

エストロゲンによって誘導されるツチガエル性転換機構の解析

高瀬 稔¹、井口泰泉²、ニールス・イー・スカケベック³、ヘンリック・レファーズ³

¹広島大学両生類研究施設、²岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター、CREST・JST、

³デンマーク国立病院発達生殖部門

【目的】我々は内分泌攪乱化学物質(ED)の毒性メカニズム解明のため、性ホルモン処理により誘導される両生類の性転換現象に着目した。最初に、エストロゲンによる性転換機構の解析を行った。

【方法】ツチガエル幼生をエストラジオール・ベンゾエート(100 μ g/l)含有の飼育水中で飼育した場合の性腺分化を組織学および分子生物学的に解析した。

【結果及び考察】ツチガエルの様々な地方集団の幼生をエストラジオール・ベンゾエート含有の飼育水中で飼育したところ、東広島(広島県)、金沢(石川県)、村上(新潟県)の各地方集団のツチガエルでは雄から雌への性転換が有意に誘導された。今回、アンドロゲン処理により雄への性転換も容易に誘導される東広島集団のツチガエルを以後の実験に用いた。エストロゲンにより誘導される性転換過程の組織学的な解析の結果、遺伝的雄の幼生では初期の生殖細胞や生殖細胞を取り囲む体細胞に雌化が観察された。RT-PCR 解析の結果、エストロゲン受容体遺伝子の発現は認められたが、エストロゲン処理による発現量の変化は認められなかった。さらに、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて、エストロゲン処理により発現変化する遺伝子を網羅的に解析した結果、これまで175個の遺伝子を単離し、それらの塩基配列を決定した。将来、マイクロアレー技術を用いてEDの毒性メカニズムを解析する予定である。

Analysis of estrogen-induced sex-reversal mechanism in *Rana rugosa* tadpoles

Minoru Takase¹, Taisen Iguchi², Niels E. Skakkebaek³, Henric Leffers³

¹Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Japan,

²Center for Integrative Bioscience, Okazaki National Research Institutes, and CREST, JST, Japan, and

³Department of Growth and Reproduction, Rigshospitalet, Denmark.

We noticed sex-reversal in the frog as a model for analyzing toxic action mechanisms of endocrine disruptors. In the present study, we analyzed ovarian differentiation in genetic male tadpoles of *Rana rugosa* exposed to estrogen. Exposure of tadpoles to estradiol benzoate (EB) in breeding water induced significantly a shift of sex ratio towards the female. Histological analysis showed appearances of swelling germ cells and female type of somatic cells surrounding germ cells in feminizing male tadpoles. In addition, we investigated sex-reversal from males into females at molecular level. Total RNA was isolated from the gonad together with mesonephros which was dissected from EB-treated tadpole. Using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique, we detected expression of estrogen receptor mRNA in the dissected organs, and its expression level was constant during sex-reversal. To isolate genes expressed differentially during estrogen-induced sex reversal, we employed differential display of RT-PCR using 243 primer pairs. We identified finally 175 differentially expressed cDNAs by direct sequencing. We expect that the present sex-reversal system supplies in future a good tool for analyzing toxic actions of endocrine disruptors on testicular differentiation in amphibians by using microarray technique.