

「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（生殖腺の性分化と性転換、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、性決定と生殖腺の性分化、減数分裂（精子形成）、卵成熟機構、及び性転換の制御機構に関する基礎的知見を蓄積するとともに、これらの諸過程に及ぼす性ホルモンと内分泌かく乱物質の影響と作用メカニズムの解析を行った。その結果、卵巣分化におけるエストロゲンの直接的役割の一つが卵巣腔形成を誘起すること（ティラピア）、精巣分化にミューラー管抑制物質が関わること（ヒラメ）などが新たにわかった。一方、孵化直後に性ホルモン処理により性転換が誘起される際の作用点は、性決定過程ではなく、性決定遺伝子の働きで起こる生殖腺の性分化過程であることが示された（メダカ）。また、エストロゲンに関しては、性分化での中心的な役割に加えて、成魚における卵巣の正常状態の維持にも重要な機能を果たすことが明らかにされた。この成果は、今後エストロゲン様働きを有する内分泌かく乱物質の影響や作用メカニズムを考える上で特に重要なことであると考えられる。さらに、先に本研究で発見されたDESの卵成熟誘起効果が卵母細胞の表面に局在するステロイド（ $17\alpha, 20\beta$ -DP）膜受容体を介して発現されることが新たに判明したことが特筆される。本年度はまた、今後の研究基盤整備という点からも大きな進展がみられた。即ち、生殖腺の性分化と性転換を生体外（試験管内）で誘導できるin vitro実験系を世界に先駆け確立したこと、さらに性分化期（孵化後5-35日）の雌雄生殖腺に発現する遺伝子クローンを網羅的に集積することができたこと、などが挙げられる。加えて、減数分裂を解析in vitro実験系が確立したことも重要な成果である。これらの研究成果は、

生殖腺性分化と減数分裂についての基本的制御機構の研究推進に貢献するばかりでなく、性分化に及ぼす性ホルモンや内分泌かく乱物質の影響と作用メカニズムを明らかにする上でも大いに有益であると考えられる。

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) エストロゲンによるXY性転換卵巣分化誘起の分子機構

昨年度までの本研究で、ティラピアではエストロゲンが正常卵巣分化に不可欠であることが明らかにされた。また、XY個体で、生殖腺形成後のエストロゲンによる短期間の暴露は完全に機能的な性転換を誘起することが確かめられた。暴露終了時では、形態学的には性転換の徴候は一切、みられない。このエストロゲンによるXY性転換卵巣分化誘起の分子機構を明らかにするために、サブトラクション法によるスクリーニングによって発現の増加、減少する遺伝子産物を検索した結果、卵巣型芳香化酵素（oP450arom）が増加する遺伝子産物として同定された。エストロゲンによる性転換誘起後（暴露終了後）のoP450aromの発現をmRNA、蛋白レベルで調べたところ、本来、この時期のXY個体では発現のみられない血管周辺のステロイドホルモン産生予定細胞に発現が誘起されていた。oP450aromのプロモーター領域の転写活性化能をルシフェラーゼアッセイで調べたところ、エストロゲンによって濃度依存的に転写が活性化されることを確かめた。以上の結果から、エストロゲンによるXY性転換卵巣分化誘起は、外因性エストロゲンによってoP450aromの発現が誘起され、次いで、誘起されたoP450aromによって内因性エストロゲンが生合成され、卵巣分化の誘起を促進することが強く示唆された。

2) 芳香化酵素プロモーターの転写活性に及ぼす各種内分泌かく乱物質の影響

これまで魚類の生殖腺の性分化過程について、XX-XYの性決定様式をもつティラピアの単性群を用いた我々の研究により、卵巣の形成には内因性のエストロゲンが重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。中でも芳香化酵素が卵巣分化の鍵酵素であると考えられ、エストロゲンによる正のフィードバック機構の存在も示された。それらのことから、外因性エストロゲン関連物質が芳香化酵素の発現に転写レベルで影響を与える可能性が考えられる。そこで、数種のエストロゲン関連物質を用いて、芳香化酵素プロモーターの転写活性化に及ぼす影響をプロモーターアッセイにより検討した。COS7細胞を使い、ルシフェラーゼをレポーターとして卵巣型芳香化酵素プロモーターにつないだコンストラクトとエストロゲン受容体 α の発現ベクターとをコトランスフェクションし、7種類のエストロゲン関連物質を最終濃度10 μ Mで添加し48時間培養した。培養終了後細胞溶解液を作製しルミノメーターにて発光強度を測定した。用いたエストロゲン関連物質はエストラジオール-17 β 、ビスフェノールA、ベンゾフェノン、オクチルフェノール、エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、ノニルフェノールである。その結果、対照

群に比べ約10倍の転写活性化能を誘導したエストラジオール-17 β と同程度の効果を示したのは、ジエチルスチルベストロールの約13倍であった。次いでエチニルエストラジオールの約6倍、ビスフェノールAの約4倍で効果があり、ベンゾフェノン、オクチルフェノール、ノニルフェノールは約2倍と弱い効果しか認められなかった。

3) 器官培養系によるティラピア生殖腺の性分化誘導

先に我々は、エストロゲンの影響を直接的に解析できるin vitroの実験系（ティラピアの分離生殖腺を用いた浮遊器官培養系）を確立した。このin vitro実験系では、エストロゲンは未分化生殖腺には明確な影響を及ぼさないが、孵化後3 - 4ヶ月の生殖腺では移動中と考えられるエストロゲン産生細胞集団の維持を促進する。しかし、これまで用いてきた浮遊培養系では培養中に生殖腺自身の重みで卵巣腔がつぶれるため、卵巣腔形成に及ぼすエストロゲンの影響を解析することはできなかった。本年度は、卵巣腔の形成と維持に及ぼすエストロゲンの直接的影響を解析する新たな培養系（旋回培養）の確立に成功した。この旋回培養系を用いることで、卵巣腔形成期前（孵化後15-20日）の生殖腺の卵巣腔形成にエストロゲンが直接的に作用することが示唆された。以上述べてきた浮遊培養と旋回培養の2つの培養系におけるエストロゲン作用機構の解析結果を踏まえると、ティラピアの生殖腺、特に性的未分化生殖腺を用いた培養系は、生殖腺の分化、発達、成熟に及ぼす性ステロイドホルモンの作用機構を解析するためのみならず、内分泌かく乱物質を含めた様々な化学物質の生殖腺に対する影響と作用機構を解析する非常に優れたin vitro実験系となると考えられる。

4) マイクロアレイによる卵巣と精巣に特異的に発現する遺伝子の網羅的解析

生殖腺の性分化の研究にティラピアを用いることの利点の一つは、孵化直後のまだ形態的性分化が起こっていない生殖腺を取り出せることである。この利点を最大限に生かし、孵化後5日から35日までの雌雄生殖腺からRNAを抽出し、それぞれの遺伝子ライブラリーを作製し、それらをカタログ化することによって独立なクローンを収集する。さらに、これらの遺伝子を用いてマイクロアレイを作製し、各々の発生ステージで雌雄特異的遺伝子を探索するとともに、種々の性ホルモンや内分泌かく乱物質による遺伝子発現への影響を解析する。

今年度は、孵化後10、15、20日の雌雄ティラピア稚魚から生殖腺を取り出し、cDNAライブラリーを構築するとともに、それらについて塩基配列の決定、クラスター解析を済ませた。昨年度までに完了した孵化後5日と35日の雌雄生殖腺のクローンとあわせ、孵化後5日から35日までのクローンが出揃った。従って、これらのクローンの中にはティラピアの生殖腺の性分化、即ち精巣と卵巣の分化、形成を制御するすべての遺伝子が含まれていると考えられる。今後、これらの独立クローンをもとにマイクロアレイを作成するとともに、雌雄特異的遺伝子を探索するとともに、種々の性ホルモンや内分泌かく乱物質による遺伝子発現への影響を解析する。

5) 器官培養系による体細胞分裂から減数分裂への移行の分子機構

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- 17β (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。従って、エストロゲンは卵原細胞の増殖は促進し、減数分裂は抑制する作用をもつものと推察された。そこで本年度は、XY生殖腺を用いて減数分裂移行の可否を検討したところ、XX生殖腺の場合と異なって、原生殖細胞の減数分裂期への移行は観察されなかった。このことは、XX、XY生殖腺の原細胞は in vitro条件下においても in vivoと同様な性質を保持していることを指し示す。これにより in vitro条件下で、生殖腺の性分化分子機構の解明が「原生殖細胞の減数分裂への移行」を指標として解析可能となった。

6) 性決定遺伝子の発現に及ぼす性ホルモンの影響

メダカは、ヒトと同じXX/XYの遺伝的性決定システムを示すこと、種内に遺伝的変異があること、及び近交系が樹立されていること等、遺伝学的研究を行う上でいくつかの優れた特徴を有する。昨年我々は、これらのメダカの利点を生かしつつ、ポジショナルクローニング、染色体歩行、ショットガンシーケンス、野生メダカの突然変異体の解析などを併用することにより脊椎動物で二番目 (ヒトの *SRY* が最初) となるメダカの性決定遺伝子 *DMY* を同定した。*DMY* はメダカの近縁種であるハイナンメダカのY染色体には存在するが、ゼブラフィッシュやフグには存在しないことがわかった。従って、脊椎動物の性決定遺伝子は生物種によって多様性が高いことが強く示唆された。

メダカの性決定遺伝子 *DMY* が同定されたので、遺伝的雌雄メダカにおける *DMY* 発現に及ぼす性ホルモン処理の影響をRT-PCRで解析した。*DMY* は孵化直前のXY生殖腺にはじめて発現し、孵化直後の精巣分化期を通して特に高い発現を示した。遺伝的雄メダカにおけるこのような *DMY* の発現パターンはエストロゲンやアンドロゲン処理によりまったく影響を受けなかった。一方、XX個体の生殖腺では性ホルモン処理の有無に関係無く、卵巣分化期を含めていかなる時期でも *DMY* の発現は認められなかった。従って、性ホルモンや内分泌かく乱物質等が性決定・生殖腺の性分化カスケードで影響を及ぼすのは、性決定そのものの過程ではなく、性決定遺伝子の下流、すなわち生殖腺性分化の過程であると結論された。なお、この研究の一部は信州大学・柴田研究室との共同研究である。

2. 性転換研究グループ (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。この生殖腺の劇的な変化は内分泌かく乱物質の影響を調べる上で大きな指標となる可能性がある。すなわち、多くの魚種では内分泌かく乱物質による卵黄タンパク、ビテロジェニンの誘導など限られた部分でしか調べられなかったが、性転換魚では性分化の根幹に関わる部分への影響を調べられる。これは脊椎動物を通してユニークな系であり、貴重な知見をもたらすと考えられる。

1) 生体外卵巣培養による精巣への転換

内分泌かく乱物質の影響を明らかにするためには生体外組織培養による簡便化したアッセイ系を確立することが必要となる。本年度は、雌性先熟魚のベラを用いて、性転換における生殖腺の劇的な変化すなわち卵巣から完全な精巣への変化が生体外において生殖腺単独で可能であるかについて調べた。沖縄産ベラ科魚類ミツボシキュウセンの卵巣を断片化し、L-15培地に男性ホルモンのメチルテストステロン (MT) を加えた実験区と加えない対照区で3-4週間無菌的に培養した。その結果、実験区および対照区どちらにおいても組織培養開始3週間で卵の退行、消失に伴う精原細胞の増殖、精子形成のための減数分裂の移行、精細胞の分化が見られた。またMTを加えた実験区では4週間目に尾部を持つ成熟した精子の分化が確認された。すなわち生体外において性転換における卵巣から精巣への全過程を誘導することに全ての生物で初めて成功した。

2) 生体外卵巣培養による精巣への転換の条件検討

今後、生体外培養により卵巣から精巣への転換を効率良く誘導するために、培地の最適濃度、培地への添加物、pHについての検討をおこなった。はじめにL-15標準培地の濃度の検討を行った。L-15培地標準濃度と2倍の濃度の培地で2、4週間卵巣を培養した。その結果、L-15標準濃度で効率よく精巣組織の分化が見られたが、2倍の濃度のL-15では精巣組織の分化は全く見られなかった。次に、L-15培地に加える男性ホルモンとして、MTの代わりに魚類の男性ホルモンである11-KTを添加して培養を行った。その結果、11-KTでも性転換が誘導された。次に、L-15培地に10%FBSのみを添加した場合とL-15培地に10%FBSとさらに各種アミノ酸（プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸）とインスリンで栄養強化した場合で比較した。その結果、L-15培地に10%FBSのみを添加した場合においてむしろ効率よく性転換を誘導することが分かった。また、FBSに含まれている未知の物質の影響を調べるため、FBSをBSAに置き換えての培養も行った。その結果、FBS培地とBSA培地で性転換効率に違いは見られなかった。次に、培地のpHの検討を行った。PH 7.2、7.4、7.6の培地で2週間培養した。その結果、pHの違いによる結果の違いは殆ど見られなかった。このことから、pH 7.2-7.6の広い範囲でも性転換を誘導することが可能であることが分かった。以上の培養条件検討によって、ベラの卵巣は一般的なL-15培地を用いた標準的な条件で精巣への転換を調べるのが最善に近いのではないかと考えられた。これはアッセイ系の簡便性にも大きく関わっている。

3) 生体外組織培養系用いての内分泌かく乱物質の影響解析

ベラの性転換では血中のエストラジオール-17 β (E2) 量が対応するように急激に減少

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。実際にE2の生合成を阻害する薬剤をベラメスのメスに経口投与したところ、全ての個体で性転換が見られた。したがって、E2は雌性の維持に強く関わっていることが示唆された。そこで、生体外卵巣培養系にMTと共に女性ホルモンのE2を種々の濃度で添加した。その結果E2添加群では明らかに卵巣から精巣への転換を抑制した。また、転換の抑制には適切なE2の濃度があることが明らかになった。次に、内分泌かく乱物質のノニルフェノールを添加した。その結果、卵巣組織の状態が維持され性転換が抑制される傾向が観察された。以上のことから、生体外卵巣培養系が内分泌かく乱物質のアッセイの簡便な方法として有効であるとともに、今後、内分泌かく乱物質の作用機構の分子解明にも有効な手段として活用可能であると判断された。

3. 海産魚研究グループ（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) ヒラメにおける雄分化マーカーの単離

我々は、ヒラメにおいて、雌への性分化に伴い発現量が上昇する因子として芳香化酵素(P450arom)を同定しているが、雄への性分化に伴って発現量が上昇する因子の同定には至っていない。そこで、哺乳類、鳥類、爬虫類において雄への性分化時期に高発現を示すミューラー管抑制物質(MIS)に注目し、このヒラメホモログを単離すると同時に、水温制御により分化誘導した雌雄の生殖腺での発現パターンを調べた。その結果、ヒラメ精巣cDNAライブラリーから1982 bpのヒラメMIS cDNAの単離に成功した。次に、RT-PCR及び*in situ* hybridization法を用いて性分化時期における発現解析を行った結果、MIS mRNAの発現量はヒラメの性的未分化時期(日齢50日)においてすでに性差が認められ、雄の生殖腺では高く、雌の生殖腺で低かった。また、性分化時期におけるMIS mRNAの発現は、雌の生殖腺では検出されず、雄の生殖腺の支持細胞でのみ観察された。これらのことから、性分化時期でのMIS mRNAの発現パターンは、哺乳類、鳥類、爬虫類だけでなく、ミューラー管を持たない硬骨魚類においても保存されている可能性が考えられた。今後、MIS mRNAの発現パターンが内分泌かく乱物質によってどのように変化するか調べる予定である。

2) ヒラメの性分化におけるアンドロゲンの作用機構

アンドロゲンは、魚類における雄への性転換誘導物質として以前から知られているが、未だに作用機構は明らかになっていない。そこで我々は、アンドロゲン処理または高水温処理により雄へと分化誘導したヒラメ遺伝的雌(XX)を用いて、その作用機構を分子生物学的に解析した。方法は、日齢38-100日間、XXヒラメに11-ケトテストステロン(11-KT; 1 µg/g餌)処理または高水温(27°C)飼育により雄へと分化誘導した個体を用いて、ステロイドホルモン産生酵素(P450scc、P450c17、P45011β、P450arom)、転写因子(SF-1、LRH-1)及びMIS mRNAの発現パターンをRT-PCR及び*in situ* hybridization法により調べた。その結果、高水温処理個体の生殖腺では、処理期間中、P450arom以外のステロイドホルモン産

生酵素、SF-1、LRH-1及びMIS mRNAは発現していたが、11-KT投与個体では、11-KT投与期間中、SF-1、LRH-1及びMIS mRNAは発現していたものの、調べたすべてのステロイドホルモン産生酵素 mRNAの発現が抑制されていた。これらのことから、11-KTは、P450aromを含むステロイド産生酵素 mRNAの発現を抑制し、その結果としてエストロゲン量を減少させることにより雄へと性転換させるのではないかと考えられた。また、11-KT投与または高水温処理による雄化処理により、MIS mRNAの発現量の急激な増加が認められたことから、今後はこの機構を詳細に解析する必要がある。

3) ヒラメの性分化に与えるフルタミドの影響

魚類の性分化における抗アンドロゲン剤(フルタミド)の影響を明らかにするため、XXヒラメを高水温処理により雄へと分化誘導し、性分化時期にフルタミドを投与して雄化が抑制されるかどうか調べた。方法は、日齢37-100日間、高水温処理下でフルタミドを0、10、100 µg/g 飼料の濃度で経口投与し、日齢300日の成魚(各約30尾ずつ)の性比を調査した。その結果、フルタミド濃度0、10、100 µg/g飼料における雄の割合は、それぞれ84.4、63.6、53.1%であり、フルタミドの濃度依存的に雄の割合が減少した。このことから、フルタミドは高水温処理による雄への性転換を抑制させると考えられた。次に、単離した2種類のヒラメARを用いてアンドロゲン応答レポーターアッセイを行った結果、11-KTにより上昇したレポーター活性は、フルタミドにより抑制されることが確認された。さらに、日齢100日のフルタミド投与個体の生殖腺を組織学的観察及びin situ hybridization法により調べた結果、調べたすべての個体で卵巣腔が確認されたが、MIS(雄分化マーカー)mRNAは支持細胞で強く発現し、P450arom(雌分化マーカー)及びP45011β(雄分化マーカー)mRNAは間質細胞で弱く発現していた。これらのことから、フルタミドは、MIS及びP45011β mRNAの発現には直接影響を与えないが、P450arom mRNAの発現を回復させることにより、雄への性転換を抑制させるのではないかと考えられた。今後は、抗アンドロゲン作用が報告されている化学物質DDEが及ぼすヒラメ性分化への影響及び作用機構を調べる予定である。

4) 内分泌かく乱物質のin vivo 評価系の開発

内分泌かく乱物質に応答するトランスジェニック魚を作製するため、ヒラメのピテロゲン遺伝子5'上流域とGFP遺伝子を連結したベクター(Vg-GFP)を、ヒラメ及びメダカ(名古屋大学の若松博士から分譲された透明メダカ系統)の受精卵にマイクロインジェクション法により遺伝子導入した。その結果、ヒラメにおいてはVg-GFPが導入されている個体は得られなかったが、メダカにおいてはF1系統の作製に成功した。このF1系統のエストロゲンに対する応答を調べた結果、エストラジオール-17β(10⁻⁷ M)に5日間浸漬することにより、肝臓で弱いGFP蛍光が観察された。また、RT-PCRにより、肝臓においてはGFP mRNAの発現も確認されたことから、この系統はエストロゲンに反応して肝臓でGFPを発現することが明らかになった。しかしながら、この系統のGFP発現は非常に弱く、内分泌かく乱物質の評価は困難であると思われたため、今後は芳香化酵素-GFPまたはMIS-GFPを遺伝子導入したトランスジェニック魚を作製し、内分泌かく乱物質を評価するためのin vivo評価系を

確立したいと考えている。

4. 卵成熟研究グループ（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

これまでの研究で、非ステロイド系合成エストロゲンであるジエチルスチルベストロール(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。また、DESによる卵成熟誘起のタイミングが天然のホルモンである $17\alpha, 20\beta$ -DPと一致したこと、 $17\alpha, 20\beta$ -DPとDESに共同作用がみられたことからその標的分子はステロイド膜受容体分子であることが示唆されていた。そこで、DESとステロイド膜受容体分子との相互作用について解析するため、キンギョのステロイド膜受容体分子の同定を行った。まず、キンギョ卵巣cDNAライブラリーからステロイド膜受容体遺伝子の α タイプをクローニングし、その全長、N末端領域や中央領域のリコンビナントタンパク質を発現し、それらに対する抗体を作製した。この内、N末端領域に対する抗体による卵成熟の阻害実験を試みたところ、抗体処理卵では卵成熟率が対照に比べ約50%に低下した。この結果はDESがステロイド膜受容体分子に作用する可能性を強く指示している。

一方、卵の培養実験からDES類似化合物のタモキシフェン類に卵成熟誘起活性があることが明らかになった。また、殺虫剤の一種であるペンタクロロフェノール(PCP)に高い卵成熟抑制効果があることも明らかになった。PCPによる卵成熟抑制効果は $17\alpha, 20\beta$ -DP、DESそしてタモキシフェンによる誘起の全てに対してみられた。この結果はこれら3種の物質が同じ反応経路を介して卵成熟を誘起していることを示唆する結果であり、すなわち内分泌かく乱物質も天然のホルモン同様にステロイド膜受容体に作用していることを裏付ける結果である。今後、結合実験を行うための膜受容体遺伝子の発現系を構築し、内分泌かく乱物質と膜受容体分子との反応を解析する予定である。

3. 研究実施体制

- ① 研究分担グループ長：長濱 嘉孝（自然科学研究機構・基礎生物学研究所、教授）
- ② 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

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・瀬底実験所・教授）
- ② 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

海産魚研究グループ

- ① 研究分担グループ長：北野 健（熊本大学大学院自然科学研究科・助手）
- ② 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

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・理学部・講師）
- ② 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

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

- Bhandari, K.R., Komuro, H., Nakamura, S., Higa, M. and Nakamura, M. (2003). Gonadal restructuring and correlative steroid honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). Zool. Sci., 20, 1399-1404.
- Bhandari, K.R., Higa, M., Nakamura, S. and Nakamura, M. (2004). Aromatase inhibitor induces complete sex change in the protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). Mol. Repro. Develop., 67, 303-307.
- He, C.L., Du, J.L., Huang, Y.S., Lee, Y.H., Nagahama, Y. and Chang, C.F. (2003). Differential expression of androgen receptor and estrogen receptor in gonad in relation to the sex change in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. Biol. Reprod., 69, 455-461.
- Jiang, J. Q., Wang, D. S., Senthilkumaran, B., Kobayashi, T., Kobayashi, H K., Yamaguchi, A., Ge, W., Young G. and Nagahama, Y. (2003). Isolation, characterization and expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 cDNAs from the testes of Japanese eel (*Anguilla japonica*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Mol. Endocrinol., 31, 305-315.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H. and Nagahama, Y. (2003). Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia. Cytogenet. Genome Res., 101, 289-294.
- Kobayashi, Y., Kobayashi, T., Nakamura, M., Sunobe, T., Morrey, C.E., Suzuki, N. and Nagahama, Y. (2004). Characterization of two types of cytochrome P450 aromatase in the serial-sex changing gobiid fish, *Trimma okinawae*. Zool. Sci., 21, 417-425.
- Matsuda, M., Sato, T., Toyazaki, Y., Nagahama, Y., Hamaguchi, S. and Sakaizumi, M. (2003). *Oryzias curvinotus* has *DMY*, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*. Zool. Sci., 20, 159-161.
- Nagahama, Y., Nakamura, M., Kitano, T. and Tokumoto, T. (2004). Sexual plasticity in fish: a possible target of endocrine disruptor action. Environ. Sci., 11, 73-82.
- Nakahata, S., Kotani, T., Mita, K., Kawasaki, T., Katsu, Y., Nagahama, Y. and

- Yamashita, M. (2003). Involvement of *Xenopus* Pumilio in the translational regulation that is specific to cyclin B1 mRNA during oocyte maturation. *Mech. Develop.*, 120, 865-880.
- Ohmuro-Matsuyama, Y., Matsuda, M., Kobayashi, T., Ikeuchi, T. and Nagahama, Y. (2003). Expression of *DMY* and *DMRT1* in various tissues of the medaka (*Oryzias latipes*). *Zool. Sci.*, 20, 1395-1398.
 - Senthilkumaran, B. Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2003). A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 215, 11-18.
 - Suzuki, A., Tanaka, M., Nagahama, Y. and Shibata, N. (2004). Expression of aromatase mRNA and effects of aromatase inhibitor during ovarian development in the medaka, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Zool.*, 301A, 266-273.
 - Tokumoto, T., Kondo, A., Miwa, J., Horiguchi, R., Tokumoto, M., Nagahama, Y., Okida, N. and Ishikawa K. (2003). Regulated interaction between polypeptide chain elongation factor-1 complex with the 26S proteasome during *Xenopus* oocyte maturation. *BMC Biochemistry* 4, 6.
 - Tokumoto, T., Tokumoto, M., Horiguchi, R., Ishikawa, K. and Nagahama, Y. (2004). Diethylstilbestrol induces fish oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 3686-3690
 - Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T. and Iguchi, T. (2004). An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and deletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 137, 11-20.
 - Watanabe, K. Tokumoto, T. and Ishikawa, K. (2003) 1,10-Phenanthroline phosphorylates (activates) MAP kinase in *Xenopus* oocytes. *Cell. Signal.*, 15, 1139-1147.
 - Yamamoto, T., Yazawa, T., Fujimoto, K., Kitano, T. and Abe, S. (2003). Low temperature promotes annexin v expression in newt testis. *Zool. Sci.*, 20, 733-735.
 - Yazawa, T., Nakayama, Y., Fujimoto, K., Matsuda, Y., Abe, K., Kitano, T., Abe, S. and Yamamoto, T. (2003). Abnormal spermatogenesis at low temperatures in the Japanese red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*: Possible biological significance of the cessation of spermatocytogenesis. *Mol. Repro. Develop.*, 66, 60-66.
 - Yoshiura, Y., Senthilkumaran, B., Watanabe, M., Ova, Y., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2003). Synergistic expression of Ad4BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (Ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis*

niloticus, during vitellogenesis suggests transcriptional interaction. Biol. Reprod., 68, 1545-1553.

(2) 特許出願

なし