

「内分泌かく乱物質」

平成12年度採択研究代表者

長濱 嘉孝

(自然科学研究機構、基礎生物学研究所 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・受容体系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、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。脊椎動物で二番目の性決定遺伝子として我々が同定したメダカのDMYに関して、更に詳細な発現解析と遺伝子ノックダウン法を駆使した機能解析を行った。その結果、DMYの主要な機能の一つは、精巣における初期生殖細胞の細胞分裂を抑制（Mitotic arrest）することであることが明らかになった。一方、生殖腺性分化の制御メカニズムに関する研究（メダカ、ティラピア）では、精巣分化誘導因子であるDMRT1が転写因子Ad4BP/SF-1との直接的結合を介して卵巣分化誘導因子である芳香化酵素の遺伝子発現を強く抑制することがわかり、脊椎動物の性分化（精巣/卵巣）カスケード間における転写レベルでの相互作用の存在がはじめて示唆された。さらに、同様な相互作用がマウスのDMRT1と芳香化酵素、Ad4BP/SF-1でもみられることを確認した。また、芳香化酵素遺伝子の発現を促進する因子としてAd4BP/SF-1と結合するFoxl2をはじめて同定することができた。また、ヒラメを用いた研究から、MISが精巣分化の鍵因子として作用することが示された。

これまで雌雄異体の脊椎動物の成熟個体に性転換を誘導させた例は皆無であった。本年度の研究で、ティラピアの成熟雌を芳香化酵素阻害剤で3-5ヶ月間処理することにより機能的雄への性転換を誘導することにはじめて成功した。これらの結果は、成熟生殖腺にお

ける性的可塑性の保持を示す脊椎動物で最初の例であり、性ホルモンや内分泌かく乱物質の影響の基本的作用メカニズムを明らかにする今後の研究に大きく貢献すると考えられる。また、性転換魚のベラの生殖腺の断片を性ホルモンや器官培養することにより *in vitro* で性転換誘導することにも世界に先駆け成功した。今後、これらの性転換魚の実験系は成体における性ホルモンや内分泌かく乱物質の性転換誘導作用の解析系として大いに活用されるであろう。

卵成熟に関しては、内分泌かく乱物質の中に魚類の卵成熟を直接誘起するプロゲステロン様の作用を示す化合物（DES、タモキシフェン）や逆に卵成熟阻害作用をもつ物質（ペンタクロロフェノール）が存在することを明らかにした。これらの化合物は卵の培養実験からいずれの場合も卵膜上に存在すると推定されているステロイド膜受容体に作用していることが示唆された。

今後は、我々が昨年度脊椎動物ではじめて明らかにすることができた卵巣分化カスケードと精巣分化カスケードに関わる転写制御因子同士のクロストーク及びその過程に関わる性ホルモンと内分泌かく乱物質の影響について重点的に解析する。また、ティラピアとメダカの成熟魚で明らかになった成体における性的可塑性の分子メカニズムについても解析する。内分泌かく乱物質のスクリーニング法の確立に関しても重点的課題とする。DNAマイクロアレイと *differential hybridization* 法を駆使して進めてきた性分化雌雄生殖腺特異的遺伝子の特定に関する研究をできるだけ早い時期に完了し、それにより特定された遺伝子を指標として性ホルモンやDESなどの内分泌かく乱物質の影響と作用メカニズムを明らかにしたい。トランスジェニック系では、本研究で明らかにされた卵巣分化の主要誘導因子である芳香化酵素遺伝子の発現パターンを生きたまま観察できる系統をメダカで作出する。また、精子形成の制御機構に関しては、減数分裂開始に関わるサイクリン遺伝子群の発現調節機構を引き続き解析する。卵成熟誘起機構に関しては、本研究で見出した新規の $17\alpha, 20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネ-3-オン（卵成熟誘起ホルモン）膜受容体の本体と機能に関する解析を継続し、DESの卵成熟誘起作用についての研究を推進する。また、卵成熟誘起ホルモンの作用直後に卵母細胞内で起こる蛋白質レベルの変動についても本研究で新しく開発したプロテオミックス法で解析する。

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) 性決定遺伝子

性決定遺伝子については、Loss-of-functionの実験（ノックダウンしたDMYをXYの受精卵に遺伝子導入することにより、XY雌個体を作成することができた）を完成させることができ、昨年までのGain-of-functionの結果と合わせ、DMYがメダカの性決定遺伝子であることを完全に証明した。また、DMYノックダウンXYメダカではXY正常

個体でみられる生殖細胞の増殖停止は起こらずに活発な細胞分裂が観察されたことから、DMYの機能のひとつは直接に或いは間接に精原細胞の分裂を抑制 (mitotic arrest) することであると推察された。

2) 生殖腺の性分化時における各種遺伝子の発現変動 (ティラピア)

これまでの本研究から、ティラピアでは、生殖腺の形態的雌雄分化に先立ち、雌では芳香化酵素 (P450arom) が、雄ではDMRT1が特徴的に発現することが分かっている。本年度は、ティラピア初期発生時の生殖腺におけるこれらmRNAの発現変化を調べ、遺伝的雌雄それぞれの生殖腺で特異的に発現する遺伝子群を特定することを目的とした。実験には全雄群および全雌群のティラピアを用い、孵化後5日目以降の稚魚から生殖腺を摘出し、リアルタイムPCR法でP450arom、DMRT1、及びP450arom の発現制御に関わる転写因子群 (Ad4BP/SF1、Foxl2、Dax1、Dax2) 及びP450aromの上流に位置するステロイド合成酵素 (P450scc、P450c17) のmRNA量も同時に測定した。その結果、P450aromは孵化後5日目から雌で雄より発現量は高く、その後雌でのみ急速に発現量は増加した。一方、雄では全期間で微量に発現が認められるものの、発現量が高まることはなかった。DMRT1は全ての期間で雌雄に一定量検出された。5日目では雌雄間に差はなく、6日目以降雄でのみ発現が増大したが、雌では期間中発現量が高まることはなかった。Ad4BP/SF1は5日目から雌雄ともに高レベルで発現しており、5-7日目の初期の段階では雌雄差はなく、10日目以降、雌では高値のまま推移するのに対し、雄ではやや発現量が低下した。Foxl2は5日目で既に雌で雄より発現量が高く、その後、雌でのみ徐々に発現量は増加したが、雄では全期間を通して発現量は低かった。Dax1、Dax2は、実験期間を通して発現量に雌雄差は認められなかった。Dax1は雌雄ともに常にある程度高レベルで発現が認められたが、Dax2は実験期間を通して発現量は非常に低かった。P450c17は雌雄ともに高レベルで発現していたが、5-7日目の初期の段階で雌雄差は認められず、10日目以降、雌でのみ発現がさらに亢進したが、雄では35日目でようやく発現が増加した。P450sccは5-7日目で雌雄差はなく、またともに発現量は低かったが、10日目以降、雌でのみ発現が急速に高まり、雄では35日目になりようやく発現が高まった。

以上、P450arom及びFoxl2の結果から、孵化後5日目で既に雌雄生殖腺間の分子的分化は開始されていると結論された。DMRT1の発現分化は1日遅れて6日目から認められた。Ad4BP/SF1、Dax1、Dax2は5-7日目の初期の段階で雌雄差はなく、この時期の生殖腺分化には関与していないと考えられた。P450c17、P450sccの発現変化の結果から、雌では10日目以降急速にステロイド合成系が活性化するのに対し、雄では遅れて35日目でようやく活性化することが示唆された。

3) 孵化後5日目の雌雄生殖腺で発現する遺伝子の網羅的解析 (ティラピア)

孵化後5日目のティラピア雌雄生殖腺の間でサブトラクトcDNAライブラリーを作製し、雌雄併せて5304クローンの塩基配列を決定した。それら塩基配列は2897クラスターに分類された。そのうち3クローン以上から構成されるクラスターは224クラス

ターに収束し、全塩基配列のうち43%を占めていた。残る希少な塩基配列は全体の57%を占め、2994クラスターを形成した。P450arom遺伝子はその中の雌特異的ライブラリー中に単独のシーケンスとして特定された。従って、性分化開始時の雌雄それぞれの生殖腺に特異的な遺伝子を特定するためには、希少なシーケンスを含めた網羅的なスクリーニングを行う必要があると結論された。

また、孵化後5、10、35日目の雌雄生殖腺からESTライブラリーを作製し、18186クローンの塩基配列を決定した。それらのクローンは5486クラスターに分類された。現在、サブトラクトcDNAライブラリーおよびESTライブラリーで特定されたクラスターを構成する、併せて8743のcDNAをプリントしたマイクロアレイを作製しており、それを用いて雌雄それぞれの生殖腺で発現する遺伝子を経時的に解析する予定でいる。最終的には、雌雄生殖腺にそれぞれ特異的に発現する遺伝子群の同定を目指す。

4) 芳香化酵素遺伝子の転写制御機構 (ティラピア、メダカ)

これまでの本研究から、ティラピアではDMRT1は精巣分化、P450aromは卵巣分化に不可欠であることが示された。転写因子DMRT1がP450arom遺伝子の発現に及ぼす影響を哺乳類の培養細胞株を用いて解析した。同時に他の転写因子群 (Dax1、Dax2、Foxl2等) についても同様な作用を調べた。その結果、Ad4BP/SF-1は単独でP450arom遺伝子の発現を促進することがわかった。一方、他の転写因子は直接P450aromには直接結合せず、Ad4BP/SF-1との結合を介してP450arom遺伝子の転写に影響を与えることが明らかになった。その場合、Foxl2のみが転写促進作用を示し、DMRT1を含むその他の転写因子 (Dax1、Dax2) は強い抑制作用を示した。以上の結果から、DMRT1はAd4BP/SF-1を介してP450arom遺伝子の発現を抑制する作用を示すことが脊椎動物で初めて明らかになった。従って、性分化期の精巣分化と卵巣分化誘導因子との間にクロストークが存在することが初めて示唆された。また本研究でFoxl2はP450arom遺伝子の強い発現促進因子として同定されたので、今後、Foxl2は卵巣分化カスケードの鍵因子として注目される。

5) 成体雌ティラピアの性転換 (中村班との共同研究)

前述したように、ティラピアでは孵化直後 (臨界期) の稚魚に性ホルモンを処理することにより不可逆的な機能的性転換を誘導することができる。しかし、性分化期 (臨界期) が過ぎた雌雄異体魚の成体ではこのようなことは決して起こらないと考えられてきた。そこで我々は、この点を確認する目的で、卵黄形成前期まで進んだ卵母細胞を多量に持つ雌ティラピアに対して芳香化酵素阻害剤 (ファドロゾール) 処理を行い、その後の生殖腺の形態変化を詳しく調べた。その結果、ファドロゾール処理された雌個体で精巣の形成が起こり、成熟した精子を生産することが分かった。5ヵ月後には卵巣がほぼ完全に退行し (卵巣腔は残っている)、生殖腺は精子を含むいろいろな発達段階にある生殖細胞で占められた。生産された精子は媒精実験により受精能をもつことが示され、性ステロイドの産生量も正常な雄の精巣と変わりなかった。卵巣におけるエストロゲン合成の低下が卵巣の退行、引き

続く精巣への分化をもたらすことはメダカでも確認された。この実験結果から、多くの卵母細胞からなる卵巣を有する雌成魚でも十分な量のエストロゲンがなければ雄に性転換する可能性があることが示されたわけであり、魚類における性の可塑性 (Sexual plasticity) が更に明確となった。この点は、今後における内分泌かく乱物質の影響を考える上で重要である。また、この結果は同時にエストロゲンが卵巣分化のみならず卵巣の機能的維持にも不可欠であることを示しており、きわめて重要な知見である。

6) 移植による生殖腺の性分化誘導 (テラピア)

性分化の決定時期、及びその分子機構を明らかにするために、様々な時期の生殖腺を摘出し、腹腔内の様々な位置に移植する実験を行った。その結果、腹腔内のどの位置に移植しても移植生殖腺の性分化が起こることから、性分化誘導因子は、ホルモンのような液性因子である可能性が示唆された。また、移植された生殖腺の形成は宿主側の性に依存して起こること、さらに、孵化後6日の生殖腺の移植実験から、孵化後5日と6日の雄生殖腺は、形態的には全く区別がつかないが、6日にはすでに分化方向が規定されつつあることが示唆された。また、孵化後6日の雄生殖腺を孵化後6日、12日、27日の雌に4日間移植すると、孵化後6日雌に移植された生殖腺は退化したが、12日雌に移植した生殖腺では生殖細胞が退化するものの体細胞は維持された。この実験で観察した移植片は、全て、抗アロマターゼ抗体陽性細胞が出現していた。このように移植した孵化後6日以降の雄生殖腺の退化が、宿主側の雌稚魚が孵化後6日で起こり、それ以降では起こらないこと、さらに、抗P450arom抗体陽性細胞の出現は、孵化後12日への移植では、100%起こり、孵化後27日雌での移植では、その割合が減少することと、孵化後6日雌生殖腺の移植においても、抗P450arom抗体陽性細胞の出現は、孵化後6日に移植したものでは100%起こるのに対し、孵化後27日の宿主では、70%に減少することから、移植性分化を誘導する因子は孵化後6-12日頃までに発現する因子であることが想定され、その後、次第に減少すると考えられる。今後、この性分化誘導因子の化学的実体を明らかにする必要がある。

7) 精子形成の制御機構

性ホルモンや内分泌かく乱物質が精子形成過程に影響を及ぼすことにより精子数の減少などを起こしている可能性がある。しかし、その詳細な分子メカニズムは不明である。本研究では、ニホンウナギのホルモンによる精子形成誘起系を用いて、精子形成の開始・進行の分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。昨年度までに引き続き、精子形成過程における細胞周期関連因子の遺伝子である種々のサイクリン (A、B、E型) のmRNAの発現を、ノーザンブロット解析、及びin situ ハイブリダイゼーションで解析した。それらの中で、サイクリンE2はホルモンによる精子形成の誘起に伴い、著しくその発現が増加し、精原細胞にその発現が見られた。サイクリンE2の発現は精原細胞期に限定される。A型サイクリンの一つであるサイクリンA2は、サイクリンE2の発現増加後、精原細胞の増殖に伴い、その発現が精原細

胞で増加するが、減数分裂期移行前にその発現は、みられなくなる。その後、第二次精母細胞から精細胞にかけて、その発現がみられる。一方、サイクリンA1は減数分裂の始まる頃より発現が見られ、発現部位を調べたところ、精母細胞から精細胞期の生殖細胞に特異的にその発現が見られた。さらに発現時期の詳細を明らかにするために、サイクリンA1の発現を、減数分裂期初期に特異的に発現するDmc1の発現と比較したところ、サイクリンA1の発現する前にDmc1の発現が見られた。このことより、サイクリンA1の発現が見られるのは、パキテン期以降の第1精母細胞から精細胞までということが明らかになった。

B型サイクリンに関しては、サイクリンB1、B2が精原細胞、精母細胞期に発現が見られるのに対して、サイクリンB3は精原細胞に特異的にその発現が見られることが、初めて明らかとなった。タンパクの発現を調べた結果、mRNAと同様な発現局在が観察された。また、ホルモンによる精子形成誘起過程においてサイクリンB1、B2、B3は、いずれもcdc2キナーゼと複合体を形成し、キナーゼ活性を示した。しかし、サイクリンB2が主に細胞質にタンパクの局在が見られるのに対して、サイクリンB1は、核、及び細胞質に、B3は核のみにタンパクの局在が見られた。これらのことは、精子形成過程において、B型サイクリンの各サブタイプの機能分化、機能分担の可能性を示唆する。

以上のホルモンによる精子形成誘起過程における種々のサイクリンの発現解析をもとに、これらのサイクリンの精子形成過程における機能解析を試みている。精子形成開始におけるサイクリンE2の機能を、エレクトロポレーション法を用いた精巣構成細胞への遺伝子導入を行い、*in vitro*器官培養精子形成再現系を用いた機能解析法により検討した。その結果、ホルモン未処理の精巣構成細胞にE型サイクリン遺伝子を導入し強制発現させることにより、A型精原細胞のB型精原細胞への分化、増殖が観察され、ホルモン刺激なしでも精子形成の開始が誘起されることが分かった。*In vivo*でのホルモン刺激による精子形成誘起に伴うサイクリンE2の発現の著しい増加と考え合わせると、ウナギの精子形成開始は、ホルモン刺激後に起こる精原幹細胞でのサイクリンE2の発現がその機能を担っていることが初めて明らかとなった。また、サイクリンB1、B2、B3の機能を詳細に解析するため、それぞれに特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた、遺伝子の発現抑制の実験系を現在検討中である。

8) ステロイド膜受容体を介した卵成熟の誘起機構

我々のこれまでの研究から、多くの魚類の微小注射などによる卵成熟誘起ステロイドであるプロゲステロンの受容体は卵細胞膜上にあると考えられてきたが、一昨年その化学的実体が米国のPeter Thomasらによって明らかにされた。昨年度までの本研究で我々は、メダカ卵巣cDNAライブラリーからPCRによって α タイプと γ タイプのプロゲステロン膜受容体遺伝子の全長cDNA配列を決定し、それぞれ、01GPCPR- α (Oryzias latipes G-protein coupled progestin receptor- α) と 01GPCPR- γ として塩基配列

データベースに登録した。01GPCPR- α のcDNAは全長2983 bpで、352アミノ酸のタンパク質をコードしており、01GPCPR- γ のcDNAは全長1566 bpで、352アミノ酸のタンパク質をコードしている。ノーザンブロット解析の結果、 α タイプ受容体のmRNAは脳、頭腎、筋肉、卵巣、精巣で発現が見られ、特に脳で強い発現を示すことが特徴である。一方、 γ タイプ受容体は雌雄の生殖腺（卵巣、精巣）でのみ発現が見られた。さらに、01GPCPR- α のアミノ酸配列をもとに、メダカのゲノムデータベースを検索することで、これに高い類似性を示す遺伝子が見つかった。これまでに報告されているプロゲスチン膜受容体の分子系統樹を作成したところ、この遺伝子が β タイプに属するプロゲスチン膜受容体のものであることが強く示唆され、01GPCPR- β とした。ノーザンブロット解析では、01GPCPR- β のシグナルは、どの組織でも得られなかった。メダカでは、 β タイプの受容体遺伝子は転写されていないか、もしくは、発現量が低いと考えられる。01GPCPR- α と01GPCPR- γ について、*in situ*ハイブリダイゼーションで卵巣内での局在を観察したところ、01GPCPR- α と01GPCPR- γ は、ともに卵母細胞の細胞質に局在していることが観察された。ともに、卵黄形成期以前の初期の卵母細胞でも発現が確認され、卵形成を通じてどの時期でも発現していることが判った。01GPCPR- γ では、特に卵母細胞のBalbiani Bodyに濃縮されていた。現在のところ、Balbiani Bodyにおける局在の意義は判らない。メダカでは α タイプと γ タイプの受容体がともに卵成熟に関与している可能性があるため、現在、抗体を作成して卵母細胞における受容体タンパク質の確認を試みている。また、これまでに知られていないが、脳においてもプロゲスチンによる膜受容体を介した迅速な応答系が存在する可能性が考えられ、今後この視点からの研究も期待される。また最近、エストロゲンに関してもG-protein coupledの膜受容体がヒトや魚類の生殖腺に見つかったという情報も得ている（Peter Thomas、私信）。従って、今後、これら新規のステロイド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の研究を精力的に推進する必要があると考えられる。

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。オキナワベニハゼは、精巣と卵巣を同時に持ち社会刺激によりどちらかの生殖腺を交互に発達させることにより性転換する。この生殖腺の劇的な変化は環境ホルモン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、多くの魚種では環境ホルモン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

本年度も昨年と同様に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卵巣から精巣への転換について継続して実験を行った。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の、培地の最適濃度、培地への添加物、pHについての検討を行った。現在これらの結果を論文としてまとめている。

2) 女性ホルモン以外のホルモンの性転換に及ぼす影響

社会的要因によって引き起こされる性転換にはストレスが関与していると考えられる。また、内分泌かく乱物質もストレスとなって間接的に生殖腺へ影響するものと考えられる。そこでストレス時に分泌されるコルチゾルを用いて性転換魚のベラの卵巣に及ぼす影響を調べた。その結果、コルチゾル (1mg/g飼料) を6週間投与した全ての雌個体の卵巣は完全に卵が消失し、活発に精子形成する精巣となった。このことからコルチゾルは、生殖腺に影響し卵巣から精巣への性転換を誘導することが明らかになった。内分泌かく乱物質の暴露がストレスとなり生殖腺に間接的に影響する経路も考えられた。

3) 性転換の生殖腺刺激ホルモンおよびその受容体の役割解明

内分泌かく乱物質は、脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモンGTHおよびその受容体に作用して生殖腺の機能・発達に影響することが考えられる。精巣と卵巣を同時に持ち、社会的構造の変化により雄から雌、雌から雄へと繰り返し両方向に性転換するオキナワベニハゼを用いて、GTHがどのように生殖腺に情報を伝えているのかを明らかにすることを試みた。本年度は、GTH受容体に着目し、生殖腺内での発現および両方向性転換に伴う発現変化を調べた。二種類のGTH受容体 (FSH-R, LH-R) をオキナワベニハゼ卵巣より単離した。その後、同一個体の精巣、卵巣内でのFSH-R, LH-Rの発現量をリアルタイムPCRによって調べた。また、飼育実験により性転換を誘起し、両方向性転換に伴う遺伝子発現量の変化も調べた。二種類のGtH受容体はいずれも、雄として機能しているときには精巣に強く発現し、卵巣での発現はきわめて低かった。逆に雌として機能している時には、精巣での発現は低く、卵巣で強く発現していた。一方、性転換時生殖腺での発現は、性転換の方向に従って急速に変動することが明らかになった。すなわち、雌から雄への性転換時には、卵巣から精巣、雄から雌への性転換時には精巣から卵巣へとその発現部位が急速に切り替わった。以上の結果より、ベニハゼのGtHの作用は受け手側である受容体により調節されており、その発現局在は性転換によって明確に切り替わることが示された。これらの結果は、GtH/GtH受容体系がオキナワベニハゼの両方向性転換に重要な働きを果たすことを示唆する。現在2種のGtH、FSH、LHの性転換に果たす役割について明らかにしている。また、内分泌かく乱物質のGtH/GtH受容体系に及ぼす影響について

も今後明らかにしたい。

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) ミュラー管抑制物質(MIS)の発現制御に及ぼすエストロゲン及びエストロゲン様物質の影響

昨年度、高水温飼育による雄化に伴い誘導される因子として、ミュラー管抑制物質(MIS)の同定に成功した。そこで今年度は、MISの発現制御に及ぼすエストロゲン及びエストロゲン様物質の影響を解明するため、XXヒラメに高水温処理(27℃水温飼育)下でエストラジオール-17β (E2)またはエストロゲン様物質を投与して雌化し、MIS mRNAの発現を *in situ* hybridization及びRT-PCRにより解析した。その結果、27℃水温飼育により雄へと分化誘導した個体においては、MIS mRNAの強い発現が観察されたが、27℃水温飼育下でE2を投与した雌個体においては、MIS mRNAの発現は全く検出されなかった。このことから、エストロゲンはMIS mRNAの発現を抑制して雌へと分化誘導することが明らかになった。また、ヒラメの雌化を誘導するノニルフェノール、ビスフェノール、ゲニステインを投与した個体においてもMIS mRNAの発現が全く検出されない個体が存在していたことから、エストロゲン様物質もE2と同様に、MIS mRNAの発現を抑制して雌へと分化誘導するのではないかと考えられた。昨年度、我々は、XXヒラメに27℃水温飼育下で抗アンドロゲン剤(フルタミド)を投与して雌化を誘導した時、MIS mRNAの強い発現が維持されることを明らかにしていることから、MISはエストロゲン様物質と抗アンドロゲン様物質を識別できる優れた分子マーカーとなりうると考えられた。

2) ヒラメ性分化に及ぼす抗アンドロゲン様物質DDEの影響

魚類の性分化における抗アンドロゲン様物質DDE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 p,p' -DDE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、27℃水温飼育下で p,p' -DDEを0、10、100 µg/g飼料の濃度で経口投与し、日齢300日の成魚の性比を調査した。その結果、 p,p' -DDE濃度0、10、100 µg/g飼料における雄の割合は、それぞれ73.3、25.0、16.7%であり、 p,p' -DDEの濃度依存的に雄の割合が減少した。このことから、 p,p' -DDE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。また、この p,p' -DDE処理したXXヒラメの日齢100における性分化関連遺伝子の発現パターンを *in situ* hybridizationにより解析した結果、3個体中1個体においては、27℃水温飼育により雄へと分化誘導した個体と同様に、MIS、Ad4BP/SF-1、LRH-1 mRNAの発現が検出され、P450arom mRNAの発現が認められず、卵巣腔も存在しなかったが、3個体中2個体においては、27℃水温飼育下でエストロゲン処理により雌へと分化誘導した個体と同様に、P450arom、Ad4BP/SF-1、LRH-1 mRNAの発現が検出され、MIS mRNAの発現が認められず、卵巣腔が観察された。さらに、 p,p' -DDEの作用機構を解明するべく、

すでに開発した魚類のエストロゲン応答性及びアンドロゲン応答性レポーターアッセイ系を用いて解析した。その結果、*p, p'*-DDEは魚類のアッセイシステムに対して抗アンドロゲン作用だけでなく、エストロゲン作用も合わせ持つことが確認された。これらの結果から、*p, p'*-DDEはヒラメに対して強い雌化作用があることが分かった。

3) ヒラメMIS遺伝子5'上流域の単離及び解析

内分泌かく乱物質に応答するmis-GFPトランスジェニック魚を作製するための第一段階として、まずヒラメのMIS遺伝子5'上流域の単離及び解析を行った。その結果、約700bの単離に成功し、翻訳開始点から139b上流に1つのAd4類似配列を確認した。この配列に転写因子Ad4BP/SF-1及びLRH-1が結合するかをゲルシフトアッセイで調べた結果、両者ともにこの配列特異的に結合する事が明らかになった。我々は、雌分化マーカーであるP450arom遺伝子の5'上流域にも2つのAd4類似配列が存在し、これらの配列にAd4BP/SF-1及びLRH-1両方ともに結合する事を証明しており、またこの両者は性分化時期の生殖腺で常時発現していることから、Ad4BP/SF-1及びLRH-1は雌雄両方の性分化に関与している可能性が考えられた。今後は、MIS遺伝子5'上流域とGFPを連結したベクターを構築し、内分泌かく乱物質に応答するmis-GFPトランスジェニック魚を作製する予定である。

4) 魚類性分化におけるMISの生理的機能

魚類の性分化におけるMISの役割を解明するため、機能解析に有利なメダカ (*Oryzias latipes*) を用いて解析を行った。まず、性分化時期の生殖腺におけるMIS mRNAの発現パターンを *in situ* hybridization法により調べた結果、MIS mRNAの発現は、生殖細胞周辺の支持細胞で特異的に発現している事が分かった。次に、アンチセンスオリゴ(AS)を用いた *in vivo*でのMISの機能阻害実験を行った。MIS mRNAの翻訳開始部位に相補的なMIS-ASと、対照実験として5塩基ミスマッチMIS-AS (5mis-AS) を用いてolvas-GFPトランスジェニック透明メダカ胚へと顕微注入し、GFP蛍光で可視化された生殖細胞数をカウントした。その結果、性分化時期において、MIS-ASを注入したメダカ胚では、Control胚及び5mis-ASを注入したメダカ胚に比べて有意に生殖細胞数が減少した。これらのことから、MISはメダカ性分化過程での生殖細胞の増殖に必須であると考えられた。さらに、olvas-GFPトランスジェニック透明メダカ胚を用いて、性分化時期の生殖腺の培養を行い、*in vitro*でのMISの機能を解析した。抗ウナギMIS抗体を添加してメダカ生殖腺を培養した結果、生殖細胞の増殖が有意に阻害されたが、同時にウナギリコンビナントMISを添加することで濃度依存的に生殖細胞の増殖率が増加した。これらのことから、*in vitro*での機能解析においても、MISは性分化過程での生殖細胞の増殖に関与することが明らかになった。今後は、ヒラメ性分化におけるMISの生理的役割を解明する予定である。

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

昨年までの本研究で、内分泌かく乱物質の中には魚類の卵成熟を直接誘起するプロゲ

スチン様の作用を示す化合物（DES、タモキシフェン）や逆に卵成熟阻害作用をもつ物質（ペンタクロロフェノール）が存在することを明らかにした。これらの化合物は卵の培養実験からいずれの場合も卵膜上に存在すると推定されているステロイド膜受容体に作用していることが示唆されている。そこで、ステロイド膜受容体分子の同定を進め、キンギョ卵巣には α 、 β の他、 γ については2タイプ（ $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ ）、計4タイプが存在することが明らかになった。これらのうち α タイプについてRNAiの実験を行った。その結果、 $17\alpha,20\beta$ -DPにより誘導される卵成熟が阻害されたことからこの分子が卵成熟誘起ホルモンの受容体であることが確認された。しかし、卵巣cDNAライブラリーから同様のステロイド膜受容体分子が4種得られたことや、これらの分子がダイマーを形成して機能していることが示唆されていることから、今後は4種類の存在状態を解明し、内分泌かく乱物質群の標的分子がこれらのステロイド膜受容体であることを検証する必要がある。

一方、サカナの生体そのものにステロイドホルモンや内分泌かく乱物質を作用させる実験を試み、*in vivo*においても実際に卵成熟に対する作用がみられることが明らかになった。ゼブラフィッシュにおいては*in vivo*においても*in vitro*と同様、3時間程度で卵成熟が誘起された。また、本研究で卵成熟に対して強い阻害作用を示すことが明らかになったペンタクロロフェノールについても*in vitro*と同様に*in vivo*においても卵成熟阻害作用を示すことが明らかになった。これらの結果は、この系がプロゲスチン様物質あるいは抗プロゲスチン様物質の*in vivo*評価系として応用できる可能性を示している（特許出願済）。今後、さらに多くの物質群について検討し、この方法の薬剤の評価系としての有用性について検証を進めていく。

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（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・助教授）
- 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) 論文発表

- 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. Reprod. Develop.* 67, 303-307.
- Bhandari, R.K., Komuro, H., Higa, M. and Nakamura, M. (2004). Sex inversion of sexually immature honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by aromatase inhibitor. *Zool Sci.* 21, 205-310.
- Horiguchi, R., Tokumoto, M., Nagahama, Y. and Tokumoto, T. (2004). Molecular cloning and expression of cDNA coding four spliced isoforms of casein kinase I α in goldfish oocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1727, 75-80.
- Horiguchi, R., Yoshikuni, M., Tokumoto, M., Nagahama, Y. and Tokumoto, T. (2004). Identification of a protein kinase which phosphorylates a subunit of the 26S proteasome and changes in its activity during meiotic cell cycle in goldfish oocytes. *Cell. Signal.* 17, 205-215.
- Kobayashi-Kajiura, H., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2004). The cloning of cyclin B3 and its gene expression during hormonally induced spermatogenesis in the teleost, *Anguilla japonica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 288-292.
- Kobayashi-Kajiura, H., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2004). Cloning of cDNAs and the differential expression of A-type cyclins and Dmcl during spermatogenesis in the Japanese eel, a teleost fish. *Dev. Dyn.* (in press).
- Kobayashi, T., Kobayashi, H. and Nagahama, Y. (2004). Two DM domain genes, *DMY* and *DMRT1*, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Dyn.* 231, 518-526.
- 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.
- Kobayashi, Y., Sunobe, T., Kobayashi, T., Nagahama, Y. and Nakamura, M. (2005). Gonadal structure of the serial-sex changing fish *Trimma Okinawa*.

Dev. Growth Differ. 47, 7-13.

- 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.
- Nakada, N., Nyunoy, H., Nakamura, M., Hara, A., Iguchi, T. and Takada, H. (2004). Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. Environ. Toxic. Chem. 23, 2807-2815.
- Nakata, H., Hirakawa, Y., Kawazoe, M., Nakabo, T., Arizono, K., Abe, S., Kitano, T., Shimada, H., Watanabe, I., Li W. and Ding, X. (2005). Concentrations and compositions of organochlorine contaminants in sediments, soils, crustaceans, fishes and birds collected from lake Tai, Hangzhou bay and Shanghai city region. China. Environmental Pollution 133, 415-429.
- Senthilkumaran, B. and Nagahama, Y. (2004). A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. Mol. Cell. Endocrinol. 215, 11-18.
- Shiraishi, E., Imazato, H., Yamamoto, T., Yokoi, H., Abe, S. and Kitano, T. (2004). Identification of two teleost homologs of the *Drosophila* sex determination factor, *transformer-2* in medaka (*Oryzias latipes*). Mech. Develop. 121, 991-996.
- Sunobe, T., Nakamura, M., Kobayashi, Y., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2004). Gonadal structure and P450scc and 3 β -HSD immunoreactivity in the gobiid fish *Trimma okinawae* during bi-directional sex change. Ichthyol. Res. 52, 27-32.
- Sunobe, T., Nakamura, M., Kobayashi, M., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2005). Aromatase immunoreactivity and the role of enzymes in steroid pathways for inducing sex change in the hermaphrodite gobiid fish *Trimma okinawae*. Comp. Biochem. Physiol. (in press).
- Suzuki, A., Tanama, 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., 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.

- Wakata, Y., Tokumoto, M., Horiguchi, R., Ishikawa, K., Nagahama, Y. and Tokumoto, T. (2004). Identification of a-type subunits of the *Xenopus* 20S proteasome and analysis of their changes during the meiotic cell cycle. *BMC Biochem.* 5, 18.
- Wang, D.S., Zhou, L.Y., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2004). Molecular cloning and gene expression of Foxl2 in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 83-89.
- Yoshinaga, N., Shiraishi, E., Yamamoto, T., Iguchi, T., Abe, S. and Kitano, T. (2004). Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Mullerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 508-513.
- Zhou, L.Y., Wang, D.S., Senthilkumaran, S., Yoshikuni, M., Shibata, Y., Kobayashi, T., Sudhakumari, C.C. and Nagahama, Y. (2005). Cloning, expression and characterization of three types of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases from the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Mol. Endocrinol.* (in press).
- 長濱嘉孝 (2004)。序論。動物の性はどのように決まるか？：性決定機構の共通性と多様性。蛋白質 核酸 酵素。49、97-101。
- 長濱嘉孝、小林 亨、松田 学 (2004)。魚類の性決定と生殖腺の性分化/性転換。動物の性はどのように決まるか？：性決定機構の共通性と多様性。蛋白質 核酸 酵素。49、116-123。
- 長濱嘉孝 (2004)。魚類生殖系に及ぼす影響のメカニズム。内分泌攪乱物質—どこまでわかったか (8)。現代化学。2004年8月、40-45。

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件 (CREST研究期間累積件数：3件)