

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

化学物質の内分泌かく乱作用を予測・検出する新たなスクリーニング法の開発
(5RF-1951)

令和元年度～令和3年度

Development of a Screening Assay to Predict and Detect for the Effect of Endocrine Disrupting
Chemicals

＜研究代表機関＞
神戸大学

＜研究分担機関＞
該当なし

＜研究協力機関＞
秋田県立大学
長浜バイオ大学

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ．成果の概要」の図表番号は「Ⅰ．通し番号」としております。なお、「Ⅱ．成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ．成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号．通し番号」としてしております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和4年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	
5-1. 成果の概要	
5-2. 環境政策等への貢献	
5-3. 研究目標の達成状況	
6. 研究成果の発表状況	
6-1. 査読付き論文	
6-2. 知的財産権	
6-3. その他発表件数	
7. 国際共同研究等の状況	
8. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II-1 化学物質の内分泌かく乱作用を予測・検出する新たなスクリーニング法の開発（国立大学法人 神戸大学）	16
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
III. 研究成果の発表状況の詳細	28
IV. 英文Abstract	29

I. 成果の概要

課題名 5RF-1951 化学物質の内分泌かく乱作用を予測・検出する新たなスクリーニング法の開発

課題代表者名 堀江好文（神戸大学内海域環境教育研究センター助教）

重点課題 主：【重点課題⑭】化学物質等の包括的なリスク評価・管理の推進に係る研究

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） 非該当

研究実施期間 令和元年度～令和３年度

研究経費

18,000千円（合計額）

（各年度の内訳：令和元年度：6,000千円、令和２年度：6,000千円、令和３年度：6,000千円）

研究体制

（サブテーマ１）化学物質の内分泌かく乱作用を予測・検出する新たなスクリーニング法の開発（神戸大学）

他のサブテーマはない。

研究協力機関

公立大学法人秋田県立大学

学校法人関西文理総合学園長浜バイオ大学

本研究のキーワード メダカ、内分泌攪乱物質、遺伝子マーカー、Cyp19a1a、EDCs、Gsdf

1. はじめに（研究背景等）

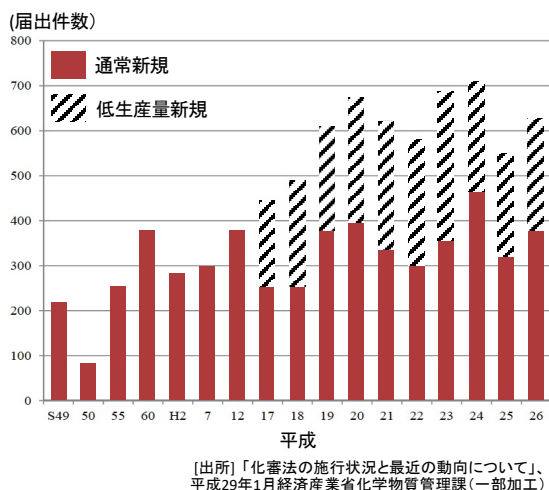
我が国の化学物質のリスク管理は、経済協力開発機構で国際的に同意された試験法（OECD TG）などに基づいて行われている。しかし、新規化学物質の届出件数は年々増加しており、従来の方法だけでは管理しきれない。そのため、今後の多種多様な化学物質を管理するためには、化学物質の特性や生態影響を短期間で評価できる新たな手法を開発する必要がある（図1）。

さらに、近年、上述した化学物質のリスク管理だけでなく、試験を実施する際の「動物福祉」に関する問題も懸念されている。ヨーロッパでは、魚類の「胚期」は生物ではなく、胚期を用いた試験は*in vitro*試験として定義されており、最近のOECDの国際会議においても動物福祉の観点から、魚類の「胚期」のみを用いた試験が強く推奨されている（EU、2010）。しかし、現状の「胚期」のみを用いた試験法では、化学物質の「致死影響」を評価する試験法（OECD TG 236）しか確立されていない。

研究代表者はこれまでに、分子生物学の観点から、「化学物質の内分泌かく乱作用が魚類の性分化に与える生物影響」に関する研究を実施してきた。その結果、内分泌かく乱作用のある化学物質が魚類の性分化に与える影響は、*Gsdf*という精巣分化決定遺伝子が鍵遺伝子であり、*Gsdf*遺伝子は「胚期」からその発現が誘導されることを明らかにした（Horie et al, MCE, 2016）。そこで、本研究計画では、バイオマーカー遺伝子を指標とすることで、化学物質が魚類の性分化に与える内分泌かく乱作用を検出できる新たな生態毒性試験法を開発することを目的とした。

●新規化学物質届出件数の推移

新規化学物質の届出件数は年々増加



●従来の試験法を用いたリスク管理

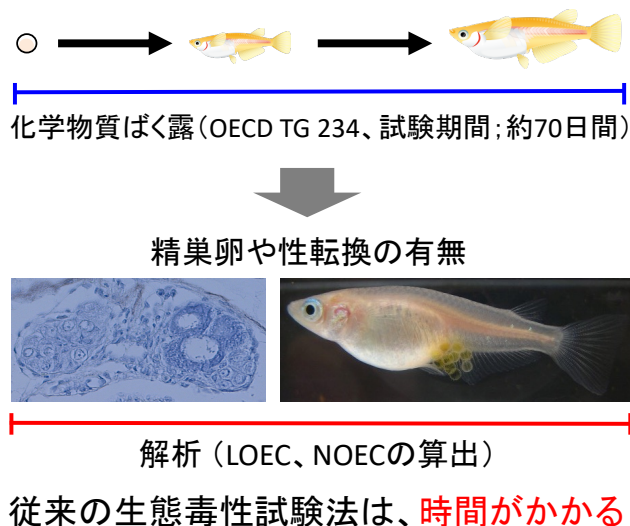


図1 研究背景

2. 研究開発目的

本研究計画では、バイオマーカー遺伝子を指標とすることで、化学物質が魚類の性分化に与える内分泌かく乱作用を検出できる新たな生態毒性試験法を開発することを目的とする。さらに、開発した試験法を応用することで、実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す物質のスクリーニング手法を開発する（図2）。

本研究では、以下の実験を行うことにより、上記の目標を達成する。

〔実験その1〕

精巣分化を誘導する*Gsdf*遺伝子や卵巣分化を誘導する*Cyp19a1a*遺伝子が、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであるかを明らかにする。

〔実験その2〕

より簡便かつ安価にバイオマーカー遺伝子発現変動を解析できるようにするため、バイオマーカー遺伝子と緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を組み込んで、男性ホルモン作用を検出するとXX個体の生殖線の緑色の蛍光が弱まり、女性ホルモン作用を検出するとXY個体の生殖線が緑色に光る「化学物質のスク

リーニングに用いるメダカ」を作出する。

[実験その3]

作出したメダカが、実際の環境水中に含まれる内分泌攪乱作用を示す物質のスクリーニングに活用できるか検討する。

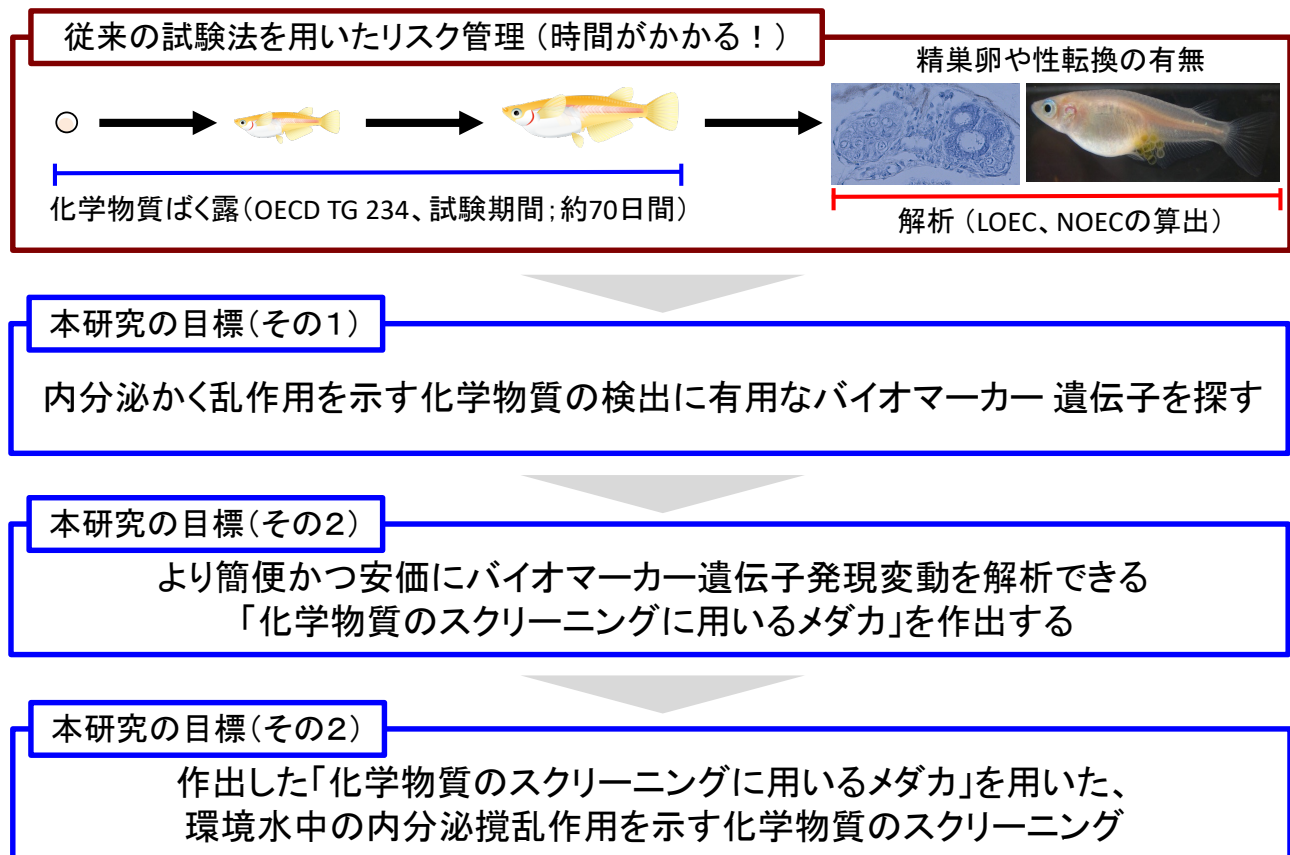


図2 研究開発目的

3. 研究目標

全体目標	本研究では、内分泌かく乱作用のある化学物質が魚類のモデル生物メダカの性分化に与える生態影響の遺伝子メカニズムを明らかにし、さらには、特定の遺伝子を指標とすることで、実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法を開発する。 本研究では、以下の実験を行うことにより、上記の目標を達成する。 1) 精巣分化を誘導する <i>Gsdf</i> 遺伝子が、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであるかを明らかにする。 ・ 女性ホルモン作用を示すビスフェノールA・ノニルフェノール、男性ホルモン作用を示すトレンボロンをメダカにばく露（魚類性発達試験；OECD TG No. 234）し、ばく露されたメダカの生殖腺の組織学的観察を行い、精巣卵や卵精巣、性転換の発生の有無を明らかにする。 ・ 上記の化学物質をメダカ胚にばく露し、各化学物質が <i>Gsdf</i> 遺伝子の発現パターンに与える影響を明らかにする。 2) より簡便かつ安価に <i>Gsdf</i> 遺伝子の発現変動を解析できるようにするため、<i>Gsdf</i> 遺伝子と緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を組み込んで、男性ホルモン作用を検出すると生殖線が緑色に光り、女性ホルモン作用を検出すると生殖線の緑色の光が弱まる「化学物質のスクリーニングに用いるメダカ」を作出する。 3) 作出したメダカが、実際の環境水中に含まれる内分泌攪乱作用を示す物質のスクリーニングに活用できるか検討する。
-------------	---

サブテーマ 1	化学物質の内分泌かく乱作用を予測・検出する新たなスクリーニング法の開発
サブテーマリーダー /所属機関	堀江好文／神戸大学
目標	

4. 研究開発内容

本研究では、内分泌かく乱作用のある化学物質が魚類のモデル生物メダカの性分化に与える影響の遺伝子メカニズムを明らかにし、さらには、特定の遺伝子を指標とすることで、実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法を開発した。

本研究では、以下の実験を行うことにより、上記の目標を達成した。

[実験その 1]

精巣分化を誘導する *Gsdf* 遺伝子や卵巣分化を誘導する *Cyp19a1a* 遺伝子が、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであるかを検討した結果、*Gsdf* 遺伝子と *Cyp19a1a* 遺伝子は魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカー遺伝子であることが示唆された。

[実験その 2]

Gsdf 遺伝子の発現を容易に判別できる遺伝子組換えメダカの作製を試みた。CRISPR/Cas法のノックインで GFP を導入した。その結果、PCR でノックインの有無を確認すると、ほとんどの個体でドナープラスミドのノックインは成功しているが、GFP が見えない（緑色に光らない）結果となった。そこで、アドバイザーおよび P0 と相談し、実験計画を当初の計画（*Gsdf*-GFP 系統）から下記の 2 系統（Y^{RFP} 系統と *Cyp19a1a*-GFP 系統）の遺伝子組換えメダカを作製するのに変更した。

Y^{RFP} 系統：遺伝的性判別を目的の RFP 蛍光（目が赤く光ると XY、光らないと XX）の有無で判別できる遺伝子組換えメダカを作出し、*Gsdf* 遺伝子の発現については従来法であるリアルタイム PCR 法を用いて測定する系統。Y^{RFP} 系統は胚期の段階だけでばく露試験を実施できる。

Cyp19a1a-GFP 系統：遺伝的性判別を目的の RFP 蛍光（目が赤いと XY、赤くないと XX）の有無で、*Cyp19a1a* 遺伝子の発現の有無は GFP 蛍光（生殖腺が緑色に光る）の有無で判別できる遺伝子組換えメダカの系統。*Cyp19a1a*-GFP 系統は孵化後 30 日までばく露試験を行う必要がある。

[実験その 3]

最後に、実験その 2 で作製した 2 系統の遺伝子組換えメダカを用いて、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す物質のスクリーニングに使えるか確認した。その結果、2 系統とも内分泌かく乱作用を示す物質を含んだ環境水をばく露した場合、反応を検出できた。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

[実験その 1：魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカー遺伝子の特定]

まず始めに、女性ホルモン作用を示すビスフェノール A（対照区、32, 100, 320, 1000, 3200 μ g/L）、ノニルフェノール（対照区、1, 3.2, 10, 32, 100 μ g/L）、男性ホルモン作用を示すトレンボロン（対照区、3.2, 10, 32, 100, 320 ng/L）を用いて魚類性発達試験（OECD TG No. 234 を参考）を行い、各化学物質のメダカ（*Oryzias latipes*; NIES-R 系統）に対する生態影響の最小影響濃度と無影響濃度を算出した。ばく露方法は、流水式魚類試験装置（SIS-24F、柴田科学株式会社製）を使用した。孵化後 30 日、60 日に各濃度 60 個体ずつサンプリングし、①PCR 法を用いた遺伝的雌雄の判別、②生殖腺の組織学的観察（図 3、表 1）を行った。

次に、*Gsdf* 遺伝子と *Cyp19a1a* 遺伝子を指標とした新たな試験法を行い、各化学物質が *Gsdf* 遺伝子と

*Cyp19a1a*遺伝子の発現パターンに与える影響の最小影響濃度と無影響濃度を算出した（図4、5）。
*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子の発現解析は、リアルタイム定量PCR装置（LightCycler® 96 システム、日本ジェネティクス株式会社）を使用した。各濃度20個体ずつサンプリングし、PCR法を用いた遺伝的雌雄の判別を行った。次に、Total RNA抽出・cDNA合成後、リアルタイム定量PCR装置を用いて*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子の発現パターンの変動を明らかにした。

ビスフェノールA、ノニルフェノール、トレンボロンを用いて、*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子のバイオマーカーとしての有用性を検討した。その結果、精巣卵や性転換が誘導される影響パターンと*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子の発現に与える影響パターン（対照区と比べて発現量が抑制または増加）が一致していた。これにより、*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子は魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであることが示唆された。そこで次に、環境省の「環境ホルモン戦略計画SPEED'98」で実施されたmedaka Partial Life Cycle Test（OECD TG 234試験に相当）の既存データを基に、ばく露物質数（17beta-Estradiol、Ethynylestradiol、*p,p'*-DDE、4-*t*-Octylphenol、Tributyltin chloride、Triphenyltin chloride、Amitrole、Endrin、Fenitrothion、Flutamide）（図6）を増やすことで*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子の有用性を最終確認した。

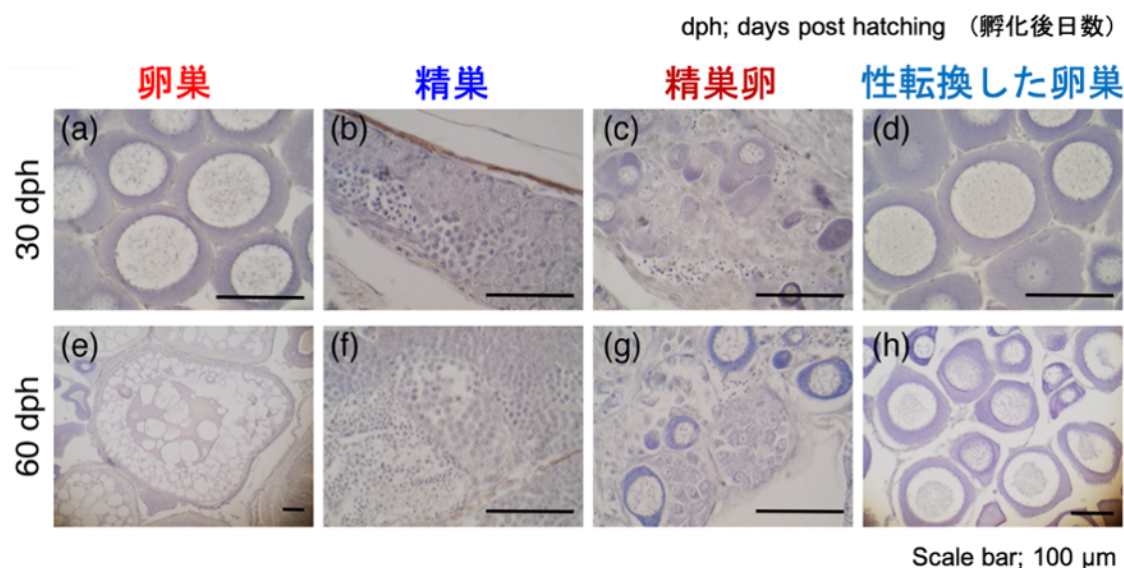


図3 生殖腺の組織学写真(例;ビスフェノールAの場合)

表1 生殖腺の組織学的観察の結果(例;ビスフェノールAの場合)

Age	濃度	n	遺伝的性別	生殖腺			性転換率 (%)	遺伝的性別	生殖腺			性転換率 (%)
	μg/L			卵巣	精巣卵	精巣			卵巣	精巣卵	精巣	
30 dph	Control	40	21	21	0	0	0	19	0	0	19	0
	45	40	21	21	0	0	0	19	0	0	19	0
	92	40	22	22	0	0	0	18	0	0	18	0
	326	40	20	20	0	0	0	20	0	0	20	0
	1030	40	19	19	0	0	0	21	1	0	20	4.7
	3406	40	17	17	0	0	0	23	22	1	0	95.6
60 dph	Control	60	32	32	0	0	0	28	0	0	28	0
	45	60	29	29	0	0	0	31	0	0	31	0
	92	60	22	22	0	0	0	38	0	0	38	0
	326	58	29	29	0	0	0	29	0	0	29	0
	1030	59	28	28	0	0	0	31	4	23	4	12.9
	3406	60	33	33	0	0	0	27	27	0	0	100

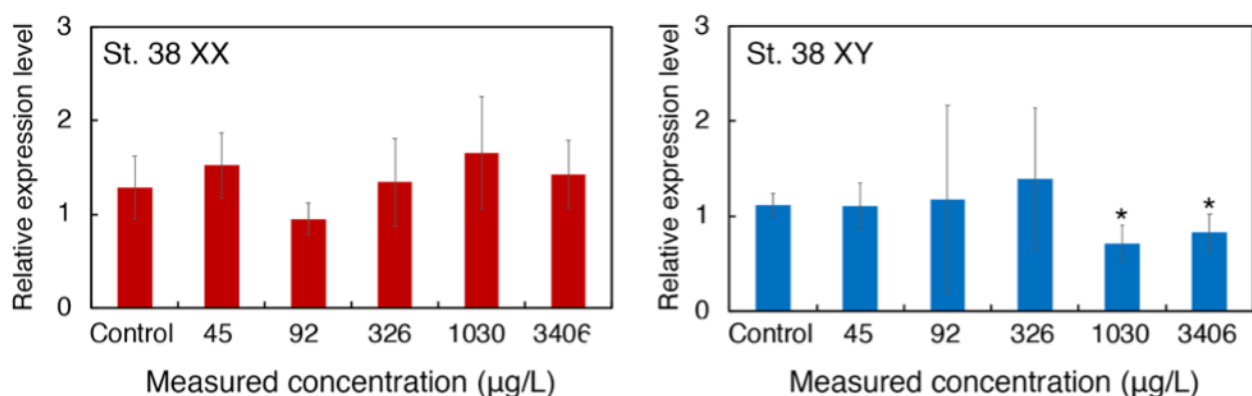


図4 Stage 38(孵化直前;受精後8日目)における*Gsd*遺伝子の発現変動(例;ビスフェノールAの場合)

Columns and error bars represent means $\pm$ SEM ($n = 4$ per group). Asterisks indicate statistically significant differences compared with the respective values for the control (Dunnett's test or Steel's test; $*P < 0.05$).

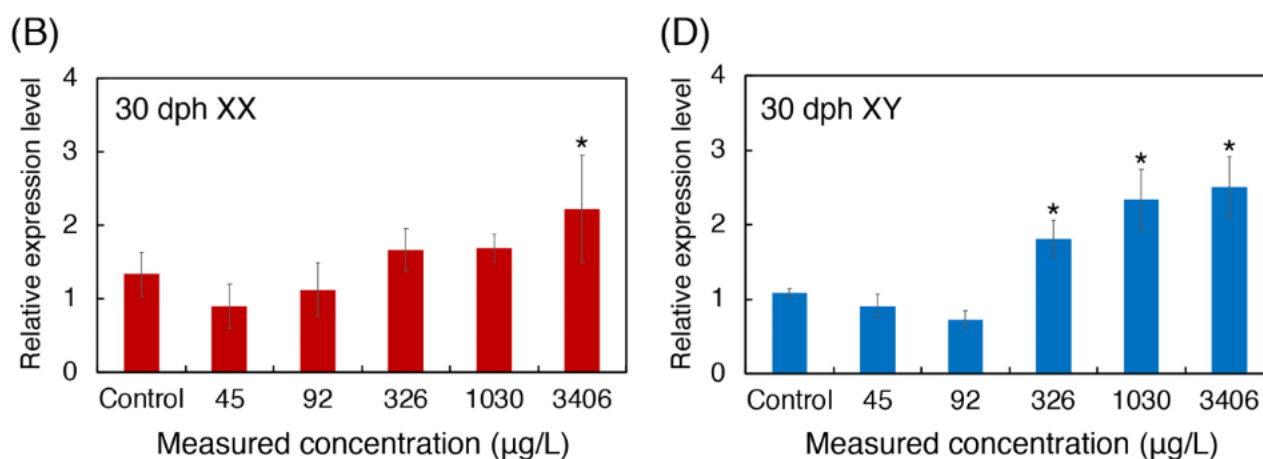


図5 孵化後30日における*Cyp19a1a*遺伝子の発現変動(例;ビスフェノールAの場合)

Columns and error bars represent means $\pm$ SEM ($n = 4$ per group). Asterisks indicate statistically significant differences compared with the respective values for the control (Dunnett's test or Steel's test; $*P < 0.05$).

精巣卵が有意に形成 17beta-Estradiol Ethinylestradiol Bisphenol A p,p'-DDE 4-Nonylphenol (branched) 4-t-Octylphenol	有意な影響なし Amitrole Endrin Triphenyltin chloride Tributyltin chloride 抗男性ホルモン作用 Fenitrothion Flutamide
---	--

図6 「環境ホルモン戦略計画SPEED'98」で実施されたmedaka Partial Life Cycle Test (OECD TG 234試験に相当)の既存データを基に本研究で使用した化学物質

[実験その2： 内分泌かく乱物質のスクリーニングに用いるメダカの作出]

Gsdf-GFP系統：*Gsdf*の発現を緑色蛍光タンパク質（GFP）によって検出できる*Gsdf*-GFP系統の作出を試みた。まず、CRISPR/Cas9を用いた相同組み換え非依存的なノックイン法を検討した。*Gsdf*の上流配列を標的とするsgRNA1と、ドナープラスミドを標的とするsgRNA2、熱ショックプロモーター付きのGFPドナープラスミドDNA、Cas9 mRNAを受精卵に注入した。*Gsdf*上流を標的としたsgRNA1については、5'UTRより前と、5'UTR内の2箇所に設計し、それぞれについて実験を行った。いずれも100個体以上に注入し、半数以上の個体でノックインされていることがPCRにて確認されたが、生殖腺でのGFP発現はほとんど認められなかった。わずかにGFP発現が見られた3個体についても、G1世代でGFP発現を示す個体は得られなかった。

そこで次に、CRISPR/Cas9を用いた相同組み換え依存的なノックイン法（Murakami et al. 2020 *Dev. Growth. Differ.*）により、*Gsdf*の終止コドン直前にインフレームでGFPを挿入することを検討した。本手法では、*Gsdf*の終止コドン直前を標的とするsgRNA1と、ドナープラスミドを標的とするsgRNA2、ホモロジーアームに囲まれたGFPを含むドナープラスミドDNA、Cas9ニッカーゼ mRNAを受精卵に注入した。その結果、PCRでは半数以上の個体で、相同組み換えによるノックインが確認されたものの、生殖腺においてGFP発現を示す個体は得られなかった。

いずれも方法でもGFP蛍光が観察されなかったことから、メダカでは*Gsdf*転写産物量やGSDFタンパク量が極めて少ない可能性が考えられた。

Y^{RFP} 系統：遺伝子型の性（XX/XY）を赤色蛍光タンパク質（RFP）の有無によって判別できる Y^{RFP} 系統を作出した。本研究では、CRISPR/Cas9を用いた相同組み換え非依存的なノックイン法（Watakabe et al. 2018 *Zool. Lett.*）により、メダカのY染色体特異的遺伝子（*Dmrt3p*）に*crystallin-mCherry*カセットを挿入した（図7）。ノックインメダカを作製する際には、*Dmrt3p*を標的とするsgRNA1と、ドナープラスミドを標的とするsgRNA2、*crystallin-mCherry*ドナープラスミドDNA、Cas9 mRNAを受精卵に注入した。これにより、遺伝的雄個体（XY個体）の目は赤く光り（図8）、遺伝的雌個体（XX個体）の目は赤く光らない Y^{RFP} 系統が完成した。従来の方（実験その1）では、孵化直前の卵殻を破り、尾ビレを採取した後、DNA抽出・PCRを行うことで遺伝的性別を判別していた。遺伝的性別の判別後に、尾ビレ以外の部分からRNAを抽出し、リアルタイムPCR法を用いて*Gsdf*遺伝子の発現を測定していた（図9）。しかし、 Y^{RFP} 系統では、孵化直前にレンズのRFP蛍光の有無で遺伝的性別を判別後、卵の状態からRNAを抽出し、リアルタイムPCR法を用いて*Gsdf*遺伝子の発現を測定することが可能となり、分析がより簡便になった（図9）。

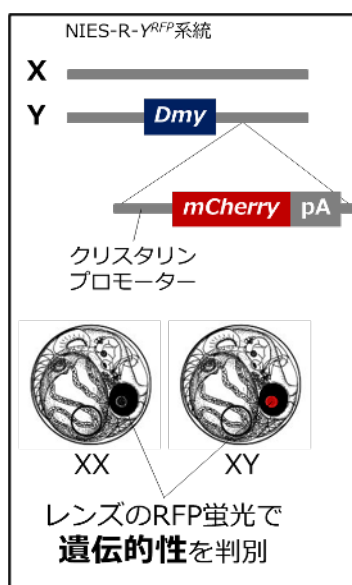


図7 NIES-R- Y^{RFP} 系統の作出

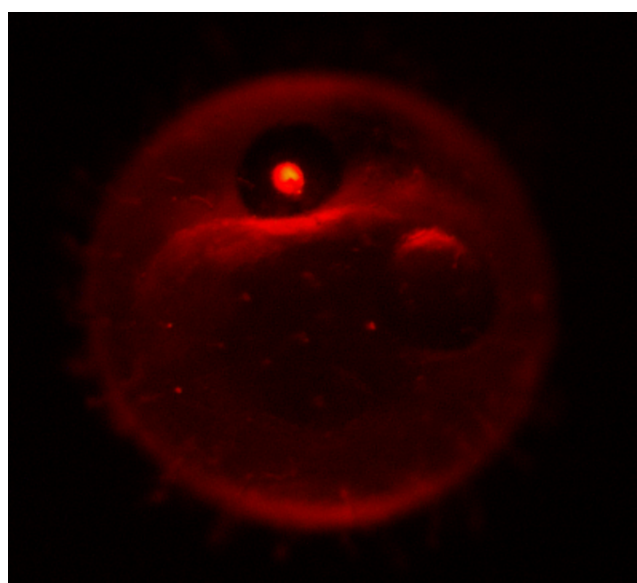
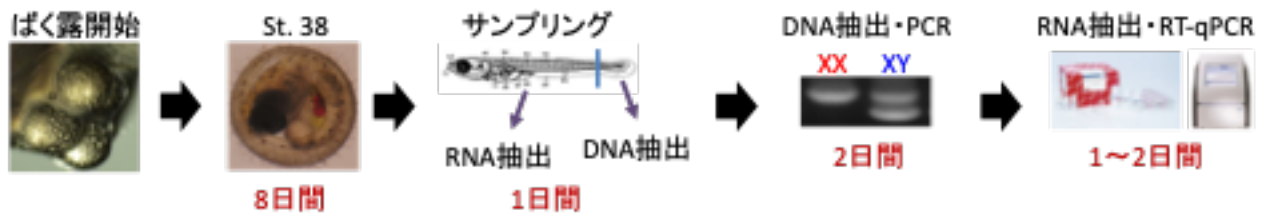


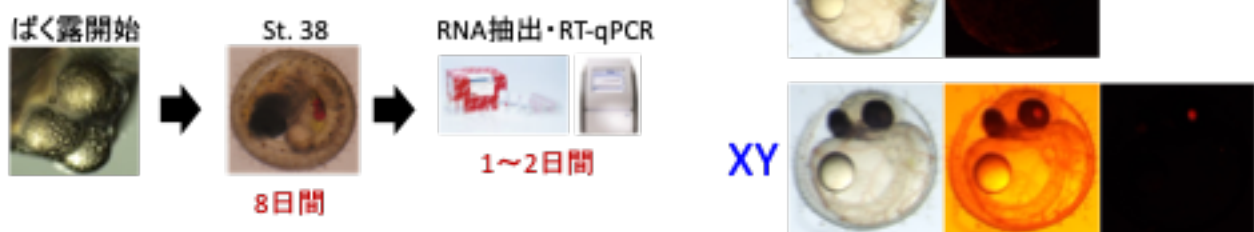
図8 Y^{RFP} 系統のXY個体におけるRFP蛍光

Y^{RFP}システムを用いた試験方法

・従来の方法(Gsdf遺伝子)



・Y^{RFP}システムを用いた方法(Gsdf遺伝子)



従来の方法では、DNAを抽出するため、卵殻を破り、尾びれを採取
 → 卵の状態から、RNA抽出・RT-qPCRが可能

図9 NIES-R—Y^{RFP}システムを用いた試験方法

Cyp19a1a-GFP系統：卵巣型アロマターゼ (*Cyp19a1a*) の発現を緑色蛍光タンパク質 (GFP) によって検出できる遺伝子導入 (*Cyp19a1a*-GFP) 系統を作出した (図10)。本研究では、fosmidゲノムクローンをを用いた遺伝子導入法 (Nakamura et al. 2008 *Dev. Growth. Differ.*) によって作出した。まず、*Cyp19a1a*を含むfosmidゲノムクローン (GOLWFno469_a24) の翻訳開始点に、大腸菌を用いた相同組換えの系 (Lee et al. 2001 *Genomics*) を用いてGFPカセットとTo12トランスポゾンの認識配列を挿入した。従来の方法 (実験その1) では、孵化後30日のメダカから尾ビレを採取した後、DNA抽出・PCRを行うことで遺伝的性別を判別していた。遺伝的性別の判別後に、生殖腺の部分からRNAを抽出し、リアルタイムPCR法を用いて*Cyp19a1a*遺伝子の発現を測定していた。しかし、*Cyp19a1a*-GFP系統では、レンズのRFP蛍光の有無で遺伝的性別を判別でき、*Cyp19a1a*の発現は生殖腺の緑色蛍光の有無で判別できる (図11)。

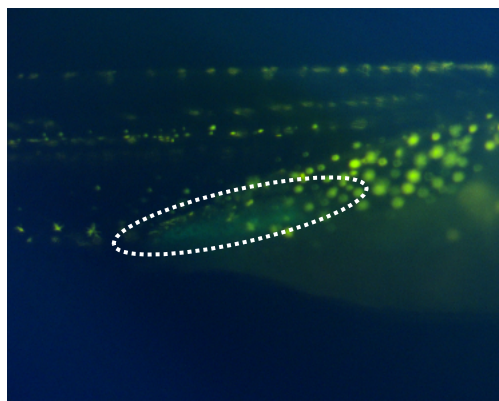


図10 *Cyp19a1a*-GFP系統の生殖腺におけるGFP蛍光 (孵化後4週齢)

Aromatase-GFP系統を用いた試験方法

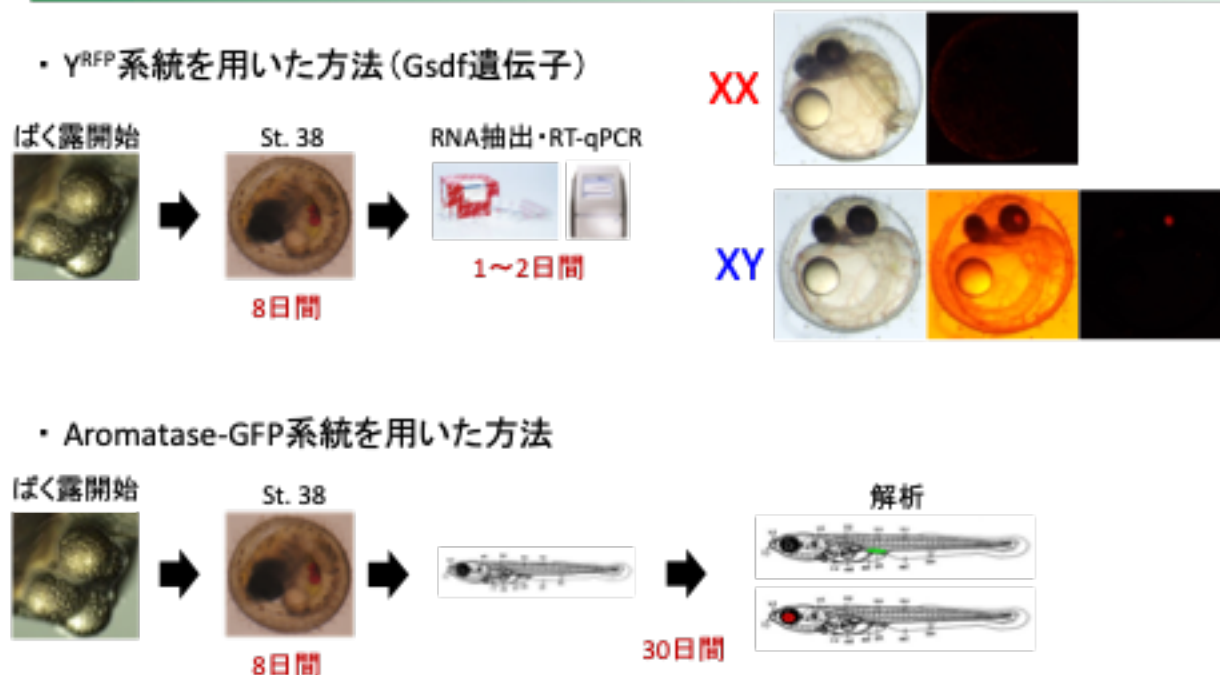


図11 *Cyp19a1a*-GFP系統を用いた試験方法

[実験その3：実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法の開発]

実験その2で作出したメダカ (Y^{RFP}系統と*Cyp19a1a*-GFP系統) が、実際の環境水中に含まれる内分泌かく乱作用を示す物質のスクリーニングに活用できるか検討した。環境水は、秋田県の馬場目川、八郎湖、男潟の3地点の水を用いた (図12)。また、環境水にビスフェノールA (女性ホルモン作用) またはトレンボロン (男性ホルモン作用) を加えた模擬環境水も準備することで、作出したメダカが内分泌かく乱作用をきちんと検出できるか確認した。

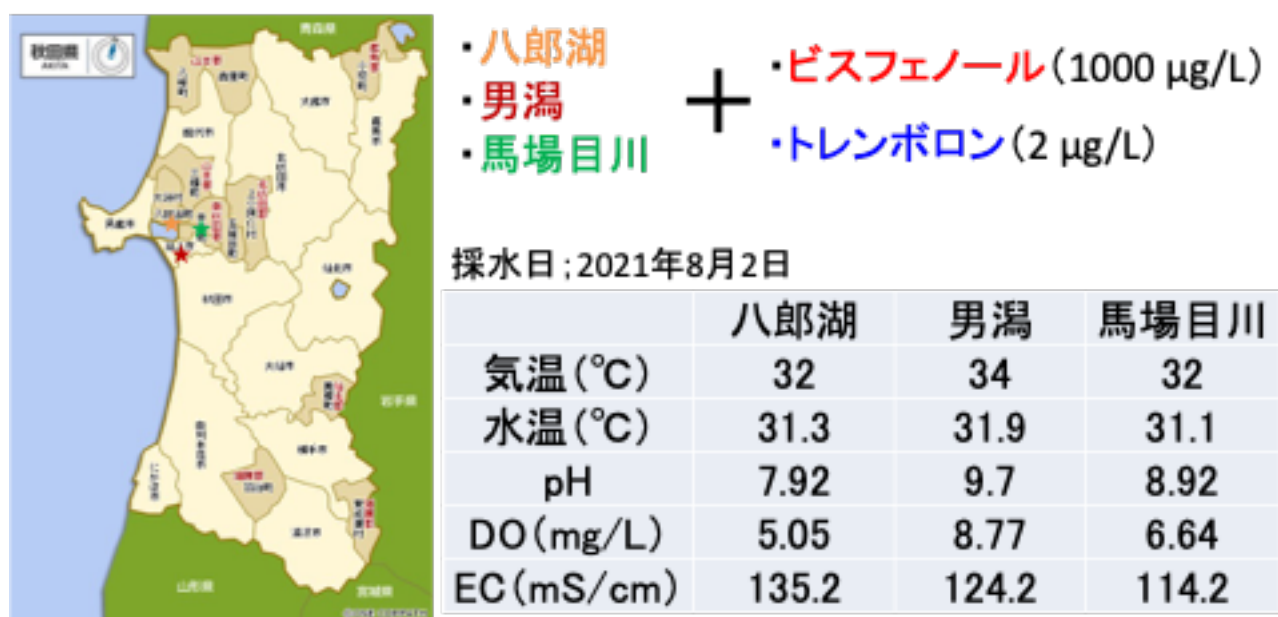


図12 スクリーニングに用いた環境水と模擬環境水

Y^{RFP}系統を用いたスクリーニングの結果

- ・ 八郎湖、男潟、馬場目川の環境水を用いた結果、*Gsdf*遺伝子の発現に変化なし。
- 八郎湖、男潟、馬場目川の環境水には魚類の性分化に影響を与える濃度で内分泌かく乱作用を示す化学物質は含まれていない。
- ・ ビスフェノールAを環境水に加えて試験を行なった結果、XY個体の*Gsdf*遺伝子の発現は低下。
- 仮に、環境水中に女性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、Y^{RFP}系統で反応を検出できる。
- ・ トレンボロンを環境水に加えて試験を行なった結果、XX個体の*Gsdf*遺伝子の発現は増加。
- 仮に、環境水中に男性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、Y^{RFP}系統で反応を検出できる。

Cyp19a1a-GFP系統を用いたスクリーニングの結果

- ・ 八郎湖、男潟、馬場目川の環境水を用いた結果、GFP蛍光に変化なし。
- 八郎湖、男潟、馬場目川の環境水には魚類の性分化に影響を与える濃度で内分泌かく乱作用を示す化学物質は含まれていない。
- ・ ビスフェノールAを環境水に加えて試験を行なった結果、XY個体の生殖腺でGFP蛍光を確認。
- 仮に、環境水中に女性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、*Cyp19a1a*-GFP系統で反応を検出できる。
- ・ トレンボロンを環境水に加えて試験を行なった結果、XX個体の生殖腺でGFP蛍光を確認できず。
- 仮に、環境水中に男性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、*Cyp19a1a*-GFP系統で反応を検出できる。

以上の結果から、本研究では、内分泌かく乱作用のある化学物質が魚類のモデル生物メダカの性分化に与える生態影響の遺伝子メカニズムを明らかにした。さらには、特定の遺伝子を指標とすることで、実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法を開発できた。

5-2. 環境政策等への貢献

化学物質は、微量で人間や野生生物に影響を示す可能性があるため、従来の生態毒性試験では、化学物質の生物影響を明らかにするためには、対象以外の化学物質の混入を極力避け、かつ微量での継続したばく露が可能になるような装置（魚類流水式曝露装置）などが必要となる。魚類流水式曝露装置は、汎用装置ではないため、その運転には経験とノウハウが必要とされ、さらに、従来の生態毒性試験では化学物質の内分泌かく乱作用を評価するのに、多くの時間（例；OECD TG No. 234試験では約70日間、OECD TG No. 229試験では試験魚の育成+試験期間で約4ヶ月）を要する。そのため、従来の方法を用いた試験法だけでは多種多様な化学物質の生態影響を明らかにするのに限界がある。

本研究の成果によって、バイオマーカー遺伝子の発現パターンに着目することで、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質を検出できた。また、「化学物質のスクリーニングに用いるメダカ」を作出し、その有用性を実証することで、より短期間で化学物質の特性（内分泌かく乱作用の有無）を明らかにすることができる新たなスクリーニング法を開発した。これにより、今後の化学物質の生態リスクの初期評価などに活用できることが期待される。

<行政等が既に活用した成果>

該当なし

＜行政等が活用することが見込まれる成果＞

上述した通り、近年、生態毒性試験を実施する際の「動物福祉」に関する問題が懸念されている。ヨーロッパでは、魚類の「胚期」は生物ではなく、胚期を用いた試験は*in vitro*試験として定義されている。また、生態毒性試験を実施する際は供試生物数を極力少なくすることも望まれている。本研究計画で作出したY^{RFP}系統は、DNA抽出・PCRを行うことなくレンズのRFP蛍光の有無で遺伝的な性別を判別できる。さらに、受精卵の段階で遺伝的な性別を判別できる。そのため、本系統は「化学物質のスクリーニング」だけでなく、現行のOECD試験法にも適応することで大幅な供試生物数の削減が可能となる。例えば、メダカ拡張1世代繁殖試験（MEOGRT）（OECD TG 240）では、受精後9～10週目（Test Day 78-85）に、生存した全個体についてメダカの性決定遺伝子であるDMYの保有有無を解析する事で、各個体の遺伝的な性別を判別する必要がある（DNA抽出・PCR法を用いた遺伝的な性別判別）。ペアリング後、余った個体は解剖されるがY^{RFP}系統を用いた場合、受精卵の段階で遺伝的な性別を判別できるため、必要以上の個体数をばく露試験に使用する必要がなくなる。さらに、ばく露個体数が減ることで実験スペース・費用も削減することに繋がる。また、現在、OECDの国際標準試験法として改訂作業中である「抗男性ホルモン作用スクリーニング試験（JMASA）」では遺伝的な雄個体（XY個体）のみを使って試験を行う必要がある。しかし、実験終了時までDNA抽出・PCR法を用いた遺伝的な性別判別が実施できないため、雌雄が混ざった状態でばく露試験を実施しているのが現状である（雌雄の割合は約1：1のため、試験に使う供試生物数は2倍必要になる）。Y^{RFP}系統を用いた場合、受精卵の段階で遺伝的な性別を判別できるため、必要以上の個体数を試験に使う必要がなくなる（供試生物数を半分程度削減できる）。さらに、ばく露個体数が減ることで実験スペース・費用も削減することができる。また、OECD TG 234やOECD 240などは、メダカの性決定遺伝子であるDMYの保有有無を解析する事で、各個体の遺伝的な性別を判別する必要がある。これらの試験についても、Y^{RFP}系統を用いることでDNA抽出やPCRをする必要がなくなり、分析の大幅な簡略化が期待される。以上のことから、Y^{RFP}系統は「化学物質のスクリーニング」だけでなく、現行のOECD試験法にも適応することで、より簡便かつ動物福祉にも配慮した試験を実施できることが期待される。

5－3．研究目標の達成状況

[実験その1：魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカー遺伝子の特定]

精巣分化を誘導する*Gsdf*遺伝子や*Cyp19a1a*遺伝子が、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであることを明らかにした（図13）。

- ・女性ホルモン作用を示すビスフェノールA・ノニルフェノール、男性ホルモン作用を示すトレンボロンをメダカにばく露（魚類性発達試験；OECD TG No. 234）し、ばく露されたメダカの生殖腺の組織学的観察を行い、精巣卵や卵精巣、性転換の発生の有無を明らかにした。

- ・上記の化学物質をばく露し、各化学物質が*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子の発現パターンに与える影響を明らかにした。

- ・環境省の「環境ホルモン戦略計画SPEED'98」で実施されたmedaka Partial Life Cycle Test（OECD TG 234試験に相当）の既存データを基に、ばく露物質数（17beta-Estradiol、Ethinylestradiol、*p,p'*-DDE、4-*t*-Octylphenol、Tributyltin chloride、Triphenyltin chloride、Amitrole、Endrin、Fenitrothion、Flutamide）を増やすことで*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子の有用性を最終確認した。

- ・精巣卵や性転換が誘導される濃度と*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子の発現パターンに与える影響濃度は似た傾向にあった。これらの結果から、*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子は、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであることが示唆された。

	Gsdf遺伝子の発現変化		Cyp19a1a遺伝子の発現変化	
	XX	XY	XX	XY
女性ホルモン作用 のあるEDCs	→	↓	↑	↑
男性ホルモン作用 のあるEDCs	↑	→ ↓	↓ ↑	ND
性ホルモン作用のない EDCs	→	→	→	→
抗男性ホルモン作用 のあるEDCs	→	→	ND	→ ↓
EDCsではない化学物質	→	→	→	→

図 1 3 バイオマーカー遺伝子の発現変化のまとめ

[実験その 2： 内分泌かく乱物質のスクリーニングに用いるメダカの作出]

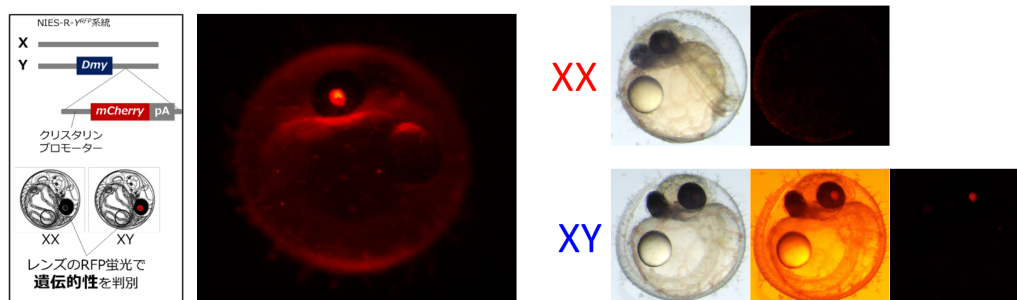
より簡便かつ安価にバイオマーカー遺伝子発現変動を解析できるようにするため、バイオマーカー遺伝子と緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を組み込んで、男性ホルモン作用を検出するとXX個体の生殖線の緑色の蛍光が弱まる、女性ホルモン作用を検出するとXY個体の生殖線が緑色に光る「化学物質のスクリーニングに用いるメダカ」を作出した（図 1 4）。

・Y^{RFP}系統：遺伝的性判別をレンズのRFP蛍光（目が赤く光るとXY個体、光らないとXX個体）の有無で判別できる遺伝子組換えメダカを作出し、Gsdf遺伝子の発現については従来法であるリアルタイムPCR法を用いて測定する系統とした。Y^{RFP}系統はDNA抽出・PCRを行うことなくレンズのRFP蛍光の有無で遺伝的性別を判別できる。さらに、受精卵の段階で遺伝的性別を判別できる。そのため、本系統は「化学物質のスクリーニング」だけでなく、現行のOECD TGにも適応することでより簡便かつ動物福祉にも配慮した試験を実施できることが期待される。

Cyp19a1a-GFP系統：遺伝的性判別をレンズのRFP蛍光（目が赤く光るとXY個体、光らないとXX個体）の有無で、Cyp19a1a遺伝子の発現の有無はGFP蛍光（生殖腺が緑色に光る）の有無で判別できる遺伝子組換えメダカの系統を作出した。Cyp19a1a-GFP系統は、男性ホルモン作用を検出するとXX個体の生殖線の緑色の蛍光が弱まり、女性ホルモン作用を検出するとXY個体の生殖線が緑色に光る。

長浜バイオ大学 竹花 祐介 准教授との共同研究

- **Y^{RFP}系統**（遺伝子型の性を赤色蛍光タンパク質(RFP)の有無によって判別できる）



- **Cyp19a1a-GFP系統**（Cyp19a1aの発現を緑色蛍光タンパク質によって検出できる）

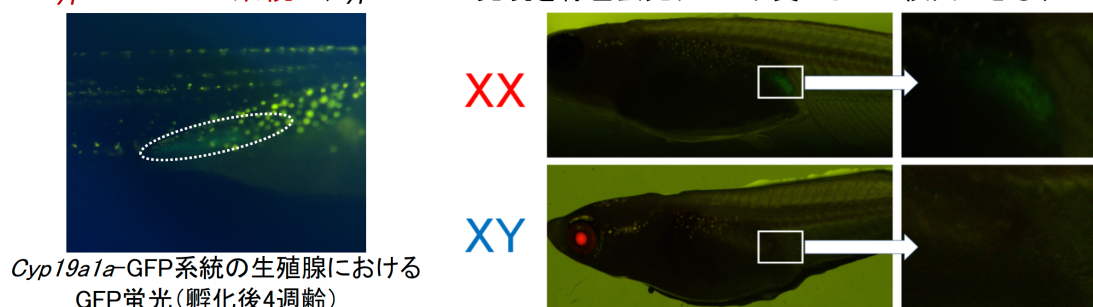
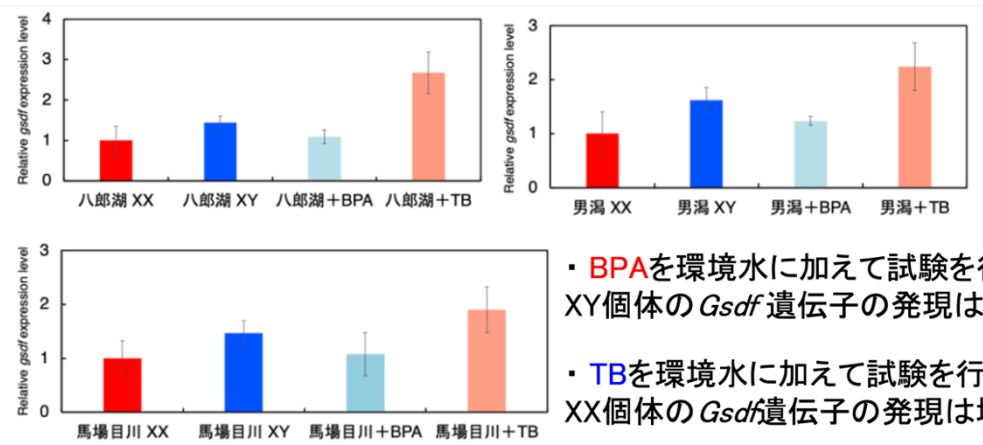


図 1 4 化学物質のスクリーニングに用いるメダカの作出

[実験その 3：実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法の開発]

実験その 2 で作出したメダカ（Y^{RFP}系統と Cyp19a1a-GFP 系統）が、実際の環境水中に含まれる内分泌かく乱作用を示す物質のスクリーニングに活用できるか検討した。環境水は、秋田県の馬場目川、八郎湖、男潟の 3 地点の水を用いた。また、環境水にビスフェノール A（女性ホルモン作用）またはトレンボロン（男性ホルモン作用）を加えた模擬環境水を準備することで、作出したメダカが内分泌かく乱作用を検出できるか確認した。その結果、2 系統とも環境水中に女性 or 男性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、反応を検出できた（図 1 5）。

YRFP系統



Cyp19a1a-GFP系統

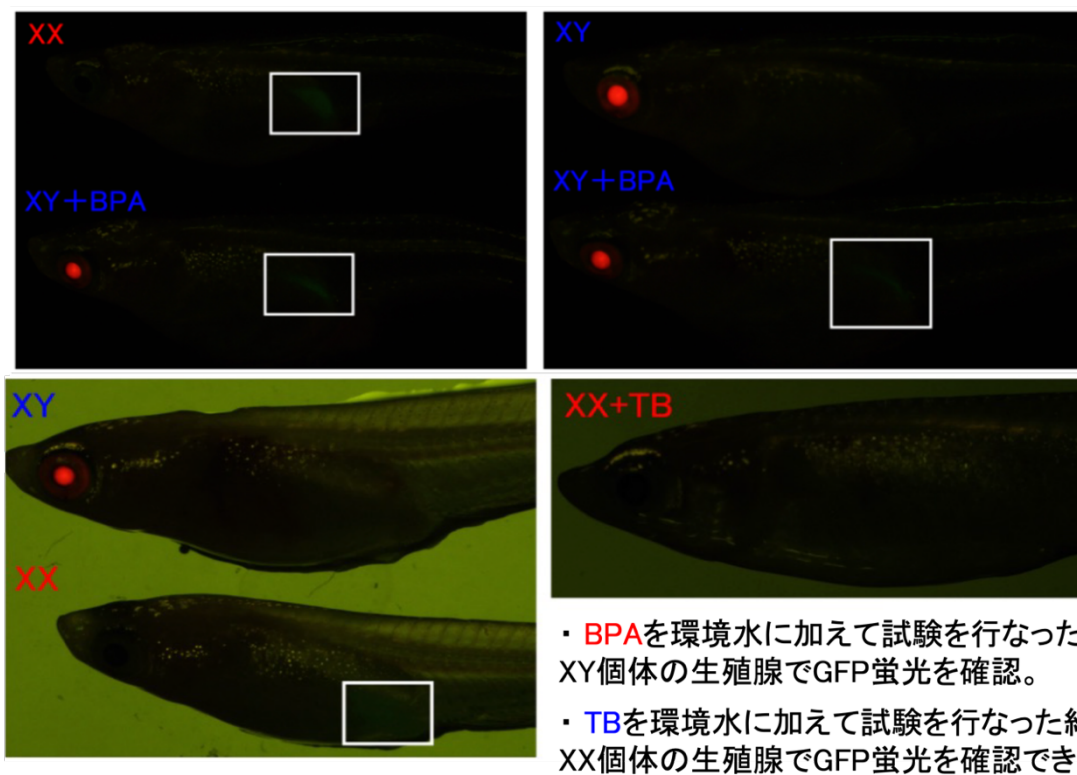


図 1 5 内分泌かく乱作用を示す化学物質を検出

以上の結果から、本研究では、内分泌かく乱作用のある化学物質が魚類のモデル生物メダカの性分化に与える生態影響の遺伝子メカニズムを明らかにした。さらには、特定の遺伝子を指標とすることで、実環境に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法を開発できた。

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

3 件

<主な査読付き論文>

- 1) Horie, Y., Kanazawa, N., Takahashi, C., Tatarazako, N., Iguchi, T: Environmental Toxicology and Chemistry, in press, (2022) (IF: 3.742) Gonadal soma-derived factor expression is a potential biomarker for predicting the effects of endocrine-disrupting chemicals on gonadal differentiation in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)
- 2) Horie, Y., Kanazawa, N., Takahashi, C., Tatarazako, N., Iguchi, T: Journal of Applied Toxicology, Vol.41, No.3, pp. 399-409 (2021) (IF: 3.446) Exposure to 4-nonylphenol induces a shift in the gene expression of gsdf and testis-ova formation and sex reversal in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)
- 3) Horie, Y., Kanazawa, N., Takahashi, C., Tatarazako, N., Iguchi, T: Journal of Applied Toxicology, Vol.40, No.6, pp. 804-814 (2020) (IF: 3.446) Bisphenol A induces a shift in sex differentiation gene expression with testis-ova or sex reversal in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)

6－2．知的財産権

特に記載すべき事項はない。

6－3．その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	3 件
その他誌上発表（査読なし）	0 件
口頭発表（学会等）	1 件
「国民との科学・技術対話」の実施	0 件
マスコミ等への公表・報道等	0 件
本研究に関連する受賞	0 件

7．国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8．研究者略歴

研究代表者

堀江 好文

東京農業大学生物産業学部卒業、博士（環境科学）、現在、神戸大学 助教

Ⅱ．成果の詳細

Ⅱ－１ 化学物質の内分泌かく乱作用を予測・検出する新たなスクリーニング法の開発

国立大学法人神戸大学

内海域環境教育研究センター

堀江 好文

<研究協力者>

公立大学法人秋田県立大学

システム科学技術学部

金澤 伸浩

学校法人関西文理総合学園

長浜バイオ大学

竹花 祐介

[要旨]

本研究では、内分泌かく乱作用のある化学物質が魚類のモデル生物メダカの性分化に与える生態影響の遺伝子メカニズムを明らかにし、さらには、特定の遺伝子を指標とすることで、実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法を開発することを目指した。まず始めに、精巣分化を誘導する*Gsdf*遺伝子や卵巣分化を誘導する*Cyp19a1a*遺伝子が、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであるかを検討した結果、女性ホルモン作用を示す化学物質をばく露した場合、XY個体の*Gsdf*遺伝子の発現は低下し、*Cyp19a1a*遺伝子の発現は増加した。一方で、男性ホルモン作用を示す化学物質をばく露した場合、XX個体の*Gsdf*遺伝子の発現は誘導され、*Cyp19a1a*遺伝子の発現は低下した。以上の結果から、*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子は魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであることが示唆された。次に、より簡便かつ安価にバイオマーカー遺伝子の発現変動を解析できるようにするため、Y^{RFP}系統と*Cyp19a1a*-GFP系統の2系統の遺伝子組換えメダカを作製した。Y^{RFP}系統は遺伝子型の性（XX/XY）を赤色蛍光タンパク質（RFP）の有無によって判別できる。*Cyp19a1a*-GFP系統は卵巣型アロマトラーゼ（*Cyp19a1a*）の発現を緑色蛍光タンパク質（GFP）によって検出できる。最後に、作出した2系統の遺伝子組換えメダカを用いて実際の環境水中に含まれる内分泌かく乱作用を示す物質のスクリーニングに活用できるか検討した。その結果、2系統とも環境水中に女性 or 男性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、反応を検出できた。

以上の結果から、本研究では、内分泌かく乱作用のある化学物質が魚類のモデル生物メダカの性分化に与える生態影響の遺伝子メカニズムを明らかにした。さらには、特定の遺伝子を指標とすることで、実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法を開発できた。

1．研究開発目的

本研究計画では、バイオマーカー遺伝子を指標とすることで、化学物質が魚類の性分化に与える内分泌かく乱作用を検出できる新たな生態毒性試験法を開発することを目的とする。さらに、開発した試験法を応用することで、実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す物質のスクリーニング手法を開発する（図1）。

本研究では、以下の実験を行うことにより、上記の目標を達成する。

[実験その1]

精巣分化を誘導する*Gsdf*遺伝子や卵巣分化を誘導する*Cyp19a1a*遺伝子が、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであるかを明らかにする。

[実験その2]

より簡便かつ安価にバイオマーカー遺伝子の発現変動を解析できるようにするため、バイオマーカー遺

伝子と緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を組み込んで、男性ホルモン作用を検出するとXX個体の生殖線の緑色の蛍光が弱まり、女性ホルモン作用を検出するとXY個体の生殖線が緑色に光る「化学物質のスクリーニングに用いるメダカ」を作出する。

[実験その3]

作出したメダカが、実際の環境水中に含まれる内分泌攪乱作用を示す物質のスクリーニングに活用できるか検討する。

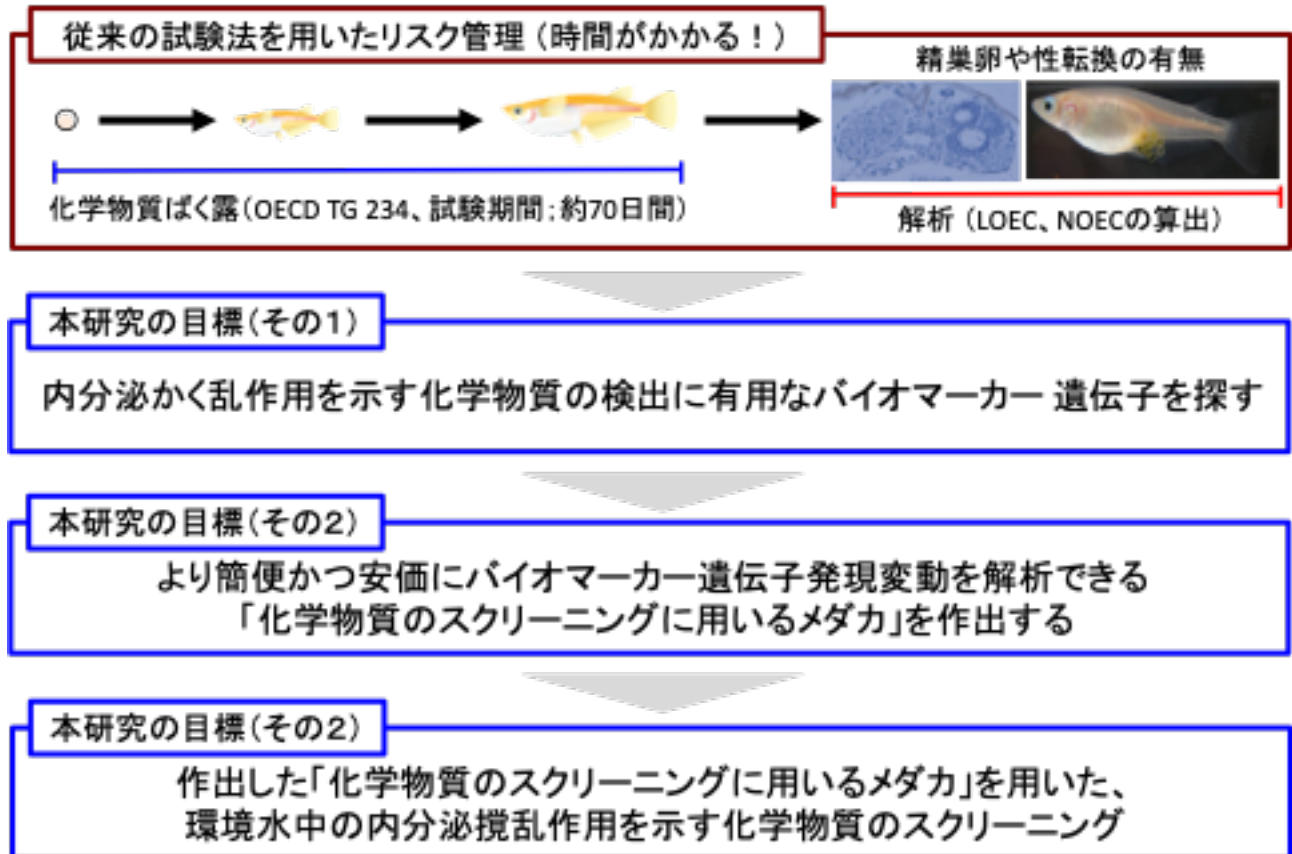


図1 研究開発目的

2. 研究目標

本研究では、内分泌かく乱作用のある化学物質が魚類のモデル生物メダカの性分化に与える生態影響の遺伝子メカニズムを明らかにし、さらには、特定の遺伝子を指標とすることで、実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法を開発する。

本研究では、以下の実験を行うことにより、上記の目標を達成する。

1) 精巣分化を誘導する*Gsdf*遺伝子が、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであるかを明らかにする。

- ・ 女性ホルモン作用を示すビスフェノールA・ノニルフェノール、男性ホルモン作用を示すトレンボロンをメダカにばく露（魚類性発達試験；OECD TG No. 234）し、ばく露されたメダカの生殖腺の組織学的観察を行い、精巣卵や卵精巣、性転換の発生の有無を明らかにする。

- ・ 上記の化学物質をメダカ胚にばく露し、各化学物質が*Gsdf*遺伝子の発現パターンに与える影響を明らかにする。

2) より簡便かつ安価に*Gsdf*遺伝子の発現変動を解析できるようにするため、*Gsdf*遺伝子と緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を組み込んで、男性ホルモン作用を検出すると生殖線が緑色に光り、女性ホルモン作用を検出すると生殖線の緑色の光が弱まる「化学物質のスクリーニングに用いるメダカ」を作出する。

3) 作出したメダカが、実際の環境水中に含まれる内分泌攪乱作用を示す物質のスクリーニングに活

用できるか検討する。

3. 研究開発内容

本研究では、内分泌かく乱作用のある化学物質が魚類のモデル生物メダカの性分化に与える生態影響の遺伝子メカニズムを明らかにし、さらには、特定の遺伝子を指標とすることで、実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法を開発した。

本研究では、以下の実験を行うことにより、上記の目標を達成した。

[実験その1：魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカー遺伝子の特定]

女性ホルモン作用を示すビスフェノールA（対照区，32，100，320，1000，3200 $\mu\text{g/L}$ ）、ノニルフェノール（対照区，1，3.2，10，32，100 $\mu\text{g/L}$ ）、男性ホルモン作用を示すトレンボロン（対照区，3.2，10，32，100，320 ng/L ）を用いて魚類性発達試験（OECD TG No. 234を参考）を行い、各化学物質のメダカ（*Oryzias latipes*; NIES-R系統）に対する生態影響の最小影響濃度と無影響濃度を算出した。ばく露方法は、流水式魚類試験装置（SIS-24F、柴田科学株式会社製）を使用した（図2）。

次に、*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子を指標とした新たな試験法を行い、各化学物質が*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子の発現パターンに与える影響の最小影響濃度と無影響濃度を算出した。ばく露方法は、半止水式で行った（図3）。*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子の発現解析は、リアルタイム定量PCR装置（LightCycler® 96 システム、日本ジェネティクス株式会社）を使用した（図4）。*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子の発現を調べる際に使用したプライマー情報とPCR条件は表1と2の通りである。さらに、環境省の「環境ホルモン戦略計画SPEED'98」で実施されたmedaka Partial Life Cycle Test（OECD TG 234試験に相当）の既存データを基に、ばく露物質数を増やすことで*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子の有用性を確認した。精巣卵が有意に形成されたと報告された17beta-Estradiol、Ethynylestradiol、*p,p'*-DDE、4-*t*-Octylphenol、有意な影響が認められなかったTributyltin chloride、Triphenyltin chloride、Amitrole、Endrin、抗男性ホルモン作用を持つFenitrothion、Flutamideの合計10物質を用いた。



図2流水式魚類試験装

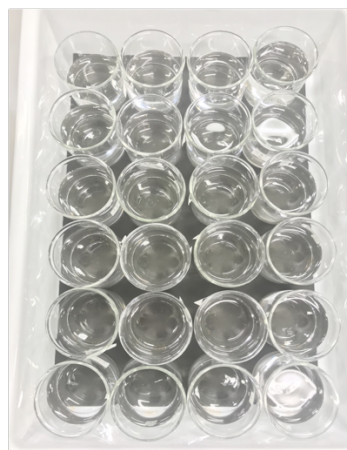


図3半止水式実験



図4リアルタイム定量PCR装置

表1 Primer sequences of the genes used for real-time quantitative PCR analysis

Gene name	Primer sequence (5'→3')	Reference
<i>cyp19a1a</i>	Forward: AGCTTATTTTGGCCCAAGGCC	Zhou et al. (2016)
	Reverse: TTGAGCAGCAGGAGCATGAAA	

Forward: GGCTGGGACAATTGGGTGATC

gsdf

Horie et al. (2016)

Reverse: TTTCATCCATGAAGACGATGG

Forward: AGTACGCCTGGGTGTTGGAC

ef-1

Horie et al. (2016)

Reverse: AAACGGGCCTGGCTGTAAG

表2 Real-time quantitative PCR profiles

Conditions	<i>cyp19a1a</i>	<i>gsdf</i>	<i>ef-1</i>
Pre-incubation	95 °C for 180 s	95 °C for 180 s	95 °C for 180 s
Amplification	40 cycles at 95 °C for 10 s, 48 °C for 20 s, 72 °C for 1 s	40 cycles at 95 °C for 10 s, 49 °C for 20 s, 72 °C for 1 s	40 cycle at 95 °C for 10 s, 50 °C for 20 s, 72 °C for 1 s
Melting curve	95 °C for 5 s, 65 °C for 60 s, 97 °C for 1 s	95 °C for 5 s, 65 °C for 60 s, 97 °C for 1 s	95 °C for 5 s, 65 °C for 60 s, 97 °C for 1 s
Cooling	40 °C for 10 s	40 °C for 10 s	40 °C for 10 s

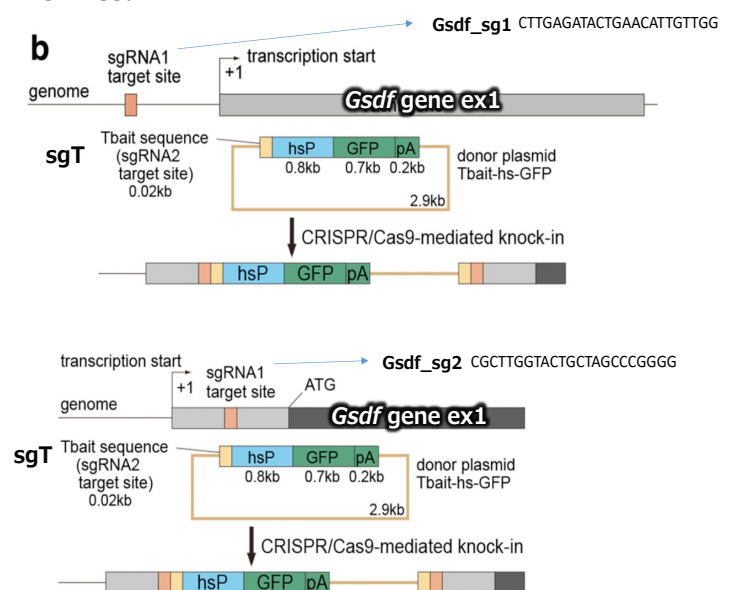
[実験その2： 内分泌かく乱物質のスクリーニングに用いるメダカの作出]

より簡便かつ安価にバイオマーカー遺伝子発現変動を解析できるようにするため、バイオマーカー遺伝子と緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を組み込んで、男性ホルモン作用を検出すると生殖線が緑色に光るor弱まる、女性ホルモン作用を検出すると生殖線が緑色に光るor弱まる「化学物質のスクリーニングに用いるメダカ」を作出した。

・まず始めに*Gsdf*の発現を緑色蛍光タンパク質（GFP）によって検出できる*Gsdf*-GFP系統の作出を試みた（図5）。まず、CRISPR/Cas9を用いた相同組み換え非依存的なノックイン法を検討した。*Gsdf*の上流配列を標的とするsgRNA1と、ドナープラスミドを標的とするsgRNA2、熱ショックプロモーター付きのGFPドナープラスミドDNA、Cas9 mRNAを受精卵に注入した。

*Gsdf*上流を標的としたsgRNA1については、5'UTRより前と、5'UTR内の2箇所に設計し、それぞれについて実験を行った。いずれも100個体以上に注入し、半数以上の個体でノックインされていることがPCRにて確認されたが、生殖腺でのGFP発現はほとんど認められなかった。わずかにGFP発現が見られた3個体についても、G1世代でGFP発現を示す個体は得られなかった。

NIES-R-*Gsdf*^{tm(hsp-GFP)}

図5 *Gsdf*-GFP系統の作出

そこで、アドバイザーおよびP0と相談し、実験計画を当初の計画（*Gsdf*-GFP系統）から下記の2系統（Y^{RFP}系統と*Cyp19a1a*-GFP系統）の遺伝子組換えメダカを作製するのに変更した。

Y^{RFP}系統：遺伝子型の性（XX/XY）を赤色蛍光タンパク質（RFP）の有無によって判別できるY^{RFP}系統を作出した。本研究では、CRISPR/Cas9を用いた相同組み換え非依存的なノックイン法（Watakabe et al. 2018 *Zool. Lett.*）により、メダカのY染色体特異的遺伝子（*Dmrt3p*）に*crystallin-mCherry*カセットを挿入した（図6）。ノックインメダカを作製する際には、*Dmrt3p*を標的とするsgRNA1と、ドナープラスミドを標的とするsgRNA2、*crystallin-mCherry*ドナープラスミドDNA、Cas9 mRNAを受精卵に注入した。

NIES-R-*Dmrt3p*Ytm(*cry*-RFP)

Y chr sequence:
Medaka-Hd-rR-PacBio_version2.2.4
Unanchored contig: 000829F

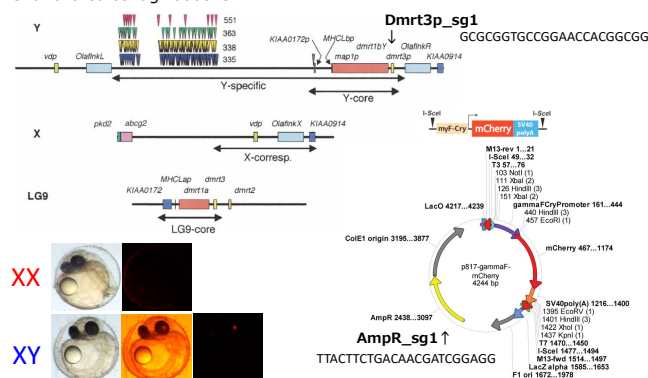


図6 Y^{RFP}系統の作出

Cyp19a1a-GFP系統：卵巣型アロマターゼ（*Cyp19a1a*）の発現を緑色蛍光タンパク質（GFP）によって検出できる遺伝子導入（*Cyp19a1a*-GFP）系統を作出した。本研究では、fosmidゲノムクローンを用いた遺伝子導入法（Nakamura et al. 2008 *Dev. Growth. Differ.*）によって作出した。まず、*Cyp19a1a*を含むfosmidゲノムクローン（GOLWFno469_a24）の翻訳開始点に、大腸菌を用いた相同組換えの系（Lee et al. 2001 *Genomics*）を用いてGFPカセットとTo12トランスポゾンの認識配列を挿入した。これにより、XX生殖腺が緑色に光るメダカを作出した。

[実験その3：実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法の開発]

実験その2で作出したメダカ（Y^{RFP}系統とAromatase-GFP系統）が、実際の環境水中に含まれる内分泌かく乱作用を示す物質のスクリーニングに活用できるか検討した（図6）。環境水は、秋田県の馬場目川、八郎湖、男潟の3地点の水を用いた。また、環境水中には内分泌かく乱化学物質が含まれていない可能性が高いため、ビスフェノールA（女性ホルモン作用）またはトレンボロン（男性ホルモン作用）を環境水に加えた模擬環境水を準備することで、作出したメダカが内分泌かく乱作用を検出できるか確認した。濃度は実験その1で得られた最小影響濃度に設定した（ビスフェノールAは1000 μ g/L、トレンボロンは2 μ g/L）。

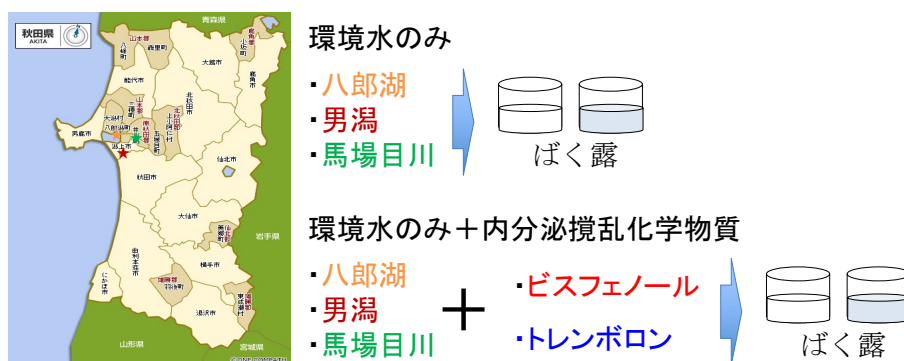


図7 スクリーニングに用いた環境水と模擬環境水

4. 結果及び考察

[実験その1： 魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカー遺伝子の特定]

女性ホルモン作用のある化学物質（ビスフェノールA、ノニルフェノール、17beta-Estradiol、Ethinylestradiol、*p,p'*-DDE、4-*t*-Octylphenol、）、男性ホルモン作用のある化学物質（トレンボロン、メチルテストステロン）、性ホルモン作用のない内分泌攪乱化学物質（Tributyltin chloride、Triphenyltin chloride）、抗男性ホルモン作用のある化学物質（Fenitrothion、Flutamide）、一般化学物質（Amitrole、Endrin）を用いて精巣分化を誘導する*Gsdf*遺伝子と卵巣分化を誘導する*Cyp19a1a*遺伝子が、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであるかを検討した（図8）。その結果、女性ホルモン作用のある化学物質をばく露した場合、XY個体の*Gsdf*遺伝子の発現が抑制される一方で、男性ホルモン作用のある化学物質をばく露した場合、XX個体の*Gsdf*遺伝子の発現が誘導された。性ホルモン作用のない内分泌攪乱化学物質や抗男性ホルモン作用のある化学物質、一般化学物質では*Gsdf*遺伝子の発現は変化しなかった。*Cyp19a1a*遺伝子の場合、女性ホルモン作用のある化学物質をばく露した場合、XX、XY個体の*Cyp19a1a*遺伝子の発現が増加される一方で、男性ホルモン作用のある化学物質をばく露した場合、XX個体の*Cyp19a1a*遺伝子の発現は、抑制される物質と増加する物質が認められた。男性ホルモン作用を示す化学物質には、男性ホルモンが芳香化されて女性ホルモンとして作用する場合がある。そのため、*Cyp19a1a*遺伝子の発現が増加されたのは芳香化されて女性ホルモンとして作用した可能性が考えられる。以上の結果をまとめると、*Gsdf*遺伝子と*Cyp19a1a*遺伝子は魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであることが示唆された。

	Gsdf遺伝子の発現変化		Cyp19a1a遺伝子の発現変化	
	XX	XY	XX	XY
女性ホルモン作用 のあるEDCs	➡	⬇	⬆	⬆
男性ホルモン作用 のあるEDCs	⬆	➡⬇	⬇⬆	ND
性ホルモン作用のない EDCs	➡	➡	➡	➡
抗男性ホルモン作用 のあるEDCs	➡	➡	ND	➡⬇
EDCsではない化学物質	➡	➡	➡	➡

図8 バイオマーカー遺伝子の発現変化のまとめ

[実験その2： 内分泌かく乱物質のスクリーニングに用いるメダカの作出]

Y^{RFP} 系統の作出：注入胚（G0）では、約10%の個体でレンズにおけるRFP蛍光が確認された。これらのG0胚を選択して育てたところ、25%以上という高い効率で次世代（G1）にノックインXY個体を得ることができた。さらに、G2世代のXY個体でのみRFP蛍光が観察されるG1ペアを選抜して系統化した。これにより、レンズにおけるRFP蛍光があるものをXY個体、ないものをXX個体と簡便に判別できる系統が作出できた（図9）。

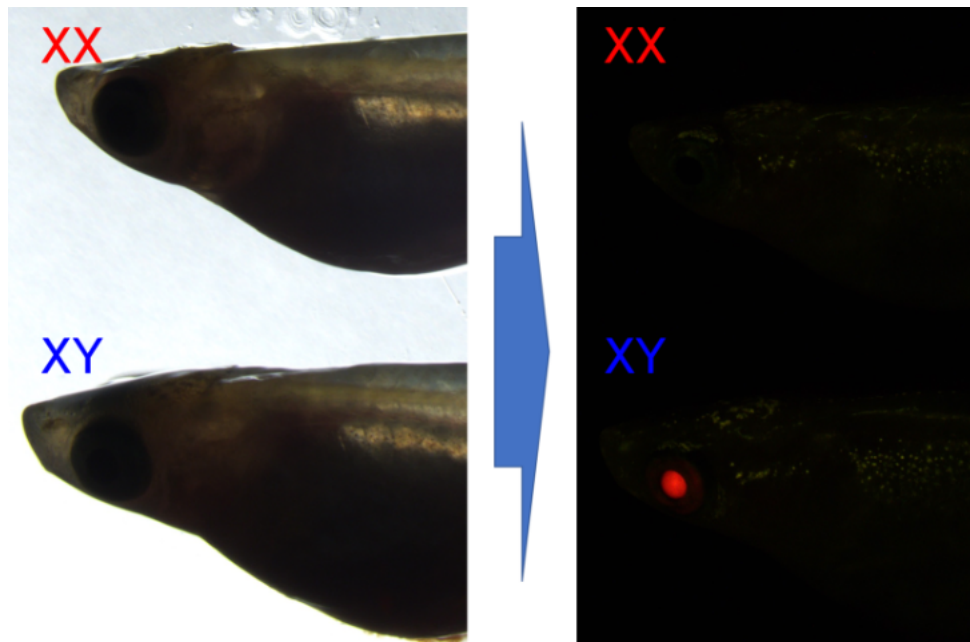


図9 遺伝子型の性 (XX/XY) を赤色蛍光タンパク質 (RFP) の有無によって判別できる Y^{RFP} 系統

Cyp19a1a-GFP系統: *Cyp19a1a*を含むfosmidゲノムクローン (GOLWFno469_a24) の翻訳開始点に、大腸菌を用いた相同組換えの系 (Lee et al. 2001 *Genomics*) を用いてGFPカセットとTo12トランスポゾンの認識配列を挿入した。次に、このfosmidクローンDNAとTo12 mRNAを受精卵に注入し、注入個体を成魚まで飼育して次世代 (G1) を得た。G1個体でGFP遺伝子をもつ個体をPCRによって選抜し、異なるG1個体から2つの*Cyp19a1a*-GFP系統 (系統1および系統2) を作出した。この系統では、孵化後3~4週齢以降の卵巣 (莢膜細胞) において実体顕微鏡下でGFP蛍光が観察可能である (図10)。遺伝的性別はレンズにおけるRFP蛍光があるものをXY個体、ないものをXX個体である。

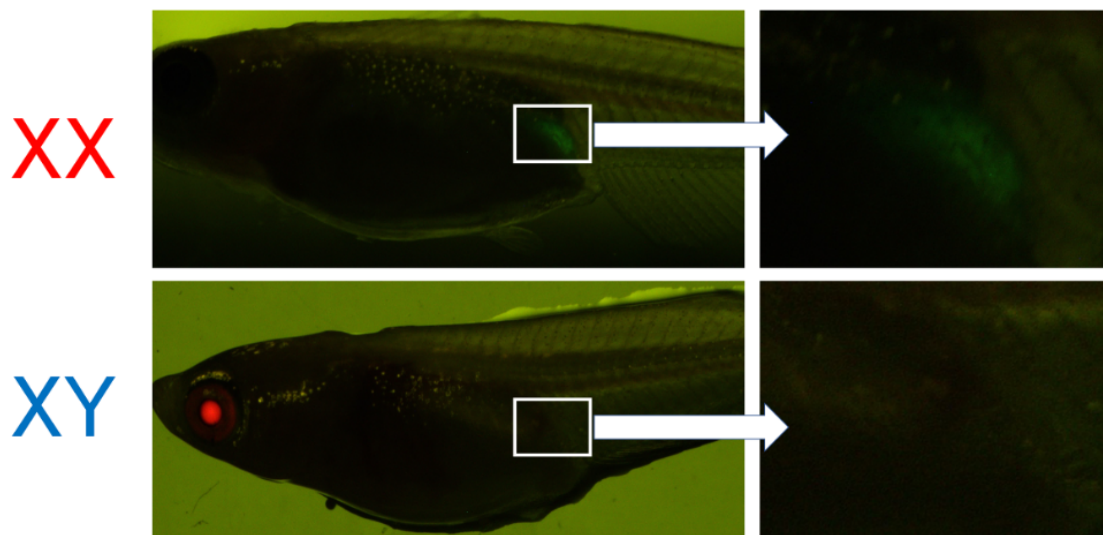


図10 XX生殖腺が緑色に光るメダカ*Cyp19a1a*-GFP系統

[実験その3: 実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法の開発]

Y^{RFP} 系統を用いたスクリーニングの結果を図11に示す。始めに、八郎湖、男潟、馬場目川の環境水を用いて、*Gsdf*遺伝子の発現を調べた結果、発現に変化は認められなかった。このことから、八郎湖、男潟、馬場目川の環境水には魚類の性分化に影響を与える濃度で内分泌かく乱作用を示す化学物質は含ま

れていないことが分かった。次に、ビスフェノールAを環境水に加えて試験を行った結果、XY個体の *Gsdf* 遺伝子の発現が低下した。このことから、 Y^{RFP} 系統は環境水中に女性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、検出できることが分かった。最後に、トレンボロンを環境水に加えて試験を行った結果、XX個体の *Gsdf* 遺伝子の発現は増加した。このことから、 Y^{RFP} 系統は環境水中に男性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、検出できることが分かった。

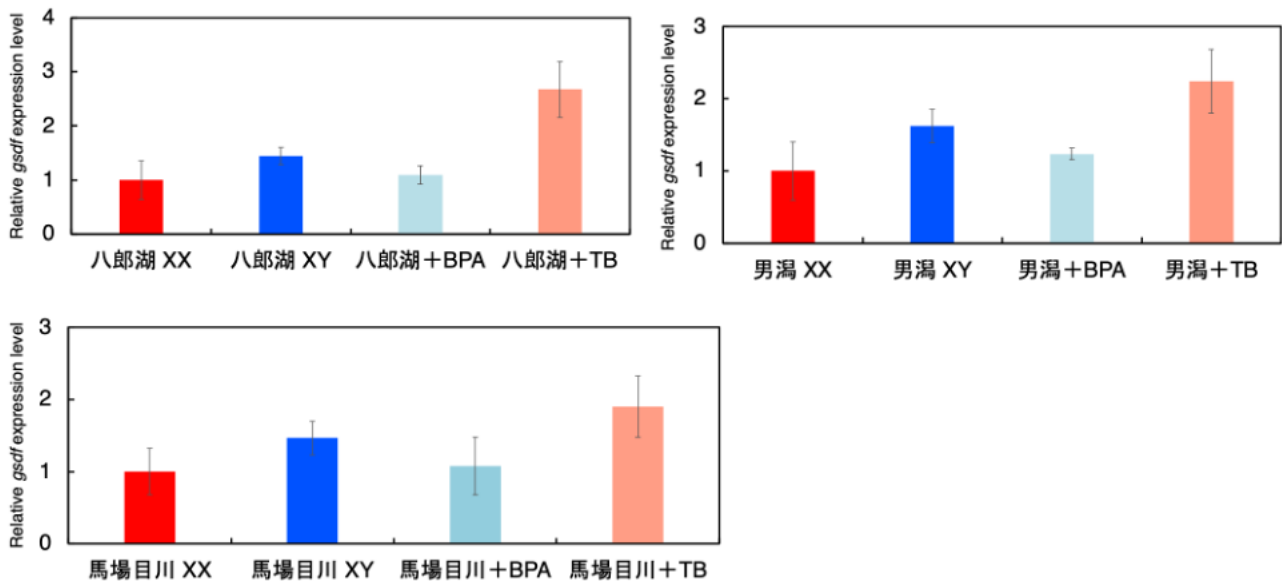


図 1 1 Y^{RFP} 系統を用いた環境水および模擬環境水のスクリーニング

Columns and error bars represent means $\pm$ SEM ($n = 4$ per group).

Cyp19a1a-GFP 系統を用いたスクリーニングの結果を図 1 2、1 3 に示す。八郎湖、男潟、馬場目川の環境水を用いた結果、GFP 蛍光に変化は認められなかった。このことから、八郎湖、男潟、馬場目川の環境水には魚類の性分化に影響を与える濃度で内分泌かく乱作用を示す化学物質は含まれていないことが分かった。次に、ビスフェノールAを環境水（八郎湖水のみ）に加えて試験を行なった結果、23個体中9個体でXY個体の生殖腺でGFP蛍光を確認できた。このことから、*Cyp19a1a*-GFP 系統は環境水中に女性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、検出できることが分かった。最後に、トレンボロンを環境水（八郎湖水のみ）に加えて試験を行なった結果、21個体中全てのXX個体の生殖腺でGFP蛍光を確認できなかった。このことから、*Cyp19a1a*-GFP 系統は環境水中に男性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、検出できることが分かった。

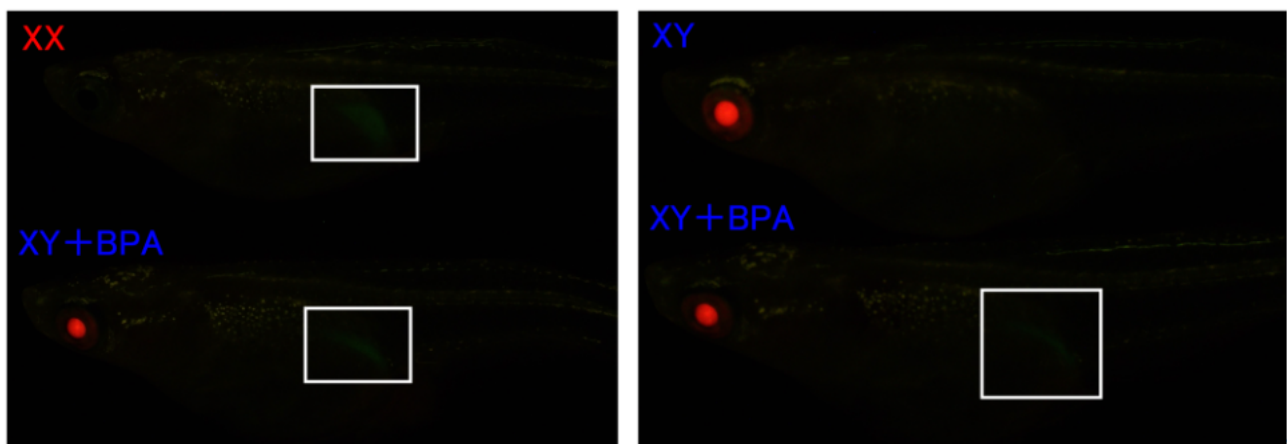


図 1 2 *Cyp19a1a*-GFP 系統を用いた環境水および模擬環境水のスクリーニング

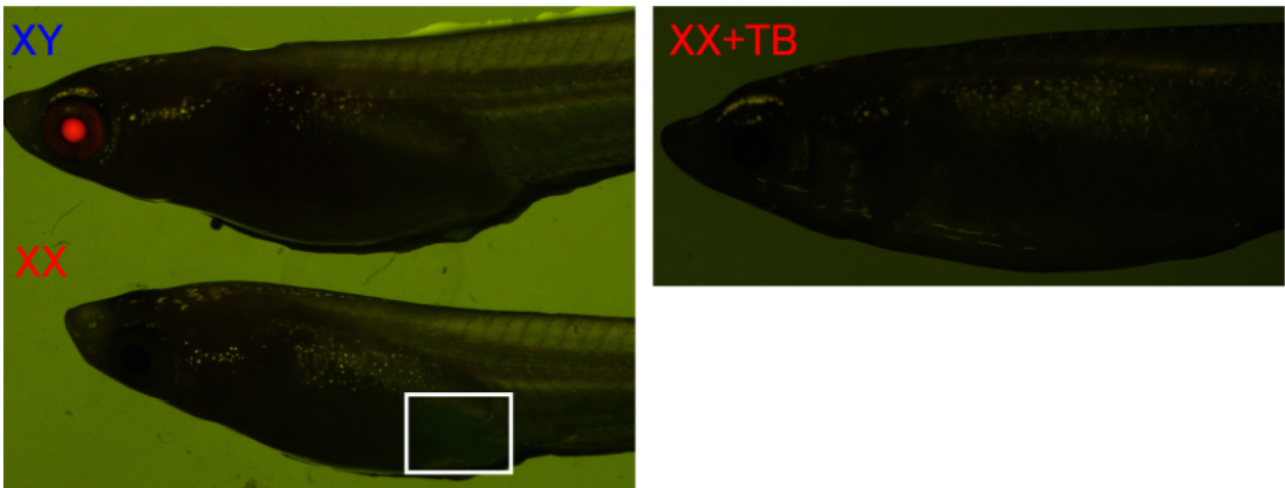


図 1 3 *Cyp19a1a* -GFP系統を用いた環境水および模擬環境水のスクリーニング

以上の結果から、本研究では、内分泌かく乱作用のある化学物質が魚類のモデル生物メダカの性分化に与える生態影響の遺伝子メカニズムを明らかにした。さらには、特定の遺伝子を指標とすることで、実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法を開発できた。

5. 研究目標の達成状況

[実験その 1： 魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカー遺伝子の特定]

精巣分化を誘導する *Gsdf* 遺伝子や *Cyp19a1a* 遺伝子が、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであることを明らかにした（図 1 4）。

- ・ 女性ホルモン作用を示すビスフェノール A ・ ノニルフェノール、男性ホルモン作用を示すトレンボロンをメダカにばく露（魚類性発達試験； OECD TG No. 234）し、ばく露されたメダカの生殖腺の組織学的観察を行い、精巣卵や卵精巣、性転換の発生の有無を明らかにした。

- ・ 上記の化学物質をばく露し、各化学物質が *Gsdf* 遺伝子と *Cyp19a1a* 遺伝子の発現パターンに与える影響を明らかにした。

- ・ 環境省の「環境ホルモン戦略計画 SPEED' 98」で実施された medaka Partial Life Cycle Test（OECD TG 234 試験に相当）の既存データを基に、ばく露物質数（17beta-Estradiol、Ethinylestradiol、*p,p'*-DDE、4-*t*-Octylphenol、Tributyltin chloride、Triphenyltin chloride、Amitrole、Endrin、Fenitrothion、Flutamide）を増やすことで *Gsdf* 遺伝子と *Cyp19a1a* 遺伝子の有用性を最終確認した。

- ・ 精巣卵や性転換が誘導される濃度と *Gsdf* 遺伝子と *Cyp19a1a* 遺伝子の発現パターンに与える影響濃度は似た傾向にあった。これらの結果から、*Gsdf* 遺伝子と *Cyp19a1a* 遺伝子は、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであることが示唆された。

	Gsdg遺伝子の発現変化		Cyp19a1a遺伝子の発現変化	
	XX	XY	XX	XY
女性ホルモン作用 のあるEDCs	→	↓	↑	↑
男性ホルモン作用 のあるEDCs	↑	→ ↓	↓ ↑	ND
性ホルモン作用のない EDCs	→	→	→	→
抗男性ホルモン作用 のあるEDCs	→	→	ND	→ ↓
EDCsではない化学物質	→	→	→	→

図 1 4 バイオマーカー遺伝子の発現変化のまとめ

[実験その 2： 内分泌かく乱物質のスクリーニングに用いるメダカの作出]

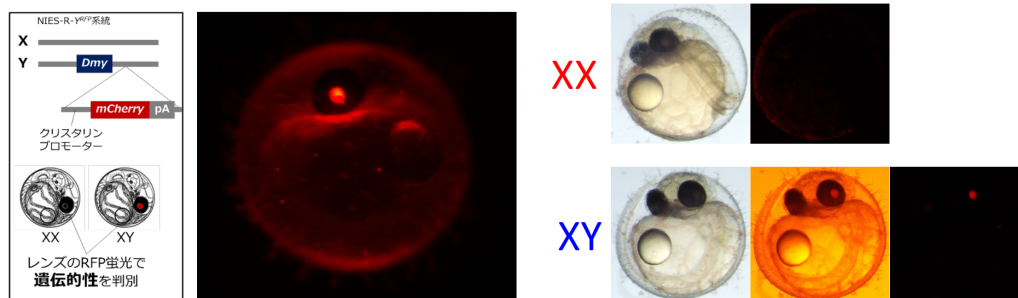
より簡便かつ安価にバイオマーカー遺伝子発現変動を解析できるようにするため、バイオマーカー遺伝子と緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を組み込んで、男性ホルモン作用を検出するとXX個体の生殖線の緑色の蛍光が弱まる、女性ホルモン作用を検出するとXY個体の生殖線が緑色に光る「化学物質のスクリーニングに用いるメダカ」を作出した（図 1 5）。

・Y^{RFP}系統：遺伝的性判別をレンズのRFP蛍光（目が赤く光るとXY個体、光らないとXX個体）の有無で判別できる遺伝子組換えメダカを作出し、Gsdg遺伝子の発現については従来法であるリアルタイムPCR法を用いて測定する系統とした。Y^{RFP}系統はDNA抽出・PCRを行うことなくレンズのRFP蛍光の有無で遺伝的性別を判別できる。さらに、受精卵の段階で遺伝的性別を判別できる。そのため、本系統は「化学物質のスクリーニング」だけでなく、現行のOECD TGにも適応することでより簡便かつ動物福祉にも配慮した試験を実施できることが期待される。

Cyp19a1a-GFP系統：遺伝的性判別をレンズのRFP蛍光（目が赤く光るとXY個体、光らないとXX個体）の有無で、Cyp19a1a遺伝子の発現の有無はGFP蛍光（生殖腺が緑色に光る）の有無で判別できる遺伝子組換えメダカの系統を作出した。Cyp19a1a-GFP系統は、男性ホルモン作用を検出するとXX個体の生殖線の緑色の蛍光が弱まり、女性ホルモン作用を検出するとXY個体の生殖線が緑色に光る。

長浜バイオ大学 竹花 祐介 准教授との共同研究

- **Y^{RFP}系統**（遺伝子型の性を赤色蛍光タンパク質(RFP)の有無によって判別できる）



- **Cyp19a1a-GFP系統**（Cyp19a1aの発現を緑色蛍光タンパク質によって検出できる）

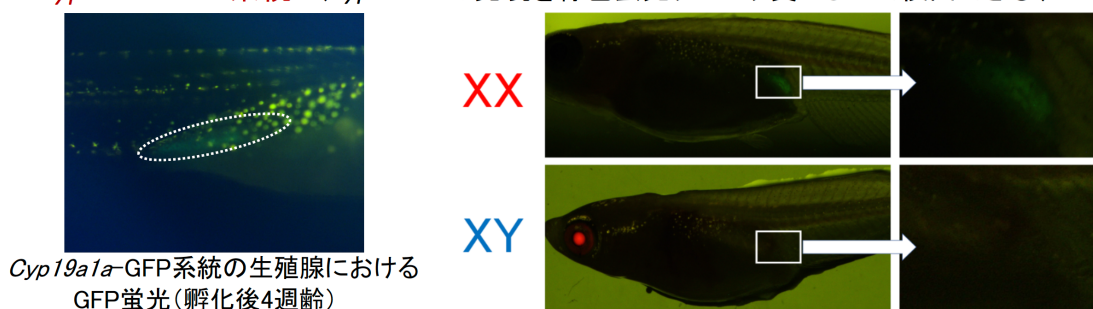
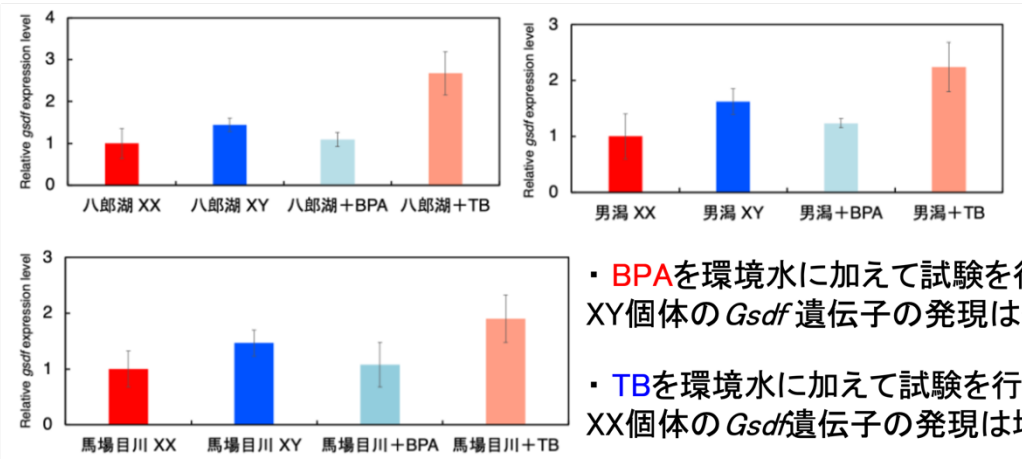


図 1 5 化学物質のスクリーニングに用いるメダカの作出

[実験その 3：実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法の開発]

実験その 2 で作出したメダカ（Y^{RFP}系統と Cyp19a1a-GFP 系統）が、実際の環境水中に含まれる内分泌かく乱作用を示す物質のスクリーニングに活用できるか検討した。環境水は、秋田県の馬場目川、八郎湖、男潟の 3 地点の水を用いた。また、環境水にビスフェノール A（女性ホルモン作用）またはトレンボロン（男性ホルモン作用）を加えた模擬環境水を準備することで、作出したメダカが内分泌かく乱作用を検出できるか確認した。その結果、2 系統とも環境水中に女性 or 男性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、反応を検出できた（図 1 6）。

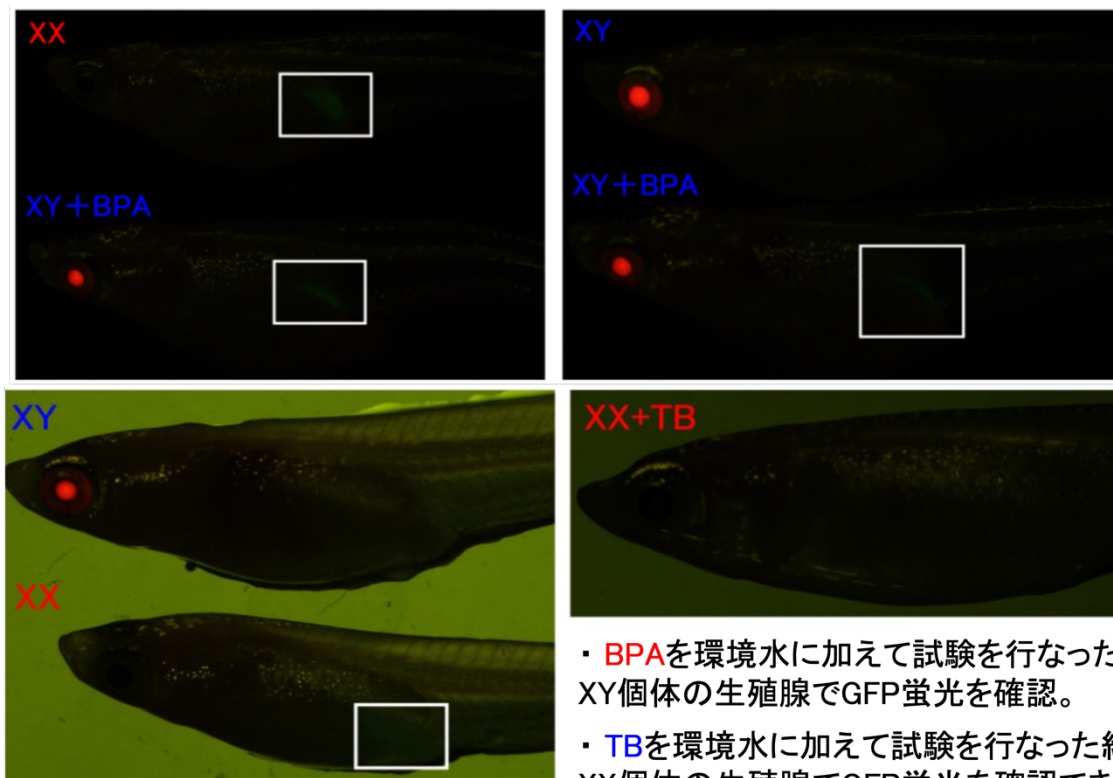
YRFP 系統



・ BPAを環境水に加えて試験を行なった結果、XY個体の *Gsdf* 遺伝子の発現は低下。

・ TBを環境水に加えて試験を行なった結果、XX個体の *Gsdf* 遺伝子の発現は増加。

Cyp19a1a-GFP 系統



・ BPAを環境水に加えて試験を行なった結果、XY個体の生殖腺でGFP蛍光を確認。

・ TBを環境水に加えて試験を行なった結果、XX個体の生殖腺でGFP蛍光を確認できず。

図 16 内分泌かく乱作用を示す化学物質を検出

以上の結果から、本研究では、内分泌かく乱作用のある化学物質が魚類のモデル生物メダカの性分化に与える生態影響の遺伝子メカニズムを明らかにした。さらには、特定の遺伝子を指標とすることで、実環境に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法を開発できた。

6. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

【サブテーマ1】

- 1) Horie, Y., Kanazawa, N., Takahashi, C., Tatarazako, N., Iguchi, T: Environmental Toxicology and Chemistry, in press, (2022) (IF: 3.742) Gonadal soma-derived factor expression is a potential biomarker for predicting the effects of endocrine-disrupting chemicals on gonadal differentiation in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)
- 2) Horie, Y., Kanazawa, N., Takahashi, C., Tatarazako, N., Iguchi, T: Journal of Applied Toxicology, Vol.41, No.3, pp. 399-409 (2021) (IF: 3.446) Exposure to 4-nonylphenol induces a shift in the gene expression of gsdf and testis-ova formation and sex reversal in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)
- 3) Horie, Y., Kanazawa, N., Takahashi, C., Tatarazako, N., Iguchi, T: Journal of Applied Toxicology, Vol.40, No.6, pp. 804-814 (2020) (IF: 3.446) Bisphenol A induces a shift in sex differentiation gene expression with testis-ova or sex reversal in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)

<その他誌上発表（査読なし）>

【サブテーマ1】

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

【サブテーマ1】

- 1) Horie Y. 2021. Impact of Environmental pollution on fish. Kobe University Academic Research and Education Forum Co-organized with The University of Western Australia Opening Commemorative Event for Kobe University Liaison Office in Perth, Online, 4 November, 2021.

(3) 「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ1】

特に記載すべき事項はない。

(4) マスコミ等への公表・報道等>

【サブテーマ1】

特に記載すべき事項はない。

(5) 本研究費の研究成果による受賞

特に記載すべき事項はない。

IV. 英文Abstract

Development of a Screening Assay to Predict and Detect for the Effect of Endocrine Disrupting Chemicals

Principal Investigator: Yoshifumi Horie

Institution: Fukaeminami-machi, Higashinada-ku, Kobe City, Hyogo, JAPAN

Tel: +81-78-431-6357

E-mail: horie@people.kobe-u.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Medaka, Endocrine disrupting chemicals, Biomarker, *Cyp19a1a*, EDCs, *Gsdf*

In this study, we elucidated the genetic mechanism behind the ecological effects of endocrine-disrupting chemicals on sexual differentiation in fish model organisms and, using specific genes as indicators, they are included in the actual environment. We aimed to develop a screening method for chemical substances with these endocrine-disrupting effects. First, we investigated whether *Gsdf* and *Cyp19a1a*, which induce testicular and ovarian differentiation, respectively, are useful biomarkers for the detection of endocrine-disrupting chemicals. It was revealed that, under exposure to chemicals that act similarly to female hormones, the expression of *Gsdf* in XY individuals decreased, while that of *Cyp19a1a* increased. However, under exposure to chemicals with androgen-like activity, the expression of *Gsdf* in XX individuals was induced, and that of *Cyp19a1a* was reduced. Based on these results, it was suggested that the two genes are useful biomarkers for the detection of chemical substances exerting endocrine-disrupting effects on sexual differentiation in fish. Next, to analyze the fluctuation in expression of each biomarker gene more easily and inexpensively, two strains of recombinant medaka, Y^{RFP} and *Cyp19a1a*-GFP, were prepared. The former can be used to discriminate the genotype sex (XX/XY) based on the presence or absence of red fluorescent protein (RFP), while the latter is used to detect the expression of ovarian aromatase (*Cyp19a1a*) based on the presence of green fluorescent protein (GFP). Finally, we examined whether the two lines of recombinant medaka produced could be used to screen for substances with endocrine-disrupting effects in actual aquatic environments. The results indicated that when both strains contained chemical substances showing female or androgen hormone-like activity in the aquatic environment, the reaction could be detected. Overall, the present study clarified the genetic mechanism regulating the ecological effects of endocrine-disrupting chemicals on sexual differentiation using the medaka fish as a model organism. Furthermore, using specific genes as indexes, we were able to develop a method to screen for these chemical substances in the environment.