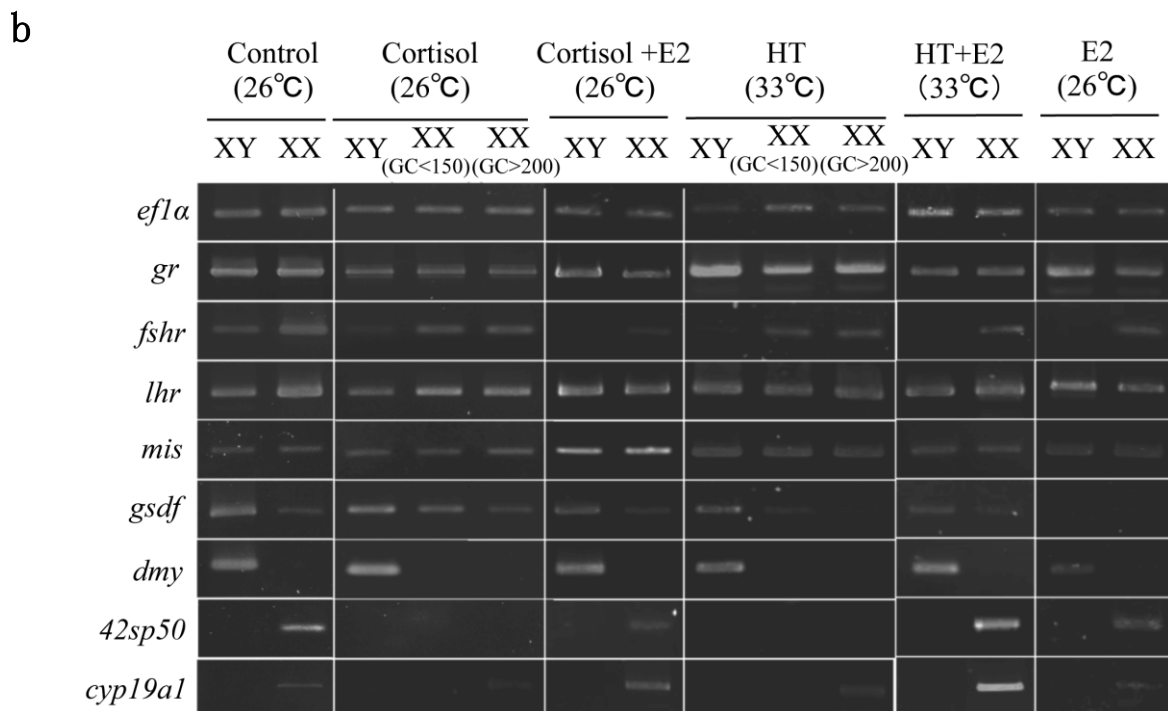
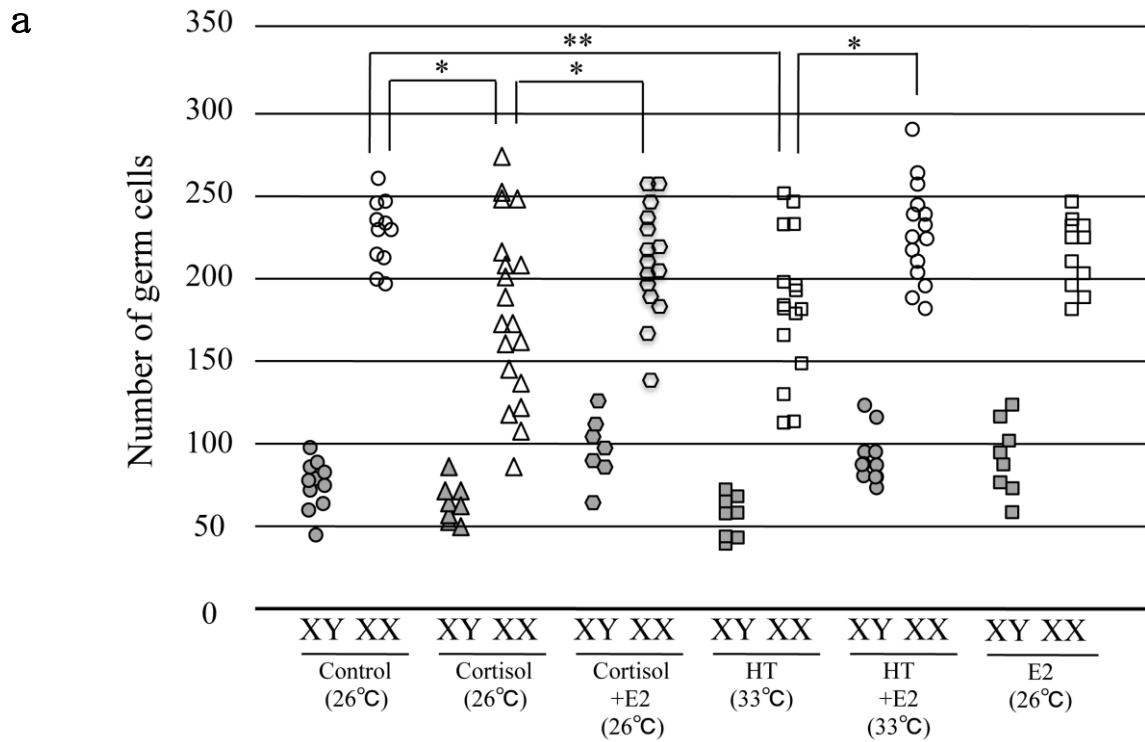


図12 高温ストレスが及ぼす生殖細胞数(a)及び性分化関連遺伝子発現(b)への影響

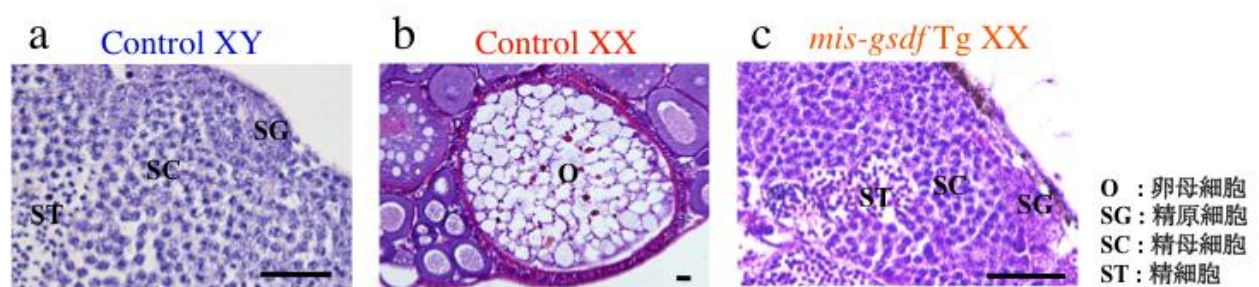
孵化後5日目のメダカ仔魚を用いて、生殖細胞数の計数を行った。また、いくつかの性分化関連遺伝子の発現パターンをRT-PCRにより解析した。HTは高水温処理、GCは生殖細胞数を示す。

7) 細胞増殖因子GSDFの過剰発現が及ぼすメダカ性分化への影響

高温ストレスがどのような分子機構で雄化を誘導するのかを解明するため、雄化に伴い発現量が増加する細胞増殖因子GSDFの機能解析を行った。生殖腺体細胞特異的にGSDFを発現し、かつ生殖細胞を赤色蛍光(DsRed)で可視化できる*mis-gsdf/olvas-DsRed* Tgメダカ系統を作製し、その表現型解析を行った。その結果、F2世代のXX個体は、すべてが雄化していることが明らかとなった(表9)。また、生殖腺の組織学的観察を行ったところ、Tg XX個体は、コントロールXY個体と同様の精巢を持っていることが分かった(図13)。さらに、生殖細胞数及び性分化関連遺伝子の発現パターンを調べた結果、Tg XX個体は、コントロールXY個体と同様に、コントロールXX個体と比べて生殖細胞数及び*fshr* mRNAの発現量が減少していることが明らかとなった(図14)。このように、本研究において、GSDFがメダカの雄化を誘導することを初めて証明できたことから、今後は、このGSDFを雄化誘導マーカーとして利用していきたいと考えている。

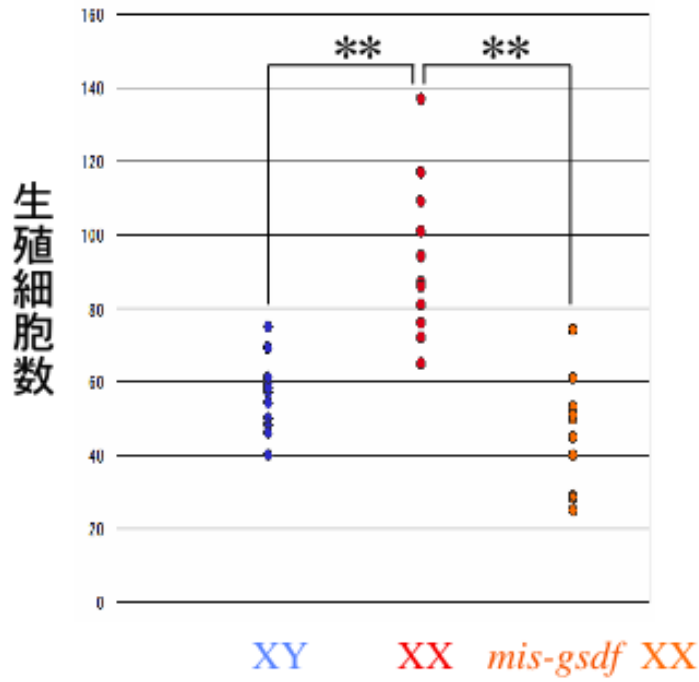
表9 成魚生殖腺の組織学的観察による性比調査結果

	XY♂	XY♀	XX♂	XX♀	Percentage of XX sex-reversal
Control メダカ	15	0	0	14	0%
<i>mis-gsdf</i> Tg メダカ	0	0	11	0	100%

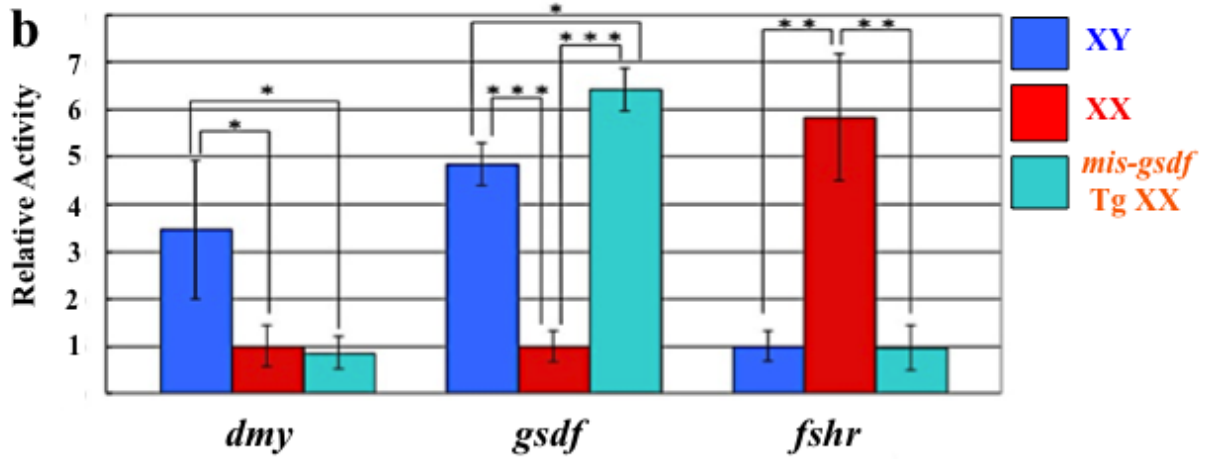
図13 *mis-gsdf* / *olvas-DsRed* Tgメダカの生殖腺の組織学的観察

Control XY (a)、Control XX (b)、*mis-gsdf* Tg メダカ (c)の生殖腺の切片を作製してヘマトキシリン・エオシン染色を行った。スケールバーは100 μ mを示す。

a



b



c

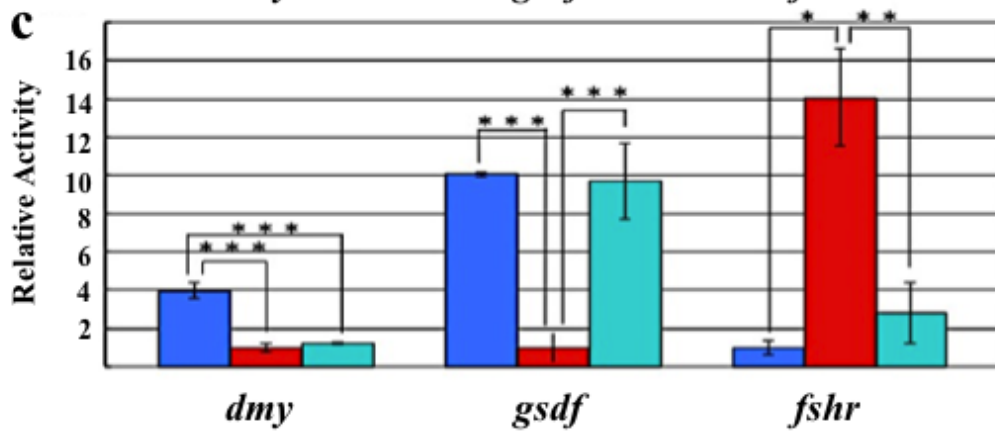
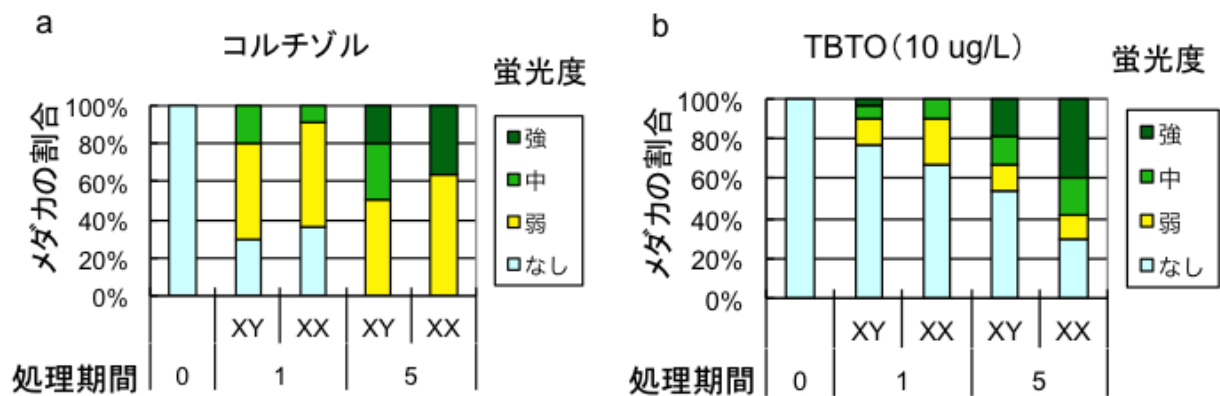


図14 GSDF過剰発現が及ぼす生殖細胞数及び性分化関連遺伝子発現への影響

孵化後0日目のメダカ仔魚を用いて、生殖細胞数の計数(a)を行った。また、孵化後0日目(b)及び5日目(c)のメダカ仔魚を用いて、性分化関連遺伝子(*dmy*、*gsdf*、*fshr*)の発現パターンをリアルタイムPCRにより解析した(***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$)。内部標準として*ef-1 α* を用いた。

(2) TBTが及ぼすストレス作用とメダカ性分化への影響

TBT0が及ぼす生物へのストレス影響を明らかにするため、*hsp70-Venus/olvas-DsRed* Tgメダカ系統を用いて孵化後0日目からコルチゾルまたはTBT0処理を行い、孵化後0日目、1日目、5日目のVenus蛍光を観察した。その結果、両処理ともに、処理期間が長くなるにつれてVenus蛍光を持つ個体が増える傾向が認められた(図15a, b)。次に、TBT0が及ぼす生殖細胞数への影響を解析したところ、XY個体においては、TBT0処理の影響は認められなかったが、XX個体においては、コントロールXX個体と比べて生殖細胞数が有意に減少し、XX個体の雌化が抑制されている可能性が示唆された(図15c)。TBT0は、イボニシ²⁾やヒラメ³⁾の雄化を誘導することがすでに報告されていることから、今後、これらXX個体が実際に雄化しているかどうかを確認する必要があると考えられる。



c

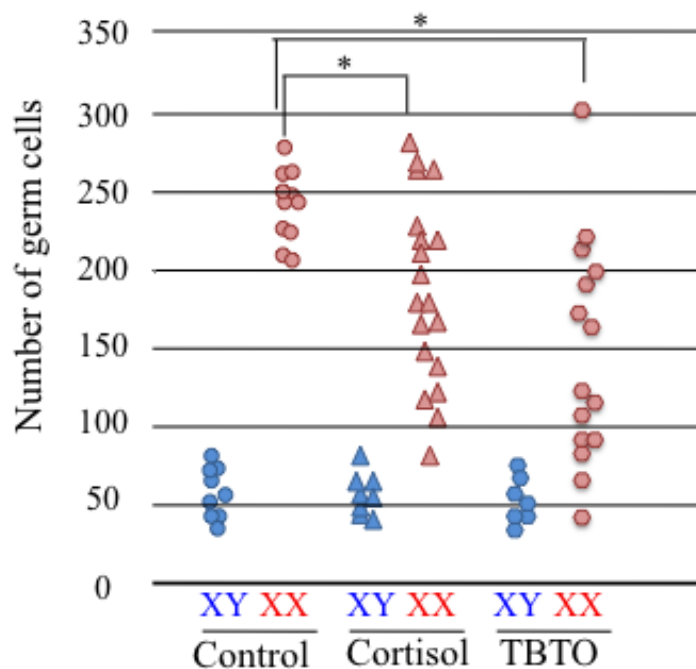


図15 TBTO及びコルチゾルが及ぼすストレス作用(a, b)と生殖細胞数(c)への影響

hsp70-Venus / olvas-DsRed Tgメダカの孵化仔魚を用いて、コルチゾルまたはTBTO処理を行い、体全体のVenus蛍光を観察すると同時に、孵化後5日目のメダカ仔魚の生殖細胞数を計数した。

(3) 化学物質が及ぼすストレス作用の評価

化学物質が及ぼす生物へのストレス影響を明らかにするため、*hsp70-Venus/olvas-DsRed* Tgメダカ系統を用いて孵化後0日目から高温(33℃)、DDVP(10⁻⁵M)、ビスフェノールA(10⁻⁵M)またはビスフェノールS(10⁻⁵M)処理を行い、処理後0日目、1日目、5日目での体全体のVenus蛍光を観察した。その結果、高温処理では、処理後1日目からほとんどの個体で強い蛍光が観察された(図16a)。一方、化学物質処理においても処理後1日目から蛍光を持つ個体が観察され(図16b, c, d)、ビスフェノールA処理ではより多くの個体で強い蛍光が認められた(図16c)。このように、エストロゲン様物質として知られているビスフェノールAにおいては、メダカに対してストレス作用も有していることが初めて明らかとなった。また、有害化学物質であるDDVPやビスフェノールSにおいても、弱いストレス作用があることが示唆された。今後は、これらの化学物質がどのようなメカニズムでストレス作用を誘起しているのか調べる必要がある。

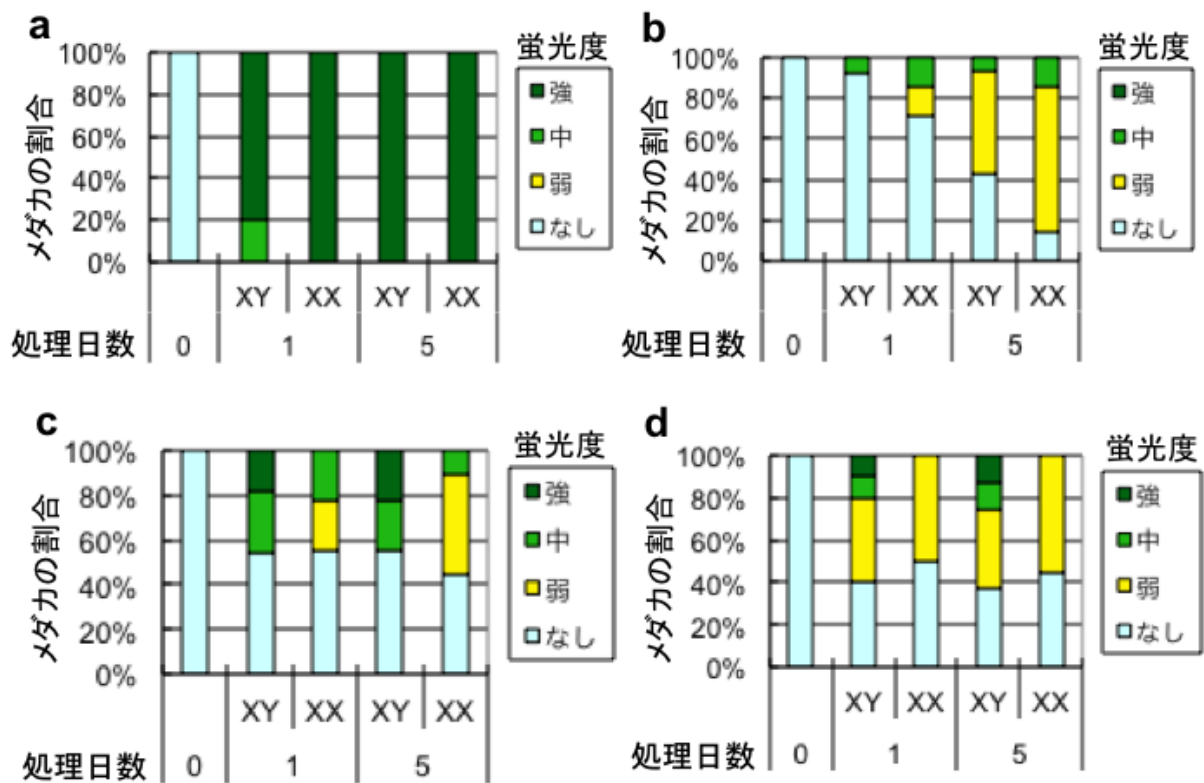


図16 高温及び化学物質が及ぼすストレス作用

hsp70-Venus / *olvas-DsRed* Tgメダカの孵化仔魚を用いて、高温(a)、DDVP(b)、ビスフェノールA(c)またはビスフェノールS処理(d)を行い、体全体のVenus蛍光を観察した。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

課題代表者らは、高温ストレスによる雄化にはコルチゾルというステロイドホルモンが深く関与していることを初めて証明し、この基礎的研究での発見を足がかりとして、DNAマイクロアレイ解析等を駆使してコルチゾル誘導因子(HSP70等)や雄化誘導因子(GSDF等)を見出した。また、これら因子を使ってストレス応答性の *in vivo* 評価系である *hsp70-Venus* Tgメダカ系統の確立に成功した。このオリジナルなメダカ系統は、今まで調べられなかった環境水のストレス作用を総合的に評価するための大変優れた生物センサーであると考えられる。さらに課題代表者らは、基礎的研究として、すでに単離したコルチゾル誘導因子や雄化誘導因子の機能解析にも着手し、新規な生理的機能を解明することができた。これらの成果は、生物が普遍的に保持している新たな仕組みの発見にも繋がる可能性を十分秘めているため、さらなる研究の発展が期待される場所である。このように、課題代表者らは基礎から応用まで幅広く研究成果を挙げる事ができた。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究の進展により、化学物質の新たなストレス作用を発見することができた。今後は、この確立したストレス応答性Tgメダカシステムを用いて、より多くの化学物質を調査する必要がある。さらに、この生物センサーは、実際の環境水に存在する複数の化学物質の複合ストレス作用を簡便に高感度で評価できる可能性を秘めており、今後の環境ストレス調査に利用できるのではないかと考えられる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) Y. Hayashi, H. Kobira, T. Yamaguchi, E. Shiraishi, T. Yazawa, T. Hirai, Y. Kamei and T. Kitano: Molecular Reproduction and Development, 77, 679-686 (2010)
“High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol”
- 2) T. Yamaguchi and T. Kitano: Biochemical and Biophysical Research Communications, 419, 287-292 (2012) “High temperature induces *cyp26b1* mRNA expression and delays meiotic initiation of germ cells by increasing cortisol levels during gonadal sex differentiation in Japanese flounder”
- 3) T. Kitano, Y. Hayashi, E. Shiraishi and Y. Kamei: Molecular Reproduction and Development, 79, 719-726 (2012) “Estrogen rescues masculinization of genetically female medaka by exposure to cortisol or high temperature”

<査読付論文に準ずる成果発表> (「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可。)

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) T. Uchikawa, H. Kobira, T. Hirai and T. Kitano: 第43回日本発生生物学会大会(2010)
“Regulatory mechanism of follicle-stimulating hormone receptor expression in medaka (*Oryzias latipes*)”
- 2) T. Uchimura, Y. Hayashi, E. Shiraishi and T. Kitano: 第43回日本発生生物学会大会(2010)

- “Gene expression profiling induced by high temperature treatment in medaka (*Oryzias latipes*)”
- 3) E. Shiraishi, D.K. Kang, T. Kitano, S. Nakamitsu, H. Hosseini and H. Akiyama: 7th International Bioelectrics Symposium, USA, 2010
“Effects of pulsed powers on the embryonic development in medaka (*Oryzias latipes*)”
 - 4) T. Kitano: The 4th Bilateral Seminar Japan-Italy: Physical and Chemical Impacts on Marine Organisms, Nagoya, Japan, 2010 (招待講演)
“Molecular mechanism of environmental sex determination in fish”
 - 5) 亀井保博、浦和博子、木村英二、出口友則、伊藤真理子、北野健、尾田正二等：第33回日本分子生物学会年会(2010)
「赤外レーザーによる遺伝子発現システム (IR-LEGO) の様々なモデル生物への応用」
 - 6) 小幡晋平、関大亮、北野健、斉藤寿仁. : 第33回日本分子生物学会年会(2010)
「メダカSenp1酵素活性部位のHeLa細胞における過剰発現系の解析」
 - 7) 林裕輝、白石絵吏、北野健：平成23年度日本水産学会大会(2011)
「メダカの温度依存性性決定におけるエストロゲンの関与」
 - 8) 内村友哉、林裕輝、田代真也、白石絵吏、北野健：平成23年度日本水産学会大会(2011)
「メダカにおいて高水温により発現変動する遺伝子の解析」
 - 9) T. Kitano, Y. Hayashi, T. Yamaguchi and E. Shiraishi : 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, India, 2011
“High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol level”
 - 10) T. Uchikawa, H. Kobira, T. Hirai and T. Kitano : 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, India, 2011
“Analysis of regulational mechanism of follicle-stimulating hormone receptor (*fshr*) expression using *fshr-GFP* transgenic medaka”
 - 11) T. Uchimura, Y. Hayashi, S. Tashiro, E. Shiraishi and T. Kitano : 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, India, 2011
“Analysis of genes regulated by high temperature in medaka”
 - 12) 北野健：平成23年度温熱生理研究会(2011) 「温度依存性性決定の分子メカニズム」
 - 13) 北野健、林裕輝、白石絵吏：第36回日本比較内分泌学会大会(2011)
「コルチゾルは高温によるメダカの雄化に関与する」
 - 14) 木寺智則、白石絵吏、松田勝、井尻成保、北野健：第36回日本比較内分泌学会大会(2011)
「メダカにおけるGonadal Soma-Derived Factor (GSDF) の機能解析」
 - 15) 亀井保博、浦和博子、山本和彦、金子拓也、木村英二、出口友則、弓場俊輔、北野健、尾田正二等：第34回日本分子生物学会年会(2011)
「赤外レーザーによる遺伝子発現システム (IR-LEGO) の様々なモデル生物への応用」
 - 16) S. Ansai, Y. Gou, T. Kitano, H. Ochiai, Y. Kamei, T. Yamamoto and M. Kinoshita : 第34回日本分子生物学会年会(2011)
“Targeted gene disruption in medaka using zinc-finger nucleases-knock out of GFP gene”
 - 17) 内川拓、小平博史、平井俊朗、北野健：平成24年度日本水産学会大会(2012)
「メダカ濾胞刺激ホルモン受容体の発現制御機構の解析」
 - 18) 木寺智則、内川拓、松田勝、井尻成保、北野健：平成24年度日本水産学会大会(2012)
「GSDF(gonadal soma-derived growth factor)はメダカ遺伝的雌の雄化を引き起こす」
 - 19) 山口寿哉、平井俊朗、北野健：平成24年度日本水産学会大会(2012)
「高水温によるcsf-1受容体の発現誘導とコルチゾルとの関係」
 - 20) E. Shiraishi, H. Hosseini, D.K. Kang, T. Kitano and H. Akiyama: Bioelectrics 2012, Kumamoto, Japan, 2012
“Effects of nanosecond pulsed power on gene expression in medaka”
 - 21) 北野健：第37回日本比較内分泌学会大会シンポジウム(2012)
「魚類における温度依存性性決定の分子機構」
 - 22) 内村友哉、田代真也、矢澤隆志、北野健：第37回日本比較内分泌学会大会(2012)

- 「メダカにおける副腎皮質ホルモン放出ホルモンの発現制御機構の解析」
- 23) 室積典和、中島良、平井敏朗、亀井保博、石川智子、藤堂剛、北野健：第37回日本比較内分泌学会大会(2012) 「濾胞刺激ホルモン受容体の機能欠損メダカの表現型解析」
- 24) T. Kawabe and T. Kitano: 3rd GelK International Symposium, Kumamoto, Japan, 2013
“Developments of *in vitro* culture of primordial germ cells and cryopreservation of early embryos in medaka”
- 25) T. Uchikawa, H. Kobira and T. Kitano: 3rd GelK International Symposium, Kumamoto, Japan, 2013
“Analysis of follicle-stimulating hormone receptor (fshr)-GFP transgenic medaka”
- 26) T. Uchimura, Y. Hayashi, S. Tashiro, E. Shiraishi and T. Kitano: 3rd GelK International Symposium, Kumamoto, Japan, 2013
“Analysis of genes regulated by heat stress in medaka (*Oryzias latipes*)”
- 27) 内村友哉、田代真也、白石絵吏、矢澤隆志、北野健：平成25年度日本水産学会大会(2013)
「メダカ副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンの発現制御におけるHSPの関与」
- 28) 室積典和、中島良、平井敏朗、亀井保博、石川智子、藤堂剛、北野健：平成25年度日本水産学会大会(2013)
「濾胞刺激ホルモン受容体の機能欠損はメダカ雌の性成熟を阻害する」
- 29) 乙木百合香、太田陽子、北野健、伊藤直樹、高橋計介、尾定誠：平成25年度日本水産学会大会(2013) 「ホタテガイにおけるエストロゲン受容体の発現様式と機能」
- 30) 川辺敏晃、江祐紀、白石絵吏、宮崎誠生、柳美穂、井上聖也、北野健：平成25年度日本水産学会大会(2013) 「メダカ始原生殖細胞の体外培養法の検討」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) Crain D.A., Erilsen M., Iguchi T., Jobling S., Laufer H., LeBlanc G.A. and Guillette L.J.: An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology*, 24, 225-239 (2007).
- 2) Horiguchi T., Shiraishi H., Shimizu M. and Morita M.: Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*. *Environmental Pollution*, 95, 85-91 (1997).
- 3) Shimasaki Y., Kitano T., Oshima Y., Inoue S., Imada N. and Honjo T.: Tributyltin causes masculinization in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 141-144 (2003).
- 4) Kitano T., Takamune K., Kobayashi T., Nagahama Y. and Abe S.: Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing

- genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Molecular Endocrinology*, 23, 167-176 (1999).
- 5) Kitano T., Takamune K., Nagahama Y. and Abe S. : Aromatase inhibitor and 17α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Reproduction and Development*, 56, 1-5 (2000).
 - 6) Kitano T., Takamune K., Nagahama Y. and Abe S. : Role of P450 aromatase in gonadal sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Environmental Sciences*, 8, 1-11 (2001).
 - 7) Kitano T., Yoshinaga N., Shiraishi E., Koyanagi T. and Abe S. : Tamoxifen induces masculinization of genetic females and regulates P450 aromatase and Müllerian inhibiting substance mRNA expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Reproduction and Development*, 74, 1171-1177 (2007).
 - 8) Yamaguchi T., Yoshinaga N., Yazawa T., Gen K. and Kitano T. : Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endocrinology*, 151, 3900-3908 (2010).
 - 9) Funahashi N., Iwasaki I. and Ide G. : Effects of bis (tri-n-butyltin) oxide on endocrine and lymphoid organs of male rats. *Acta Pathologica Japonica*, 30, 955-966 (1980).
 - 10) Oda S., Mikami S., Urushihara Y., Murata Y., Kamei Y., Deguchi T., Kitano T., Fujimori K., Yuba S., Todo T. and Mitani H. : Identification of a functional medaka heat shock promoter and characterization of its ability to induce in vitro and in vivo exogenous gene expression in medaka. *Zoological Science*, 27, 410-415 (2010).
 - 11) Hayashi Y., Kobira H., Yamaguchi T., Shiraishi E., Yazawa T., Hirai T., Kamei Y. and Kitano T. : High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. *Molecular Reproduction and Development*, 77, 679-686 (2010).
 - 12) Shiraishi E., Yoshinaga N., Miura T., Yokoi H., Wakamatsu Y., Abe S. and Kitano T. : Mullerian inhibiting substance is required for germ cell proliferation during early gonadal differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology*, 149, 1813-1819 (2008).

Development of Monitoring System for Effects of Environmental Stress on Animals

Principal Investigator: Takeshi KITANO

Institution: Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University
2-39-1 Kurokami, Kumamoto 860-8555, Japan
TEL: +81-96-342-3031, FAX: +81-96-342-3431
E-mail: tkitano@kumamoto-u.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Stress, High temperature, Cortisol, Monitoring, Medaka

High temperature stress induces masculinization of the genetically female medaka through elevation of cortisol produced by the interrenal cells. Cortisol secretion is induced through elevation of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) levels by corticotrophin-releasing hormone (CRH), which is secreted from hypothalamus. However, the molecular mechanism which regulates CRH secretion in hypothalamus remains unclear. In this study, to elucidate the regulating mechanism of CRH expression in medaka, we analyzed the expression profiling of genes regulated by high temperature in the hypothalamus of *neurogenin3-GFP* transgenic medaka, which expresses specifically green fluorescent protein (GFP) in the hypothalamus, using DNA microarray analysis. As a result, the expression of 65 genes containing *heat shock protein 70-kDa (hsp70)* in medaka 44,000 genes was increased more than ten-fold by high temperature treatment, and *crh* had about five-fold increase in their expressions. The expression patterns of these genes were similar to the results obtained by quantitative real-time PCR analysis. These results suggest that their genes isolated here might regulate CRH expression in the hypothalamus under the high temperature stress.

Next, we investigated the expression patterns of green fluorescent protein (Venus) in *hsp70-Venus* transgenic medaka to establish a monitoring system for environmental stress *in vivo*. We observed the Venus fluorescence in the medaka embryos reared at 26°C or 33°C from 0 days post-fertilization under the fluorescent microscope. As results, in 26°C-reared embryos Venus fluorescence was observed only in the lens but not in the whole bodies. On the other hand, in 33°C-reared embryos the fluorescence was strongly detected not only in the lens but also in the whole bodies. Moreover, also in embryos treated with acid, cortisol or tributyltin oxide the fluorescence was observed in the whole bodies. Thus, this transgenic medaka appears to possess strong responsiveness to environmental stress. Therefore, the original medaka strain can be an excellent biosensor for monitoring comprehensively stress levels in environmental water.

RF-1003 環境ストレスが及ぼす生物影響の 評価手法の開発(熊本大学)

環境ストレスにより発現量が激増する因子として、
ヒートショックプロテインを同定

ヒートショックプロテインの発現を緑色蛍光で
モニターできる遺伝子導入メダカ系統の確立

遺伝子導入メダカ(生物センサー)を用
いた化学物質等が及ぼすストレス
作用の評価手法の確立

