

「内分泌かく乱物質」

平成12年度採択研究代表者

長濱 嘉孝

(岡崎国立共同研究機構 教授)

「魚類生殖内分泌系に及ぼす内分泌かく乱物質の影響の分子メカニズム」

1. 研究実施の概要

内分泌かく乱物質は性ステロイドホルモン・受容体を介して生殖機能に障害をもたらすことが多いが、その作用メカニズムの詳細は未だ明らかにされていない。我々はこれまで魚類を対象として生殖腺の性分化や配偶子形成を制御する性ステロイドホルモン因子を単離、同定するとともに、それらの産生と作用の分子機構を解明してきた。本研究では、内分泌かく乱物質が深く影響を及ぼすと考えられる3つの過程（生殖腺の性分化、精子形成、卵成熟）に焦点を絞り、各々の過程における内分泌かく乱物質の影響と作用メカニズムを分子・細胞レベルで解明することを目指す。また同時に、これら3過程の制御機構については遺伝子レベルの基礎的研究をさらに発展させ、内分泌かく乱物質の作用メカニズム解析のための堅固な基盤とする。

本年度も引き続き、生殖腺の性分化機構、特に卵巣分化に果たすエストロゲンの役割、精巣分化に果たすDMRT1遺伝子の役割、減数分裂の制御因子、精子形成と卵成熟の機構、雌から雄への性転換時における性ホルモン、特にエストロゲンの役割、などについての基礎的知見を蓄積するとともに、内分泌かく乱物質の影響とメカニズムを解析するためのin vitro評価法の開発、さらには性分化やキンギョの卵成熟に及ぼす内分泌かく乱物質の影響とメカニズム、などについて解析した。その結果、エストロゲン処理によりアロマターゼ遺伝子の発現が促進され、DMRT1遺伝子の発現が抑制されること、アンドロゲンで誘導される生殖腺の雄化にDMRT1遺伝子の発現が不可欠であること、エストロゲン生成の低下がベラの雌から雄への性転換の引き金となること、等を示すとともに、新規のステロイド膜受容体遺伝子のクローニングに成功した。また、エストロゲン受容体 α と β 、アンドロゲン受容体 α と β 、プロゲステロン(核)受容体 α と β のin vitroアッセイ法を確立するとともに、ノニルフェノール及びビスフェノールAの作用が主にエストロゲン受容体 α を介していることを明らかにした。さらに、ゲスタインがノニルフェノールやビスフェノールと同様にヒラメを雌化させることを示した。

2. 研究実施内容

(1) 基礎研究グループ (長濱) グループ

研究項目： 魚類生殖内分泌系に及ぼす内分泌かく乱物質と性ステロイドホルモンの影響の分子メカニズムに関する研究

1) 卵巣分化に果たすエストロゲンの役割：

昨年度までの研究で、エストロゲンが卵巣分化に不可欠であることがわかったので、本年度からは主にテラピアを用いてエストロゲンの作用機構について解析を行っている。XY個体を孵化後4-6日間のみエストロゲンに暴露すると機能的な雌への性転換が起こる。この時期の本来のXY個体では生殖細胞の増殖停止が起こるが、XY性転換魚ではこの増殖停止はみられず、XX個体と同様な生殖細胞の増殖を示した。この系を用いて、卵巣分化を誘起するエストロゲンの下流遺伝子をサブトラクション法により検索した。現在までに、エストロゲンによって発現の増加する7遺伝子、減少する3遺伝子を単離した。この検索はさらに続行中である。これまでに得られた中で特に注目される遺伝子は、エストロゲン処理により発現が顕著に増加したアロマターゼ遺伝子である。卵巣型アロマターゼ (CYP19a) の5' 上流域、約2 kbをクローニングした結果、estrogen responsive element (ERE)が存在することを確かめた。そこで、卵巣型アロマターゼ (CYP19a) の5' 上流域、約2 kbにレポーターとしてルシフェラーゼを繋いだコンストラクトを作製し、293細胞に α 型あるいは、 β 型のエストロゲンリセプターと共発現させ、estradiol-17 β の存在、非存在下でのルシフェラーゼの発現を指標として、転写活性を調べた。その結果、リセプターの型に関係なく、エストロゲンの濃度依存的に転写活性の促進がみられた。このことから、エストロゲンによるXY性転換卵巣分化の誘起に伴ってみられる卵巣型アロマターゼ (CYP19a) の顕著な発現増加は、エストロゲンにより、エストロゲン受容体を介して直接的に誘起されること、また、発現誘起されたアロマターゼ (CYP19a) は生合成されたエストロゲンによりオートクリン・コントロールのもとにup-regulationされていることが明らかとなった。一方、エストロゲン処理により顕著に発現が減少した遺伝子としてはDMRT1が同定された。そこで、エストロゲンによって誘起されるXY個体での卵巣分化過程におけるDMRT1の発現動態を調べたところ、孵化後15日でその発現はほとんど消失することが明らかとなった。これらのことから、DMRT1は精巣分化に重要な機能を果たすが、卵巣分化には必要ではないと結論された。今後、同様な解析を内分泌かく乱物質を処理したXY個体についても行い、エストロゲン処理の結果と比較する予定である。

2) 精巣分化に果たすDMRT1の役割：

昨年度までの研究で、テラピアの精巣分化にはDMRT1が重要な役割を果たすことが明らかになった。このことは、孵化直後の遺伝的雌稚魚にアロマターゼ阻害剤 (ファドロゾール) やアンドロゲン进行处理することにより誘導される雄への性転換の過程でDMRT1の発現が誘導されることによっても支持される。このアンドロゲンによるXX個体の雄への性転換時におけるDMRT1の役割を、in vivo 遺伝子導入法 (マイクロインジェクションとエレ

クトロポレーション)により解析した。DMRT1のモルフォリノアンチセンスオリゴをこの方法によりXX生殖腺に導入した結果、アンドロゲン処理を行ったXX個体でも、精巢の発達は認められず卵母細胞をもつ典型的な卵巢の形成がみられた。一方、DMRT1のモルフォリノアンチセンスオリゴと同時にDMRT1 mRNAを導入した場合には、性転換が誘導され、精巢組織が観察された。これらの結果から、アンドロゲン処理によりXX個体で誘起された精巢分化には、DMRT1の発現誘導が必要であることが明らかとなった。さらに、DMRT1とともに精巢分化に必須な遺伝子産物を明らかにするために、アンドロゲン処理によって発現が特異的に増加、減少する遺伝子産物をサブトラクション法で検索している。

一方で、引き続きDMドメインを有する遺伝子のクローニングを継続しているが、これまでに合計6つの遺伝子(DMRT1とDMOはすでに報告した)が見つかっている。現在、まだ発現パターンが明らかでない4つの遺伝子について生殖腺での発現を解析している。

3) 生殖腺の性分化に発現する遺伝子の網羅的解析:

生殖腺の性分化機構を解析する上で、ティラピアを用いることの最大の利点は、孵化直後(5-20日)の性的未分化雌雄生殖腺を別々に単離することができることである。本研究では、ティラピアの性分化期前後(孵化後5、10、15、20、35日)の雌雄それぞれの生殖腺を取り出し、cDNAライブラリーを作成することを計画している。まず、作成したcDNAライブラリーからランダムに3,840クローンを選び、遺伝子の5'側からの1回シーケンスによりその塩基配列(500-600 bp)を決定する。塩基配列データからコンピュータを用いたクラスター解析により、独立クローンを抽出する。将来的には、独立クローンを集めたマイクロアレイを作成し、ホルモン処理や内分泌かく乱化学物質に曝露した時に、発現量の変化する遺伝子を同定する計画である。

これまでに、孵化後35日と5日の雌雄の生殖腺cDNAライブラリーの構築を完了し、現在、10日のライブラリーを構築中である。さらに、孵化後35日と5日の雌雄の生殖腺cDNAライブラリーについては、すでにシーケンスは終了するとともに、それぞれのライブラリーごとのクラスター解析についても5日の雌雄、孵化後5日の雌については終了した。今後、孵化後10、15、20日の雌雄の生殖腺由来のcDNAライブラリーも順次構築し、それらについて塩基配列決定、クラスター解析へと進める予定である。これまでの解析で明らかになったことで注目されるのは、孵化後5日の雌の生殖腺にFSH受容体遺伝子が発現していることが示されたことである。従って今後、生殖腺の性分化における脳/下垂体系の関与についても解析する必要がある。

4) 体細胞分裂から減数分裂への移行の分子機構解明のためのin vitro培養系の構築:

脊椎動物一般に、遺伝的雌では雄よりも早く減数分裂の開始がみられ、雄の生殖細胞ではこの時期、減数分裂への移行はみられない(mitotic arrest)。しかし、解析するための適当な実験系が欠如していたために、この分子機構は未だに脊椎動物を通じて明らかにはなっていない。最近、我々は孵化後20日のXX個体の生殖腺を器官培養することによって、in vivoと同様な時間軸で減数分裂への移行を再現することに成功した。この系では開始時の生殖細胞はすべて卵原細胞である。この系におけるエストロゲンの影響を調べたとこ

ろ、エストラジオール-17 β (E2, 0.1 nM) で有意な卵原細胞の増殖を起こすことができたが、減数分裂への移行はみられなかった。今後、この系を用いて減数分裂移行の分子機構を解析する。

5) ステロイド受容体およびレポーターの恒常的発現細胞系の樹立：

我々は先に、アンドロゲン受容体 (AR) とプロゲステロン受容体 (PR) のそれぞれについて2種類のサブタイプ (AR α , AR β , PR α , PR β) を、脊椎動物ではじめてニホンウナギの精巣から単離した。両サブタイプは転写活性化ドメインの構造や発現する組織が異なることからそれぞれ異なる働きを持つことが予想される。また、これらのサブタイプが示すステロイドに対する反応性が異なるので、薬剤を含む化学物質などに対する反応性もサブタイプ間で異なることが予想される。そこで、これらのステロイド受容体に対する内分泌かく乱物質を含む種々物質の反応性を調べるために、簡便で精度の高い検出系の確立が必要となる。そこでまず、それぞれのサブタイプとレポーター遺伝子が恒常的に発現する細胞系の樹立を試みた。ステロイド反応配列を有する MMTV-LTR プロモーターの制御下においたホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現ベクターと、ネオマイシン耐性遺伝子も同時に発現するウナギAR または PR (AR α , AR β , PR α , PR β) の発現ベクターを直鎖状にして HEK293 細胞にリポフェクション法により導入した。導入48時間後、G418 添加による薬剤選択、さらには限界希釈法により細胞のクローン化を行った。その結果、AR α , AR β , PR α , PR β のそれぞれについて、数系統の細胞系が得られた。さらに、AR 導入細胞には11-ケトテストステロンを、PR には17 α , 20 β -ジヒドロキ-4-プレグネン-3-オンを添加したところ、ホルモン濃度依存的なルシフェラーゼの発現が認められた。

6) 精子形成の制御機構：

ウナギの器官培養系では、10 pg/mlのエストロゲンが存在すると精原幹細胞は精子形成の方向へは決して分化せず、自己再生のみを行うことがわかっている。エレクトロポレーション法を用いて、このような精巣組織断片にA型サイクリンを過剰発現させ、エストロゲン存在下で15日間培養することにより、一部の精原幹細胞は減数分裂前期の形態を示すようになり、かつ、DMC1タンパク質を発現することがわかった。このことは、エストロゲンにより制御されていた精原幹細胞の自己増殖サイクルが、A型サイクリンの強制発現により配偶子形成の方向へと転換したことを示す。これら一連の結果は、体細胞型から生殖細胞型の分裂への移行にA型サイクリンの発現増加が重要な役割を果たすことを強く示唆する。今後、この系を用いて体細胞型から生殖細胞型 (減数分裂) 分裂への移行の分子機構をサイクリンA1, A2及びDMC1を鍵としてこの分子機構の解析を行う。これと平行して、この時期に特異的に発現するような新たな機能分子マーカーとなりうる遺伝子産物の検索、同定も行っているが、そのような遺伝子の一つとしてサイクリンB3が同定された。この遺伝子の発現は一過性で、減数分裂移行前に始まり (DMC1の発現に先立ち) 第一減数分裂のザイゴテン期まで続く。

7) ステロイド膜受容体遺伝子のクローニング：

我々のこれまでの研究から、多くの魚類の卵成熟誘起ホルモンは17 α , 20 β -ジヒドロキ

シ-4-プレグネン-3-オン(17 α , 20 β -DP)であることが明らかになっている。ところが、この17 α , 20 β -DPはステロイドホルモンでありながら抑制性のGタンパク質に連結した膜受容体であることがわかっている。最近、米国のPeter Thomasらはプロゲステロン系のステロイドに結合するプロゲステロン膜受容体遺伝子をクローニングした。そこで我々も彼らとの共同研究で、メダカとティラピアの卵巣から同様なプロゲステロン膜受容体遺伝子のクローニングを行った。その結果、 α と β の2型のプロゲステロン膜受容体をクローニングすることができた。さらに現在、これら膜受容体遺伝子発現の組織特異性、及び卵巣の発育、成熟に伴う発現変動について調べているが、すでにこれら膜受容体が生殖腺と脳に強く発現することを見出している。今後、この新規膜受容体を介した内分泌かく乱物質の影響や作用メカニズムについて解析する計画である。

8) 魚類の生体組織を用いたプロテオーム解析法の確立：

魚類の卵母細胞を用いて、卵成熟能の獲得機構及び卵成熟誘起ホルモンの情報伝達初期過程を明らかにする目的で、新たにプロテオーム解析法を確立した。この解析法では、一つ一つの蛋白質の追跡だけでは明らかにしようのない、同時並行的に起こる複合的・協調的な調節により始めて可能となる、より高次の生体調節機構を明らかにする為に、生体の細胞・組織で発現する全ての蛋白質の変化を網羅的に定量解析し、複数の蛋白質の空間的・時間的相互関係を明らかにすることが可能となる。本解析法の確立にあたっては、将来にわたって、異なる魚種での種々の細胞・組織での運用性と、また微量から多量の試料にも対応できる汎用性を持たせることを特別に考慮した。また、特に微量な変化を追跡する上で問題となる実験上の誤差や試料に由来する個体差などの影響も検討した。本法の確立によって、内分泌かく乱化学物質の影響をタンパク質レベルでも解析することが可能となると考えられる。

(2) 性転換(中村)グループ

研究項目： 性転換魚類に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用機構に関する研究

性転換を行う魚類は、内分泌かく乱化学物質の影響を調べる有効な実験系となることが考えられる。ベラの性転換は、縄張りオス(二次オス)がいなくなる等の社会変化が視覚刺激として脳に伝わり、行動、体色および生殖腺の変化を引き起こす。生殖腺における卵巣の退縮、精原細胞の増殖、精子形成といった一連の変化は急激で、約2週間で完全な卵巣から完全な精巣へと変わる。この変化に対応するように血中のE2量が急激に減少することから、E2の減少が性転換において重要な役割を担っていると考えられる。

1) 性転換に果たすエストロゲンの役割：

E2合成酵素である芳香化酵素を阻害し、人為的にE2を減少させることで性転換が引き起こされるのかを調べた。実験には沖縄産ベラ科魚類のミツボシキュウセン(*Halichoeres trimaculatus*)を用いた。この魚種の二次オスはメスに比べて派手な体色を示し、二次オス特有の斑点が背中に見られる。アロマターゼ阻害剤(AI)には塩酸フェンドロゾールを使用した。このAIが本魚種に効果を持つことは卵巣の生体培養実験により確かめてある。魚への投与はAIを100または500 mg/kgの濃度で含んだ餌を、2または6週間の

期間行った。その結果、AI投与によりミツボシキュウセンのメスは行動、体色および生殖腺すべてが二次オスのものへ変化した。AIによる性転換誘導はE2の同時投与によって抑えられることも確かめられた。したがって、血中E2量の急激な減少が性転換の引き金となっていることが強く示唆された。現在、この実験系を用いて性転換に及ぼす内分泌かく乱化学物質（ノニルフェノール）の影響についても調べている。

2) 生殖腺の性転換時におけるDMRT1遺伝子の発現変動：

E2の減少による性転換が明らかとなったことで当然考えられるのは、非繁殖期やストレス条件下で見られる卵巣の退縮した、血中E2量の低いメスで何故性転換が起こらないのかということである。このことを調べるため、我々は生殖腺において性転換特異的な変化を探すことにした。具体的には精巣の分化に重要と考えられる分子のうち、魚のアンドロゲンである11-ケトテストステロンを合成する11 β -水酸化酵素、アンドロゲン受容体、そしてDMRT1をクローニングし、それらの遺伝子発現を解析した。実験にはハワイ産ベラ (*Thalassoma duperrey*) を用い、AI投与で性転換を誘導した個体の生殖腺を調べた。遺伝子発現の測定にはリアルタイムPCR法を用いた。その結果、上述した分子のうち、DMRT1遺伝子の発現が卵巣の退縮から精原細胞の増殖へと移り変わる決定的な時期に上昇することが明らかになった。In situ hybridization法による観察では、DMRT1遺伝子はメスの卵巣ではほとんど発現が見られないが、性転換が始まり、血中E2量が低下したような個体において、退縮した卵巣の卵巣薄板上皮で発現が上昇した。転換が進むにつれ、卵巣薄板上皮組織内部の組織へと広がっていた。これらの結果はDMRT1遺伝子は卵巣から精巣への性転換に重要であることが示唆する。また、この遺伝子を発現する細胞がどのような役割を持っているのかは、性の可塑性を司る生理機構を知る手がかりとして、非常に興味深い。すなわち、DMRT1遺伝子が生殖腺における性転換のスイッチとして働き、非繁殖期やストレス条件下のメスではこのスイッチがONにならないと考えられる。

(3) 海産魚（北野）グループ

研究項目： ヒラメの水温依存性性決定・分化に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用機構

1) ヒラメにおけるエストロゲン様物質のin vitro 評価系の確立：

昨年度開発したエストロゲン様物質のin vitro 評価系の感度上昇を目的に、ウナギ肝臓培養細胞(Hepa-E1)を用いて再検討を行った。ヒラメのビテロゲニン遺伝子のプロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターと、ヒラメのエストロゲン受容体 α (ER α)またはER β の強制発現ベクターをHepa-E1細胞にco-transfectionした。その結果、ER α とER β のどちらを導入しても、エストラジオール-17 β (E2)の濃度依存的にルシフェラーゼ活性が誘導されたが、その誘導はタモキシフェンにより抑制された。本年度開発したin vitro 評価系は、ER α とER β 両方のエストロゲン様物質の評価に適するだけでなく、昨年度のCOS-7細胞に比べて100分の1のE2濃度で評価できることから、高感度なin vitro 評価系として広く利用できると考えられる。また、ビテロゲニン遺伝子プロモーター領域内の2ヶ所のエストロゲン応答配列(ERE)に変異を導入してルシフェラーゼ活性を測定した

結果、変異を導入した場合にのみルシフェラーゼ活性が低下したことから、2ヶ所とも機能的であると考えられた。

次に、このin vitro 評価系を用いて、ヒラメの雌化を誘導する3種類のエストロゲン様物質(ノニルフェノール、ビスフェノールA、ゲニスタイン)の作用機構を調べた。その結果、ノニルフェノール及びビスフェノールAは、ER β よりもER α を導入した方が明らかにルシフェラーゼ活性を誘導したが、ゲニスタインは、ER α とER β のどちらを導入しても同様にルシフェラーゼ活性を誘導した。このことから、ノニルフェノール及びビスフェノールAは主にER α を介して、ゲニスタインはER α とER β 両方を介してエストロゲン様作用を行うと考えられた。

2) ヒラメの性分化に与えるゲニスタインの影響:

魚類の性分化におけるゲニスタイン(植物エストロゲン)の影響を明らかにするために、遺伝的全雌ヒラメを高水温で飼育し(全雄へと誘導)、性分化時期にゲニスタインを投与して雌化するかどうか調べた。方法は、日齢30-100日間、高水温処理下でゲニスタインを0、10、100 μ g/g飼料の濃度で経口投与し、10ヶ月間飼育した個体(各約30尾ずつ)の性比を調査した。その結果、ゲニスタイン濃度が0、10、100 μ g/g飼料における雌の割合は、それぞれ16.7、46.7、96.7%であり、ゲニスタインの濃度依存的に雌の割合が上昇した。このことから、昨年度雌化することを明らかにしたノニルフェノール及びビスフェノールAに加えてゲニスタインについても、ヒラメの性分化に影響を与えて雌化させることが明らかになった。

3) 2種類のFtz-F1によるアロマターゼ遺伝子の転写調節機構の解析:

ヒラメの性分化に深く関与するアロマターゼ遺伝子の転写調節機構を解析するための第一歩として、fushi tarazu factor 1 (Ftz-F1) cDNAを単離し、これらによるアロマターゼ遺伝子の転写調節機構を調べた。まず、ヒラメ精巣から2種類のFtz-F1の全翻訳領域を含むcDNAの単離に成功した。次に、これら遺伝子の発現パターンをRT-PCRにより調べた結果、性分化前後において雌雄両方の生殖腺で発現が認められた。さらに、ヒラメのアロマターゼ遺伝子のプロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターと、2種類のFtz-F1の強制発現ベクターをHepa-E1細胞にco-transfectionした。その結果、2種類のFtz-F1のどちらを導入しても、ルシフェラーゼ活性が誘導された。このことから、2種類のFtz-F1ともにアロマターゼ遺伝子の転写を上昇させる作用があることが明らかになった。

(4) 卵成熟研究(徳元)グループ

研究項目: 卵成熟に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用機構

昨年度までの研究で、非ステロイド系合成エストロゲンであるジエチルstilbestrol (DES)がそれ自体で魚類の卵成熟を誘起する作用をもつことが明らかになった。そこで、DESのホルモン作用に必要な化学構造の同定を目指し、DESの誘導体について卵成熟誘起活性を調べた。その結果、DESのエチル基をメチル基に置換したDMSでは作用は極端に小さくなったが、中央の二重結合の部位の誘導体 (HEX, DIES) についてはやや効果は低くなったものの卵成熟誘起活性を示した。また、DESの両端の水酸基を化学修飾した、DM-

DES、DP-DESの場合は卵成熟の誘起活性が極めて低いことが明らかになった。これらの結果からDESの標的分子との結合にはエチル基と両端の水酸基の両方が必要であることがわかった。また、HEXとDIESの作用濃度におよそ10倍の差がみられたことからエチル基の回転自由度が標的分子との相互作用には重要であることが明らかになった。

一方、DESの標的分子がステロイド膜受容体であることを調べるため、DESと天然の卵成熟誘起ホルモンである $17\alpha, 20\beta$ -DPとの共培養実験を行なった。その結果、DES、 $17\alpha, 20\beta$ -DPのそれぞれが単独では卵成熟を誘起できない濃度を同時に作用させることで卵成熟を引き起こすことが明らかとなった。このことからDESはステロイド膜受容体に作用することが強く示唆された。今後、膜受容体を同定し、リコンビナントタンパク質の合成やそれに対する特異抗体の作製などによりDESと膜受容体との関連について詳細に解析する予定である。

3. 研究実施体制

基礎研究グループ

- ① 研究分担グループ長：長濱 嘉孝（岡崎国立共同研究機構、教授）
- ② 研究項目：

性転換研究グループ

- ① 研究分担グループ長：中村 将（琉球大学熱帯生物圏研究センター、教授）
- ② 研究項目：

海産魚研究グループ

- ① 研究分担グループ長：北野 健（熊本大学、助手）
- ② 研究項目：

卵成熟研究グループ

- ① 研究分担グループ長：徳元 俊伸（静岡大学、講師）
- ② 研究項目：

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Fujimoto, K., Yamamoto, T., Kitano, T. and Abe, S.-I. (2002).
Promotion of cathepsin L activity in newt spermatogonial apoptosis induced by prolactin. FEBS Letters 521, 43-46.
- Ikeuchi, T., Todo, T., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2002).
A novel progestogen receptor subtype in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. FEBS Letters 550, 77-82.
- Iwamatsu, T., Shibata, Y., Hara, O., Yamashita, M. and Ikegami, S. (2002).
Studies on fertilization in the teleost IV. Effects of aphidicolin and camptothecin on chromosome formation in fertilized medaka eggs. Develop.

Growth Differ. 44, 293-302.

- Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y. and Abe, S.-I. (2002).
Gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*.
Fisheries Sci. (Suppl.), 68, 679-680.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H. and Nagahama, Y. (2002).
Two isoforms of *vasa* homologs in a teleost fish: their differential
expression during germ cell differentiation. Mech. Develop. 111, 167-171.
- Kusakabe, M., Kobayashi, T., Todo, T., Nagahama, Y. and Young, G. (2002).
Molecular cloning and expression analysis of cDNA encoding rainbow trout
testicular 11 β -hydroxylase (P-450 11 β). Mol. Reprod. Develop. 62, 456-469.
- Morrey, C.E., Nagahama, Y. and Grau, E.G. (2002).
Terminal phase males stimulate ovarian function and inhibit sex change in the
protogynous wrasse *Thalassoma duperrey*. Zool. Sci. 19, 103-109.
- Nakamura, M., Nagoya, H. and Hirai, T. (2002).
Nonylphenol induces complete feminization of the gonad in genetically
controlled all-male amago salmon. Fish. Sci. 68, 1387-1389.
- Nakata, H., Kawazoe, M., Arizono, K., Abe, S., Kitano, T., Shimada, H., Li,
W. and Ding, X. (2002).
Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl residues in foodstuffs
and human tissues from China: Status of contamination, historical trend, and
human dietary exposure. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 43, 473-480.
- Strussmann, A.C. and Nakamura, M. (2002).
Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex
differentiation in teleost fishes. Fish Physiol. Biochem. 26, 13-29.
- Senthilkumaran, B., Sudhakumari, C.C., Chang, X.T., Kobayashi, T., Oba, Y.,
Guan, G., Yoshiura, Y., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2002).
Ovarian carbonyl reductase-like 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase shows
distinct surge in messenger RNA expression during natural and gonadotropin-
induced meiotic maturation in Nile tilapia. Biol. Reprod. 67, 1080-1086.
- Shimasaki, Y., Oshima, Y., Yokota, Y., Kitano, T., Nakao, M., Kawabata, S.,
Imada, N. and Honjo, T. (2002).
Purification and identification of a tributyltin-binding protein from serum
of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Environ. Toxicol. Chem. 21,
1229-1235.
- Shimasaki, Y., Kitano, T., Oshima, Y., Inoue, S., Imada, N. and Honjo, T.
(2003).
Tributyltin causes masculinization in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22, 141-

- Tokumoto, M., Nagahama, Y. and Tokumoto, T. (2002).
A major substrate for MPF: cDNA cloning and expression of polypeptide chain elongation factor 1g from goldfish (*Carassius auratus*). DNA Sequence 13, 27-31.
- Tokumoto, T. (2002).
Multiple modifications and factors of proteasome regulation. Recent Research Developments in Biochemistry 3, 287-296.
- Tanaka, M., Nakajin, S., Kobayashi, T., Fukada, S., Guan, G., Todo, T., Senthilkumaran, B. and Nagahama, Y. (2002).
Teleost ovarian carbonyl reductase-like 20^α-hydroxysteroid dehydrogenase: Potential role in the production of maturation-inducing hormone during final oocyte maturation. Biol. Reprod. 66, 1498-1504.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T. and Iguchi, T. (2002).
Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. J. Exp. Biol. 205, 711-718.
- Wang, D., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Sakai, F., Sudhakumari C.C., Suzuki, T., Yoshikuni, M., Matsuda, M., Morohashi, K. and Nagahama, Y. (2002).
Molecular cloning of Dax1 and SHP cDNAs and their expression patterns in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 297, 632-640.
- Yokoi, H., Kobayashi, T., Tanaka, M., Nagahama, Y., Wakamatsu, Y., Takeda, H., Araki, K., Morohashi, K. and Ozato, K. (2002).
Sox9 in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): Evidence for diversified function of *Sox9* in gonad differentiation. Mol. Reprod. Develop. 63, 5-16.
- Yoshiura, Y., Senthilkumaran, B., Watanabe, M., Oba, Y., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2003). Ad4BP/SF-1 modulates the transcription of cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) expression in the ovary of a teleost fish, the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Biol. Reprod. 68, 1545-1553.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：0件）