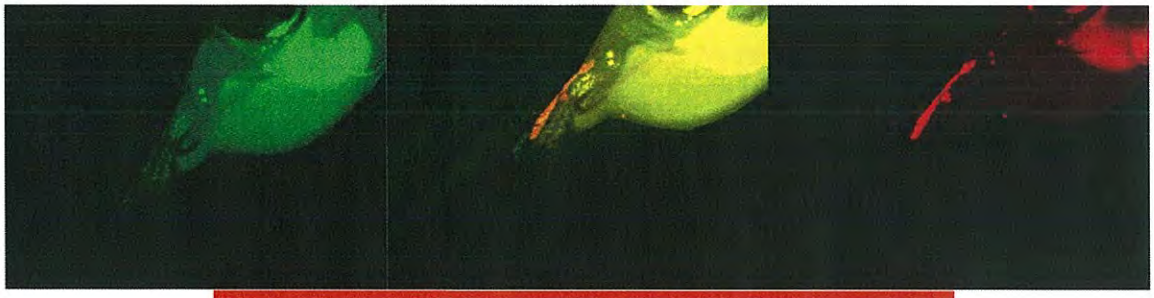
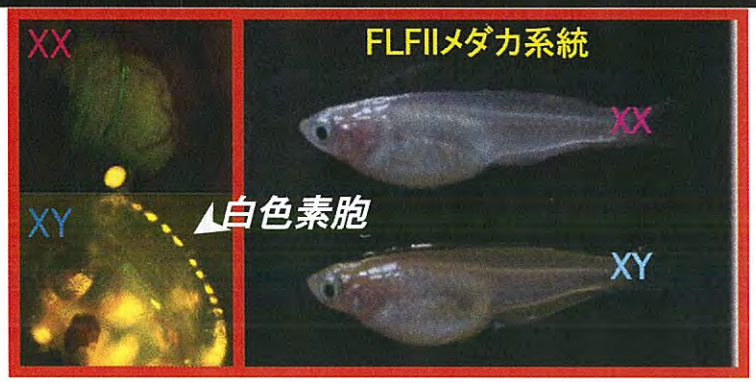
2013年3月15日　環境研究総合推進費　成果報告会

環境ストレスが及ぼす生物影響の評価手法の開発

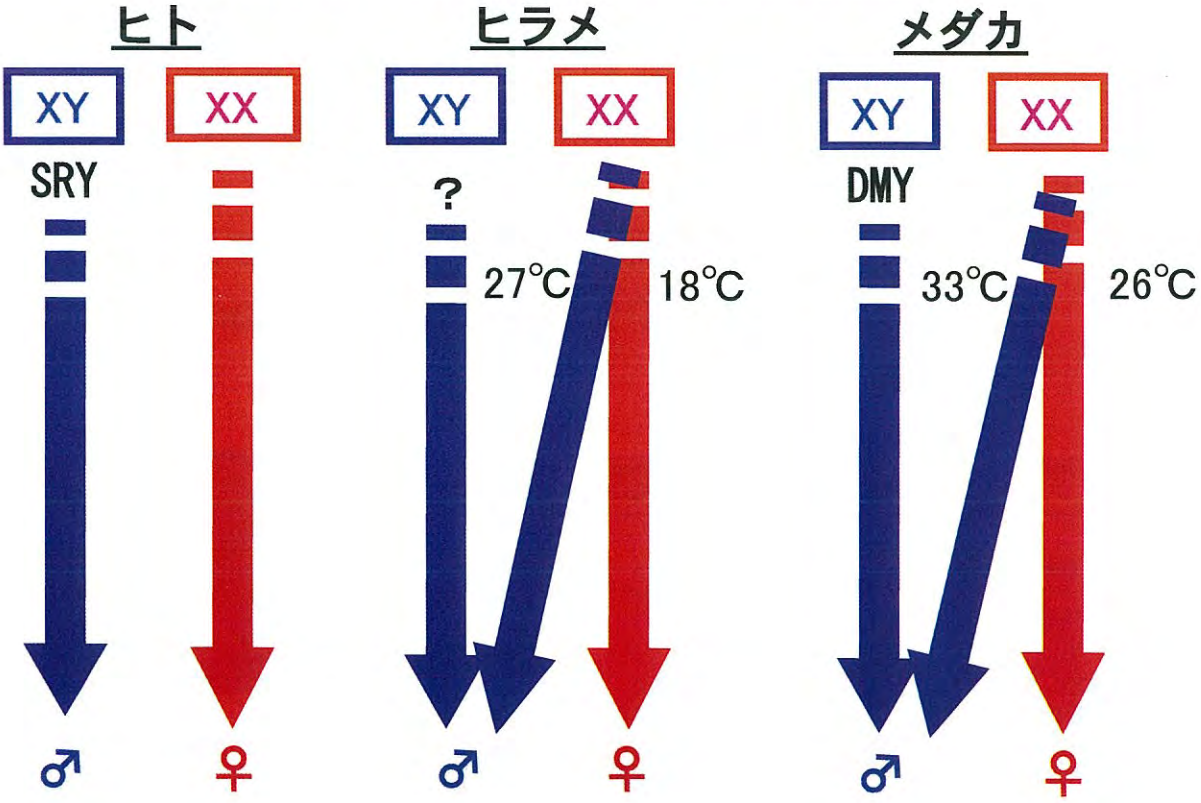
熊本大学大学院自然科学研究科　　北野　健





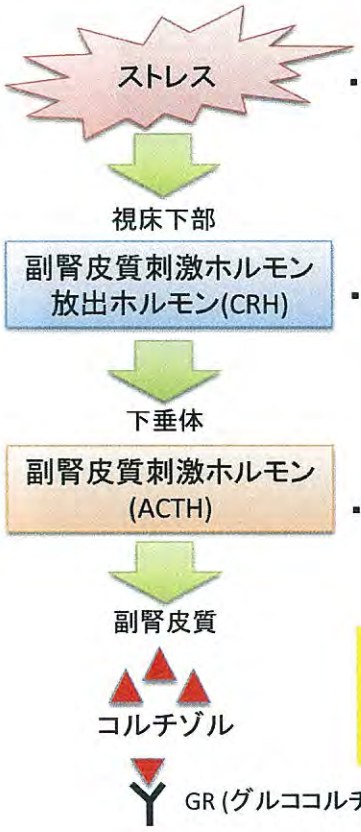
背景－1

脊椎動物の性決定・性分化



背景−1

コルチゾル



- 副腎皮質で産生される糖質コルチコイドで、ストレスから生物を守り、恒常性の維持に関わる。
- 生物が身体的・精神的ストレスを受けることで、下垂体前葉からのACTHの作用により分泌が増加する。
- 硬骨魚類では、高水温、高密度飼育などのストレスにより、分泌が増加する。

高温ストレスによる雄化には、コルチゾル量の増加が関与している

(ヒラメ: Yamaguchi, Kitano et al., 2010)

背景−2

トリブチルスズ(TBT)によるヒラメの雄化

- トリブチルスズオキシド(TBTO)は、ヒラメ遺伝的雌の雄化を誘導する (Shimasaki, Kitano et al., 2002)。
- TBTは、ヒト繊維芽細胞において、hsp70などのストレス関連遺伝子の発現を誘導する(Zhang and Liu, 1992)。

Table 2. Proportion of sex-reversed males among genetically female flounder treated with tributyltin oxide

Treatment dose	*n*	Male rate (%)
Control	45	2.2
0.1 μg/g diet	35	25.7*
1.0 μg/g diet	45	31.1*

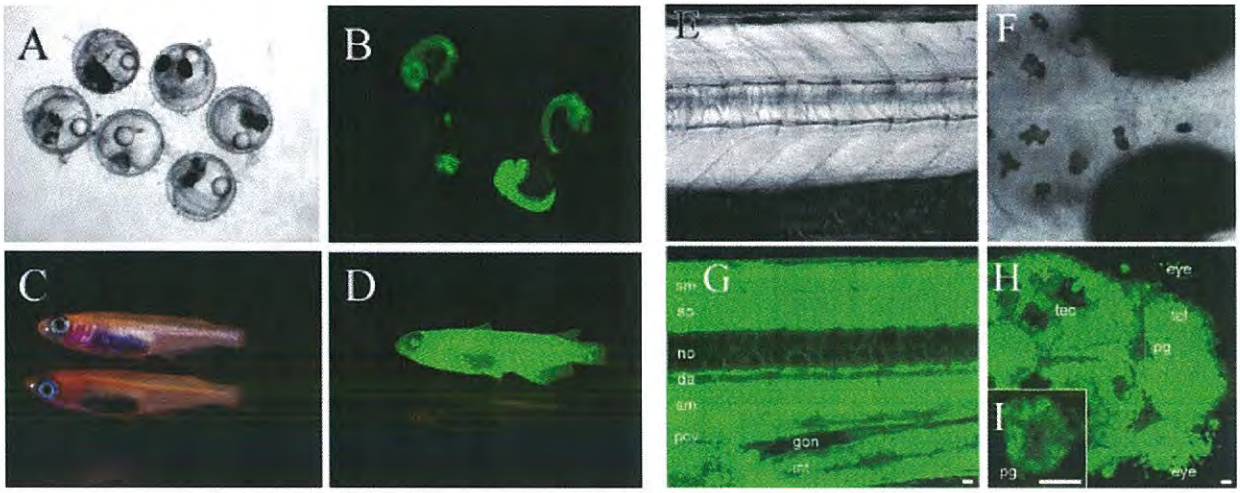
* Significantly different from control at $p < 0.05$ (chi-squared test).

(Shimasaki, Kitano et al., 2002)

背景−3

hsp70−Venusトランスジェニックメダカ系統

・hsp70-Venusトランスジェニック(Tg)メダカ系統の作製に成功している (Oda, Kitano et al., 2010)。



目 的

多くの化学物質は、ストレス作用を通して
生物に影響を与えている可能性がある。

↓ 化学物質のストレス作用を調査する必要あり

環境ストレスが及ぼす生物影響の評価手法の開発

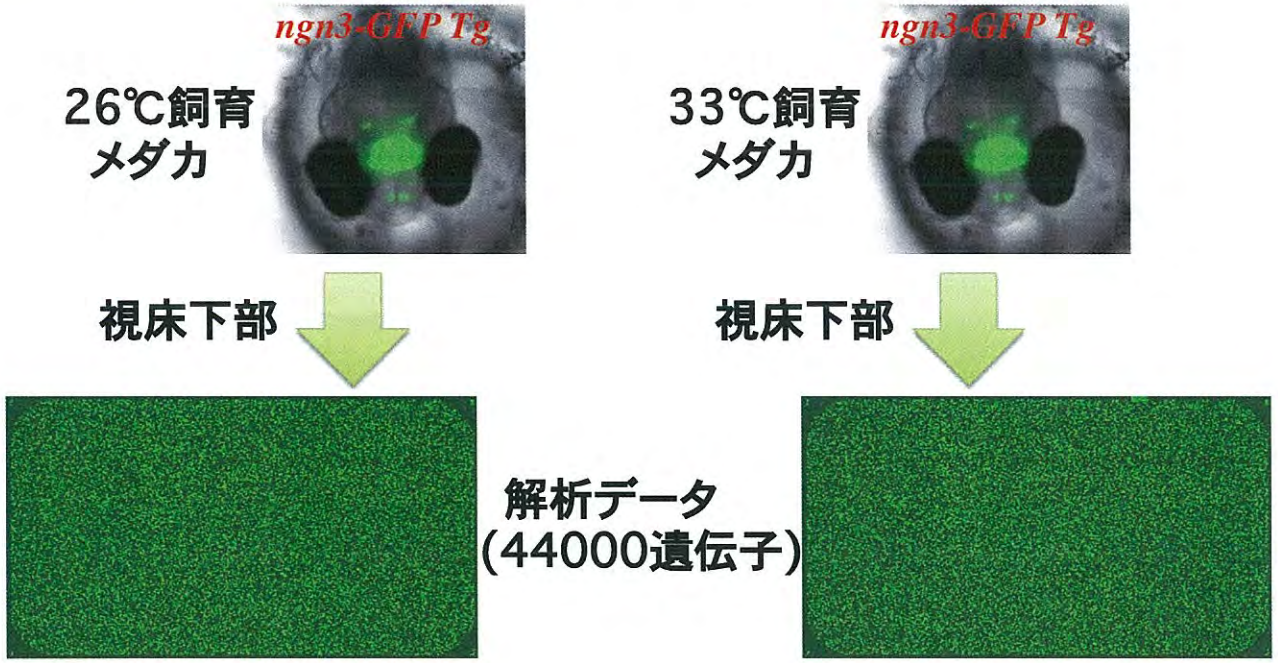
1. 高温ストレスが及ぼすストレス及び雄化誘導機構の解析(1年目)

2. TBTが及ぼすストレス及び雄化誘導機構の解析(2年目)

3. 化学物質等が及ぼすストレス作用の評価手法の開発(3年目)

1年目

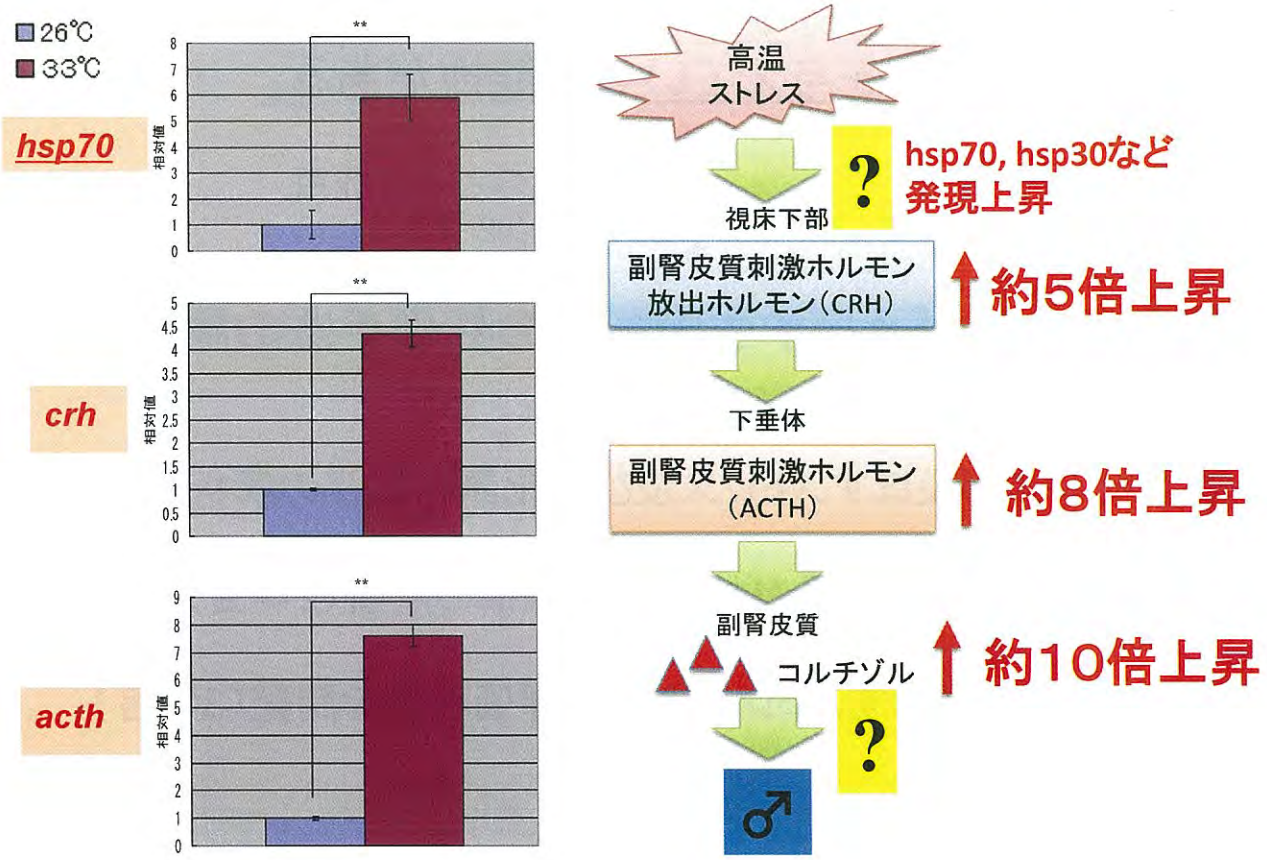
DNAマイクロアレイ解析



・10倍以上発現量が上昇した遺伝子 65個 (hsp70, hsp30など)
・10倍以上発現量が減少した遺伝子 58個

1年目

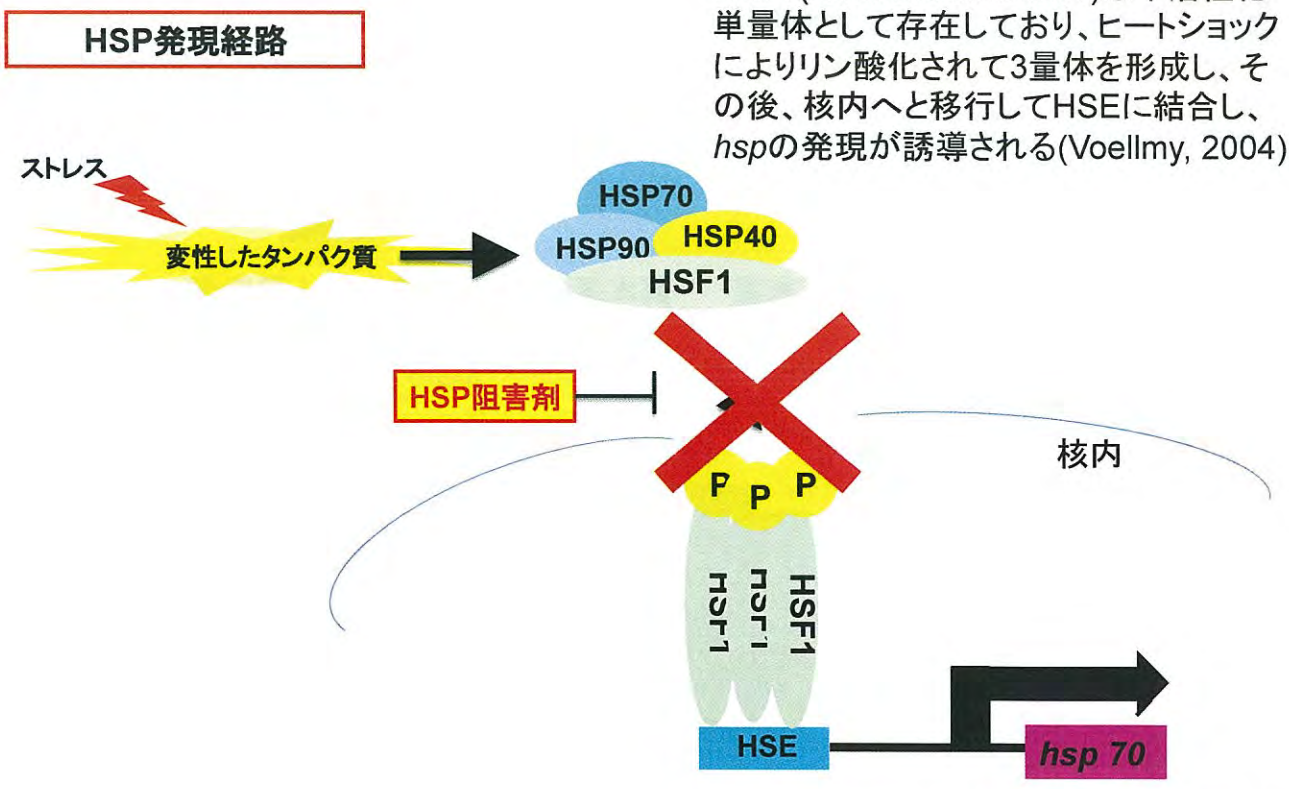
高温ストレスによる雄化誘導機構



ヒートショックプロテイン（HSP）の生理的機能

ヒートショックプロテイン(HSP)の発現制御機構

HSF1(Heat shock factor1)は不活性化単量体として存在しており、ヒートショックによりリン酸化されて3量体を形成し、その後、核内へと移行してHSEに結合し、*hsp*の発現が誘導される(Voellmy, 2004)。



(Holmberg et al., 2001)

Tgメダカを用いたin vivo実験システム

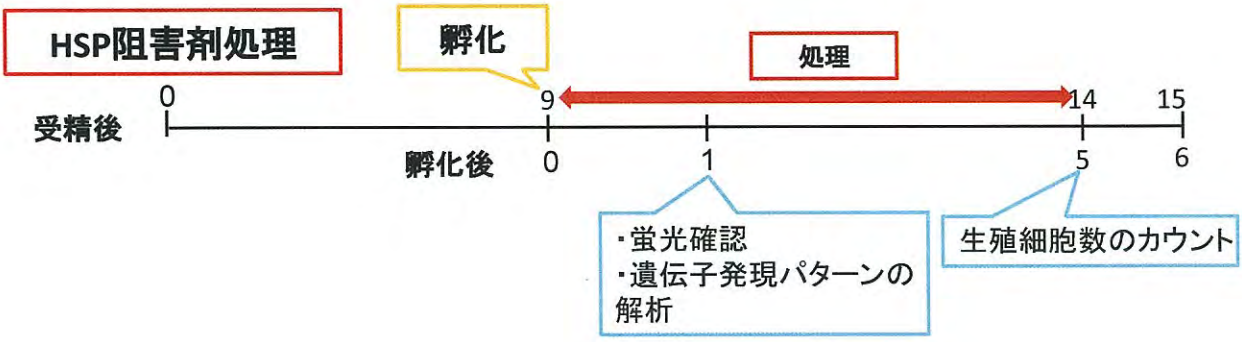
高水温処理条件下でHSP阻害剤処理を行い、Tgメダカへの影響を解析する

CONTENTS

1. **HSP阻害剤の条件検討**
   - 蛍光確認・生存率
   - 遺伝子発現パターンの解析
2. **性分化への影響**
   - 生殖細胞数のカウント

hsp70-Venus / olvas-DsRed Tg 系統

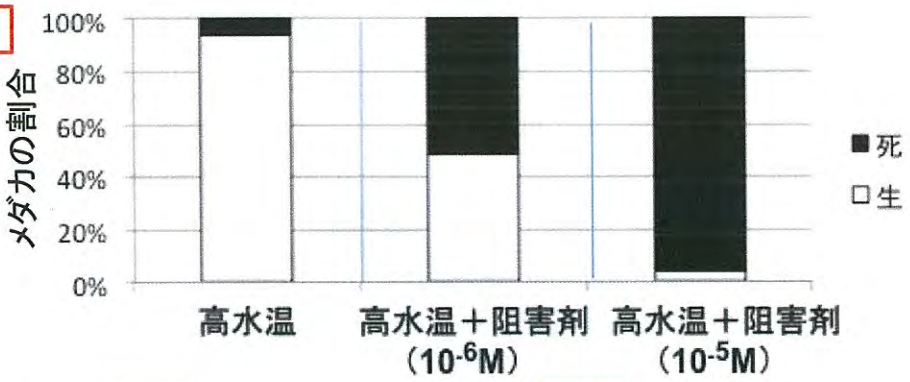
*hsp70*を Venus蛍光で可視化/ 生殖細胞を外部から可視化

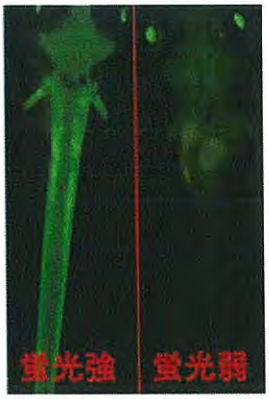


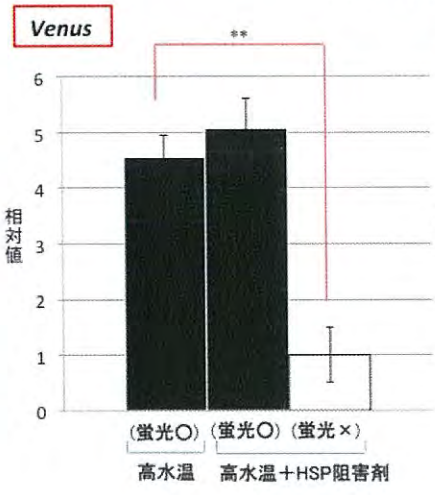
3年目

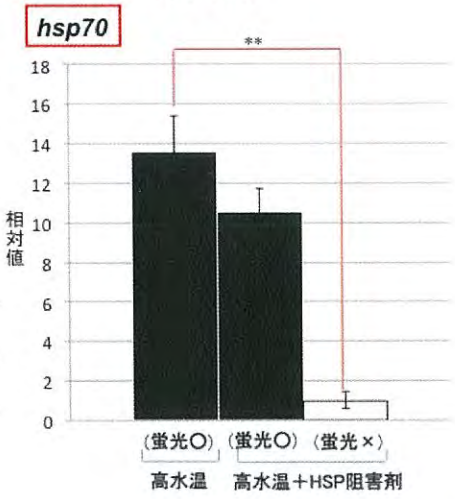
HSP阻害剤処理個体の生残率及びVenus蛍光

生存率





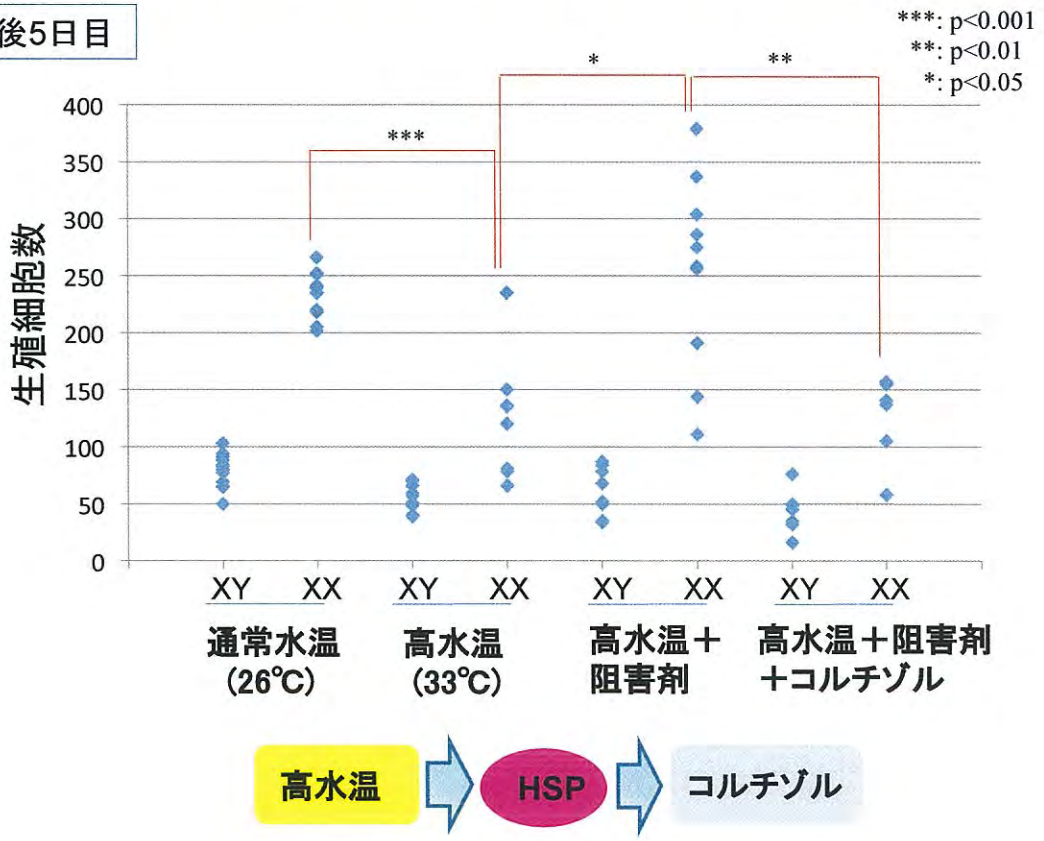




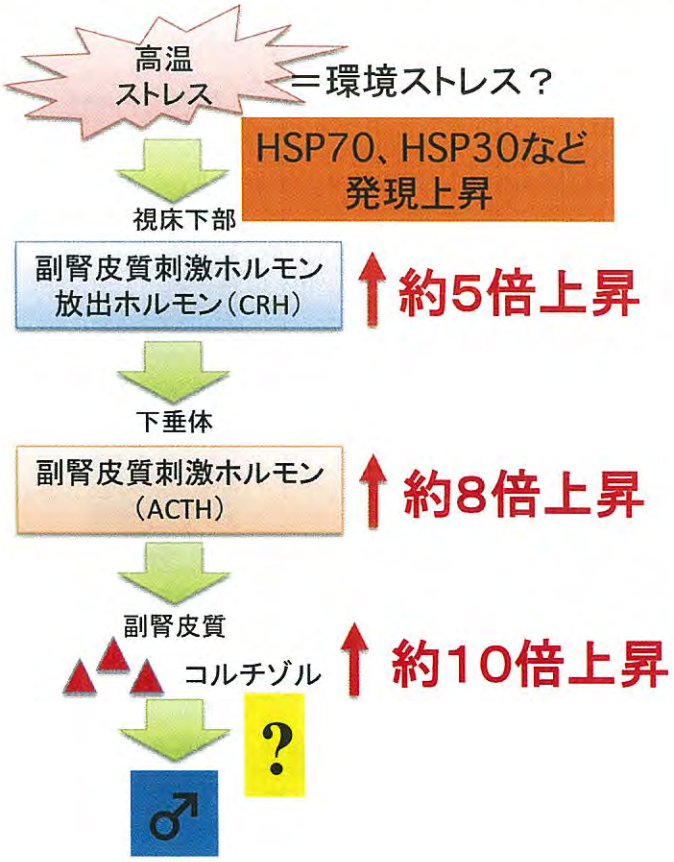
3年目

HSP阻害剤処理個体の生殖細胞数

孵化後5日目



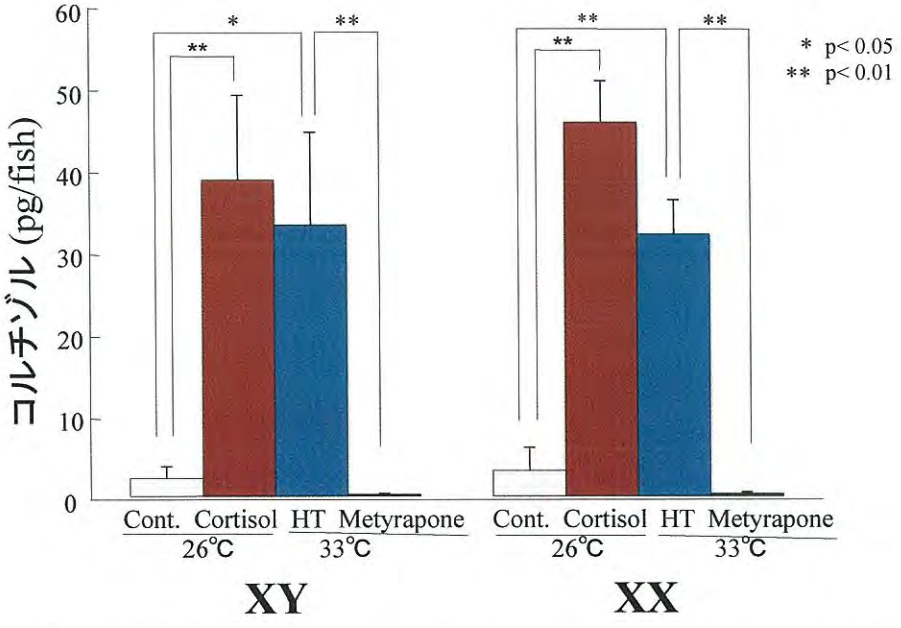
高温ストレスによる雄化誘導機構



高温ストレスによる雄化の分子機構

1年目

メダカ性分化時期の体内コルチゾル量



体内コルチゾル量は、コルチゾルまたは高水温処理により増加し、
メチラポン処理により有意に減少した。 *(Hayashi, Kitano et al., 2010)*

1年目

コルチゾルまたは高温処理したメダカの性比

FLFII メダカ	No. of adult fish XY ♂	XY ♀	XX ♂	XX ♀	雄化率
Control (26°C)	15	0	0	14	0 %
Cortisol (26°C)	17	0	12	13	48 %
HT-control(33°C)	10	0	3	9	25 %
Metyrapone(33°C)	11	0	0	9	0 %

通常 XY ♂

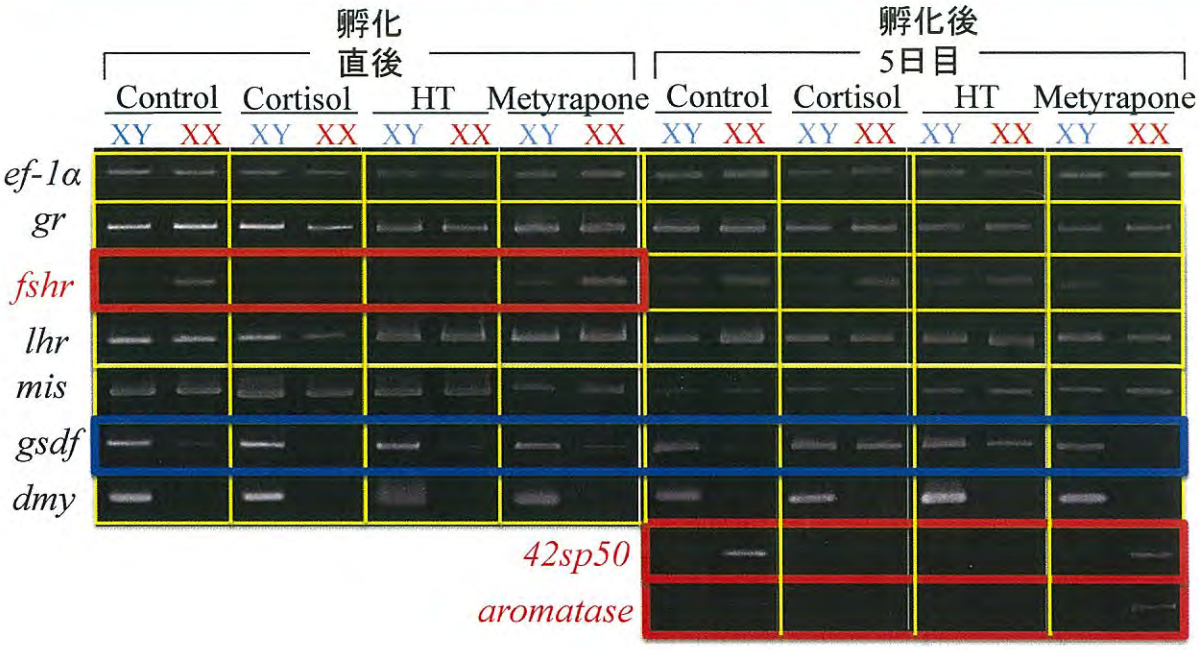
通常 XX ♀

コルチゾル処理 XX ♂

(Hayashi, Kitano et al., 2010)

1年目

コルチゾル及び高水温が及ぼす性分化関連遺伝子への影響



コルチゾルまたは高水温処理したXXメダカにおいて、エストロゲン合成酵素(*aromatase*) mRNAの発現が抑制、細胞増殖因子(*gsdf*) mRNAの発現が誘導されていた。

2年目

エストロゲン処理したメダカの性比

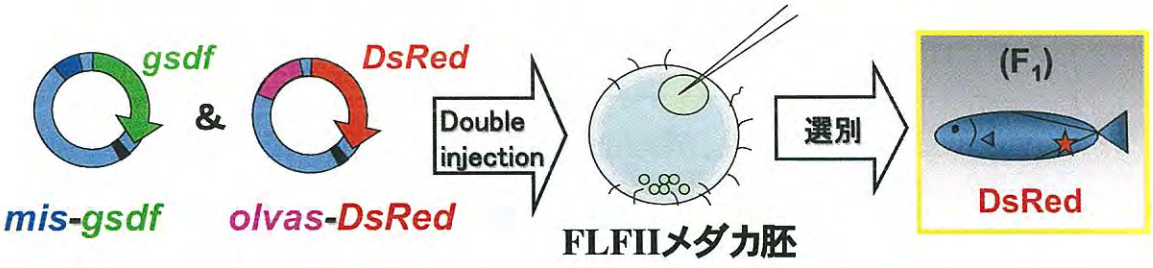
FLFII メダカ	No. of adult fish XY ♂	XY ♀	XX ♂	XX ♀	雄化率
Control (26°C)	15	0	0	14	0 %
Control (26°C)+E2	9	0	0	5	0 %
Cortisol (26°C)	9	0	24	6	80 %
Cortisol (26°C)+E2	8	0	0	10	0 %
HT (33°C)	8	0	3	12	20 %
HT (33°C)+E2	12	0	0	8	0 %

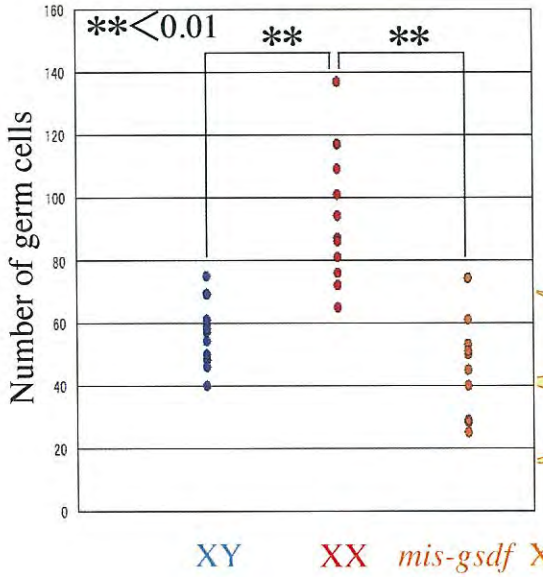
コルチゾル及び高温処理による雄化は、エストロゲン処理により完全に回復した。このことから、高温ストレスによる雄化は、エストロゲン量の減少により引き起こされていると考えられる。

(Kitano et al., 2012)

3年目

GSDF過剰発現メダカ系統の作製



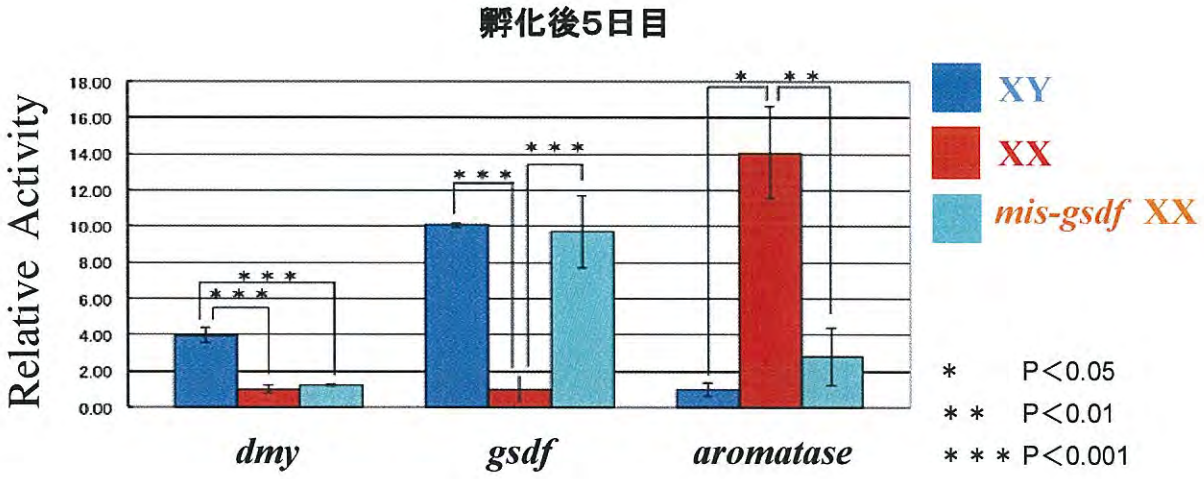


GSDF過剰発現 Tg XX ♂

XX → male
Sex-reversal

3年目

GSDFが及ぼす性分化関連遺伝子の発現への影響 ー定量的リアルタイムPCRー

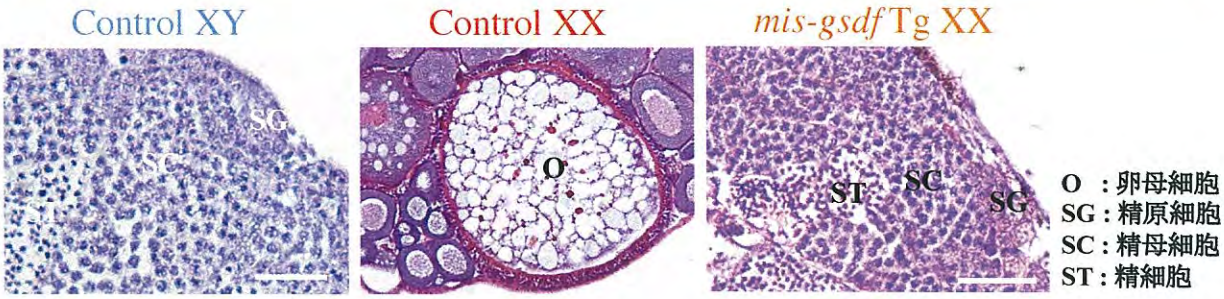


GSDF過剰発現メダカにおいては、*gsdf* mRNA発現が誘導、*aromatase* mRNA発現が抑制された。

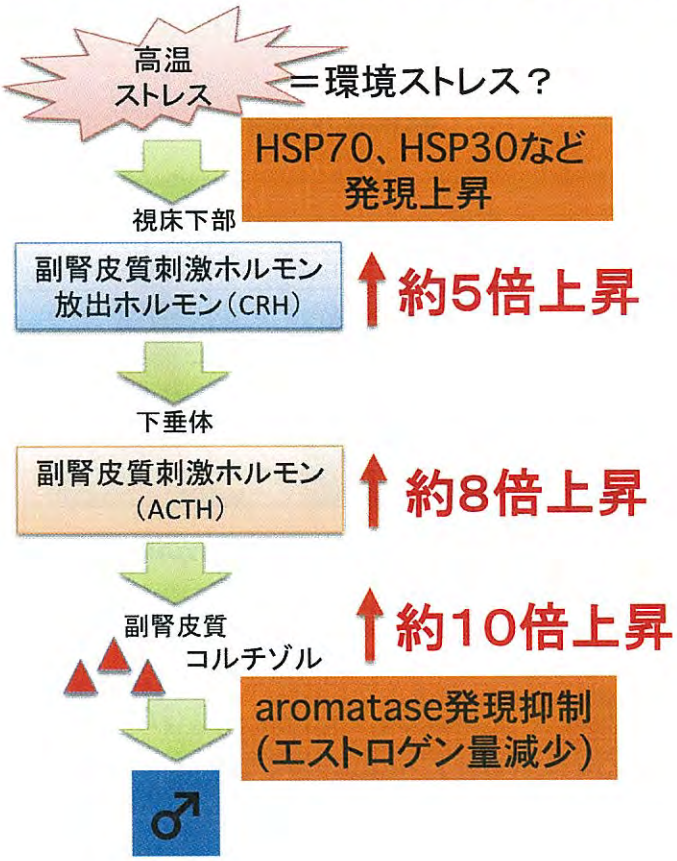
3年目

エストロゲン処理した*mis-gsdf* XXメダカの雄化率

	XY♂	XY♀	XX♂	XX♀	Percentage of XX sex-reversal
Control (FLF)	15	0	0	14	0%
mis-gsdf Tg	0	0	11	0	100%
mis-gsdf Tg +E2	0	0	0	13	0%



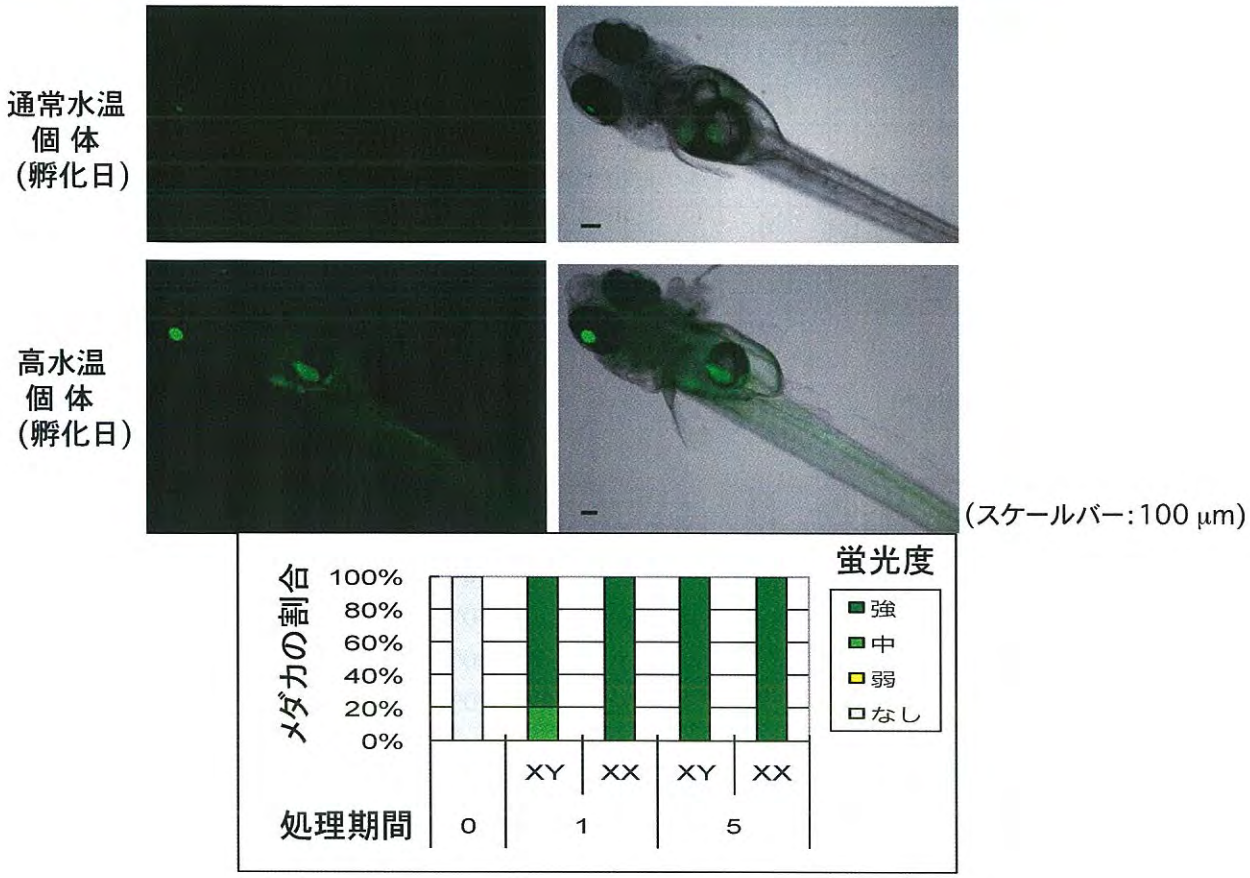
高温ストレスによる雄化誘導機構



Tgメダカの蛍光タンパク発現における環境ストレスの影響

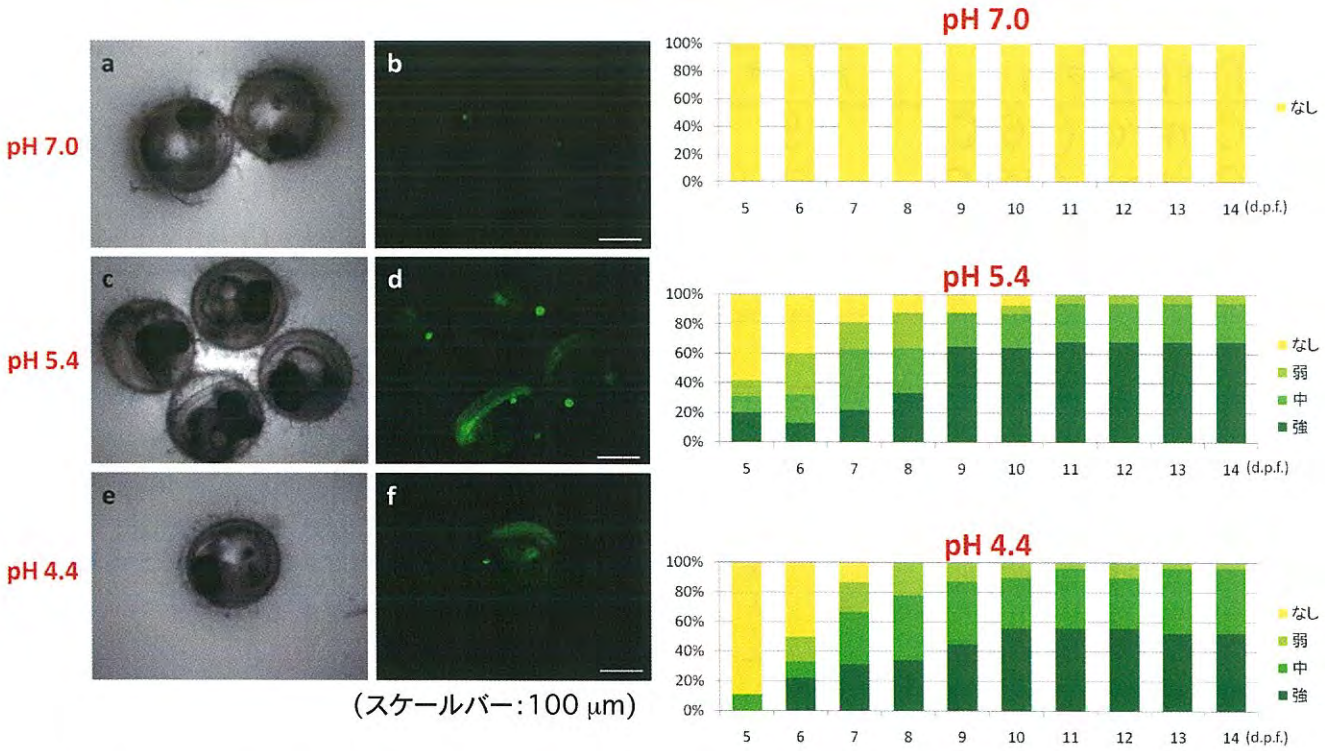
1年目

高温ストレスによるVenusの発現変化



2年目

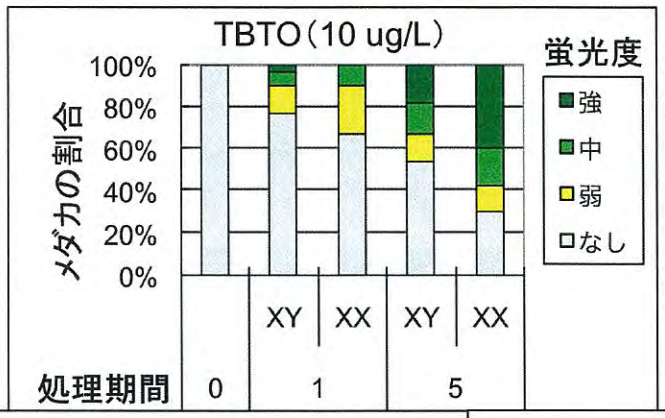
酸性ストレスによるVenusの発現変化

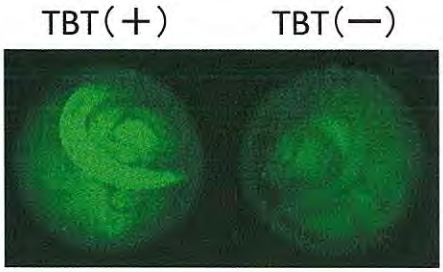


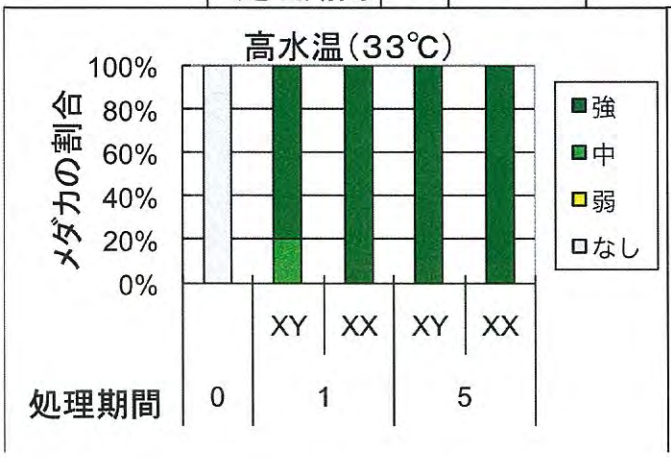
hsp70-Venus Tg メダカは、高温や酸性の環境ストレスに対して強い応答性を示すことが分かった。

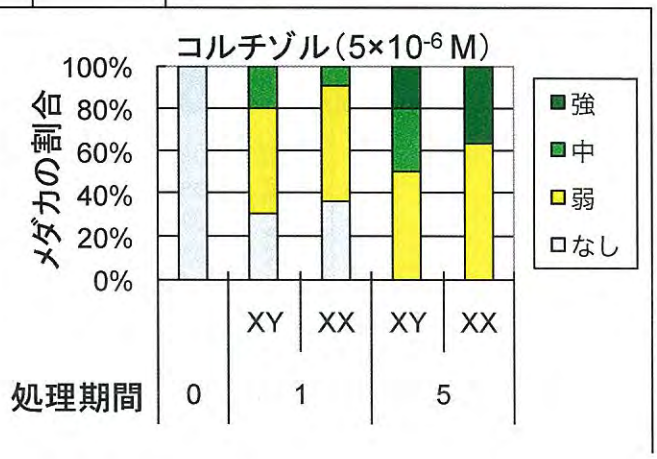
2年目

hsp70-Venus Tgメダカにおいて TBTOが及ぼす Venus発現への影響





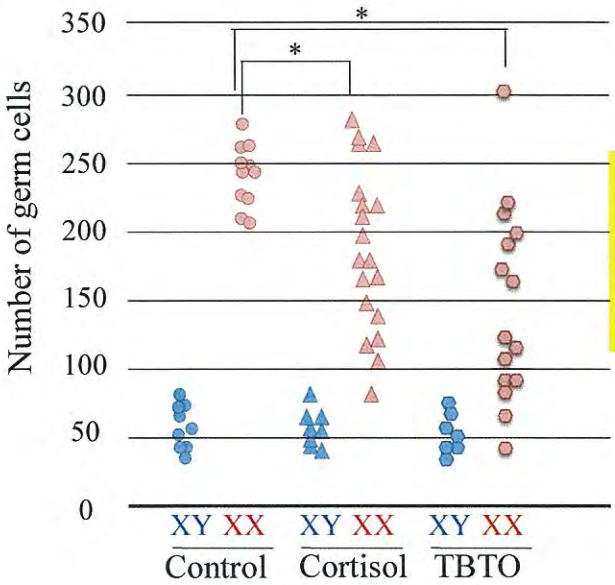




2年目

TBT処理したメダカの性比

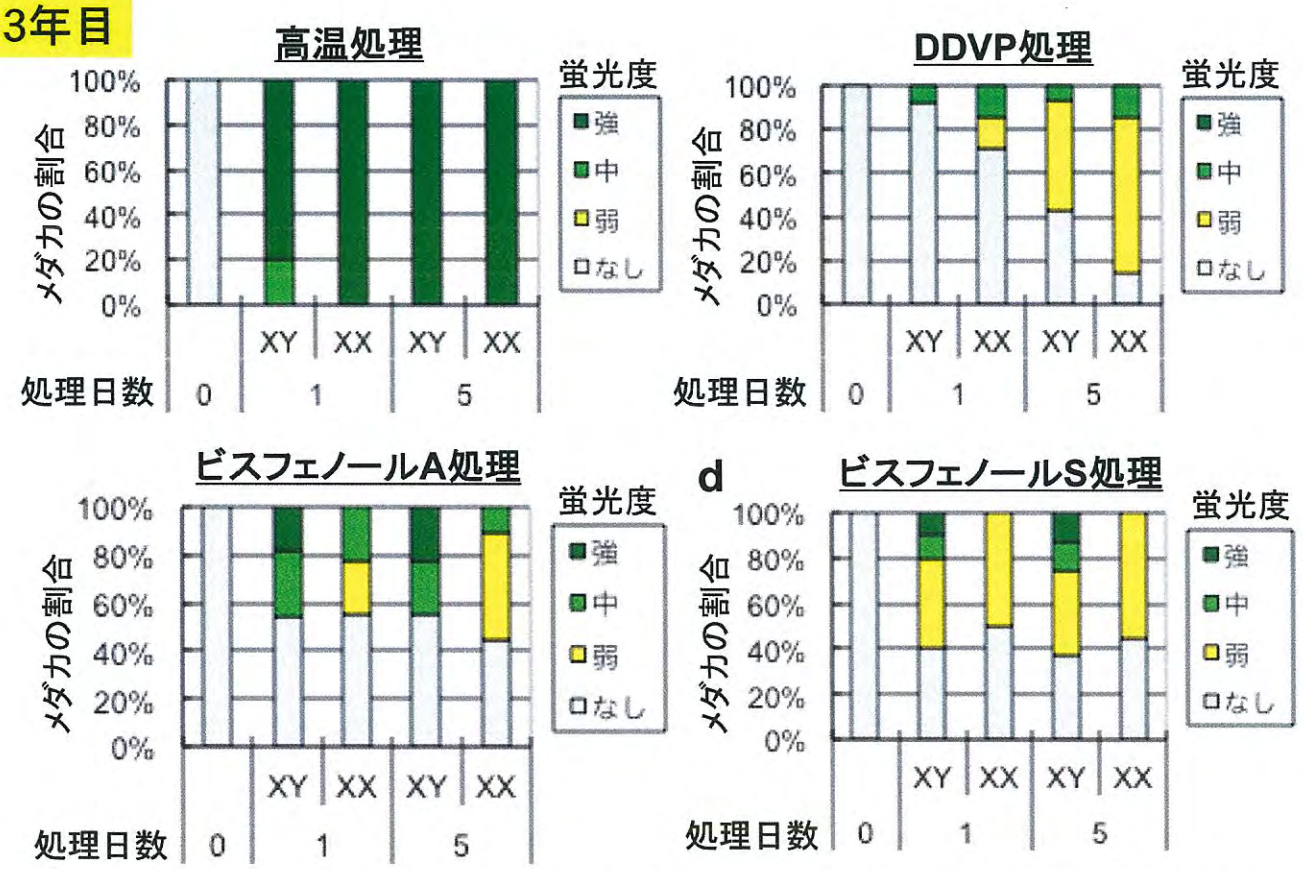
FLFII メダカ	No. of adult fish XY ♂	XY ♀	XX ♂	XX ♀	雄化率
Control (26°C)	15	0	0	14	0 %
Cortisol (26°C)	17	0	12	13	48 %
TBTO (10 ug/L)	14	0	0	16	0 %



＊：P＜0.05

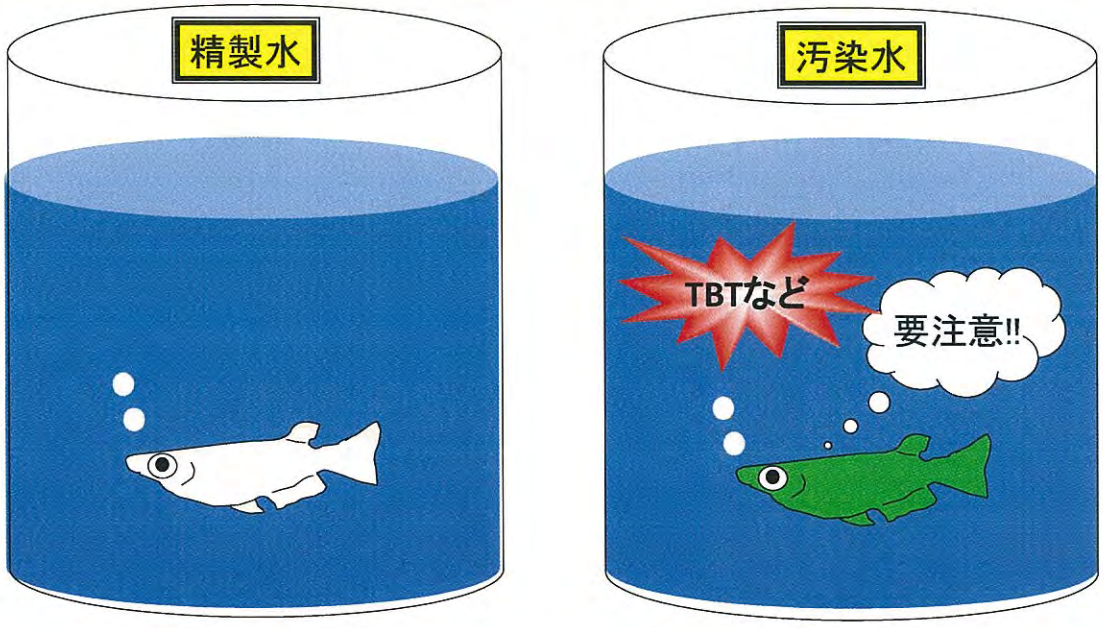
TBT処理したメダカ仔魚（孵化後5日目）の生殖細胞数

3年目



このTgメダカは、化学物質に対しても応答性を示すことから、「環境水の複合ストレス作用」を評価するための優れた生物センサーとなりうると考えられる。

遺伝子導入メダカ（生物センサー）を用いた環境水の複合ストレス作用評価システム



利点 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評価できる