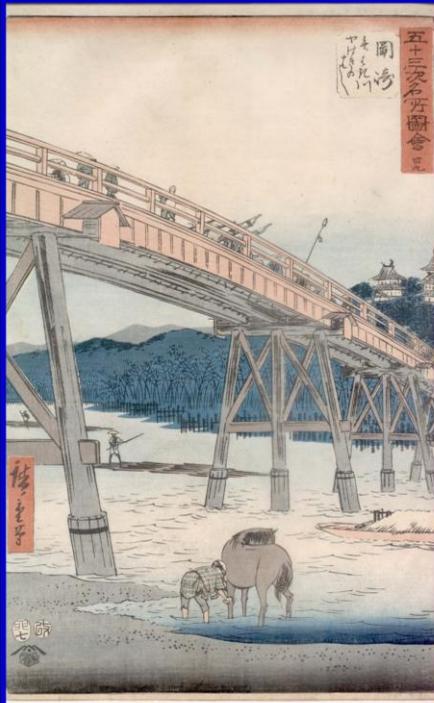


12月 13日, 2013



ミジンコにおける内分泌かく乱 作用メカニズムの解析

たかが微塵子されどミジンコ
ミジンコ類の環境依存性
性決定・性分化

井口泰泉
自然科学研究機構
基礎生物学研究所
岡崎統合バイオサイエンスセンター

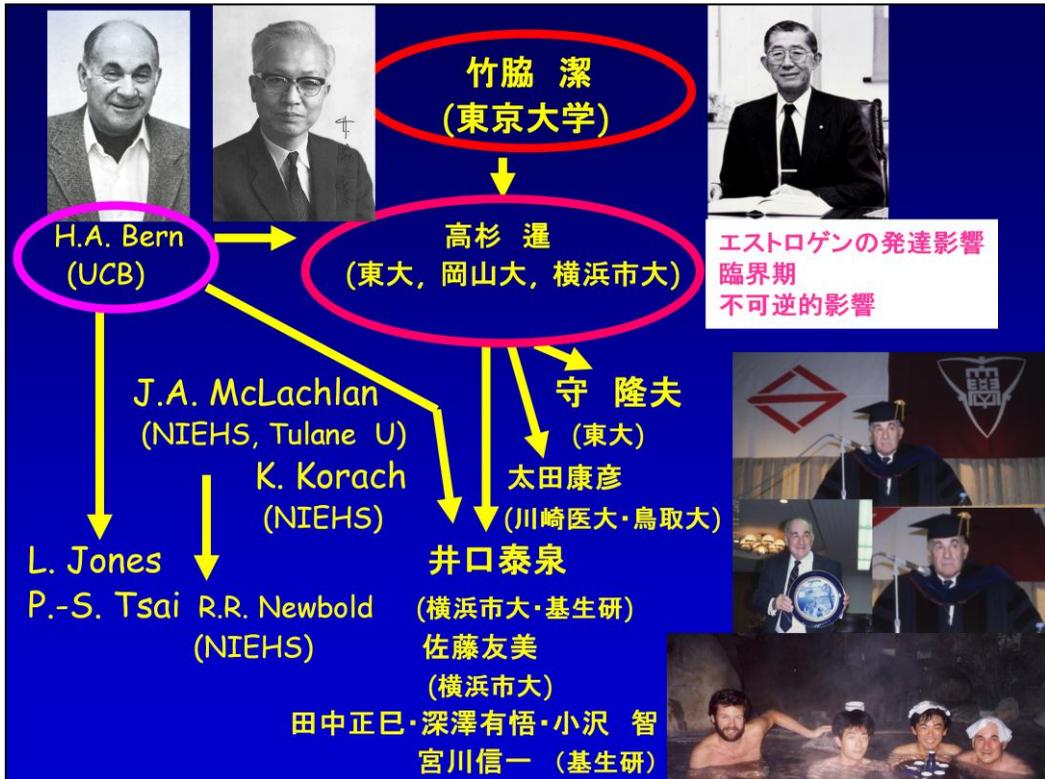
環境省基盤研究(その他)、
LRI、科学研究費補助金

いろんなことをしているのですが、今日は、ミジンコに特化したお話をさせていただきます。ミジンコに関しては、環境省の基盤研究（その他）、LRIあるいは文科省の科学研究費とかも補助されています。

「沈黙の春」出版(1962年)から50年 50th Anniversary "Silent Spring"



レイチェル・カーソンの「沈黙の春」が出てから去年がちょうど50周年だったんです。だから、化学物質問題が起こってもう50年経ったのに今どんな状況か。この下の方には、私の先生が、レイチェル・カーソンのこの本が出た1962年に、産まれたばかりのマウスに女性ホルモンを投与すると膣がんになるということを見つけられて、こういう研究がベースになって、発生時期の女性ホルモン作用によっていろんな悪いことが起こるのではないか。これが、ヒトで合成女性ホルモンを流産防止に使って、そのお母さんから産まれた女の子に膣がんが出たというよりも10年ぐらいに前に出された論文なものですから、今は、ここにありますように「Developmental Origin of Adult Disease」あるいは「Fetal Basis of Adult Disease」というような研究の概念のもとになっています。



私の先生の高杉先生、横浜市大の学長をされていました。それからアメリカの先生。こういう先生たちが1960年ぐらいにネズミを使って女性ホルモンの影響をみていらっしやいました。

Life in a Contaminated World

Louis J. Guillette, Jr.¹, Taisun Iguchi²

Until the early 1960s, pesticide use was perceived as a benefit to agriculture and public health, with few detrimental consequences. This perception changed dramatically with the publication 50 years ago of Rachel Carson's *Silent Spring* (1). The book was the start of a debate that continues to this day on the relative benefits and risks of not just pesticides but all synthetic chemicals.

Pesticides are unquestionably beneficial for food production (2), but there is a growing awareness of the risks to human and ecological health associated with their use. Over

the past decade, a growing literature (3–6) has examined how early life exposure to an array of chemical agents, found not only in pesticides but also in personal care products and plastics, can affect human health. The effects on endocrine signaling (and thus endocrine disruption) have been observed in the exposed generation and also in succeeding generations, but the conclusions are not without controversy.

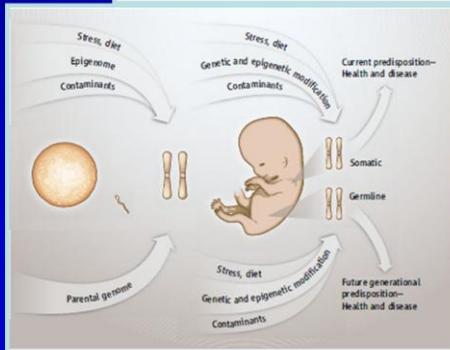
"It is ironic to think that man might determine his own future by something so seemingly trivial as the choice of an insect spray" wrote Carson in 1962 [p. 8 in (1)]. Although she had no mechanism to explain her observations, it is now well documented that exposure early in embryonic development to commonly used chemicals alters gene expression patterns that can lead to altered health later

in life (7). But what dose is required to cause an effect? A large literature in the fields of endocrinology and general physiology demonstrates not only that can different effects be induced at different doses but also that the mechanisms driving those effects can differ as well (7). A report from the Endocrine Society states that different effects should be expected when comparing high- and low-dose regimens of endocrine disruptors (3). Studies using acute high-dose exposures may thus be of limited value for predicting what might occur following the chronic low dose exposures that almost every population on Earth is subjected to today, often at low but detectable concentrations.

in life (7).

Early-life exposure to chemicals with endocrine disruption potential has been

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Medical University of South Carolina and Hollings Marine Laboratory, 221 East Johnson Road, Charleston, SC 29412, USA; ²Osaka Institute for Integrative Biocience, National Institute for Basic Biology, Okazaki 464-0877, Japan. E-mail: guillette@musc.edu



Guillette, L.J. Jr. and Iguchi, T. (2012) *Science* 337, 1614-1615.

The role of the environment. Environmental factors, including numerous contaminants, have been shown to modify the parental genome, so that the genetic makeup of any offspring is a combination of a parental inherited genome (itself likely influenced by epigenetic mechanisms of the germline) and environmental influences on that germline during maturation. Environmental factors such as diet, stress, and contaminants can also modify the genome of the developing embryo by classic selection and mutation or by epigenetic mechanisms at both the somatic and germline levels. These modifications can produce predispositions for health and disease in the current lifetime of the individual. Future transgenerational effects could also be established through modifications in the germline genome or epigenome after exposures during the lifetime of that individual.

レイチェル・カーソンの話にまた戻りますが、50年経って化学物質対策と
 いいますか、扱い方として今後どうしたらいいのかというのを「サイエンス」
 という雑誌からパースペクティブと書いてくれと言われまして、ここに
 いますワニの研究者でGuillette、この人は今、南カロライナ大学の産婦人科と
 フォーリングズ・マリン・ラボの教授をしています。我々が短い2ページぐ
 らいのパースペクティブを書いたのは、もっと発生時期の早い時期、発生の
 途上に女性ホルモンがくると、女の子の膣がんとか、ネズミでは子宮がん、
 膣がんが起こりますが、もう少し早い時期のジャームセル、生殖細胞のあた
 りにさかのぼって女性ホルモンの影響を調べた方がいいというパースペク
 ティブを書きました。

2013年 春

環境依存性性決定 (ワニ、ミジンコ)
温度依存性性決定 (TRP) (ワニ)

性決定のメカニズム
幼若ホルモン受容体、脱皮ホルモン受容体
幼若ホルモン・脱皮ホルモン生合成経路
単為生殖 vs 性生殖
外敵の臭いによる防御形態の変化

ER・AR

周生期のエストロゲン影響
レポーターアッセイ系の確率

エストロゲン受容体・アンドロゲン受容体の分子進化
メダカ尻鰭の乳頭状小突起

今私の研究室は非常に少ないグループですが、若い人もいまして、ここに
あるように、メダカがいたり、カダヤシがいたり、ワニがいたり、ネズミが
いたり、それぞれがいろんなことをやっています。頭の上にミジンコが飛ん
でいるのは、ミジンコの研究者です。ミジンコのことを考えてくれているば
いのですが、こういうグループでやっています。

"It was a late summer with limited voices"

環境汚染物質
工場からの
農薬流出事故



基礎研究が重要....

環境依存性性分化
温度依存性性分化

最初にワニのことを紹介します。10年ぐらい前からワニの研究を少しずつ始めていましたが、日本にワニはいないので、毎年フロリダに行って、ワニの卵を採取してフロリダ大学で育てて、組織の一部を持って帰って日本で研究するということをしていました。

なぜそんなことをしていたかという、ワニは孵卵の温度によって雄になるか雌にするか、温度が性を決めているのです。環境依存性の性分化あるいは性決定の中の温度がキーである。だけど、そのメカニズムはずっとわかっていませんので、ここを解いてみたいというのが最初です。



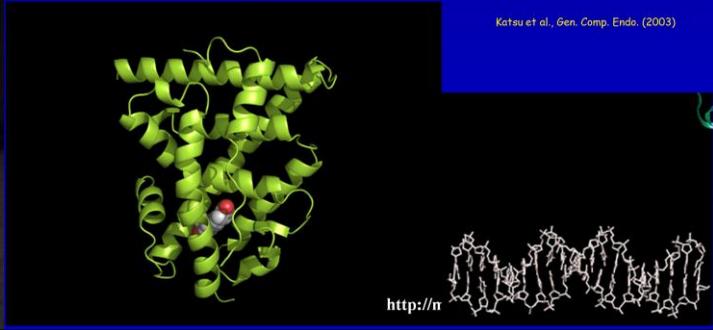
アリゲーターの分子生物学的な研究の開始
エストロゲン受容体のクローニングから

Structure of ER α

	dna			ligand		
	A/B	C	D	E	F	AA
alligator						587
chicken	87	100	89	98	76	589
human	60	100	73	95	54	595
mouse	56	100	76	95	55	599
zebrafish	31	95	42	68	28	569

Alligator 91% similar to chicken

Katou et al., Gen. Comp. Endo. (2003)



私たちが研究を始めるまでワニはほとんど研究されていませんでした。ですから、女性ホルモンの受容体の遺伝子を探って、まずはどういう遺伝子、ヒトとどう違うかということを始めました。

NASA

2000+ ° C

HCl cloud

Water pH = 0.5 {After launch}

アリゲーター体内汚染？
野生生物への影響？
新規汚染物質？

そうしているうち、NASAが、ロケットを飛ばしていますから、この辺のワニにどれぐらい化学物質がコンタミネートしているかということも調べてくれという話で、これも少しお手伝いしています。



ワニの調査というのは、夜、湖に出て、真っ暗い中をサーチライトを照らしながら、光が当たると目が反射で光りますので、それを見つけては手づかみで引っ張り上げる。これは手づかみでは引っ張り上げられませんが、縄をかけて船の上に乗せて血液採取して、タグを付けて返すということをしています。



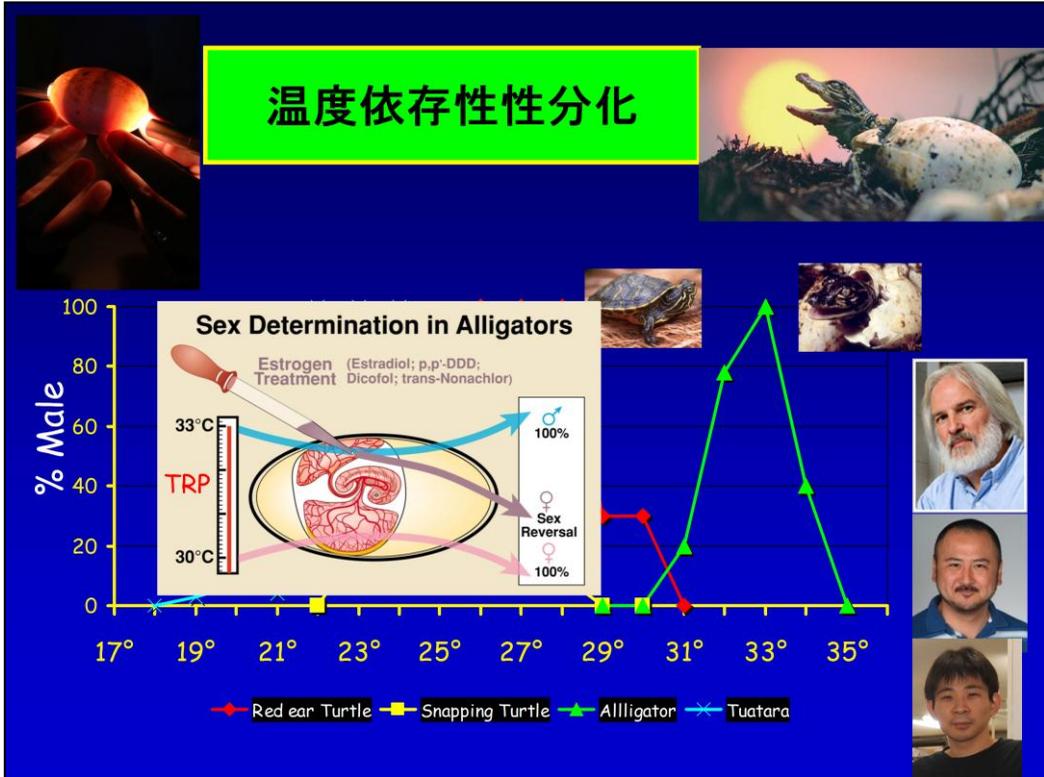
これは朝ご飯をワニが食べていますが、40cmぐらいのナマズをかんで、魚の骨をバキッと折って、それから丸飲みです。こんなことをしています。

これはフロリダ大学の学生に、同じような体形だから、ちょっと寝てごらんよと言ったら、ちょっと近づくと怖いと言って、かなり離れたところにいました。朝食後はこういうふうになんとなくずっと岸辺にいてひなたぼっこをしています。

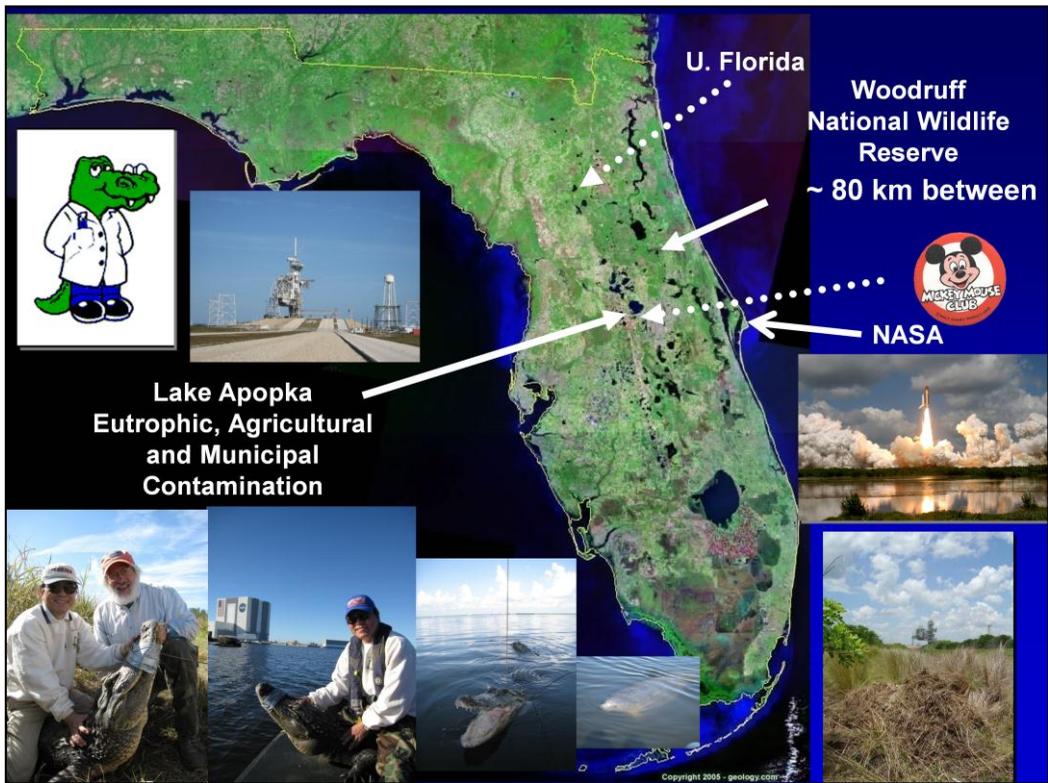


ワニの巣がここにあります、ここに卵を採りに行っています。

温度依存性性分化



温度依存の性分化というときに、ワニは30°Cぐらいだと全部雌、33.5°Cぐらいで雄になります。このときにどういう遺伝子が動いて雄になるか雌になるかというのをやってみました。



(説明を省略)

TRPs ?

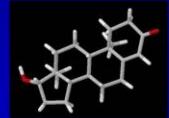
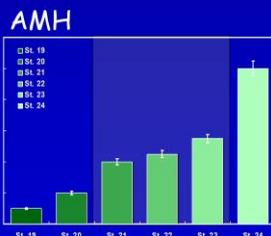
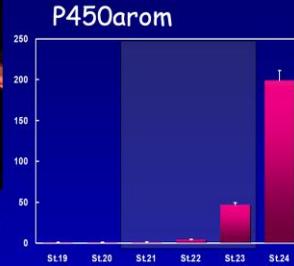
環境依存性性分化

Applying agonist and antagonist of TRPs in 2011

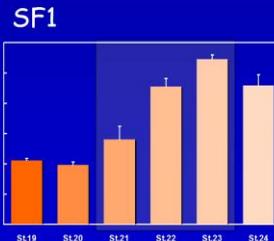
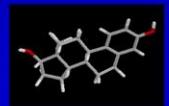
Male gonad (♂)



Female gonad (♀)



P450arom



Transient receptor potential

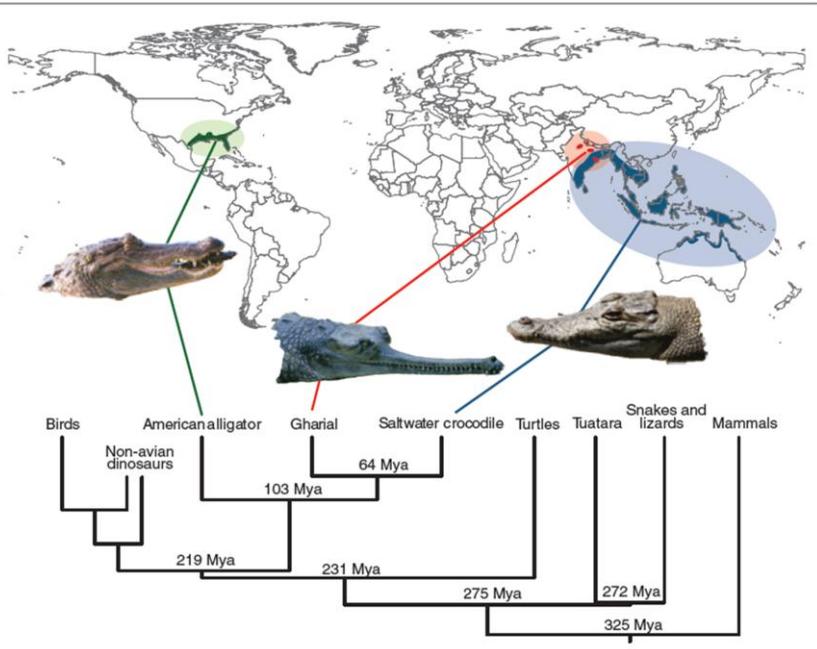
Urushitani et al., Mol. Cell. Endocrinol., (2011).

ということで、いくつかの遺伝子はわかってきていまして、この辺は一緒なんですけど、これも今とれてきました。温度を感知するセンサーとして transient receptor potential というのがあります。皆さんがカラシとかワサビを食べれば辛いという、あれはカプサイシンリセプターというリセプターですが、温度センサーの遺伝子とホモログです。

Sequencing three crocodilian genomes to illuminate the evolution of archosaurs and amniotes

John A St John¹, Edwa
Christopher Moran⁵, B
Nicholas G Crawford¹⁶
Matthew K Fujita⁷, Ma
Daniel E Janes^{18,19}, Sha
John E McCormack²³,
Kyria A Roessler¹, Jerer
Miryam Venegas-Ana
and David A Ray^{*8,15}

Genome Biology,
13, 415, 2012.

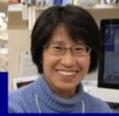
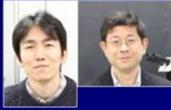


今ワニの方もやっと遺伝子を読み始めたところです。



(説明を省略)

ミジンコの環境依存性性分化



Daphnia magna



Daphnids in Japan

界	動物界	Animalia
門	節足動物門	Arthropoda
亜門	甲殻亜門	Crustacea
綱	鯉脚綱	Branchiopoda
亜綱	葉脚亜綱	Phyllopoda
目	双殻目	Diplostraca
亜目	枝角亜目	Cladocera
下目	異脚下目	Anomopoda
科	ミジンコ科	Daphniidae
属	ミジンコ属	<i>Daphnia</i>
種	ミジンコ	<i>D. pulex</i>

分類、特徴、化学物質の有害性試験 単為生殖、有性生殖、環境依存性性決定

ここから同じ環境依存性のミジンコの話をしていきます。なぜこんなことをしているかといいますと、最初は、ミジンコはOECDにテストガイドラインがありまして、テストガイドラインの211とか、産まれたばかりのミジンコを1匹50ccのビーカーに入れて3週間のうちに何匹子どもを産むかというのが判定方法です。そこに化学物質を入れてリプロダクションがどれだけ落ちるかということだけが、化学物質が危ないとか、いいとか言っているのですが、21世紀になって、それはちょっとあまりにも古典的すぎるだろうということで、ここに遺伝子の情報を持ち込みたいということで始めました。

研究目的

単為生殖でメスしか産まないミジンコがオスを産む仕組みの解明

ミジンコの性決定の仕組みを明らかにする。

化学物質のリスク評価(産仔数)にメカニズムを入れる。

ミジンコのホルモン合成経路の解明・ホルモンを定量する。

ホルモン受容体を明らかにする。

現在までの研究成果

1. 幼若ホルモンおよびその類似物質の暴露によりオスを産む (2003)
2. ミジンコの遺伝子を明らかにして、マイクロアレイを開発 (2005)
3. 脱皮ホルモン受容体のクローニング・レポーターアッセイ (2007)
4. OECD TG211 Annex7 (性比の観察を追加) (2008)
5. ミジンコ卵の遺伝子操作法(RNAi)の開発 (2011)
6. ミジンコの性決定遺伝子の解明 (2011)
7. 幼若ホルモン受容体のクローニング (2013)
8. 環境に依存してオスを産むミジンコを見出した (2013, 未発表)
9. ミジンコのホルモンの定量
10. ホルモン合成経路の解明
11. 環境依存性性決定の仕組みの解明

それは表向きの興味ということで、実際の研究目的は、ミジンコは通常、単為生殖で雌が雌を産んで増えます。だから、雄は基本的に要らないのですが、そういった単為生殖で雌しか産まないものが雄を産む。これはどうしてそうなるのだろうか。

その背景には、いろんなことを知らなきゃいけないのです。ミジンコの性決定、ミジンコの雌と雄はどう違うのかとか、雄を決める遺伝子は何とかか。

それから、さっきも言いましたが、化学物質のリスク評価に子どもの数だけではあまりにもダサい。だから、もう少しナウい方法を入れたいと。

それから、ミジンコのホルモンは幼若ホルモンと脱皮ホルモンだろうということはわかっていますが、ほとんど定量できていないので、どうやって定量するか。

それから、ホルモン合成経路がどうなっているとか、ホルモンの受容体を明らかにする。この辺がそろわないと、マウスとかメダカに追いつけないですね。ということで始めています。

ここに11まで書いておきましたが、それぞれのところで何年頃に、例えば幼若ホルモン様物質を入れると雄が産まれる。これは環境研の鑪迫先生たちと一緒に始めまして、これが2003年。

今度はミジンコの遺伝子を整理しなきゃいけない。ゲノムプロジェクトをやるほどお金はないので、ESTぐらい始めました。それが2005年ぐらいにマイクロアレイを作って、化学物質が来て動く遺伝子が大体わかるようになった。

その後、脱皮ホルモンの受容体はわりと簡単にクローニングできましたので、脱皮ホルモンの受容体も2つの蛋白質が一緒になって働くので結構面倒くさいのですが、それがわかったのが2007年。これを使って今レポーター遺伝子アッセイというのを作っていますので、環境省のEXTEND2010の中の無脊椎動物のin vitroアッセイはこれでやっています。

それからOECDのテストガイドラインの中に、化学物質をばく露して雄が産まれるか産まれないか、どれぐらい性比が変動するかということも評価に入れたら、というのが認められてAnnex7 になりましたが、これが2008年。

それから、ミジンコの卵の遺伝子操作をして、ある特定の遺伝子の発現しないようにするというRNA干渉法というのを作りました。それから、ミジンコの雄を決める遺伝子がわかったというのが2011年。

この辺の話をずっと経時的に話していきたいと思います。8、9、10というのは、未発表ですが、1つの系統で1日の光の長さを変えるだけで、短日、光の長さが短いと雄を産む。長くすると雌だけ産むという系統が見つかりましたので、化学物質をそう作らなくても、自然界にミミックして雄・雌が作れるという系もわかりました。

ミジンコのホルモンの定量、幼若ホルモン、脱皮ホルモンも何とか測れそうな雰囲気です。あと1年ぐらいの間にはきちっとできると思います。ホルモン合成経路もわかってきました。ということで、それを全部合わせると、環境依存性性決定として、ミジンコはどういうふうな雄を産むかということがわかるので

はないか。

1. ミジンコについて

特徴

(環境依存性性決定、単為生殖)

ミジンコを用いた毒性・環境評価試験

(TG202、TG211)

ゲノム

生態

最後に先ほどと同じスライドが出てきますが、まずミジンコです。特徴としては、環境依存性性決定。環境が悪くなると雄を産むと言われていますが、どういう環境をどういふふうが悪くしたら雄を産むかということは、教科書にも書いてないし、いろんな論文に書いてあることをいろいろ試しましたが、どれもこれも失敗です。だから、そう簡単にいかない。

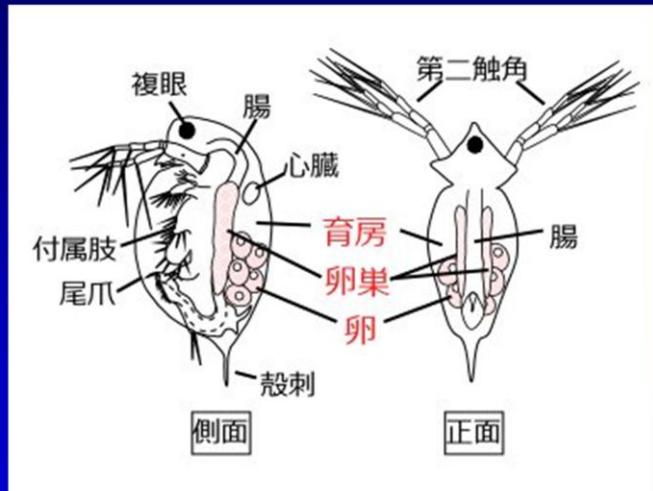
動物の性決定方式



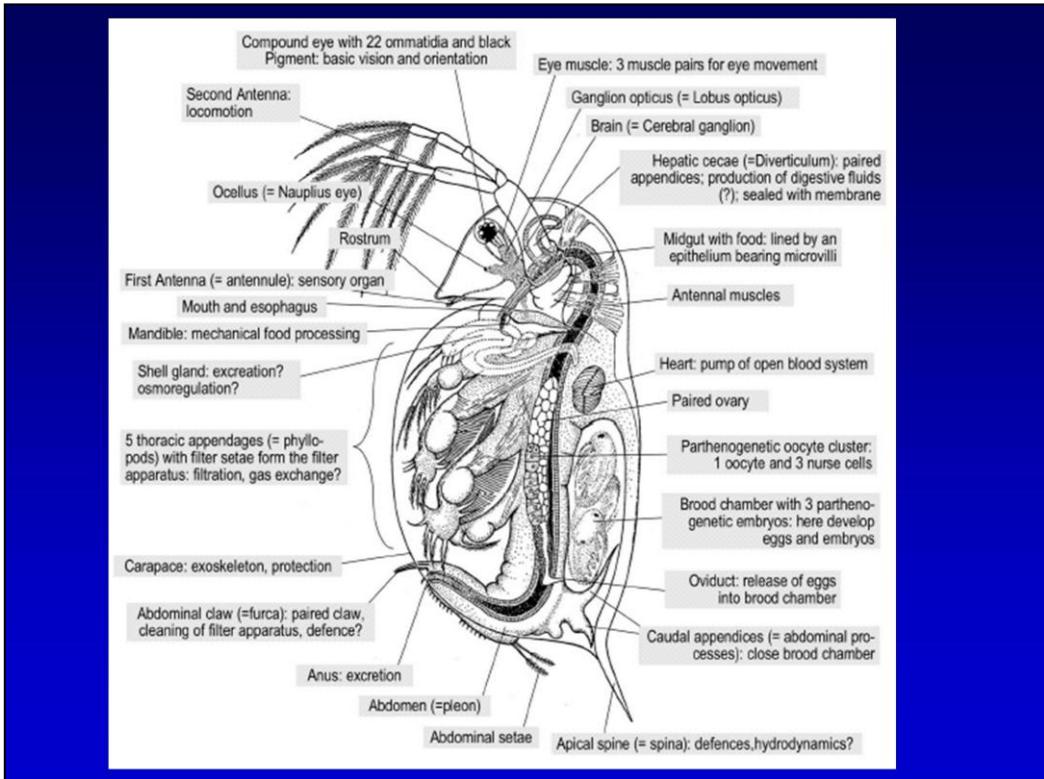
動物の性決定には遺伝子が決まっています、例えばネズミとかヒトではSRYという遺伝子があれば、それがちゃんと働くと精巣ができるということがわかっています。

一方こっちの方は、ワニは温度、だから性決定遺伝子はおそらくない。カメもそうですね。ミジンコの場合には、温度ではなくて、結論から言ってしまうと、幼若ホルモンがある程度あると雄を産むということがわかってきました。

ミジンコ *Daphnia pulex*

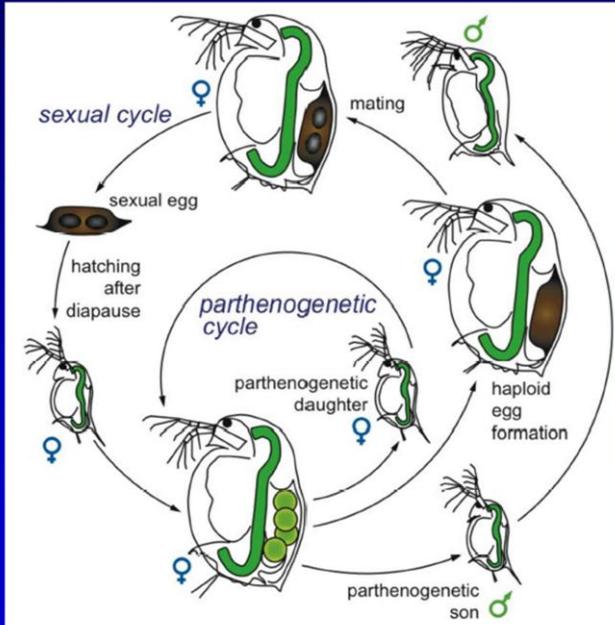


ミジンコの簡単な図ですが、複眼が真ん中であって、小さい単眼がこのあたりに1個あります。背中に育房という部屋があって、ここに産卵します。ここの中で発生して小さなミジンコができて、親が体を曲げたときにこの辺から泳ぎだしてきます。ということで、ここでは育房という卵が育つところ。卵巣は腸の両側にこういうふうにはりついています。



もっと詳しくはこういうふうになりますが、私も覚えていません。

単為生殖と有性生殖



環境依存性
性決定・性分化

環境悪化による雄産仔
短日
餌不足
混雑

幼若ホルモン及び
幼若ホルモン類似物質
による雄産仔

教科書によると、環境が悪くなると、雌のミジンコの卵が雄になる卵を産んで雄ができます。雄と雌が交尾すると、背中にちょっと茶色のところがありますが、耐久卵といいます。あの中に卵が2個入っていて、さやごと産みます。さやに入った耐久卵が田んぼの中にありますね。今はもう稲刈りも終わって水もないです。春先になって水が入ってきて、ちょっと温かくなると、また雌ミジンコがいっぱい増えますが、これは耐久卵が土の中であって、それが孵化してくる。こういう戦略で生きています。



単為生殖と有性生殖の使い分け

生殖様式

卵形成



単為生殖

(2n)

体細胞分裂？



切り換え



有性生殖

(n + n = 2n)

減数分裂

どちらの生殖様式でも2倍体の子を形成

非常に面白くてまだ研究はこれからというのは、単為生殖というのは、同じ雌が雌を産みますので、減数分裂する必要がないですね。だけど、雄を産んで、雄と交尾するときには、雄は精子を出す。雌の方も減数分裂して卵の遺伝子を半分におこなきゃいけない。この仕組みがまだわかりません。この辺が行政の話とはだいぶ違いますが、研究的には非常に面白いところです。