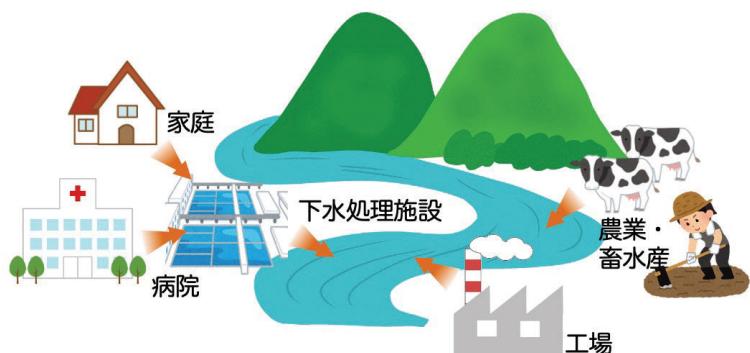




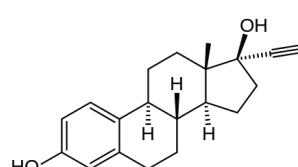
環境化学物質の水生動物に対する 作用メカニズム解明に向けたアプローチ



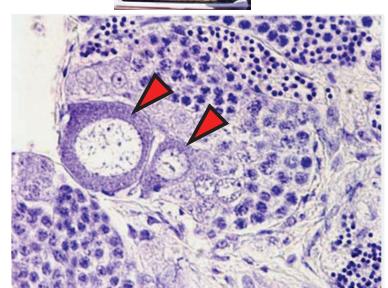
内分泌かく乱化学物質・環境医薬品の生物へ影響



環境ホルモン・PPCPs
(pharmaceuticals and personal care products)



17 α -エチニルエストラジオール (EE2)
(ピルの主成分)



精巣の中に卵が発生する
(0.1ng/Lの濃度ででてくる)

本日のトピック

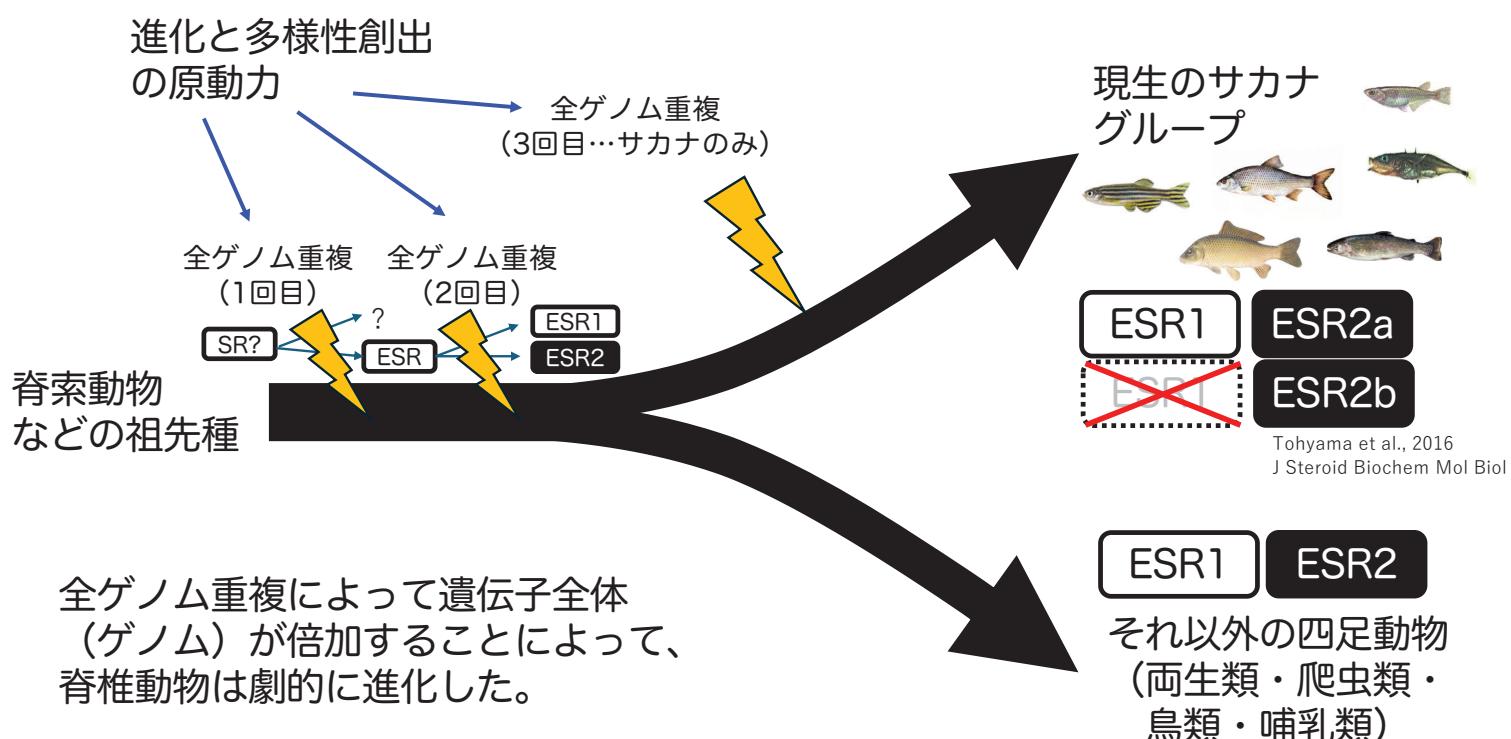
► エストロゲン受容体 (Estrogen receptor; ESR) の機能を明らかにするためのノックアウトメダカを用いた解析

- 多くの化学物質が女性ホルモンであるエストロゲン受容体に結合して作用する
 - そもそもエストロゲン受容体は何種類あるのか？その違いは？
 - 化学物質のエストロゲン作用をメディエイトするのはどの受容体？

► 内分泌かく乱/新規汚染物質/医薬品の作用を検出する生体モデル実験系の開発

- 生体に作用する化学物質を検出するトランスジェニック（ノックイン）メダカの開発
 - 医薬品成分の作用を検出するメダカ

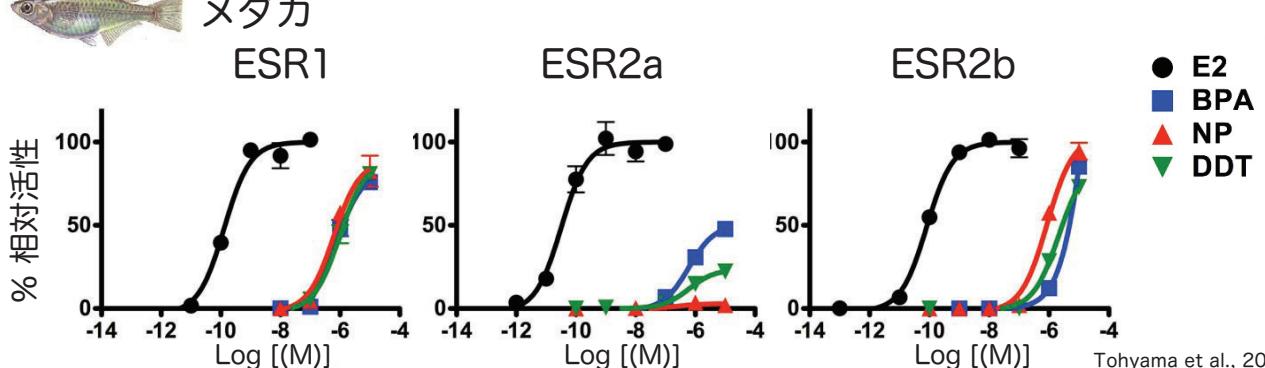
現生魚類は遺伝子の重複によって遺伝子（ゲノム）が倍加している



サブタイプによって化学物質に対する応答性が異なる



メダカ



- E2
- BPA
- ▲ NP
- ▼ DDT

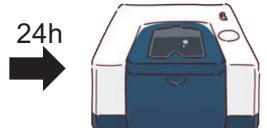
Tohyama et al., 2015
(Environ Sci Technol)



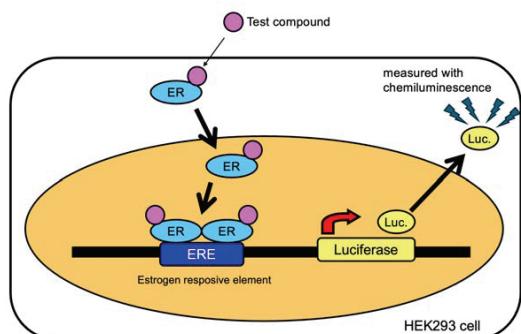
HEK293細胞にDNAを導入
それぞれのESR発現ベクター
レポーターべクター



化学物質を培地に添加
例:E2 10⁻¹²-10⁻⁸ M
BPA 10⁻¹⁰-10⁻⁵ M



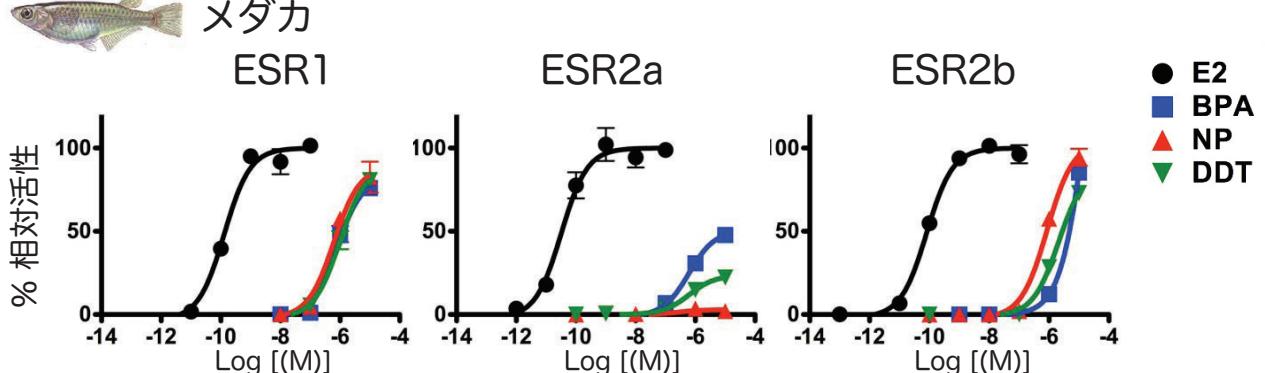
発光シグナルを
検出して定量化



サブタイプによって化学物質に対する応答性が異なる



メダカ

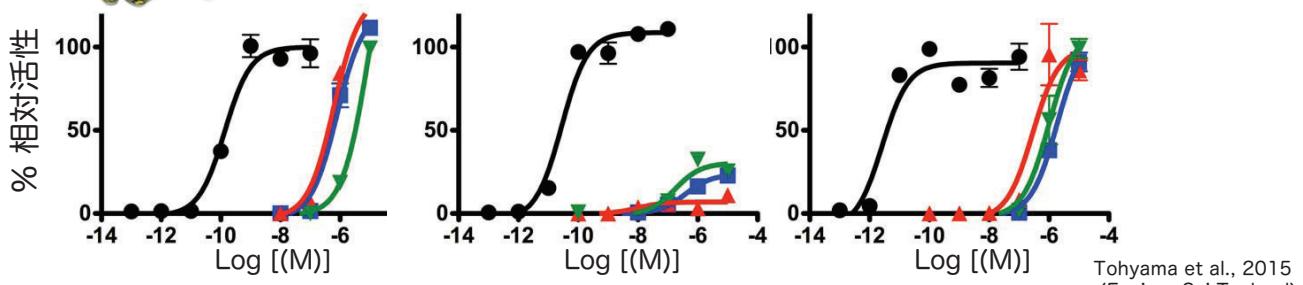


- E2
- BPA
- ▲ NP
- ▼ DDT

Tohyama et al., 2015
(Environ Sci Technol)



ゼブラフィッシュ



- E2
- BPA
- ▲ NP
- ▼ DDT

ゲノム編集によるESR1ノックアウトメダカの作製



フレームがズレて正常なタンパク質が作られなくなる→遺伝子の機能破壊

Tohyama et al., 2017
(Dev Growth Differ)

マウスではESR1はオスでもメスでも生殖に必須…メダカでは？



Esr1KOマウスは生殖器官がエストロゲンに反応せず、オスも不妊

メダカでは？

ESR1ノックアウトメダカの鰓の表現型

オス

メス

野生型

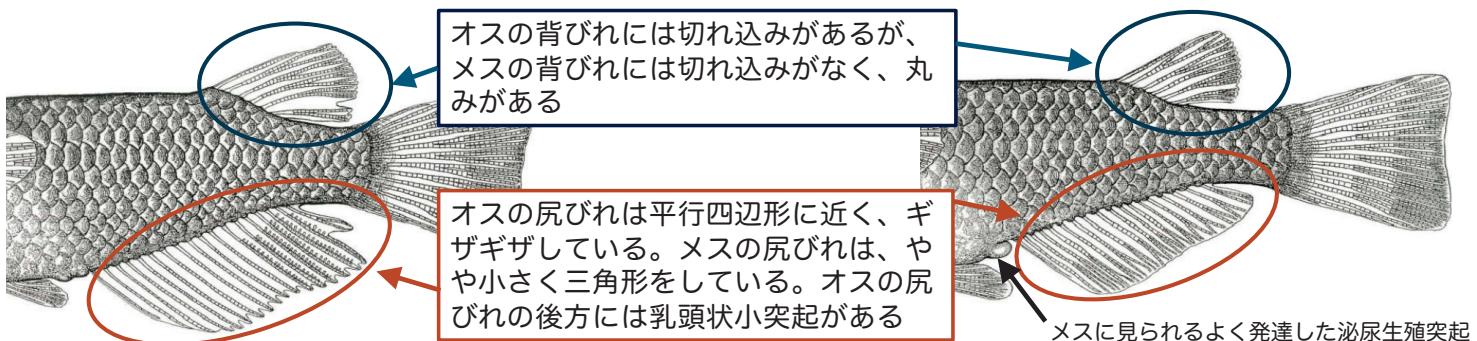


esr1
KO



Tohyama et al., 2017
(Dev Growth Differ)

泌尿生殖突起

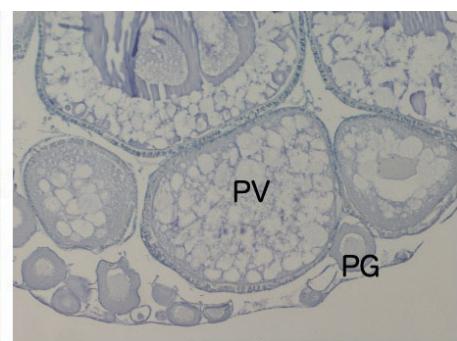
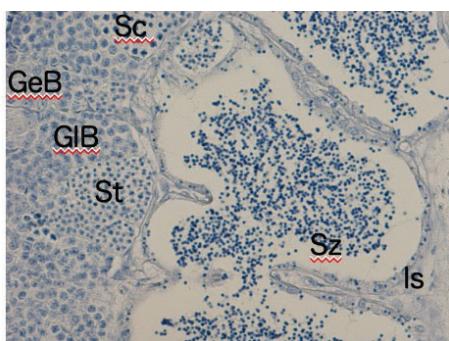


ESR1ノックアウトメダカの生殖腺の表現型

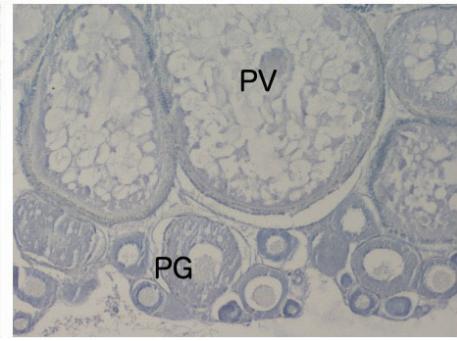
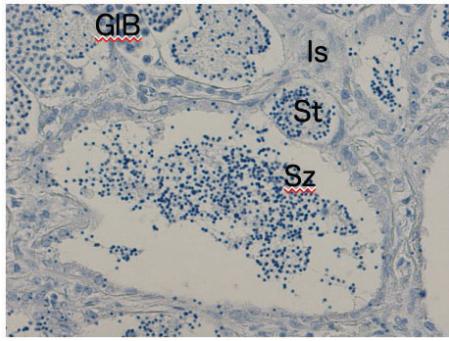
精巣

卵巣

野生型

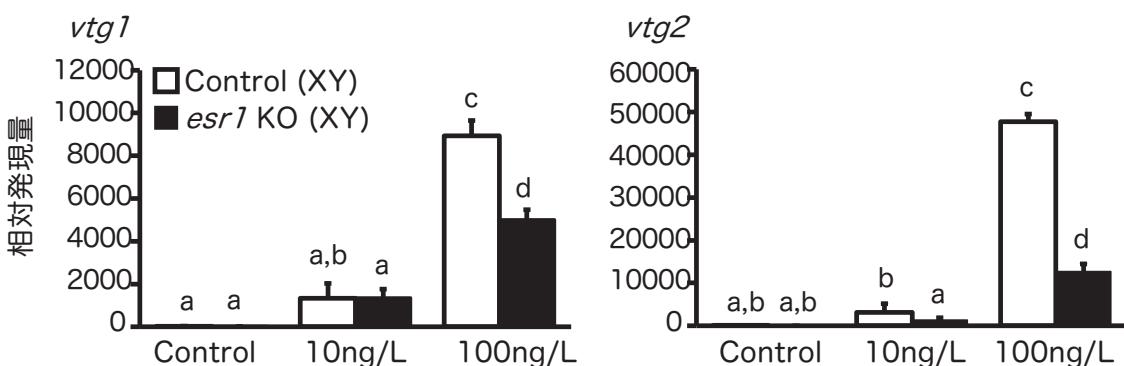


esr1
KO

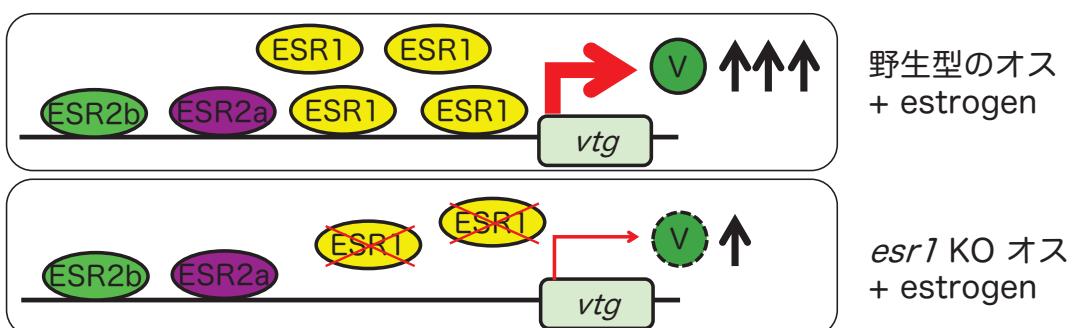


Tohyama et al., 2017
(Dev Growth Differ)

ESR1KOメダカのオスにおいてエストロゲン曝露によって誘導されるビテロジエン遺伝子の発現が抑制される



Tohyama et al., 2017
(Dev Growth Differ)



マウスとメダカではESR1の機能が異なる

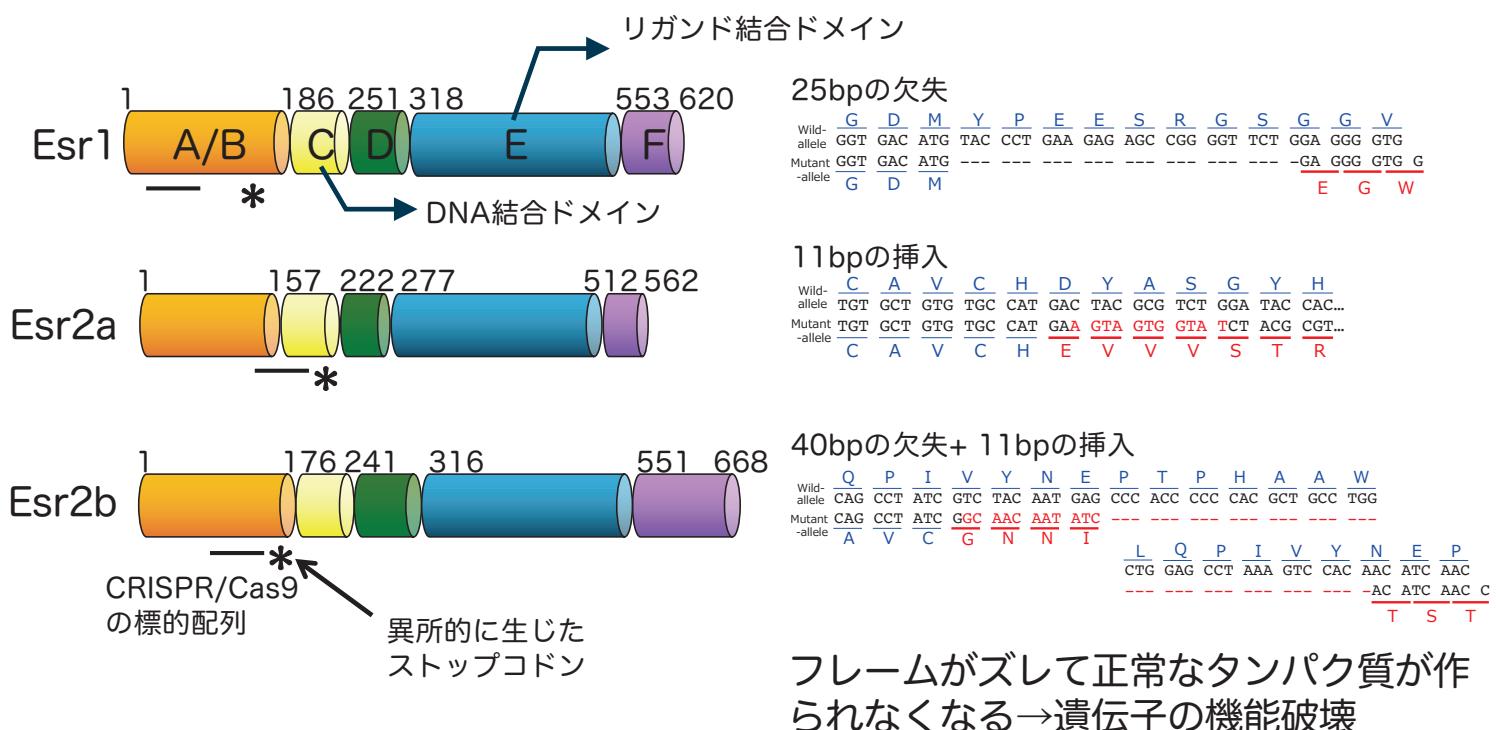


Esr1 KOマウスは生殖器官がエストロゲンに反応せず、オスも不妊

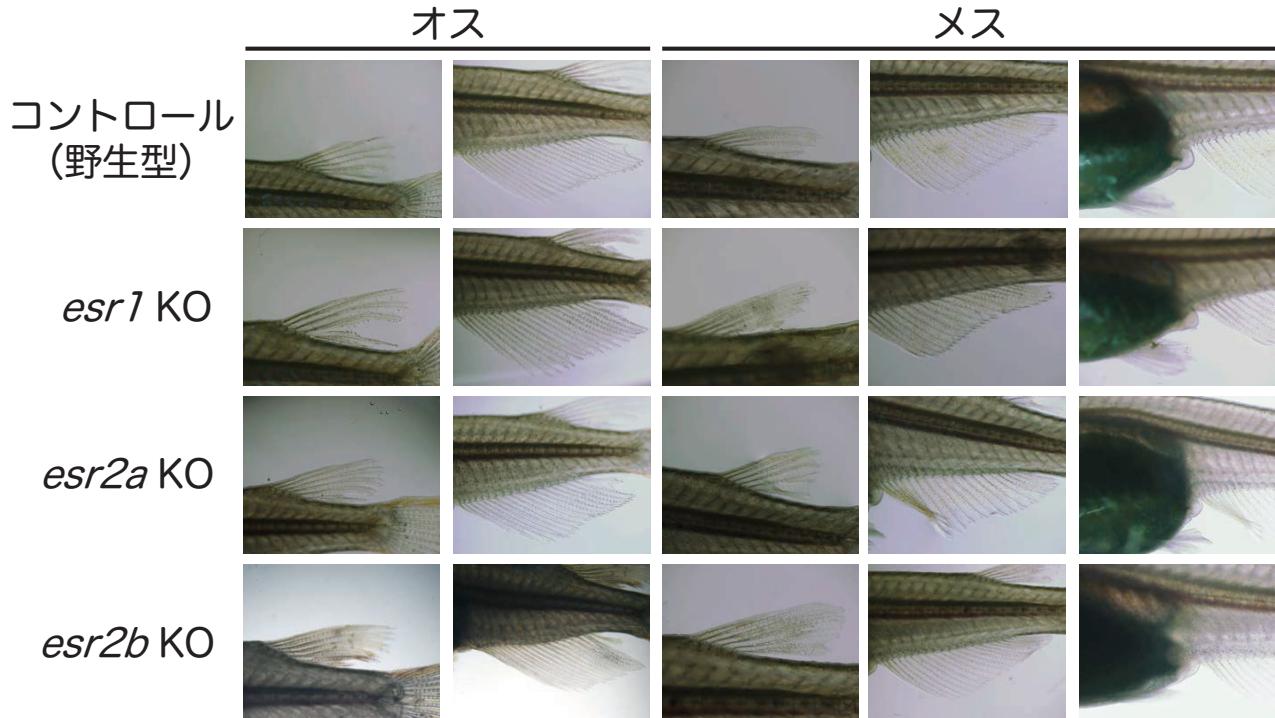


ESR1 KOメダカは妊性がある（機能が違うか、ESR2aやESR2bによる機能補償？）

Esr2a、Esr2bノックアウトメダカ

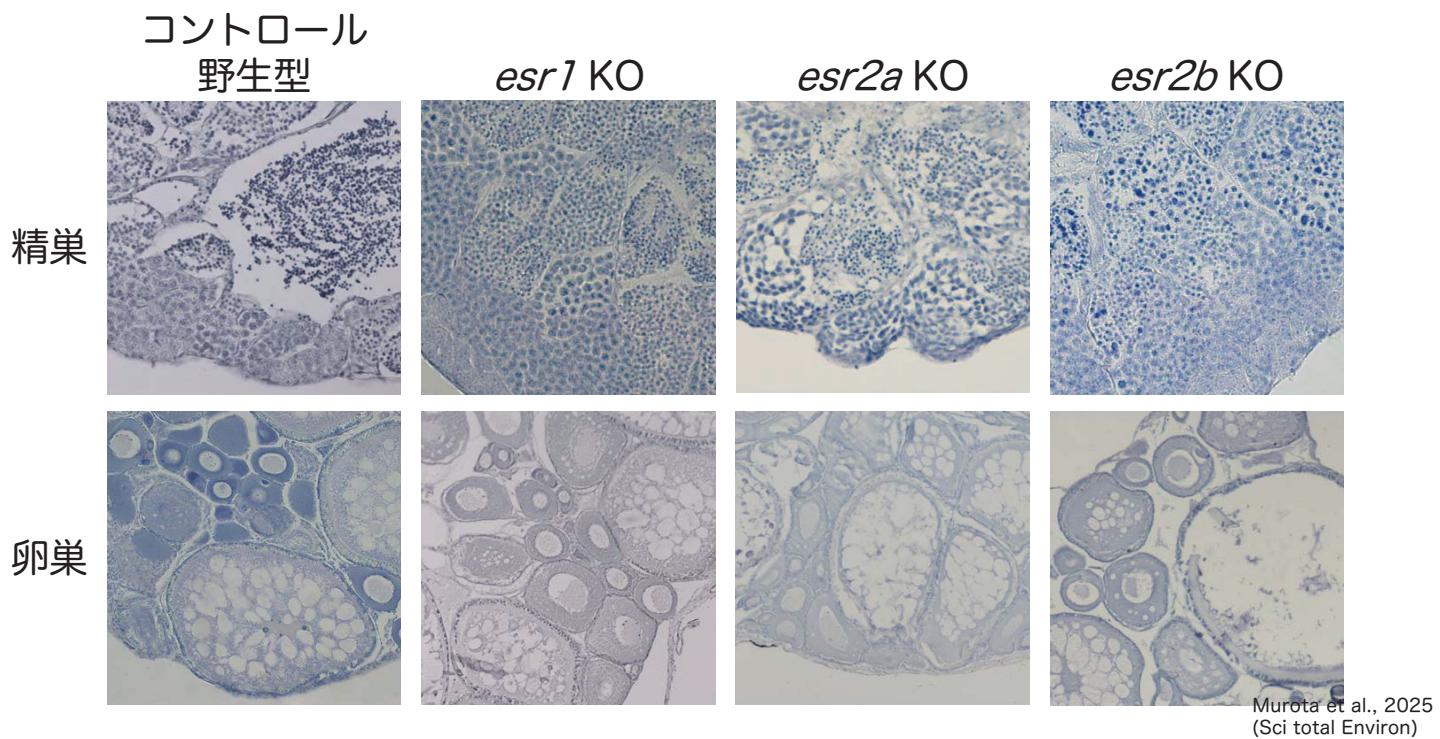


ESR2a KO, ESR2b KOメダカは正常な性的二型を示す



Murota et al., 2025
(Sci total Environ)

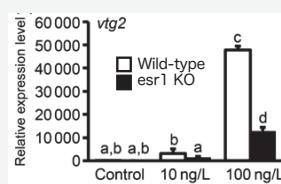
ESR2a KO, ESR2b KOメダカは正常な生殖腺に発達を示す



ESR KOメダカの表現型のまとめ

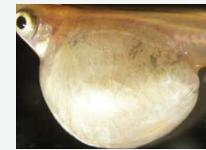
- esr1* KO
- ・オスもメスも顕著な表現型はない
 - ・エストロゲンによってオスメダカで誘導されるビテロジエン遺伝子の発現レベルが低下

(*Tohyama et al., 2017)



- esr2a* KO
- ・卵管の閉塞によってメスメダカの腹部が膨大して不妊
 - ・オスメダカは顕著な表現型はない

(*Ogino et al., 2018, Kayo et al., 2019)



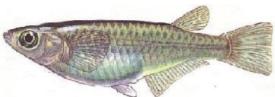
- esr2b* KO
- ・メスのメダカがオスの性行動を示して不妊
 - ・卵巣の生殖細胞の維持に関与

(Chakraborty et al., 2019, Nishiike et al., 2021)

*は私たちのグループの報告

メダカとゼブラフィッシュの表現型比較

メダカ (*Oryzias latipes*)



性決定遺伝子 (Dmy) が同定されている=遺伝的な性が簡単に同定できる

顕著な表現型はない

メスにおいて卵管閉塞 (不妊)

メスがオスの性行動 (不妊)

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)

VS



性決定様式

多因子による性決定
雌性先熟（仔魚は全て卵巣をもつが、成長に伴って半数個体では卵巣から精巣に変化する）

Esr1 KO

顕著な表現型はない
(Premature ovarian failure in female?)

Esr2a KO

顕著な表現型はない

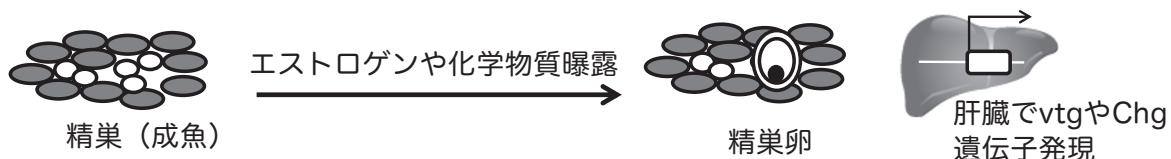
Esr2b KO

顕著な表現型はない

これらの内分泌かく乱作用をメディエイトするのは、どのESRサブタイプか？

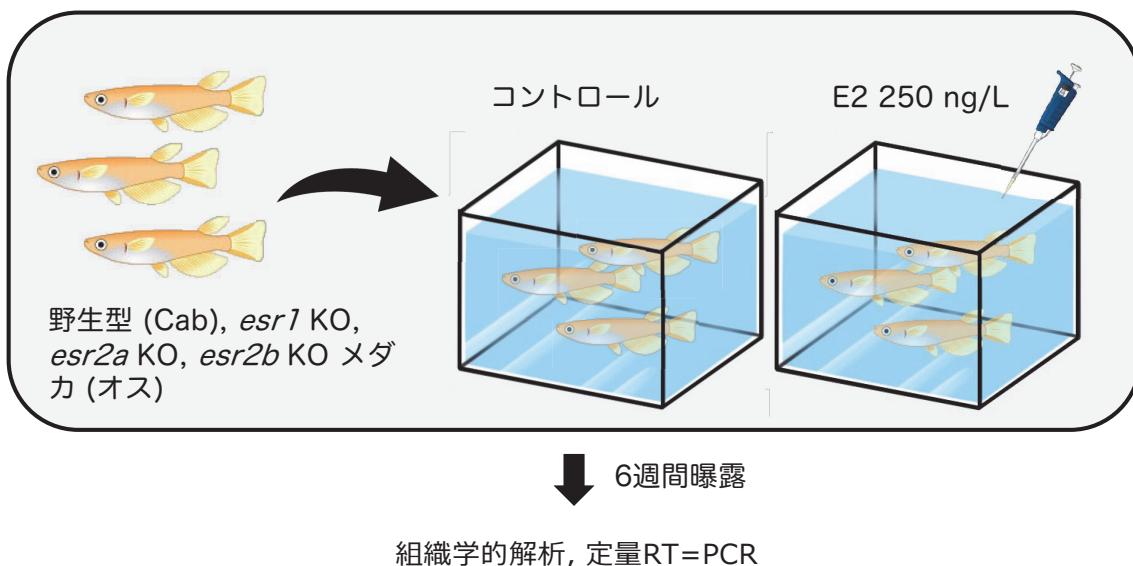


発生期のオスにエストロゲンが作用すると、メスに性転換する



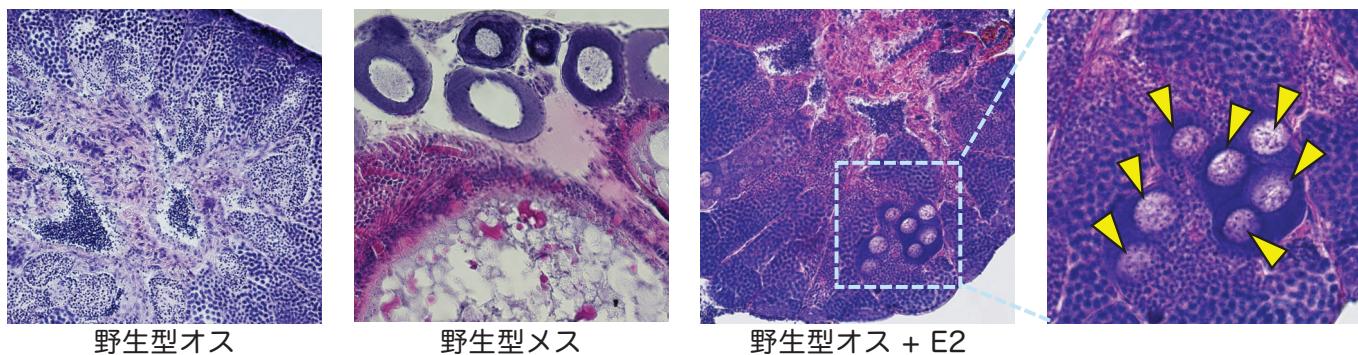
成魚にエストロゲンが作用すると、精巣卵ができたり、肝臓で本来オスで作られないはずの卵黄・卵膜タンパク質（ビテロジエニンやコリオジエニン）が発現するようになる

ESR KOメダカにおける精巣卵誘導実験



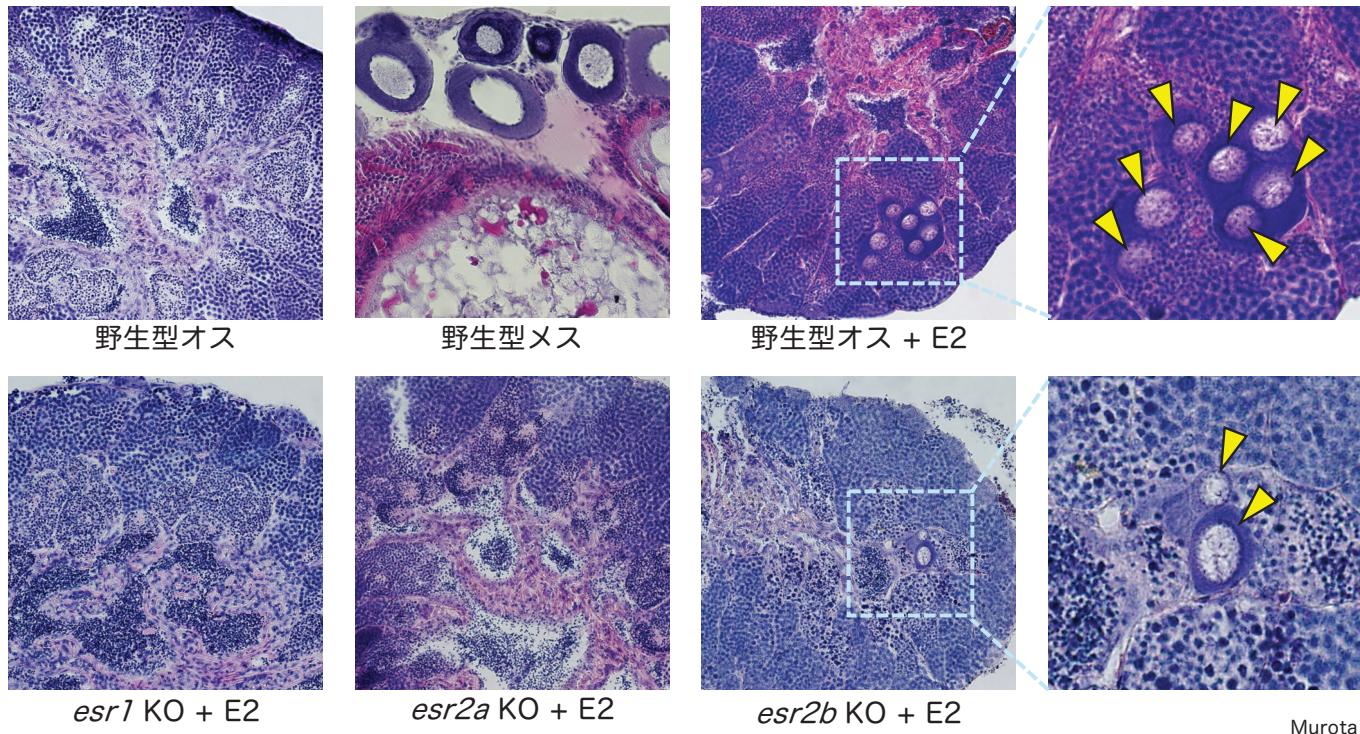
Murota et al., 2025
(Sci total Environ)

ESR KOメダカにおける精巣卵誘導実験

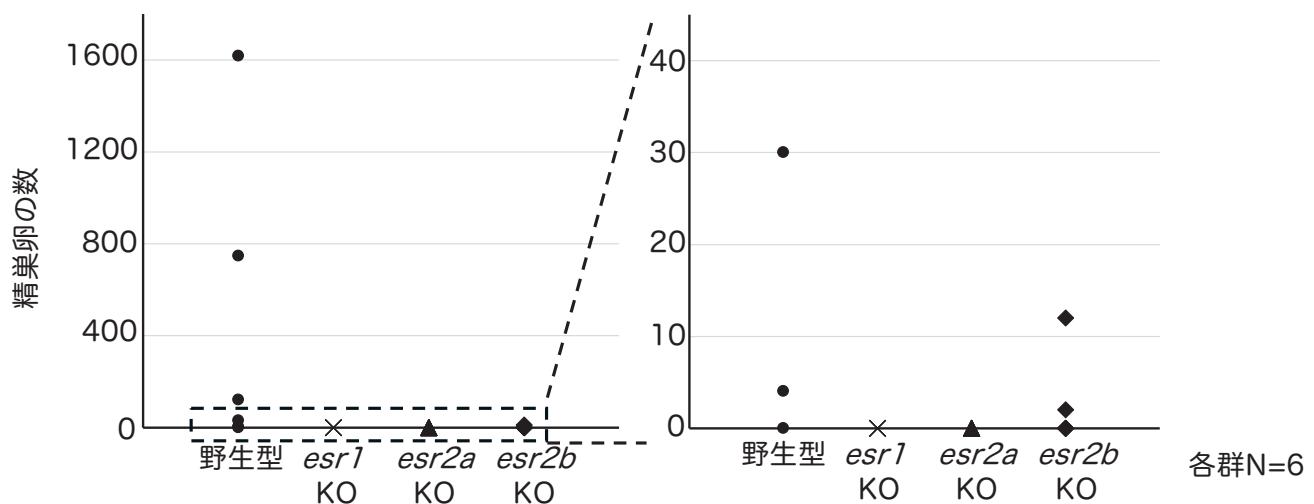


Murota et al., 2025
(Sci total Environ)

ESR1およびESR2aKOメダカでは精巣卵が形成されない

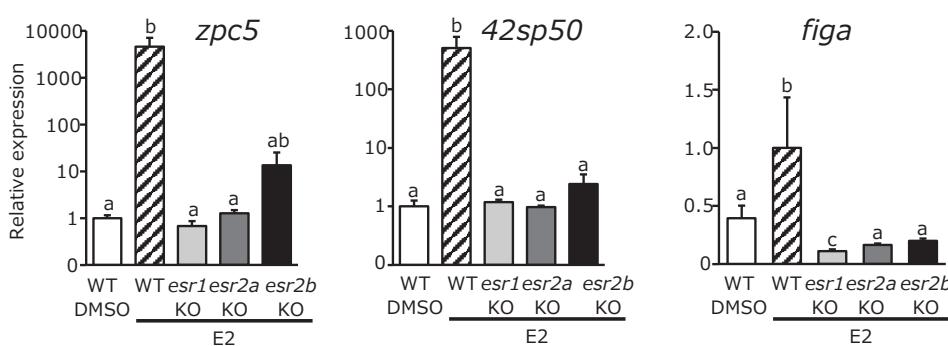


ESR KOメダカで誘導された精巣卵の数



Murota et al., 2025
(Sci total Environ)

生殖腺における精巣卵巣連遺伝子の発現パターン



Gene expression profiles in the testis associated with testis-ova in adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 β -ethynodiol
Ikumi Hirakawa^{a,b,c}, Shinichi Miyagawa^{b,1}, Yoshinori Katsu^d, Yoshihiro Kagami^e, Norihisa Tatarazako^f,
Tohru Kobayashi^g, Teruhiko Kusano^h, Takeshi Mizutaniⁱ, Yukiko Ogino^j, Takashi Takeuchi^k,
Yasuhiko Ohta^l, Tatsuo Iguchi^m
^aGraduate School of Environmental Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan
^bGraduate School of Integrative Biosciences, Nagoya University, Showa-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8303, Japan
^cDepartment of Biological Sciences, Aichi Gakuin University, Sapporo 460-0010, Japan
^dGraduate School of Environmental Sciences, Nagoya University, Showa-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8303, Japan
^eGraduate School of Natural and Environmental Sciences, University of Akita, Akita 010-0046, Japan
^fGraduate School of Environmental Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan

Hirakawa et al., 2012
(Chemosphere)

Murota et al., 2025
(Sci total Environ)

ESR KOメダカの表現型と精巣卵形成

- ・ 単一のESR KOメダカは遺伝的な性に従って正常に発生し、性分化する（ただし性転換個体の出現頻度は野生型よりも高い）
 - ・ ESR1とESR2aは、精巣卵形成に必要（野生型メスでは、卵形成にESR1とESR2aは不要にも関わらず）
- エストロゲンによって誘導される精巣卵形成をメディエイトするエストロゲン受容体はESR1とESR2aである

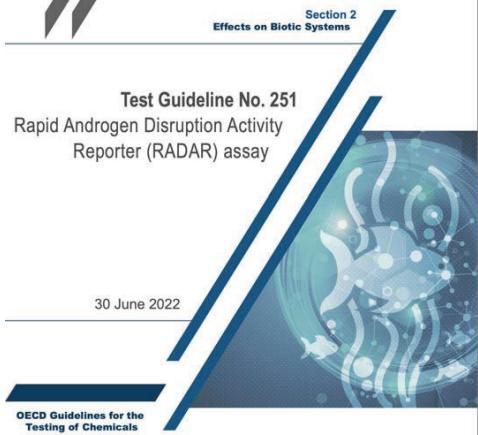
本日のトピック

➤ エストロゲン受容体 (Estrogen receptor; ESR) の機能を明らかにするためのノックアウト/ノックインメダカを用いた解析

- ・多くの化学物質が女性ホルモンであるエストロゲン受容体に結合して作用する
…そもそもエストロゲン受容体は何種類あるのか？その違いは？
化学物質のエストロゲン作用をメディエイトするのはどの受容体？
- ・内在的なエストロゲン(17 β -エストラジオール)の作用と、化学物質のエストロゲン作用は何が違うのか？
- ・エストロゲン受容体はクロマチンにいつ、どこで、どのように、誰と相互作用して結合するのか？
…ESR結合配列の同定と結合様式の解明

➤ 内分泌かく乱/新規汚染物質/医薬品の作用を検出する生体モデル実験系の開発

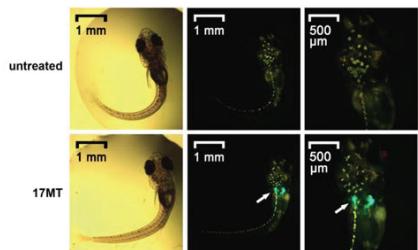
- ・生体に作用する化学物質を検出するトランスジェニック（ノックイン）メダカの開発
…医薬品成分の作用を検出するGap43-jGCaMP7sメダカ



Rapid Fluorescent Detection of (Anti)androgens with *spiggin-gfp* Medaka

Anthony Sébillot,[†] Paulina Damdimopoulou,^{‡,||} Yukiko Ogino,[‡] Petra Spirhanzlova,^{‡,§} Shinichi Miyagawa,[§] David Du Pasquier,[‡] Nora Mouatassim,[‡] Taisen Iguchi,[‡] Gregory F. Lemkine,^{§,†} Barbara A. Demeneix,[§] and Andrew J. Tindall[†]

[†]Watchfrog S.A., 1 rue Pierre Fontaine, 91000 Evry, France
[‡]Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institute for Basic Biology, 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi, 444-8787, Japan
[§]CNRS UMR 7221, Evolution des Régulations Endocrinien, Département Régulations, Développement et Diversité Moléculaire, Muséum National d'Histoire Naturelle, 75005 Paris, France



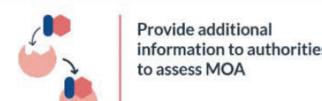
Key event



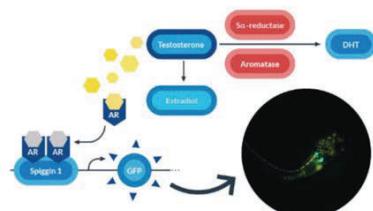
OECD physiological criterion: Spiggin production in the Three Spined Stickleback



Modes of actions



Provide additional information to authorities to assess MOA



Watchfrog社 webページより

イトヨのスピギン遺伝子のプロモーターの下流でGFPを発現するトランスジェニックメダカ→(抗)アンドロゲン作用を検出する



Test Guideline No. 250
EASZY assay: Detection of Endocrine Active Substances, acting through estrogen receptors, using transgenic tg(cyp19a1b:GFP) Zebrafish embrYos

14 June 2021

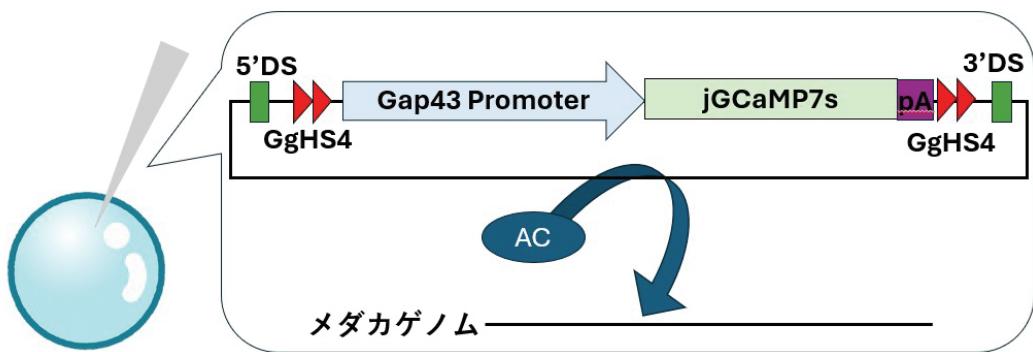


Test Guideline No. 252 Rapid Estrogen Activity *In Vivo* (REACTIV) assay

25 June 2024

コリオジエニン遺伝子プロモーター-GFPを導入したトランスジェニックメダカ→(抗)エストロゲン作用を検出

Gap43-jGCaMP7s トランスジェニックメダカ



Gap43遺伝子のプロモーター制御下でjGCaMP7s を発現するように設計されたDNAを、メダカの受精卵に注入して、トランスジェニックメダカを利用

Neuroscience Research 219 (2025) 104944

ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Research

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/neuroscience-research

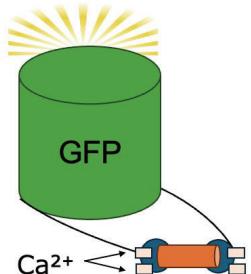
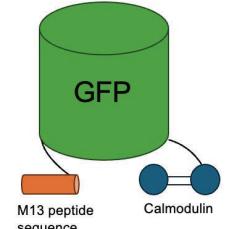


Technical Notes

Establishment of a transgenic strain for the whole brain calcium imaging in larval medaka fish (*Oryzias latipes*)

Takahide Seki ^a, Kazuhiro Miyanari ^b, Asuka Shiraishi ^b, Sachiko Tsuda ^b, Satoshi Ansai ^{c,*}, Hideaki Takeuchi ^{a,*}

東北大学竹内先生と
の共同研究



メダカの神経活動を細胞内カルシウム濃度野変動で可視化する

固定 → イメージング → データ解析

Gap43-jGCaMP7sメダカ



テスト物質
を添加

