

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域「内分泌かく乱物質」
研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 平成12年11月～平成17年10月

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)

1 研究実施の概要

内分泌かく乱物質は、ヒトを含むいろいろな動物の生体内の正常なホルモン作用をかく乱する物質であり、生殖系、免疫系、脳神経系に影響を与えると考えられている。このような内分泌かく乱物質の影響の原因やメカニズムを明らかにするためには、それぞれの動物に関する基礎的知見の蓄積が必要となることはいまでもない。本研究で我々は、野生動物に及ぼす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目的から、魚類の生殖内分泌系を取り上げ、性決定・分化及び配偶子形成の制御機構に関する基礎的知見をさらに蓄積するとともに、それぞれの過程に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用メカニズムを解析した。

魚類のみならず多くの野生動物の生殖に及ぼす影響でもっとも懸念されることの一つは自然界における性比の混乱であり、内分泌かく乱物質の長期的暴露を考えると将来的には重大な影響を及ぼすことになる。本研究では、この問題を4つの研究グループがお互いにそれぞれの専門分野を背景として協力し合うことによって研究を実施した。研究開始時には、野生動物の性決定、分化の研究は緒についたばかりで本研究で計画された細胞・分子メカニズムについての知見はきわめて少なかった。しかし、内分泌かく乱物質を含む外因性の化学物質の性決定/分化過程への作用メカニズムを正確に判断するには、対象とする生物個体の「遺伝的な性」を知ることが不可欠であると考えられた。そこで、本研究を開始するにあたって、哺乳類以外ではまだ見つかっていなかった性決定遺伝子をメダカ (*Oryzias latipes*) から探索する研究を最優先課題として設定した。幸いなことに、メダカの遺伝的特徴を上手く生かすことにより、研究開始2年目に性決定遺伝子の最有力候補としてDMYをポジショナルクローニングにより単離することに成功した。DMYがメダカの唯一の性決定遺伝子であることは性分化時における遺伝子発現パターン解析、DMYの野生突然変異体の解析及びgain-of-function (XXへのDMYの遺伝子導入によるトランスジェニックメダカの作出) とLoss-of-function (XY個体でのノックダウン実験) により確認することができた。DMYを遺伝子導入することによって作出されたトランスジェニックメダカは、遺伝的背景がXXにもかかわらず正常な精巣が形成され、妊性を有する精子がつけられたのである。マウスでSryを遺伝子導入して作出されたXXトランスジェニック個体では、雄への性転換は誘導されるものの、精巣の発達は異常となり、精子はつくられないことにはなかつた。このように本研究で、脊椎動物で第2番目となるメダカの性決定遺伝子DMYが同定されたが、十数種をこえるメダカ属のなかで、DMYが見つかるのはわずか2種であること、また遺伝子構造が哺乳類のSRY/Sryとはまったく異なることなど、脊椎動物における性決定遺伝子の研究に大きく貢献することができたと考えている。

次に、メダカの性決定遺伝子DMYを遺伝子マーカーとして性決定過程に及ぼす性ホルモンや内分泌かく乱物質の影響を調べることが可能となったので、DMY遺伝子の発現に及ぼすアンドロゲンやエストロゲン処理の影響を調べた。その結果、これら性ホルモンはDMYの発現にまったく影響を及ぼさないことが判明した。従って、遺伝的支配にある性決定の過程は性ホルモン等の外因性因子には影響を受けないことが本研究ではじめて明らかとなった。

上記の研究成果から、内分泌かく乱物質が性転換を誘導する際の作用部位は、性決定遺伝子が働いた後の性分化過程、もしくはそれ以降であることが推察された。そこでこのことを解析するために、すでに生殖腺の性分化に関するある程度の知見が蓄積していて、内分泌かく乱物質が作用すると考えられる体細胞（性ホルモン産生細胞）が大型で細胞学的研究に適しているという特徴を有するティラピア (*Oreochromis niloticus*)、さらには温度依存性のユニークな性決定システムを示すヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) を用いて研究を進めた。ティラピアは全雌、全雄群（100%）がすでに我々の研究室で確立されていたのでこの方法を駆使することで効率的かつ高精度の研究を推進することができた。この特徴を生かしつつ、EST解析やディフェレンシャルハイブリダイゼーション法等を併用することにより、2つの重要な性分化制御因子、すなわち精巢分化に関するDMRT1と卵巣分化に関するエストロゲン/エストロゲン受容体系、を同定することに成功した。精巢分化へのDMRT1の重要性は、XX個体へのDMRT1の過剰発現（トランスジェニック）とXY個体を用いたDMRT1遺伝子のノックダウンによる性転換することによって確かめた。一方、卵巣分化へのエストロゲン/エストロゲン受容体系の重要性は、内因性エストロゲンの合成阻害とエストロゲン受容体の作用阻害による性転換実験により実証した。また、主要なエストロゲン合成酵素である芳香化酵素の遺伝子発現が全雌ティラピア群の生殖腺で性分化に先立って特異的に観察されたので、以後この遺伝子の発現を卵巣分化の遺伝子マーカーとして使用することにした。DMRT1

と芳香化酵素という2つの重要因子が同定されたので、これらの遺伝子発現に及ぼす性ホルモンや内分泌かく乱物質の影響をRT-PCRやin situ ハイブリダイゼーション法などにより解析することで、外因物質が性分化過程に及ぼす影響を検証した。その結果は非常に明確であり、アンドロゲン処理（メチルテストステロン、魚類の主要アンドロゲンである11-ケトテストステロン）は全雌群をすべて雄に性転換させた。

この時の生殖腺体細胞における遺伝子発現についても、XXにもかかわらずアンドロゲン処理で芳香化酵素遺伝子の発現が抑制され、DMRT1遺伝子の発現が促進された。一方、エストロゲン処理（エストラジオール-17β、エチニルエストラジオール）は全雄群をすべて雌に性転換させた。この時の生殖腺体細胞における遺伝子発現についても、XYにもかかわらずエストロゲン処理でDMRT1遺伝子の発現が抑制され、芳香化酵素遺伝子の発現が促進された。このように性ホルモン処理により、生殖腺の体細胞（ステロイド産生細胞、前セルトリ細胞、前顆粒膜細胞）で遺伝子発現パターンは急激に変化し、それに伴って生殖腺構築や生殖細胞が大きく変化し、性転換を誘導するものと推察された（図1）。このように、性分化期の生殖腺中に存在する体細胞も生殖細胞のいずれも外因性の刺激に対して著しく高い感受性を示すことが明らかとなったのである。また、温度依存性を示すヒラメでも、芳香化酵素遺伝子の発現の有無が生殖腺の性分

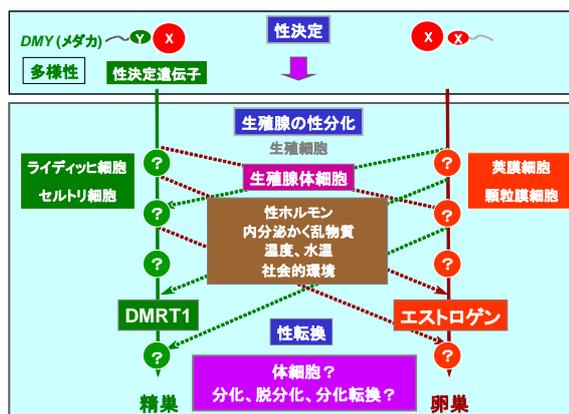


図1 性ホルモン、内分泌かく乱物質、環境要因などによる性分化期生殖腺での性転換誘導メカニズム

化に重要な役割を果たすことが確認されたばかりでなく、ノニルフェノール、ビスフェノールA、ゲニステイン、DDE などが芳香化酵素遺伝子発現を誘導して雌化すること、またTBTOが芳香化酵素遺伝子発現を抑制することで雄化することも明らかになった。これらの結果を総合すると、**性ホルモンや内分泌かく乱物質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り、その作用点は生殖腺の体細胞であると結論された。**

一部の性転換魚を除いて、性分化期以降は性の可塑性は失われ、性ホルモン処理や環境要因の変動により性転換は決して起こらないと考えられてきた。しかし、この問題は成体における内分泌かく乱物質の影響を考えると重要であると考えられたので、本研究で再検討することにした。サンゴ礁に生息する性転換魚は性ホルモンや内分泌かく乱物質による性転換誘起のメカニズム研究の良いモデルとなる。我々は先にこれらの魚の性転換は個体の大きさをもとに視覚によって起こることを明らかにしたが、さらに本研究で、生殖腺の性転換はエストロゲン合成の鍵酵素である芳香化酵素の遺伝子発現のオン、オフが引金となり起こることを明らかにした。加えて、ベラ雌から分離された卵巣片をメチルテストステロンと器官培養することにより卵巣の退行、さらには精巣分化を誘導させることに成功した。この実験は *in vitro* で生殖腺の性転換誘導に成功した脊椎動物で最初の例である。そこで、体細胞における芳香化酵素遺伝子の発現のオン、オフが性転換魚における性的可塑性の基本的メカニズムであると考え、成体では性転換は起こらないと考えられていたティラピアで体内のエストロゲン量を低下させた条件下で長期間にわたって飼育することにした。その結果、ティラピア成体雌で体内のエストロゲン量が低下すると卵巣が退行し始め、精巣が形成されることが分かった。また、メダカでも成熟雌雄で性ホルモン処理することにより性行動及び生殖腺の遺伝子発現の変動が速やかに誘発されることを見出した。これらの結果は、これまで成体（魚）では決して性転換を起こすことはないと考えられていた雌雄異体動物でも、生体内の性ホルモン量を変えることによって性転換を起こし得ることを明確に示しており、成体（魚）でも性的可塑性が保持されていることを示した最初の実験例となった。従って今後は、自然条件下で成魚の生殖腺が長期間にわたって内分泌かく乱物質に暴露される場合にも、性分化過程と同様に内分泌かく乱物質の標的となる可能性を考慮しながら注意深く見守る必要がある。

本研究では、上記の研究成果の他に、精子形成、特にエストロゲンの影響、さらには卵成熟に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用メカニズムについての研究に関しても新発見が得られた。特に、卵成熟の研究では、試みた十数種類の内分泌かく乱物質のうちで、ジエチルスチルベストロール (DES) が唯一、単独で卵成熟誘起作用を持つことを発見した。DESによる卵成熟誘起作用は、魚類の卵成熟誘起ホルモンである $17\alpha,20\beta$ -DPと同じように新規の7回膜貫通型ステロイド膜受容体を介していることが示され、ノンゲノミック作用を介した内分泌かく乱物質の新規メカニズムが明らかにされた。このステロイド膜受容体は生殖腺のみならず脳等にも強く発現しているので、内分泌かく乱物質の新規作用メカニズムとして今後さらに広範囲の組織、細胞における検討が必要となろう。特に、本研究でも観察された性ホルモン処理の直後に起こる性行動の転換とこの膜受容体との関連が注目される。

本研究ではまた、魚類の生殖系に及ぼす内分泌かく乱物質の影響を評価するための新たなス

クリーニング法を開発することができた。特に、性分化期のティラピアの雌雄生殖腺から作製されたマイクロアレイは、性分化期生殖腺の遺伝子発現に及ぼす内分泌かく乱物質の影響を評価するための高精度のツールとなるであろう。また、性決定/分化に関わる数種の遺伝子の制御領域にGFPをつなぎ受精卵に導入することによって標識したトランスジェニックメダカ系統を作出することができた。これらのトランスジェニック系統は、今後における内分泌かく乱物質の新しい視点からの研究に有益であるばかりでなく、性決定/性分化の基礎的研究にも大きく貢献することが期待される。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

開始時における目標、ならびに研究計画と研究の進め方の概要

研究の開始当時は世界各地の河川、湖沼で性的異常魚の発見が相次いで報告されていたが、特定の内分泌かく乱物質との因果関係やその作用メカニズムについてはほとんど不明であった。従って、野生動物についての基礎的研究が早急に必要とされていた。このような背景のもとに本研究では、これまでの研究成果を基盤として、分子・細胞生物学、発生工学的研究手法を駆使しながら、魚類の生殖内分泌系、特に生殖腺の性分化及び配偶子形成の諸過程に影響を及ぼす性ホルモンや内分泌かく乱物質の作用メカニズムを分子・細胞レベルで解明することを目的として計画された。またあわせて、内分泌かく乱物質の新しいスクリーニング法の開発をも試みることにした。この研究目的を達成するために、これまで魚類の生殖メカニズムの研究に携わってきた4つの研究グループ（長濱・基礎研究グループ、中村・性転換研究グループ、北野・海産魚研究グループ、徳元・卵成熟研究グループ）が結集された。これらの研究グループは、お互いの交流を密にするために、研究グループ会議を領域会議や学会の際に度々開催し、研究の進行状況や協力体制について十分な討論、意見交換を行った。また、個々の研究者同士は、研究代表者の長濱を中心として、頻繁に交流するとともに、特に性分化と卵成熟の研究に関して共同研究を実施した。

本研究の遂行にあたり、まず対象とする魚類生殖系の各々について十分な基礎的知見を集積することを最優先し、その堅固な基盤の上に性ホルモンや内分泌かく乱物質の作用点を遺伝子、細胞レベルで特定することを目指すことにした。この点に関して、本研究の開始2年目に脊椎動物で第2番目となる性決定遺伝子*DMY*を発見することができたことはその後の本研究の展開に大きな影響を与えることになった。この*DMY*の発見を契機として、研究代表者のグループの研究の中心を、中村、北野グループとともに、性分化期と成体（熟）期における生殖腺の性的可塑性の解析に重点化することとした。ただ、卵成熟の研究に関しては、新規のステロイド膜受容体の遺伝子クローニングやDESが卵成熟誘起作用を有するという重要な新知見が見つかりつつあったので、そのまま徳元グループと緊密な協力体制のもと研究を展開することにした。

その結果として、最終的には、本研究で大きく3つの研究成果、1) 性ホルモンや内分泌かく乱物質は、性分化期の生殖腺の体細胞に作用し、性転換を誘導する、2) 成体（魚）の生殖腺も性的可塑性を保持しており、外因性化学物質のターゲットとなり得る、3) DESは新規のステロイド膜受容体を介して卵成熟を誘起する、を得ることができた。これらはいずれも、本研究で新しく見つかったことであり、内分泌かく乱物質問題と考える上で貴重な知見を提供するばかりでなく、性ステロイドホルモンのノンゲノミック作用、さらには「性の基礎生物学」の視点からも大きな問題を包含するものである。

その後の展開から生まれた新たな目標

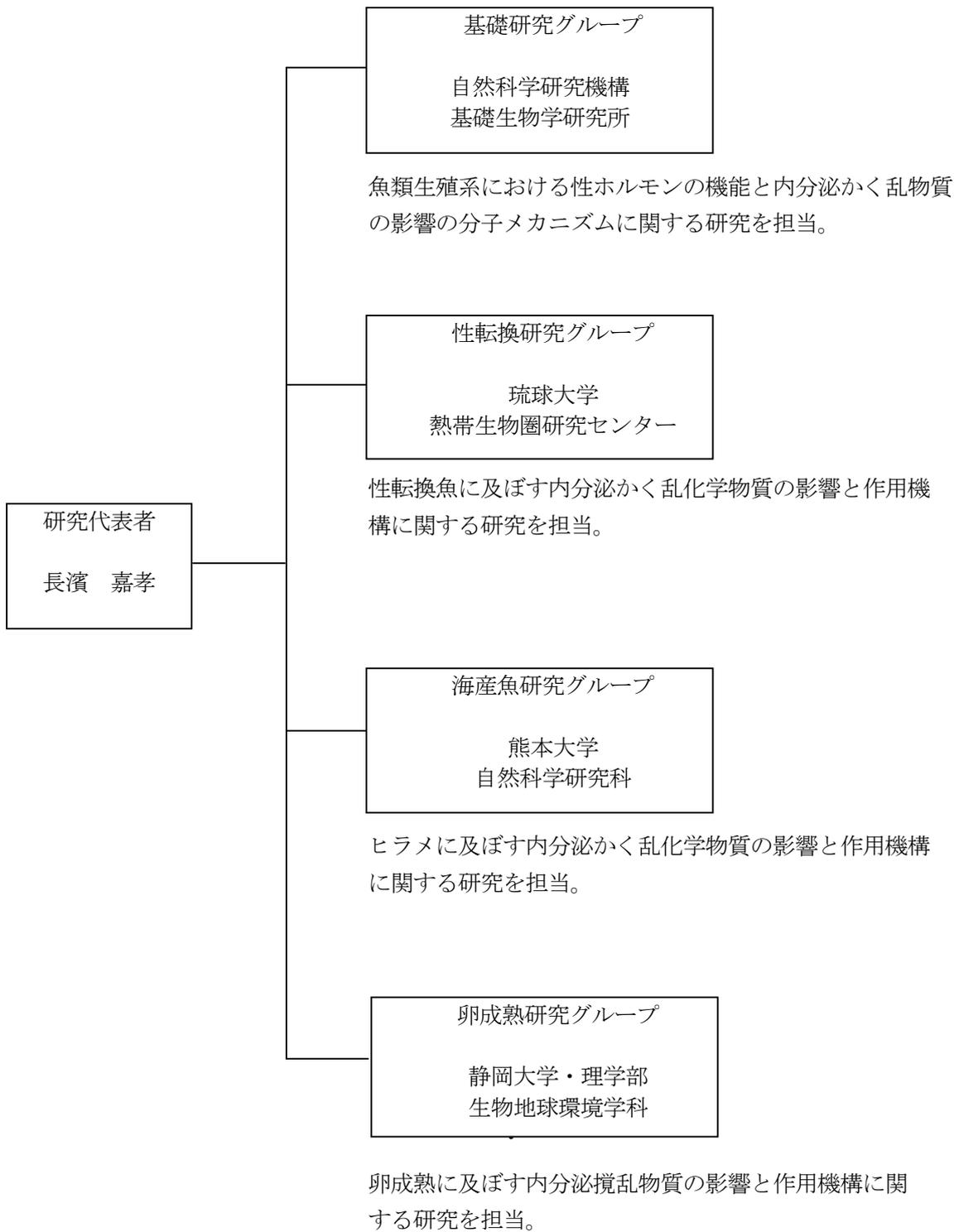
本研究が推進されたことにより、大きく2つの新たな目標が生まれた。まず、内分泌かく乱物質の研究については、本研究により性分化期生殖腺の体細胞が外因性化学物質のターゲットとして特定されたことで、今後の研究目標のひとつが定まったといえる。対象とする内分泌かく乱物質の優先順位を考え、絞り込んだ研究が可能となる。このような研究から、それぞれの内分泌かく乱物質の真のターゲット分子や作用メカニズムが解明されることが期待される。ただ、性分化過程に焦点をあてる場合にも、これまでに同定された分子、細胞マーカーに限定するばかりでなく、新しいターゲットを常に探索しつつ研究展開をはかることが大事である。その目的には、本研究で新たに作製された性分化期生殖腺に特化したマイクロアレイが大いに有効である。また、マーカー分子の発現が生きたまま観察できるトランスジェニックメダカ系統を駆使した研究からは、これまでには見ることができなかった内分泌かく乱物質の連続的な影響パターンを明らかにすることができる。このような基礎生物学的研究により、個々の内分泌かく乱物質が示す性分化かく乱活性を正確に把握することが可能となり、そうすることで種々の内分泌かく乱物質間における相違点と共通点を明らかにすることができるであろう。

また、本研究で発見されたDESの卵成熟誘起能についても引き続き研究を推進する必要がある。特に、その作用がこれまでの核受容体を介したゲノミック作用とは違い、新規のステロイド膜受容体を介したノンゲノミックであることが分かったので、これまで余り研究されることがなかった内分泌かく乱物質の急速作用の基本的メカニズムを解析するための実験系としてさらなる展開が期待される。

本研究で生まれたもう一つの新たな目標は、脊椎動物における「性の基礎生物学」についてである。まず、メダカの性決定遺伝子*DMY*を発見する過程で明らかにされた脊椎動物における性決定遺伝子の驚くべき多様性である。哺乳類の性決定遺伝子*SRY/Sry*と遺伝子構造が全く異なることは驚きであったし、また*DMY*がメダカ種間に共通な性決定遺伝子でないことも予想していなかったことである。この新知見は動物における性決定の仕組みが生物種間で著しく多様性に富むことを示唆しておりきわめて興味深いことである。この我々の研究が契機となり、世界の多くの研究室でいろいろな動物種を用いて脊椎動物における第3、第4の性決定遺伝子を探索する研究プロジェクトが著しく活性化することになった。我々自身も、ティラピアの性決定遺伝子の探索をいろいろなアプローチを駆使しながら進めている。哺乳類の性決定遺伝子*SRY/Sry*は10数年前に発見されたにもかかわらずまだ標的遺伝子が特定されていないし、従ってその正

確な機能についても不明なままである。今後、DMYの機能についての研究が益々期待される。また、性決定遺伝子の有無で誘導させる生殖腺の性分化カスケードについても本研究により大きな進展があった。特に、卵巣分化にエストロゲン/エストロゲン受容体系が積極的に働くことを明確にできたのは大きな収穫である。デフォルトによるものとして、卵巣分化メカニズムにはほとんど目を向けてこなかった哺乳類研究者達も今ようやくその重要性を認識したようである。今後、いろいろな脊椎動物を対象とした雌化についての分子レベルの研究が熾烈をきわめることであろう。また一方で、「性的可塑性」が性分化期のみならず成熟後の生殖腺、さらには成体の性行動にまで保持されていることをはじめて実証することができたことは今後の性研究一般に与えるインパクトははかり知れないものがある。成体に保持されている性的可塑性の分子メカニズムに関しては、引き続き「SORST」で研究を実施することができる。

(2) 実施体制



3 研究実施内容及び成果

3. 1 魚類生殖系における性ホルモンの機能と内分泌かく乱物質の影響の分子メカニズムに関する研究

(基礎生物学研究所、基礎研究・長濱グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

1) 研究のねらい

研究代表者の長濱らは、本研究の開始に先立ち、魚類を対象として魚類の生殖機構、特に配偶子の形成と成熟を制御する主なホルモン因子群（生殖腺刺激ホルモン、各種の性ステロイドホルモン）を同定するとともに、それらの産生と作用に関わる多くの遺伝子とタンパク質マーカーを単離してきた。さらに、自らが単離した個々のホルモン因子を培養液中に添加すること（細胞・器官培養系）により、試験管内で配偶子形成の諸過程を再現させることに成功していた。本研究では、魚類の生殖内分泌系についての基礎研究をさらに発展させるとともに、これらの研究成果を基盤として、魚類の性決定/性分化、精子形成、卵成熟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を分子、細胞レベルで明らかにすることを目的とした。研究のねらいとしては、生殖系の制御機構を研究するための優れたモデルと考えられる魚類の特徴を上手く生かしつつ、魚類の生殖腺がいろいろな発生、成熟状態で示す、性ホルモンや内分泌かく乱物質に対する感受性の違いなどに特に注目しながら研究を展開した。

2) 研究実施方法

対象とした魚類は、メダカ (*Oryzias latipes*、性決定と卵成熟の研究) とティラピア (*Oreochromis niloticus*、生殖腺の性分化と精子形成の研究) が主であるが、性の可塑性に関する研究には、これらの魚類に加えて性転換魚のオキナワベニハゼ (*Trimma okinawae*) とハワイ産ベラ (*Thalassoma duperrey*) も用いた。また、精子形成と卵成熟の研究には、これまで我々の研究室で研究対象としてきたウナギ (*Anguilla japonica*) とキンギョ (*Carassius auratus*) を用いた。研究手法としては、細胞、分子生物学的アプローチに加え、トランスジェニック系統の作出等を含めた発生工学的手法も併用した。

3) 研究成果

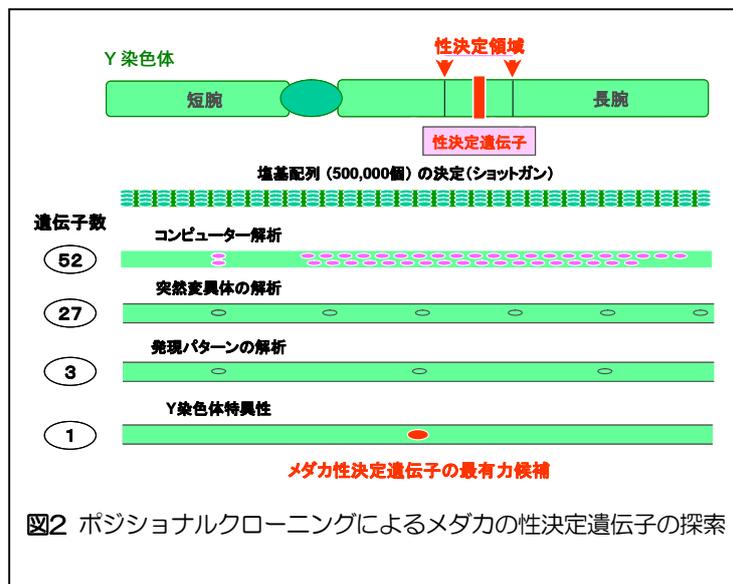
これまでに得られた研究成果を以下の6項目 (I. 性決定、II. 生殖腺の性分化、III. 精子形成、IV. 卵成熟、V. 成体(魚)の性的可塑性、及び VI. 内分泌かく乱物質のスクリーニング法の開発) に分けて記述する。

I. 性決定

1) 基本的メカニズム

A) メダカの性決定遺伝子 (DMY)

多くの脊椎動物の性は、受精時における性染色体の組み合わせによって決まる。1990年にヒトの性決定遺伝子がSRYと同定されてからすでに十数年が経過した。その間、哺乳類以外の脊椎動物でもSRY/Sry相同遺伝子の存在を確かめる研究が精力的になされたが、これまでにそのような遺伝子は見つかることはなかったし、また新しい性決定遺伝子の探索についての研究も特に進展はみられなかった。従って、性決定遺伝子の発現を引金として起こると考えられる生殖腺の性分化機構もほとんど不明のままである。



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。本研究で我々は、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を併用することによりメダカの性決定遺伝子を同定することに成功した (図2)。

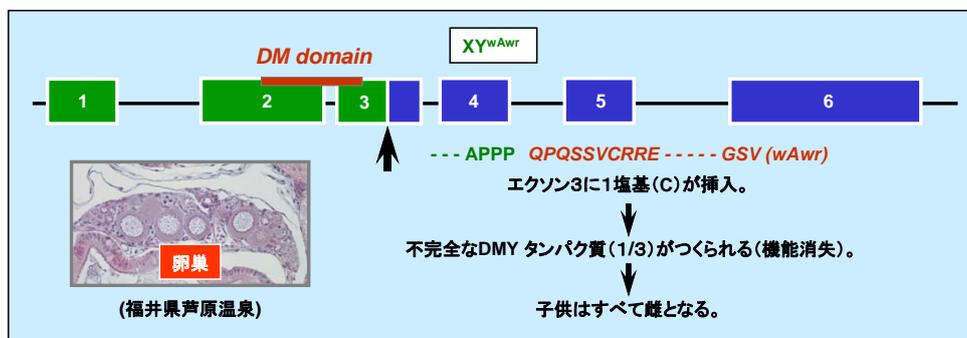


図3 芦原温泉で見つかったDMYの野生突然変異体の解析

この遺伝子によってコードされるタンパク質は、広く脊椎動物と無脊椎動物の性発達に関わると考えられているDNA結合配列 (DMドメイン) を持つことから、**DMY** (**DM**-related gene on the **Y** chromosome) と名付けた。*DMY*は6つのエクソンからなり、*SRY/Sry*とは遺伝子構造をまったく異にする。*DMY*をゲノム上に持つにもかかわらず表現型が雌である*DMY*野生突然変異体の解析 (図3)、*DMY*ノックダウンによるXY個体の雌化、さらには過剰発現させたXXトランスジェニック個体の雄化などの実験により、*DMY*がメダカの性決定遺伝子であることの完全な証拠が出揃った。*DMY*遺伝子は孵化前のXY胚生殖腺の体細胞で強く発現する。*DMY*はメダカの近縁種であるハイナメダカ (*Oryzias latipes*) 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。脊椎動物における性決定遺伝子の多様性を示唆する興味ある知見である。なお、ここで触れたメダカの性決定遺伝子の同定に関する研究の前半部は、平成12年度に終了した日本学術振興会未来開拓学術研究推進事業によってなされたことを申し添える。

B) Gain-of-function の実験 (DMYを過剰発現させたXXトランスジェニックメダカ)

*DMY*の全コード領域を含むBACクローンmCON051H1を制限酵素*Sfi*Iを用いてサブクローニングすることで、*DMY*のORFよりゲノムの上流 (発現制御領域) 約60 kbと*DMY*のORFおよび3'UTRを含む約56 kbの120 kb弱のゲノム領域をpCCベクターにつないだ。このpCC1-*DMY*geをd-rR系統の一細胞期にマイクロインジェクション法により顕微注入することで、トランスジェニックメダカを作出した (図4)。BACクローンは、HNI系統のY染色体由来なので、d-rR系統の*DMY*とトランスジェニックジーンの*DMY*とは系統間の多型を用いて識別可能である。トランスジェニック個体の孵化日において全胚より抽出した

RNAからRT-PCR法を用いて、*DMY*の発現を調べた。また、別の個体で*in situ*ハイブリダイゼーション法により、*DMY*の発現を調べた (図5)。孵化後20日と30日のトランスジェニック個体の生殖腺組織切片を作成し、生殖腺の形態を観察した。さらに、トランスジェニック個体を第二次性徴のまで飼育し表現型を観察した。

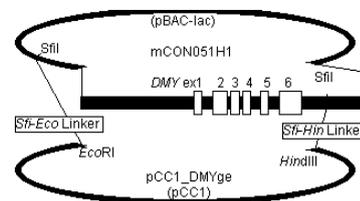


図4 DMYゲノムのトランスジェニックコンストラクト

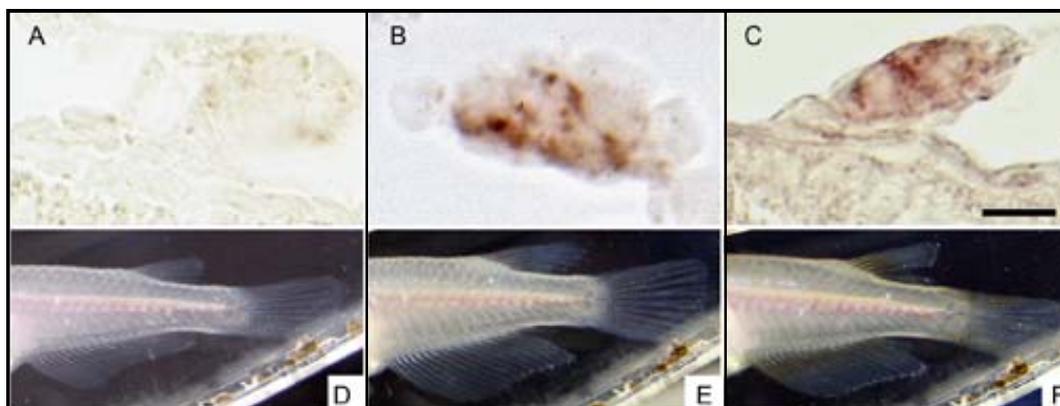


図5 DMYの過剰発現実験。AとD, XX対照群、RとE, XY対照群、CとF, XXトランスジェニック

| 遺伝的性と表現型 | 判定方法 | XY | XY | XX | XX | 雄化率(%) |
|----------|---------|----|----|----|----|--------|
| | | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | |
| 0 dah | RT-PCR | 0 | 3 | 0 | 5 | 100 |
| 0 dah | ISH | 0 | 6 | 11 | 4 | 26.7 |
| 20 dah | Section | 0 | 6 | 11 | 1 | 8.3 |
| 30 dah | Section | 0 | 9* | 14 | 1 | 6.7 |
| 親 | 第二次性徴 | 0 | 33 | 30 | 11 | 25.0 |

図6 DMYの遺伝子導入実験

孵化日のXX個体でのトランスジェーンの発現を調べたところ、RT-PCR法では全ての個体で、*in situ*ハイブリダイゼーション法では約1/4の個体で検出された。トランスジェニック個体の孵化後20日および30日では、XXながら精巣を持つ個体が1個体ずつ得られた。その他のXX個体の中には、卵母細胞の数の減少など卵巣分化の遅延のみられる個体もあった。親まで飼育したところ、XX個体のうち1/4が雄の第二次性徴を示した。これらのうち4個体からは、次世代を得ることができた(図6)。

C) Loss-of-function の実験 (DMYのノックダウン)

DMYの機能を調べるために、特定遺伝子の翻訳阻害の可能なgripNAを用いた。DMY特異的なgripNA、DMY-gripを設計した。山本メダカリンガーに5 mMの濃度で溶解したDMY-gripをHd-rR系統の一細胞期の受精卵にマイクロインジェクション法で顕微注入した。孵化後、尾部を切断し、そこからDNAを抽出して遺伝的性をPCR法を用いて、DMYの有無を調べることで決定し、残りの部分はPFAに固定して、ホルマウント*in situ*ハイブリダイゼーション法により*vasa*と*SCP3*の発現をしらべた。正

常発生では減数分裂に関わる*SCP3*遺伝子は孵化後50日までは雌特異的に発現し、*vasa*遺伝子は生殖細胞特異的なマーカー遺伝子である。

メダカの生殖腺の性分化過程において最初に観察される雌雄差は、生殖細胞の数である(図7)。遺伝的雌では、孵化前の時点から生殖細胞の分裂活性が雄と比較して高くなり、孵化時には雌は雄の2-3倍の生殖細胞を持つ。また、その後雌で

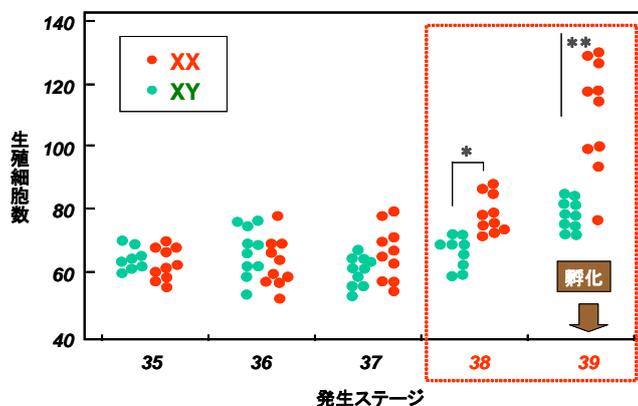


図7 メダカの雌雄生殖腺における生殖細胞数の性差

は速やかに減数分裂に入ることが知られている。*DMY*に対するgripNAをインジェクションした個体における*vasa*や*SCP3*の発現をこれらの遺伝子のアンチセンスRNAをプローブとして調べたところ、XY個体の生殖細胞は増殖し、減数分裂に入ると考えられた(図8、9、10)。

| Genetic sex | XY | XX |
|-------------|----|----|
| SCP3(+) | 25 | 18 |
| SCP3(-) | 0 | 15 |

図8 SCP3の発現

図10にメダカの性決定遺伝子*DMY*の働きについての現段階での仮説を示した。XYメダカの*DMY*をノックダウンすると、XX個体と同じようなタイミングで生殖細胞数が増加し、孵化前後に減数分裂に移行することが分かった。従って、XY個体に

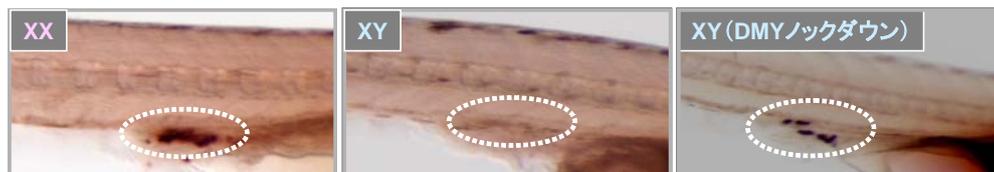


図9 メダカ生殖腺におけるSCP3遺伝子の発現

における*DMY*の主な作用の一つは生殖細胞の分裂を停止させる (mitotic arrest) ことであると推察される。しかし、*DMY*遺伝子がコードするタンパク質は転写因子であり直接には生殖細胞に作用しない。*DMY*の働きによりセトリ細胞でつくられる因子が精原細胞に働いて細胞分裂を抑制すると考えられる。

性分化期精巣での精原細胞の分裂抑制は哺乳類を含む脊椎動物全般で共通である可能性が高いので、*DMY*の働きによりセトリ細胞でつくられると推察される生殖細胞分裂抑制因子の実体を明らかにしたいと考えている。

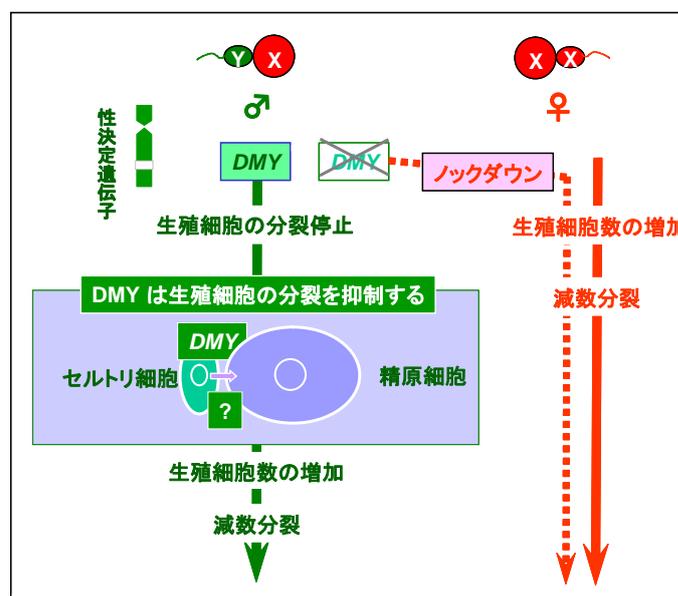


図10 メダカの性決定遺伝子*DMY*の働き

2) 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

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(図11)。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以降であると結論された。

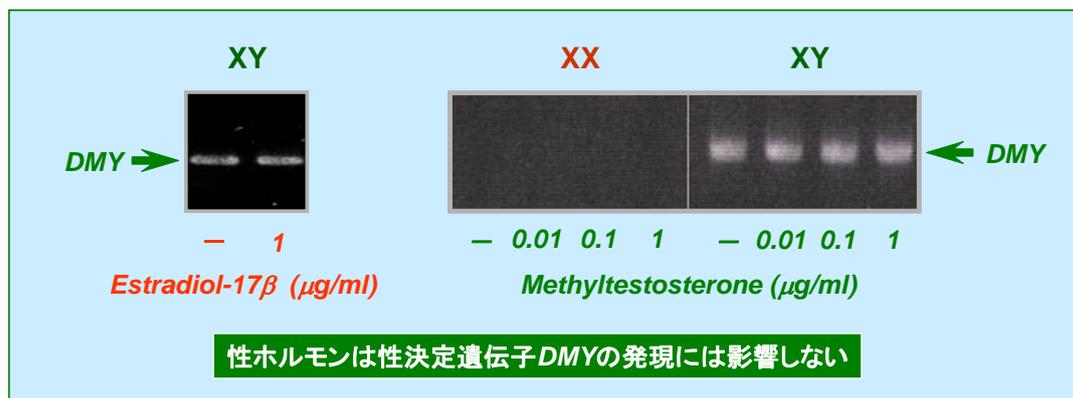


図11 DMYの発現に及ぼす性ホルモン処理の影響

II. 生殖腺の性分化

1) 基本的メカニズム

この研究では、ティラピアを主な実験材料に用いて、生殖腺の性分化に関わる遺伝子の同定と機能解析を進めることにより、生殖腺の性分化機構を明らかにするとともに、この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を明らかにすることを旨とした。なお、ここで用いるティラピア

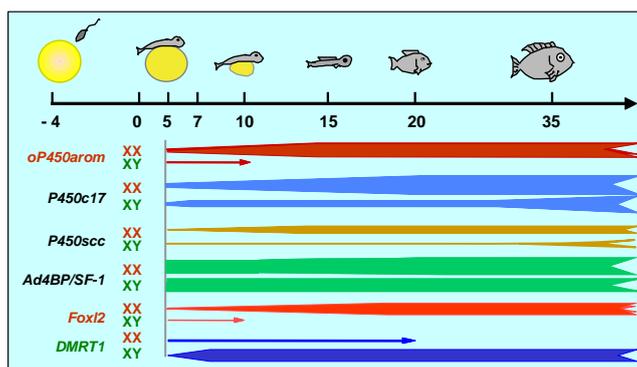


図12 ティラピアの性分化時生殖腺における遺伝子発現

では、正常雌(XX)とステロイド処理による偽雄(XX)、或いは超雄(YY)との交配から、全雌と全雄を作出することができるシステムが我々の研究室ですでに確立している。

A) 卵巣の分化

ティラピアの遺伝的雌の生殖腺には、卵巣分化に先行して、エストロゲン生成に必要なすべ

での酵素遺伝子の発現を示すステロイド産生細胞が存在し、その細胞ではそれら遺伝子にコードされるタンパク質の生産も行われていることが明らかになった（図12）。さらに、これらの生殖腺では、エストロゲンの作用に必要なエストロゲン受容体遺伝子もすでに発現していた。また、孵化直後から芳香化酵素阻害剤（ファドロゾール）を用いることにより内因性エストロゲンの生成を抑制したり、あるいはエストロゲン受容体の拮抗剤（タモキシフェン）処理によりエストロゲン作用を抑制すると、遺伝的雌は雄に不可逆的に性転換することが分かった（図13）。これらの結果から、魚類ではエストロゲン/エストロゲン受容体系が卵巢分化に中心的な役割を果たすことが明らかになった。また、ファドロゾール処理されたXX個体では、正常の卵巢分化時にみられる生殖細胞数の増加は抑えられた。従って、卵巢分化時におけるエストロゲンの作用の一つは生殖細胞数を増加させることであると考えられる。

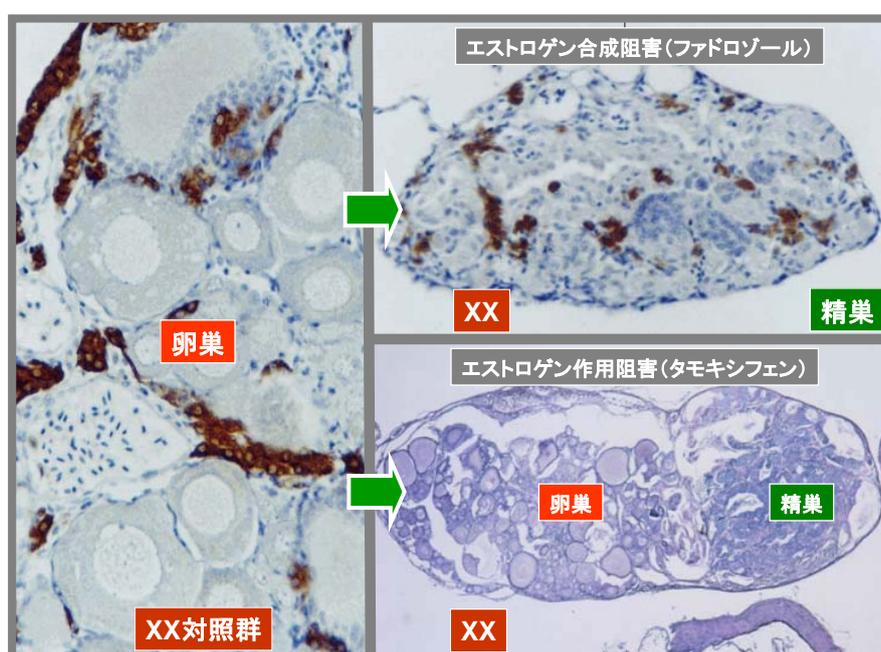


図13 ティラピアにおける卵巢分化に果たすエストロゲン/エストロゲン受容体の重要性

B) 精巢の分化

上述した遺伝的雌の場合とは異なり、遺伝的雄の性分化期（精巢形成期）の生殖腺には、ステロイド代謝酵素遺伝子の発現を明確に示すステロイド産生細胞は認められなかった。これらの個体でアンドロゲン生成に必要なステロイド代謝酵素遺伝子の発現が最初に確認されるのは精巢分化が起こった後であり、さらにそれらの酵素が強く発現するのは孵化後2ヶ月を経た精子形成開始期になってからである。また、成熟精巢では2型あるアンドロゲン受容体についても、遺伝的雄の性分化期生殖腺での発現はまったく認められないことが判明した。以上の結果から、遺伝的雄ティラピアにおける精巢分化にはアンドロゲン/アンドロゲン受容体は主要な働きはしないと判断される。

一方、性分化期のティラピア雌雄生殖腺を用いたRT-PCRとin situ ハイブリダイゼーションに

よる解析から、性分化に先がけXY生殖腺の体細胞で特異的に発現する遺伝子は*DMRT1*であることが分かった（図12）。*DMRT1*はDMドメインを持つ遺伝子であり、動物種を超えて共通に存在し、脊椎動物では精巢の形成や維持に重要な役割を果たすと考えられている。前述したようにメダカの性決定遺伝子*DMY*は常染色体上の*DMRT1*遺伝子の重複化によって生じたものであることが推察されている。ティラピアでの*DMRT1*遺伝子の発現は、性分化期のXY生殖腺の生殖細胞を囲む上皮細胞（前セルトリ細胞）で特異的になり、以後もセルトリ細胞や輸精管上皮に強く発現する。

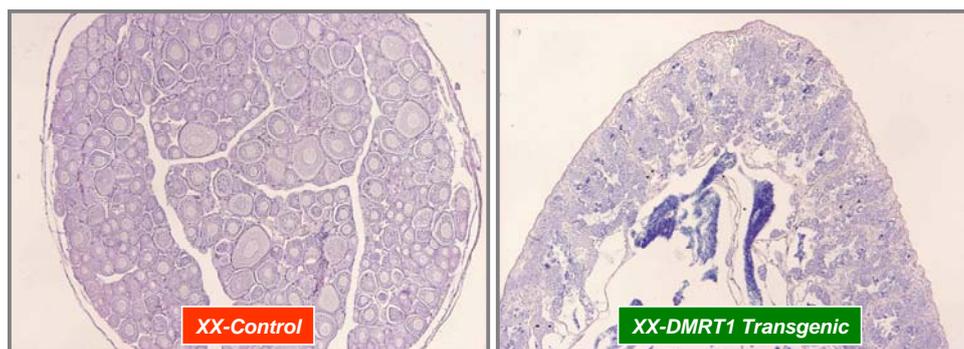


図14 XXティラピアへのDMRT1遺伝子の過剰発現実験（トランスジェニック）

*DMRT1*がティラピアの精巢に重要な役割を果たすことを示すために遺伝的全雌（XX）群の受精卵に*DMRT1*遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックXXティラピアを作成した。その結果、*DMRT1*遺伝子を導入されたXXティラピアの多くの個体で精巢が形成され、雄への機能的性転換が観察された（図14）。これらの結果から、ティラピアでは*DMRT1*は精巢形成に十分な要因であると考えられる。本研究は、*DMRT1*遺伝子の過剰発現により遺伝的全雌から雄への機能的性転換をおこさせた脊椎動物で最初の例であり、精巢分化における*DMRT1*の重要性を実験的に示した点できわめて重要である。

C) 卵巣と精巢に特異的に発現する遺伝子の発現パターン解析

上述した研究成果により、ティラピアでは精巢分化に*DMRT1*遺伝子が、また卵巣分化にはエストロゲン/エストロゲン受容体が重要な役割を果たすことが明らかになった。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XY全雄群とXX全雌群の生殖腺を解剖顕微鏡下で取り出せることである。この点を生かし、孵化後5日から35日までの雌雄生殖腺からRNAを抽出し、性分化関連遺伝子の発現パターンをリアルタイムPCRで定量化した。測定した遺伝子群は、*P450arom* (*cyp19*) および*DMRT1*、また、*P450arom* の発現制御に関わる転写因子群、*Ad4BP/SF-1*、*Foxl2*、*Dax1*、*Dax2*、および*P450arom*の上流に位置するステロイド合成酵素である*P450scc*、*P450c17*である。以下にそれぞれの遺伝子の発現パターンについて簡単に述べる。

卵巣型芳香化酵素（*P450arom*、*cyp19*）： 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。雄では全期間で微量に発現が認められるものの、発現量

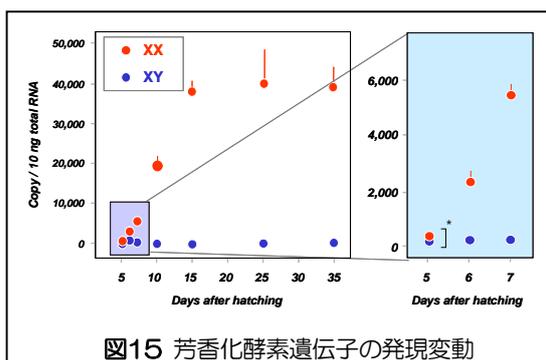


図15 芳香化酵素遺伝子の発現変動

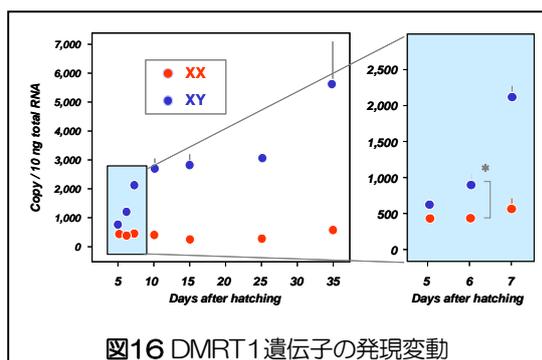


図16 DMRT1遺伝子の発現変動

が高まることはなかった（図15）。*DMRT1*：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。雌では期間中、発現量が高まることはなかった（図16）。*Ad4BP/SF-1*：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*：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。雄では全期間を通して発現量は低かった。*Dax1*、*Dax2*：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*：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。雄では35日目ようやく発現が増加した。*P450scc*：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った。雄では35日目ようやく発現が高まった。

以上、*P450arom*及び*Foxl2*の発現パターン解析の結果から、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が*Ad4BP/SF-1*、*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重要な役割を果たしてはいないと判断される。一方、*P450c17*と*P450scc*の2種のステロイド代謝酵素遺伝子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、雄のステロイド合成系は遅れて35日目ようやく活性化することが明らかになった。

D) 性分化生殖腺の交換移植による性分化機構の解析

脊椎動物の生殖腺の性分化メカニズムを解析するための有用な実験系として細胞・器官培養系や器官移植系などがある。このうち細胞・器官培養系に関しては内分泌かく乱物質の*in vitro*スクリーニング法として後述するので、ここでは交換移植法について本研究で開発、確立された方法について述べる。この実験法は生殖腺自体が示す性分化能などを解析する系として優れていると考えられる。まず、移植実験条件を確認するためのコントロール実験として、孵化後7日の雌生殖腺を、同時期の雄の腹腔内に移植した。移植後3日の移植生殖腺を観察したところ、生殖腺は腹腔内のどの位置に移植されたても、退縮することなく維持されることが分かった。また、免疫組織化学による観察から、この培養条件下での芳香化酵素陽性細胞の維持も確

認められた。次に、移植した生殖腺が、腹腔内で分化できるか否かを調べるために孵化後5日と6日の雌生殖腺を同時期の雌腹腔内に移植し、孵化後10から25日まで飼育し、その間における移植片の変化を芳香化酵素陽性細胞の出現の有無と生殖細胞数を数えることによって解析した。孵化後5日と6日の生殖腺では、雌の分化指標である芳香化酵素陽性細胞はまだ出現していないことが分かっている。移植後、孵化後10日、15日、20日で調べた結果、いずれの移植片でも芳香化酵素陽性細胞の出現が認められ、生殖細胞数も個体の成長に伴って増殖するのが観察された。以上のことから、腹腔内に移植された生殖腺は、どの位置に移植しても正常に分化し、成長することが分かり、この移植系が性分化研究に有用であることが明らかになった。

このようにティラピアの生殖腺を用いた移植実験が可能となったので、この系を用いて生殖腺の性分化開始時期などについて解析した。本研究では、生殖腺を腹腔内のいろいろな場所に移植したが、いずれの位置に移植しても移植された生殖腺の性分化はホストの性に依存して起こることが分かった。このことから、腹腔内には性分化を誘導する因子が存在することが強く示唆され、その因子はホルモンのような液性因子である可能性がある。今後この因子の単離、同定の研究が必要であり、特にティラピアですでに明らかになっているDMRT1(精巣分化因子)とエストロゲン(卵巣分化因子)との関連が非常に興味あるところである。

次に、生殖腺の分化時期、すなわち性分化誘導の開始と終了の時期を決定する目的でいろいろな時期での生殖腺の交換移植を行った。まず、孵化後5日と6日の生殖腺の交換移植を同時期の別姓の個体の腹腔中に行った。その結果、孵化後5日の移植生殖腺では、生殖腺の性転換が引き起こされ、その性はホストに依存したのに対し、孵化後6日の移植生殖腺では退化することがわかった。また、孵化後6日の雄生殖腺を、孵化後12日の雌の腹腔中に移植すると生殖細胞は退化するものの、体細胞は維持され、芳香化酵素陽性細胞が観察された。以上の結果から、移植された生殖腺はホスト側の性に依存して性分化することが明らかとなった。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日の雌雄生殖腺は形態的には全く区別がつかないが、6日にはすでに性分化方向が決定されつつあることが強く示唆された。

さらに、性分化能が維持される期間についても検討した。孵化後6日の雄生殖腺を孵化後6

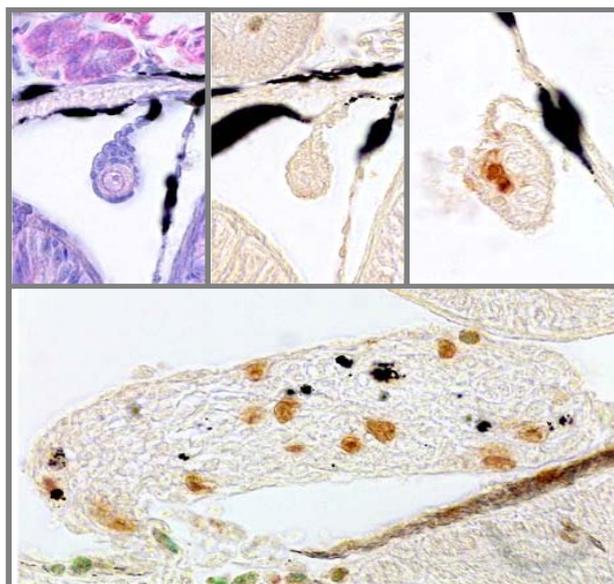


図17 ティラピア生殖腺の移植実験。孵化後6日のXY生殖腺を孵化後12日のXXの腹腔内に移植して4日後(下図)とその対照群(上右)、芳香化酵素抗体染色。孵化後6日のXX個体のHE染色(上左)と芳香化酵素抗体染色(上中)。

日、12日、27日の雌の腹腔内に4日間にわたって移植した。その結果、孵化後6日の雌の腹腔内に移植された生殖腺はすぐに退化した。一方、12日雌に移植した生殖腺は生殖細胞が退化するものの体細胞は維持され、芳香化酵素陽性細胞も多数観察された(図17)。しかし、孵化後27日の雌に移植した生殖腺では、12日の雌に移植した時と同様に生殖細胞の退化は起こるものの、芳香化酵素陽性細胞の出現する割合が20-60%に減少した。また、孵化後6日の雌生殖腺を孵化後27日の雌に移植した場合においても、芳香化酵素陽性細胞の出現率は70%に減少するとともに、50%の移植片で生殖細胞の退化が認められた。以上のことから、性決定能力は孵化後6日に出現しその後次第に減少するものと考えられた。

E) 芳香化酵素遺伝子の発現制御機構

すでに述べたように、XXティラピアにおける卵巢分化にはエストロゲン/エストロゲン受容体系の関与が不可欠である。また、これまでの研究を総合して考えても、哺乳類の除く多くの脊椎動物でエストロゲンは卵巢分化に深く関わっている可能性が高い。従って、XX個体での生殖腺の性分化カスケードを明らかにする上でエストロゲン/エストロゲン受容体系の発現メカニズムを明らかにすることは非常に大切なことであり、また、内分泌かく乱物質の作用メカニズムを考える上でも中心的課題となると考えられる。前述したティラピアを用いた研究でも、主要なエストロゲン合成酵素である芳香化酵素は中心的役割を果たしていると考えられるので、まず芳香化酵素遺伝子の発現メカニズムを転写、翻訳レベルで解析することが必要であると考えられる。そこで本研究では、芳香化酵素の遺伝子発現機構について重点的に解析を行った。

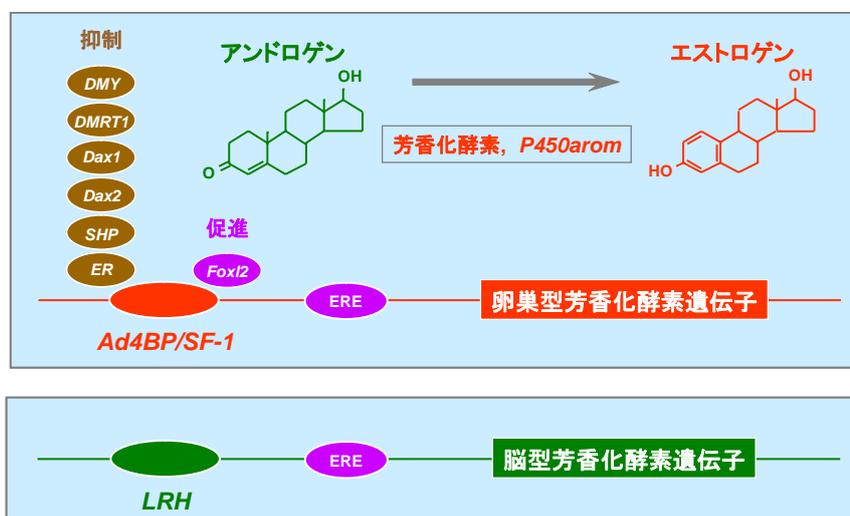


図18 魚類の2種類(卵巣型と脳方)の芳香化酵素遺伝子

魚類の芳香化酵素には他の脊椎動物の芳香化酵素にはみられない顕著な特徴がある。それは魚類には2種類の芳香化酵素遺伝子が存在することである(図18)。生殖腺、特に卵巣に強く発現する卵巣型芳香化酵素(*cyp19a1*または*oP450arom*)と主に脳に強く発現する脳型芳香化酵素(*cyp19a2*または*bP450arom*)である。ティラピアやメダカではこれら2つの芳香化酵素遺伝子の相同性は約70%である。また、それぞれの遺伝子の5'上流域の塩基配列も大きく異なる。両者のプロモーター解析から、Ad4BP/SF-1が卵巣型芳香化酵素遺伝子の発現調節に、またLRHが脳型芳香化酵素遺伝子の転写制御に重要な役割を果たすことが明らかになった(図18)。Ad4BP/SF-1は脊椎動物全般を通して芳香化酵素遺伝子の発現制御に重要な役割を果たすと考えられているが、メダカでもAd4BP/SF-1は性分化期のみならず卵形成期の卵胞の顆粒膜細胞にも強く発現することから卵巣型芳香化酵素の転写制御には深く関わる可能性が高い。ところが、メダカの脳でAd4BP/SF-1の発現は明確ではなく、従って脳型芳香化酵素の制御との関連は今のところ否定的である。

本研究では、哺乳類の細胞株を用いたプロモーター解析により、ティラピアの卵巣型芳香化酵素遺伝子の転写を制御する因子について重点的に調べた。プロモーター解析の対象とした転写因子の多くはティラピアやメダカの性分化期雌雄生殖腺の体細胞に発現が確認されている、いわゆる性分化関連遺伝子群(*Ad4BP/SF-1*, *DMY*, *DMRT1*, *Dax1*, *Dax2*, *Foxl2*など)である。す

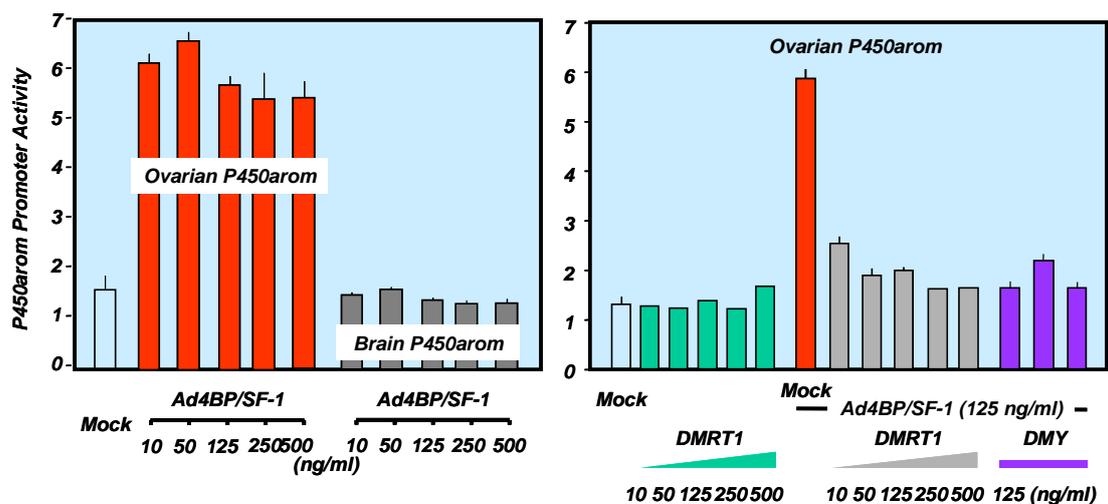


図19 ティラピア芳香化酵素遺伝子の転写制御

で述べたように、Ad4BP/SF-1は芳香化酵素遺伝子のプロモーター活性を著しく高める作用を有する。さらに、Ad4BP/SF-1は芳香化酵素遺伝子と直接結合することがゲルシフトアッセイでも確かめられた。従って、Ad4BP/SF-1は魚類の卵巣型芳香化酵素遺伝子の基本的転写制御因子であると考えられる。しかし、上述したようにAd4BP/SF-1はティラピアの性分化期生殖腺では強い発現を示すものの、明確な性差は認められない。従って、Ad4BP/SF-1による芳香化酵素遺伝子の発現制御には他の要因が働いているものと推察される。

次に、Ad4BP/SF-1と協同して芳香化酵素遺伝子の発現に影響を及ぼす因子について解析した。その結果、DMY、DMRT1、Dax1、Dax2はいずれも単独では芳香化酵素遺伝子の転写活性には影響を及ぼさないが、Ad4BP/SF-1による芳香化酵素遺伝子の転写促進作用を著しく抑制することが明らかになった(図19)。特に、DMRT1による芳香化酵素遺伝子の発現抑制作用は注目される。DMRT1はティラピアの精巣分化カスケードの最上流近くで作用すると推察されるので、その因子に卵巣分化カスケードの中心的因子である芳香化酵素遺伝子の転写を抑制する作用があることが示されたことは大き

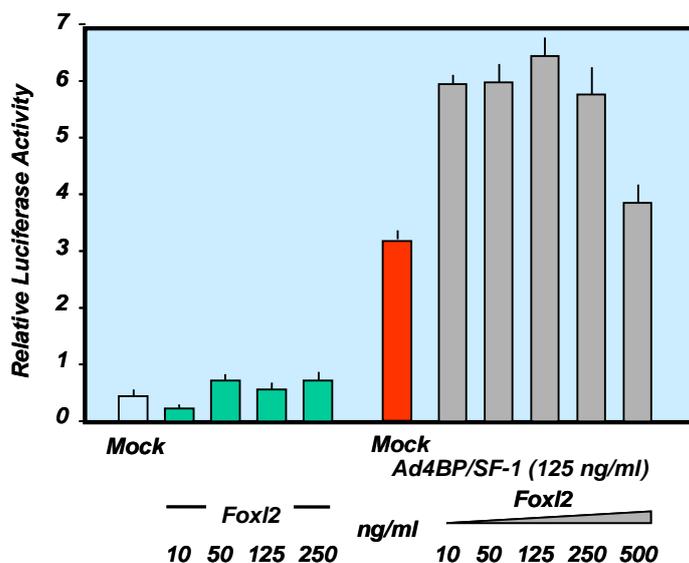


図20 Foxl2による芳香化酵素遺伝子の転写促進

く、その因子に卵巣分化カスケードの中心的因子である芳香化酵素遺伝子の転写を抑制する作用があることが示されたことは大き

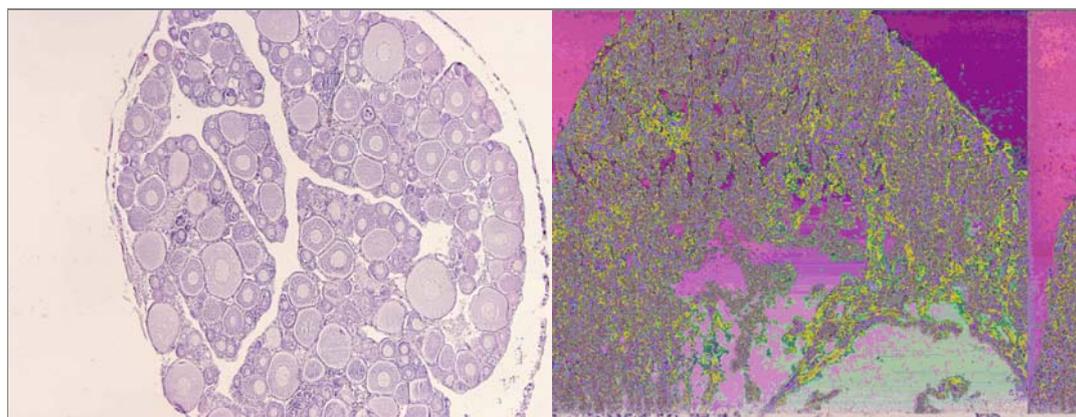


図21 Foxl2のドミナント/ネガティブ (トランスジェニックティラピア)

な意義がある。また、前述したDMRT1を過剰発現させたトランスジェニックXXティラピアの雄への性転換のメカニズムを考える上でも重要である。この発見は、脊椎動物における生殖腺の雌雄性分化カスケードの中心的因子が直接に影響しあうことを示唆する最初の例としてきわめて重要であり、今後の生殖腺の性分化研究に大きな影響を与えると考えられる。

一方、Ad4BP/SF-1による芳香化酵素遺伝子のプロモーター活性の促進作用をさらに上昇させる因子としてFoxl2が本研究で新たに同定された(図20)。この場合にも、Foxl2単独では芳香化酵素遺伝子のプロモーター活性には影響を与えない。また本研究により、Ad4BP/SF-1とFoxl2とはそれぞれの蛋白質同士が直接結合することもプルダウンアッセイを用いて確かめられた。前述したように、Foxl2は芳香化酵素遺伝子とともにティラピアの卵巣分化に先立ち雌特

異的に発現する。従って、Foxl2は芳香化酵素遺伝子の雌特異的発現に深く関わっている可能性が考えられた。そこで、Foxl2を遺伝的全雌（XY）群に過剰発現させたトランスジェニックテラピアを作成した。その結果、形成された生殖腺は精巣ではあるものの、その周辺部が著しく退行した個体が出現した。この場合には、Foxl2が作用することで芳香化酵素遺伝子の発現が起こり、さらにこれにより合成されたエストロゲンが精巣の退行をもたらしたものと推察される。本研究では、卵巣分化カスケードにおけるFoxl2の役割をさらに検討するために、XX個体におけるFoxl2の機能を抑制する実験を実施した。この目的のためにFoxl2のドミナント・ネガティブミュータントを作成した。このFoxl2ミュータントはDNA結合配列を有するが、トランスアクティベーション配列を欠失する。このようなトランスジェニック個体の一部は、図21で示されるように、遺伝的にはXX個体でありながら完全に性転換を起こし、成熟した精巣を有していた。従って、Foxl2はテラピアの卵巣分化に深く関わっていることが推察され、またその基本的メカニズムとしては、Ad4BP/SF-1の作用を介した芳香化酵素遺伝子の発現促進であると考えられる。

1) 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

A) 生殖腺の性分化に及ぼすエストロゲンの影響

テラピアのXY個体を、孵化後4-6日の期間にわたりエチニルエストラジオール等の外因性エストロゲンで処理すると、本来のXY生殖腺で起こる生殖細胞の増殖停止はみられず、XX生殖腺でみられる生殖細胞の増殖が起こり、生殖腺は卵巣へと分化した。この時、DMRT1遺伝子の発現は完全に抑制され、かわってエストロゲン合成酵素遺伝子群の発現が急速に誘導され

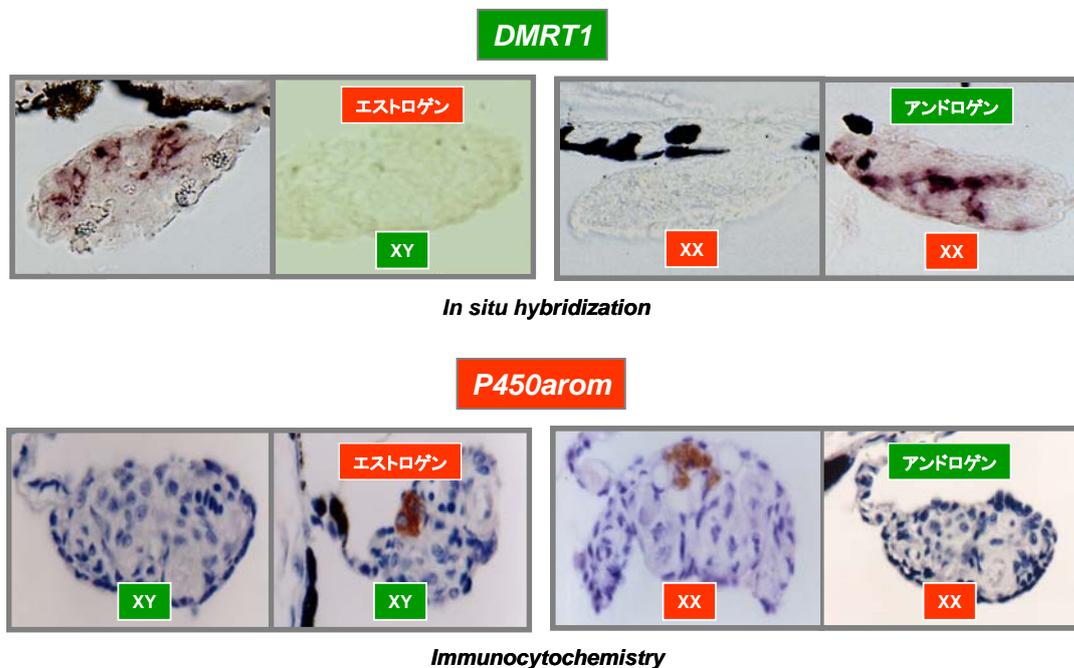


図22 ティラピア性分化期雌雄生殖腺における遺伝子発現に及ぼす性ホルモンの影響

た（図22）。エストロゲン受容体は α 、 β 型ともに遺伝的雄の生殖腺でも孵化5日後までにはすでに発現しているので、外因性のエストロゲンの作用はこれらの受容体との結合を介していると考えられる。

B) 生殖腺の性分化に及ぼすアンドロゲンの影響

孵化直後のティラピアXX個体をメチルテストステロン等の外因性アンドロゲンで処理すると、本来のXX個体で起こる生殖細胞の増殖はみられず、生殖腺は精巣に分化した。ここで、アンドロゲンの雄化作用機構として、用いたアンドロゲンの直接的な作用、或いはエストロゲンの合成系の抑制などを介した間接的機構が考えられる。この点に関しては、性分化期のXX個体をメチルテストステロンで処理すると、生殖腺での芳香化酵素の発現が急速に消失することが分かったので、アンドロゲン作用はエストロゲンの合成抑制を介した間接的なものである可能性が高いと判断される（図22）。

C) アンドロゲンによるアンドロゲン受容体を介した芳香化酵素遺伝子の発現抑制

他の脊椎動物とは異なり、ティラピアの卵巣には2種類の芳香化酵素遺伝子（卵巣型、脳型）が存在することを示した。このうち卵巣型芳香化酵素遺伝子の5'上流域には、アンドロゲン応答配列が存在する。エストロゲン受容体の発現がみられない哺乳類の293細胞を使い、芳香化酵素遺伝子のプロモーターにレポーターとしてルシフラゼを繋いだコンストラクトとAR (α , β)、ER (α , β) の発現ベクターとを共発現させると、いずれのARもメチルテストステロンの濃度依存的に芳香化酵素遺伝子の転写活性を強く抑制した。このような影響はERを共発現させた場合には認められなかった。従って、メチルテストステロンはARを介して芳香化酵素遺伝子の発

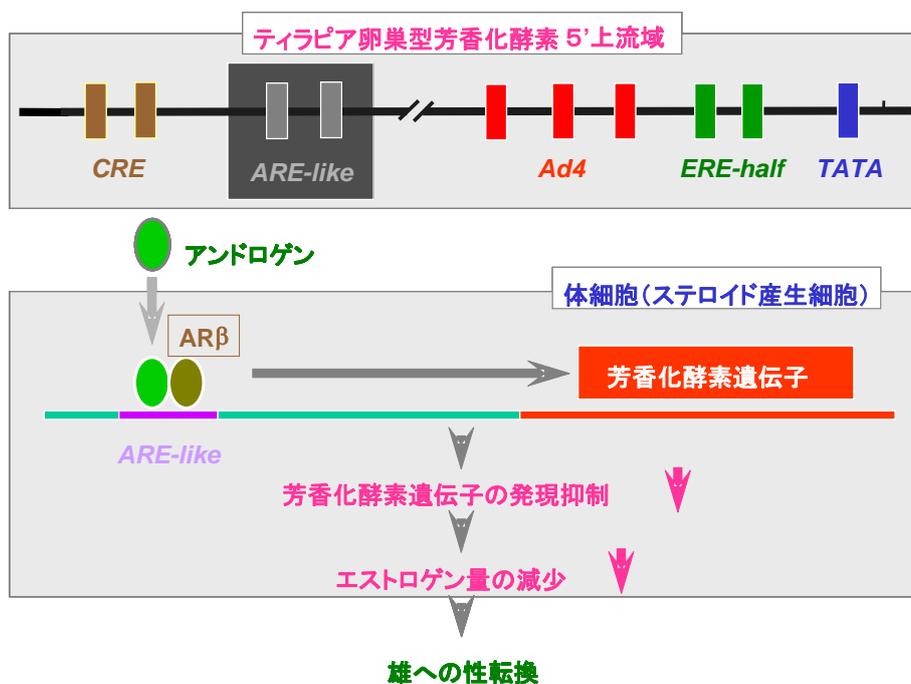


図23 アンドロゲンによる卵巣型芳香化酵素遺伝子の発現抑制（雄への性転換）

現を抑制しているものと考えられる(図23)。孵化後15日のXX個体の生殖腺にはAR α が発現しているため、この受容体がアンドロゲン作用を仲介する可能性が高い。

アンドロゲン処理によりXX生殖腺で精巣が誘導された場合にも、正常の精巣形成の際に起こるDMRT1の特異的発現が起こった。ところがこの実験で、アンドロゲン処理を行う前にDMRT1のモルフォリノアンチセンスオリゴをXX生殖腺に導入しておくこと、アンドロゲン処理の後でも精巣の発達は認められず卵母細胞をもつ典型的な卵巣が形成された。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を導入すると、アンドロゲン処理単独の場合と同様に性転換が誘導され、完全な精巣組織が形成された。従って、アンドロゲン処理によるXX個体の精巣分化誘導にも、XY生殖腺における正常な精巣形成と同様にDMRT1遺伝子の発現が必須であることが明らかになった。

III. 精子形成

内分泌かく乱物質が及ぼす影響のなかで、生殖系、特に精子形成過程への影響が、精子数の減少との関連で注目されている。そこで、精子形成の基本的制御機構の研究が重要となるのであるが、これまで実験系に限られているため、この分野の研究の進展は必ずしも満足するものではない。そのような状況の中で、我々はウナギの未熟精巣を用いた無血清器官培養系を確立し、これを駆使してホルモンによる精子形成の開始機構を解析してきた。また最近、同様な精巣器官培養系をティラピアでも立ち上げた。本研究では、この器官培養系を主な研究手法に用い、分子生物学的、発生工学的研究手法も併用しながら、精子形成の基本的制御機構と性ホルモンと内分泌かく乱物質の精子形成に及ぼす直接的な影響と作用メカニズムを明らかにすることを目指した。

1) 基本的メカニズム

精原幹細胞から精子までの全精子形成過程をin vitroで再現できるウナギ精巣器官培養系を用いて、精子形成の開始・進行に伴う精原細胞の分裂・増殖の詳細を明らかにすることを試みた。そのために、細胞周期関連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。

これらの中で、サイクリンE1 mRNAが精子形成過程を通して著しい変化を示さなかったのに対して、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た。また、サイクリンE2の発現は精原細胞期に限定された。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。減数分裂期移行前にその発現は見られなくなるが、その後、第2次精母細胞から精細胞にかけてその発現が見られる。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。サイク

リンA2 は、精原細胞と、第2次精母細胞、精細胞に加えて、セルトリ細胞を含む精巣を構成する体細胞に、その局在が見られた。減数分裂初期に特異的に発現するDmc1 タンパク質は、第1次精母細胞の初期のステージにのみ局在する。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は、第1減数分裂後期から、即ちパキテン期以降の第1次精母細胞から精細胞まで特異的に発現することが明らかになった。

3種のB型サイクリンについて、同様にホルモンによる精子形成誘起過程におけるRNAの発現を調べた。サイクリンB1、B2は精原細胞から精母細胞期に発現が見られたが、一方、サイクリンB3は精原細胞にのみ特異的にその発現が見られることが明らかとなった。タンパク質の発現を調べた結果、mRNAと同様な発現が観察された。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。mRNAの発現と同様に、サイクリンB1及びB2タンパク質は精原細胞と精母細胞にその局在が観察された。これに対して、サイクリンB3タンパク質は精原細胞にのみ、その局在が特異的に見られた。これらの結果より、ニホンウナギではサイクリンB3は減数分裂ではなく、精原細胞の分裂・増殖に関与していることが示唆された。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の結果をもとに、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た。精子形成開始におけるE型サイクリンの機能を明らかにするため、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わかった。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、これらの結果は、サイクリンE2の発現の増加が、精子形成の開始、即ち幹細胞（A型精原細胞）から分化型細胞（B型精原細胞）への移行に重要な役割を担っていることを示唆している。

2) 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

A) エストロゲンによる精原幹細胞の増殖促進

ティラピア稚魚精巣を用いたin situ ハイブリダイゼーションにより、この時期の精巣では脳型の芳香化酵素が精原細胞を支持するセルトリ細胞で特異的に発現していることが初めて明らかとなった。そこで、前述したウナギの精巣の器官培養系と同様な器官培養系をティラピア精巣でも確立し、その系を用いてエストロゲン処理の影響を調べた。まず、HCG（ヒト絨毛性腺刺激ホルモン）により、エストラジオール-17 β の生合成が促進されることがわかった。このエストロゲン生合成は、テストステロンの濃度依存的に起こった（図24）。次に、生殖細胞が精原幹細胞のみをもつ時期の精巣を用いた実験により、低濃度のエストラジオール-17 β は

精原幹細胞の増殖を促進することが明らかとなった（図25、26）。

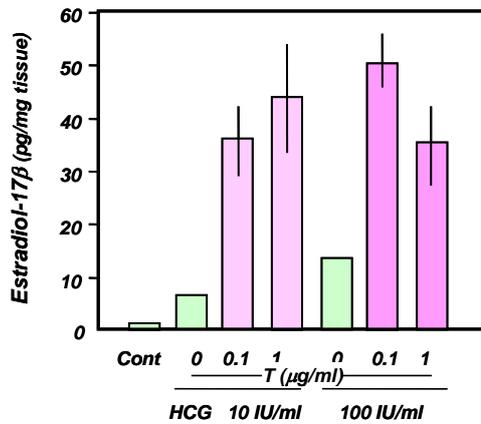


図24 HCGによる精巣芳香化酵素活性の促進

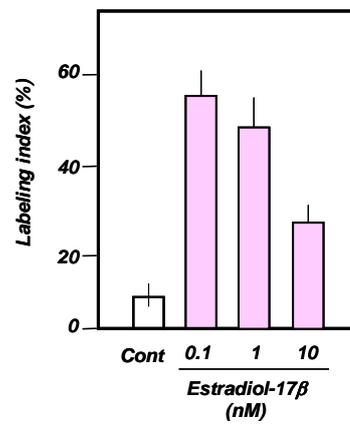


図25 精巣における芳香化酵素活性

しかし、高濃度のエストロゲン添加では精原幹細胞の増殖は阻害される傾向にあった。また、いかなる濃度のエストロゲン添加により精子形成が誘起されることはなかった。これらの結果は、精原細胞を支持するセルトリ細胞によって生合成されたエストロゲンが精原細胞の増殖調節を行っていることを明確に示している。本研究で、精子形成過程におけるエストロゲンの働きの一つが特定されたことは、今後の精巣発達や精子形成に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用機構を解析する上で重要である。

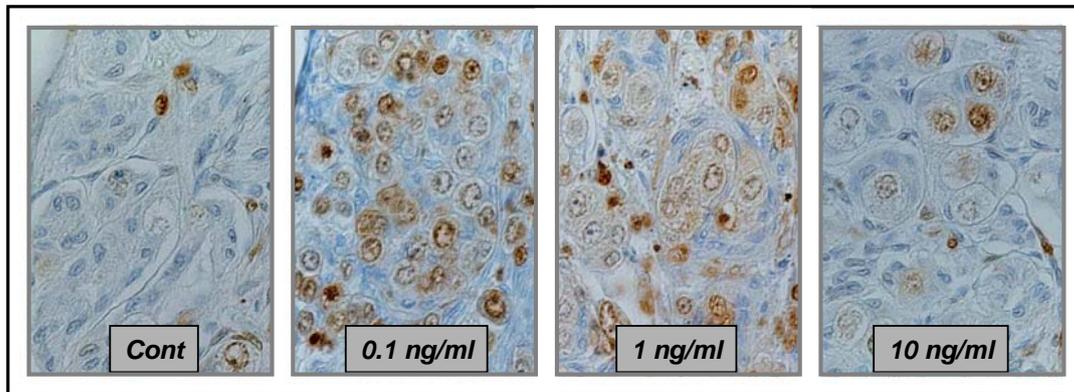


図26 エストロゲン処理による精巣での生殖細胞分裂活性の上昇

IV. 卵成熟

卵成熟は卵を受精可能にさせる重要な過程であり、脊椎動物を通して脳下垂体から一過性に分泌されるLHによって引き金を引かれると考えられている。しかし、LHが卵巣に働いてどのような機構で卵が成熟し、受精能を獲得するかについては哺乳類などではよく分かっていない。LHによる卵成熟誘起のホルモン調節機構が脊椎動物でもっともよく明らかにされているのは魚類を用いた研究である。本研究では、特にステロイド性卵成熟誘起ホルモンの生成と作用に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用メカニズムを解析した。

1) 基本的メカニズム

A) 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プロゲステロン系のステロイドである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、その作用はノンゲノミックであり、卵母細胞膜に局在する抑制性のGタンパク質に連結した膜受容体を介することが我々自身の研究から分かっていた。最近、米国の Peter Thomas らは卵成熟誘起ホルモン (17 α ,20 β -DPの類似ステロイド) 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することに成功したが、この受容体はGタンパク質に連結するステロイドの膜受容体として遺伝子構造が明らかになった最初の例である。そこで我々も早速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試み、 α と γ の2型のプロゲステロン膜受容体をクローニングした。さらに、RACE法によって、これらの遺伝子の全長cDNA配列を決定し、それぞれ、OIGPCPR- α (*Oryzias latipes G-protein coupled progestin receptor- α*) と OIGPCPR- γ として塩基配列データベースに登録した。OIGPCPR- 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、OIGPCPR- 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、特に脳で強い発現が見られた。一方、 γ タイプ受容体は卵巣と精巣でのみ発現が見られた(図27)。さらに、OIGPCPR- 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、OIGPCPR- β とした。ノーザンブロット解析では、OIGPCPR- β のシグナルは、どの組織

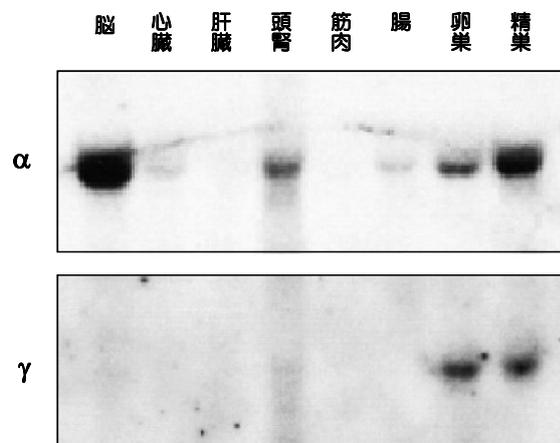
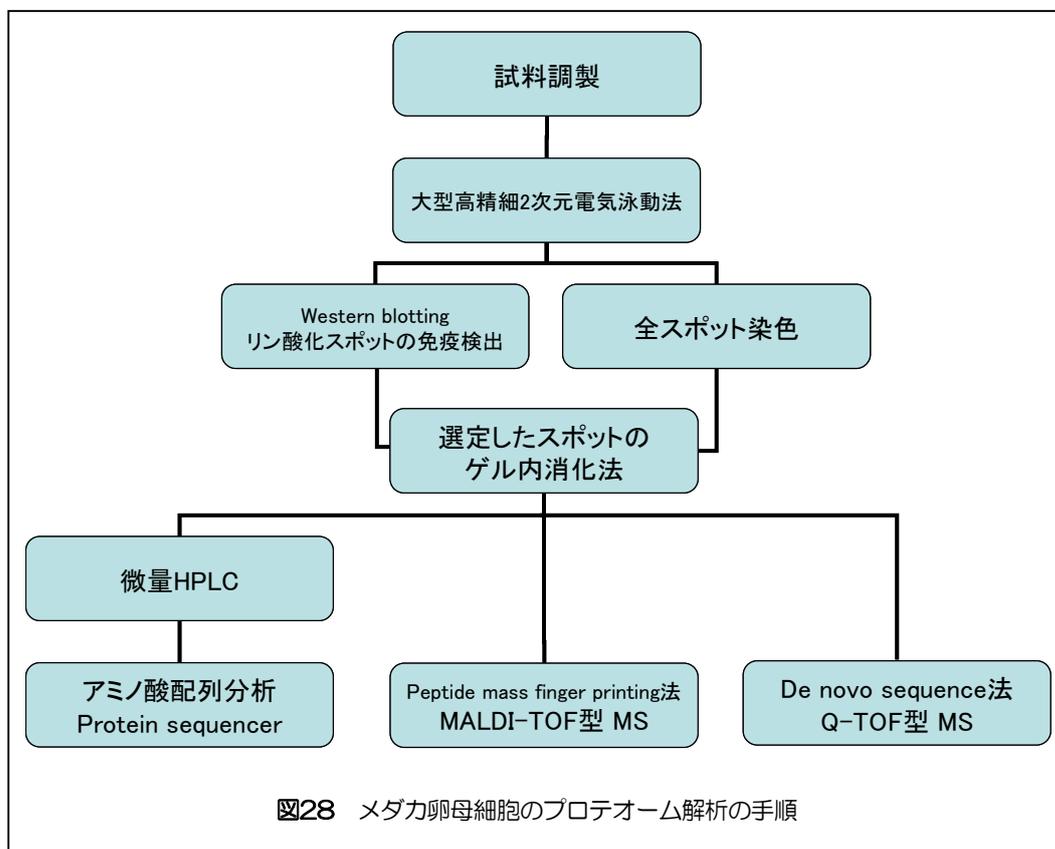


図27 ステロイド膜受容体の組織分布

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。OIGPCPR- α とOIGPCPR- 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、OIGPCPR- α とOIGPCPR- 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。OIGPCPR- α 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わからない。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、これまでには知られていないが、脳においてもプロゲステロ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、今後調べていく必要がある。

B) 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することを試みた。この解析法では、生体の細胞・組織で発現する全てのタンパク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。従って、これを用いることで、一つ一つのタンパク質の追跡だけでは明らかにできない、同時並行的に起こるより高次の生体調節機構を明らかにすることができるようになる。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。本法の確立によって、内分泌かく乱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。

本課題ではまず、卵母細胞に含まれる全蛋白質を大型高精細2次元電気泳動法により網羅的に解析し、その中から、情報伝達に関わると考えられるリン酸化蛋白質スポットを選定し、それらをアミノ酸解析又は質量分析により同定する一連のプロトコル、メダカ卵母細胞のプロテオーム解析法を確立した。本課題で構築した方法は次の3つのステップ、1) メダカ卵母細胞を試料とする大型高精細2次元電気泳動法、2) 同ゲルを用いた大型Western blot解析法、3) メダカ卵蛋白質電気泳動スポットのゲル内消化法、からなる(図28)。

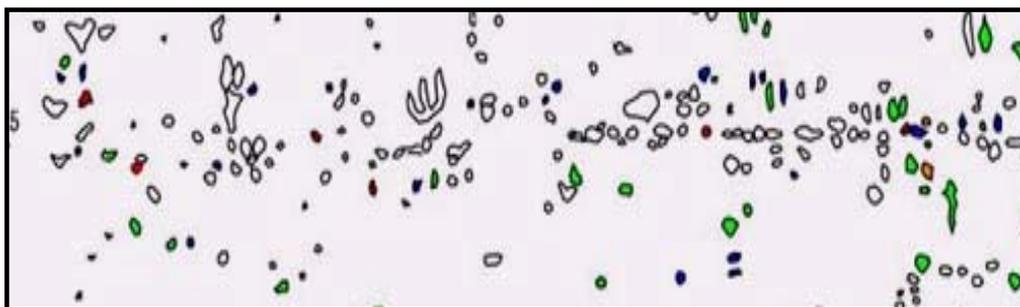


図29 成熟直前のメダカ卵の2次元電気泳動パターン

調製する試料として2種類を準備したが、そのひとつは、卵成熟誘起ステロイドホルモンに対する感受性の獲得過程の解析のための試料である。同一個体から産卵前21時間と45時間前の卵母細胞群を選び、それぞれ成熟能獲得卵と未獲得卵とした。本課題で採用している大型2次元電気泳動法により検出されるスポットは、全泳動領域で2000を超えるが、現在までに詳しい解析が完了したのは、泳動範囲としては、等電点4.7-6.0、分子量5,500-66,000の領域で、スポット数は900に満たない。このうち、卵成熟能の獲得に伴い変化したものは、総数149スポット、内訳は、成熟能獲得に伴い増加したもの59、消失したもの5、3倍以上増加したもの61、逆に1/3以下になったもの24スポットであった。現在これらのスポットをin gel digestion-protein sequencer (又は mass spectrometer)で順次解析中である。

準備したもう一つの試料は、卵成熟誘起ホルモンが結合した直後に発動する細胞内情報伝達の経路解析のためのものである。産卵21時間前のメダカ卵巣から、すでにホルモン感受性を獲得し成熟可能な卵母細胞を選び、この卵にin vitroで17 α ,20 β -DPを添加し卵成熟誘起刺激を与えた後、0分、1分、5分、15分間の培養後、卵可溶化緩衝液でホモゲナイズして培養を停止させた。泳動後、専用で作成した大型電気転写装置でWestern blottingを行い、blot膜上のリン酸化蛋白質(抗リン酸化セリン抗体、同スレオニン抗体、同チロシン抗体を使用)、全蛋白質(Sypro Ruby染色)を検出した(図29)。ホルモン刺激後、15分間にリン酸化度に変化の見られたスポットは、総数55スポット、内訳は、新たにリン酸化されたもの及びリン酸化量が増加したもの22、リン酸化が消失したもの4、リン酸化量に一過性的変化が見られたもの29スポットであった。これらのリン酸化量の変化を時間軸に沿って解析し、変化するスポットを辿り逐次、同定することで、一つの蛋白質リン酸化カスケードを構築出来る。本課題でこのカスケードに関わると考

えられる候補スポットを選定することが出来たので、今後これらを順次、同定していくことで卵成熟誘起ホルモンの細胞内情報伝達経路を解明することができると期待している。

V. 成体（魚）の性的可塑性

前述したように、ティラピアなどの雌雄異体魚でも発生初期の性分化の生殖腺は性ホルモン処理等に対して高い感受性を有し、性転換を起こす。しかし、これまで脊椎動物を通して、成体（魚）においては性ホルモン等に反応して性転換することはまったく報告されていない。すなわち、成体では性的可塑性を失うと考えられていた。しかし我々は、自然界では環境水などの化学物質に長期間にわたって暴露される可能性があるため、性転換魚と雌雄異体魚の成魚を実験材料としてこの問題を改めて検討することにした。

1) 性転換魚

サンゴ礁に生息する性転換魚（雌から雄に性転換する日本産ベラ、*Halichoeres trimaculatus*、と雄から雌、雌から雄へと条件が整えば同一個体が両方向の性転換を繰り返すオキナワベニハゼ、*Trimma okinawae*）は性ホルモンや内分泌かく乱物質による性転換誘起のメカニズム研究の良いモデルとなる。我々は先にこれらの魚の性転換は個体の大きさをもとに視覚によって起こることを明らかにしたが（図30）、さらに本研究で、生殖腺の性転換はエストロゲン合成の鍵酵素である芳香化酵素の遺伝子発現のオン、オフが引金となり起こることを明らかにした（図31）。更に、ベラ雌から分離された卵巣片を芳香化酵素阻害剤（ファドロゾール）と器官培養することにより卵巣の退行、更には精巣分化を誘導させることに成功した。この実験は *in vitro* で生殖腺の性転換誘導に成功した脊椎動物で最初の例である。

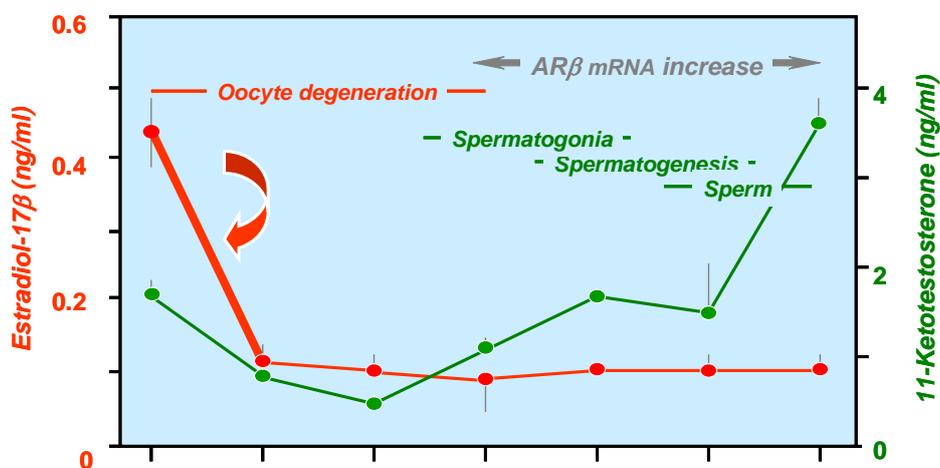


図30 ハワイ産ベラの雌から雄への性転換時における血中性ホルモン量の変動



図31 両方向性転換魚の雄から雌への性転換実験

次に、オキナワベニハゼに関しては、再現性の高い両方向性転換実験系を確立した（雌→雄への機能的性転換は5日間、逆に雄→雌への性転換は約10日間）。この実験系を駆使することにより、視覚刺激の入力から8時間以内に性行動の転換、12時間以内に生殖腺における生殖腺刺激ホルモン受容体（GtHR、LHRとFSHRともに）遺伝子発現の急激な変動が起こることを明らかにした（図32）。

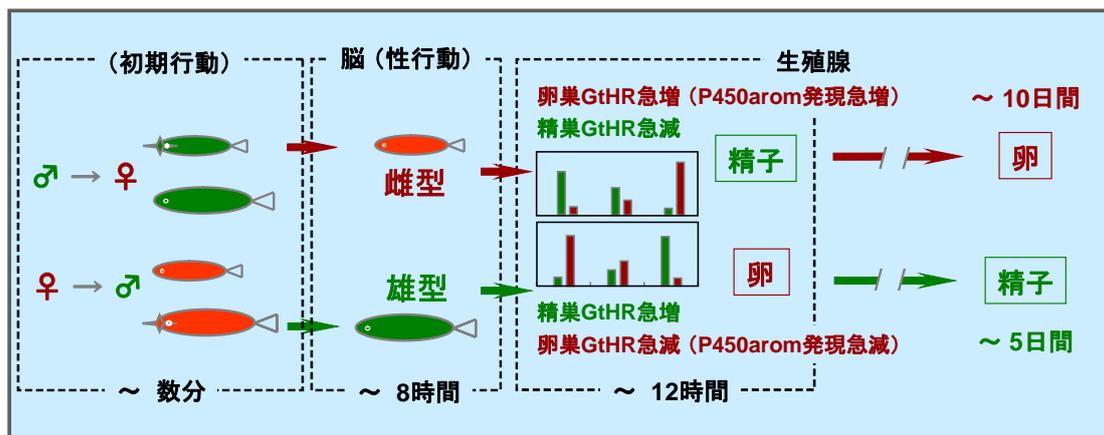


図32 オキナワベニハゼの性転換の時間的経過（性行動、生殖腺の遺伝子発現）

2) 雌雄異体魚

A) 雌ティラピアの生殖腺（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（図33）。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（図34）。この実験結果から、多くの卵母細胞からなる卵巣

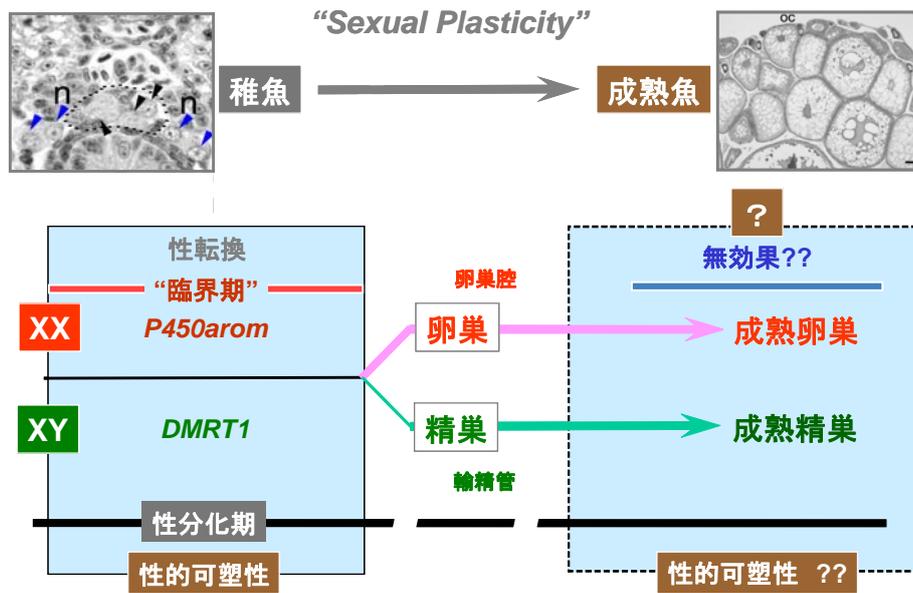


図33 性分化期と成体の魚類における性的可塑性

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 (plasticity) がさらに明確となった。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いる。

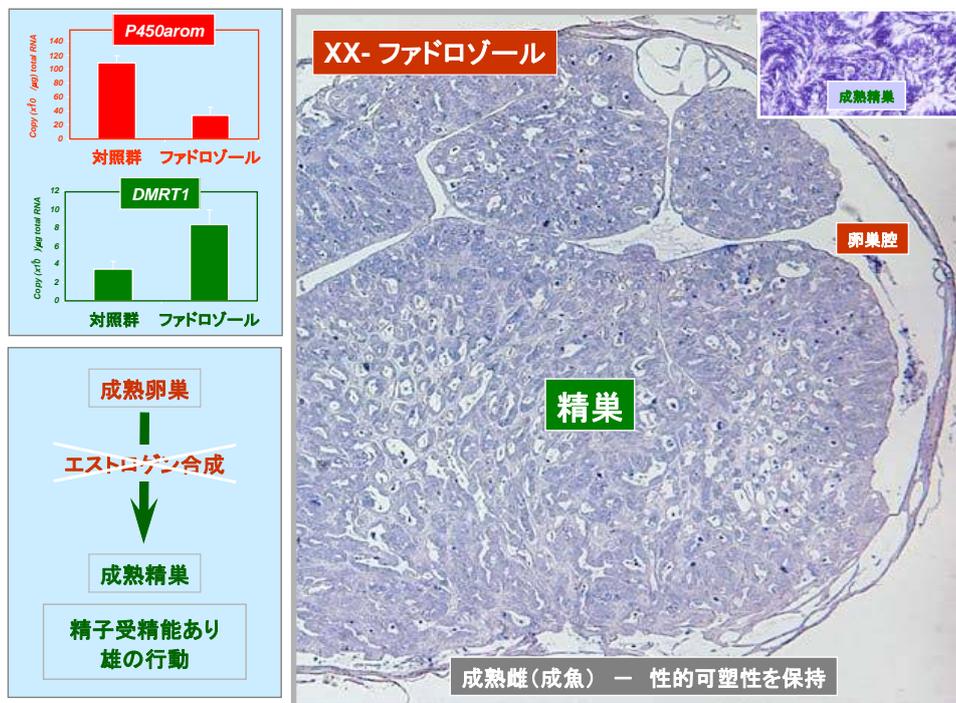


図34 フアドロゾール (エストロゲン合成阻害剤) 処理によるティラピア成魚雌の性転換

B) メダカの性行動

メダカ胚を孵化前に性ホルモンで処理することで、遺伝的な性に関わらず、人為的に性の表現型をコントロールできることが知られている。このことは、メダカの脳は、少なくとも発生過程では性的可塑性をもつことを意味している。今回我々は、メダカの脳が発生過程だけでなく、性成熟後も性的可塑性を保持しているか否かを明らかにする目的で、メダカ成魚を、異性に特有な性ホルモンで処理し、異性の性行動が誘起されるかを調べた(図35)。10 ng/mlのエストラジオール (E2) を含む水で飼育した雄のメダカ成魚を、通常の雄メダカ成魚とペアにし、しばらく行動を観察した。その結果、E2処理した雄は、E2処理2日目から雌型の性行動を示すようになり、通常の雄と交差(哺乳類の交尾に相当する行動)まで行った。また、E2処理の期間を長くするにつれて、単位時間当たりの交差回数はともに増加した。このことから、雄

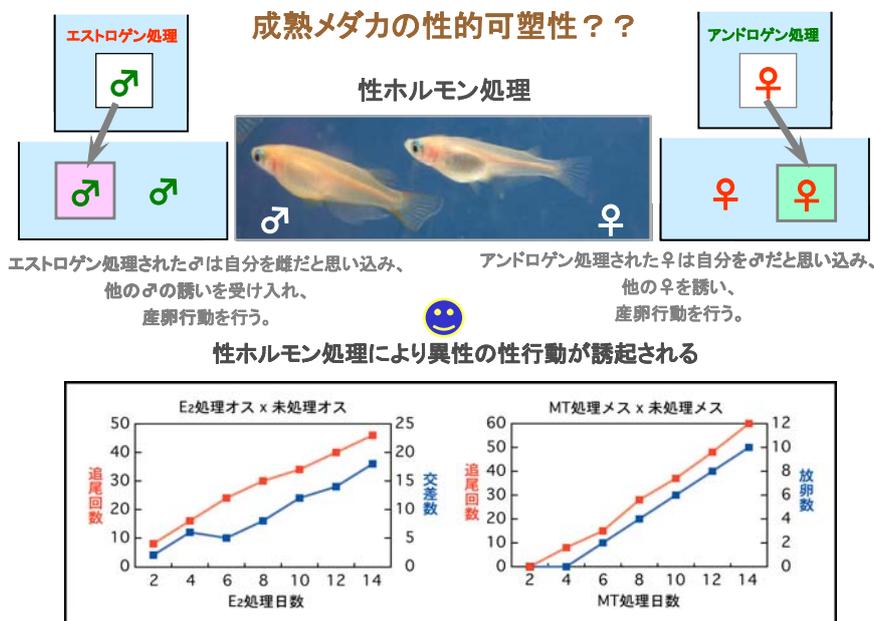


図35 性ホルモン処理によるメダカ成魚における性行動の転換

のメダカ成魚の脳は、雌性ホルモンで処理することにより、雌化し得ること、また、その転換には(実験に使用した濃度では)数日を要することが示された。また逆に、10 ng/mlのメチルテストステロン (MT) を含む水で飼育した雌のメダカ成魚を、通常の雄のメダカ成魚とペアにし、しばらく行動を観察した。その結果、MT処理した雌は、処理後4日目から雄型の性行動を示し、通常の雌と交差を行うようになった。その際、通常の雌が実際に卵を放出することも確認された(雌同士の行動なので、受精はできない)。また、MT処理の期間を長くするにつれて、単位時間当たりの交差回数は増加した。このことから、雌のメダカ成魚の脳も、雄性ホルモン処理により、雄化し得ること、また、その転換には(実験に使用した濃度では)数日を要することが示された。以上の結果から、メダカもオキナワベニハゼなどの性転換魚と同様、性成熟後も脳の性的可塑性を保持していることが明らかとなった。自然条件下で性転換を行う魚種であるか否かに関わらず、魚類は一般的に、生涯にわたり、強弱の差(要する期間の違い)

こそあれ、脳の性的可塑性を保持している可能性が示された。さらには、魚類は、内分泌かく乱物質の影響がある環境中では、生殖腺が正常に発達したとしても、雄どうし、あるいは雌どうしが性行動を行うようになることで、無駄に配偶子が放出されるという新たな危険要因を有していることが示された。

VI. 内分泌かく乱物質のスクリーニング法の開発

1) 各種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

各種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の簡便で精度の高い検出系を開発することを目的として、それぞれのステロイド受容体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 -DP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。

2) 芳香化酵素プロモーターの転写活性測定系

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様々な濃度で添加し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

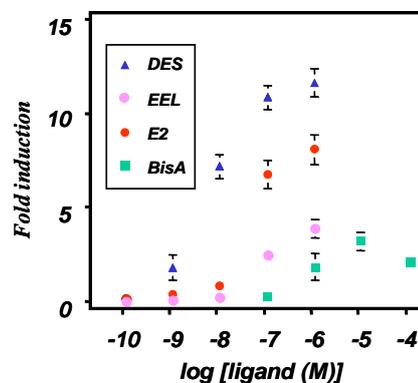


図36 内分泌かく乱物質による芳香化酵素遺伝子の転写活性促進

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、最終濃度10 μ Mにおいて対照群に比べ約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5倍、ビスフェノールAの約3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（図36）。

3) ティラピア生殖腺発現遺伝子のマイクロアレイ系

前述したように、ティラピアの生殖腺の雌雄分化は孵化後5日目頃から開始される。その分化に関わる遺伝子を網羅的に探索するためのマイクロアレイ系を作製した。このマイクロアレイ作製には、初期発生時期の雌雄生殖腺におけるランダムな発現遺伝子、及び5日目の雌雄生殖腺間において差分化されたcDNAを用いた。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、合計18,186クローンの塩基配列を決定した。そのシーケンスから5,486の独立シーケンスが得られた。また、孵化後5日目の雌雄生殖腺間からサブトラクト（差分化）cDNAライブラリーを作製し、“雌引く雄”および“雄引く雌”のサブトラクトcDNAライブラリーから合計5,304シーケンスを決定し、アセンブル解析の結果、2,897の独立シーケンスが得られた。両ライブラリーから得られた独立シーケンスのcDNAクローン、計8,383クローンをマイクロアレイにプリントした（図37）。

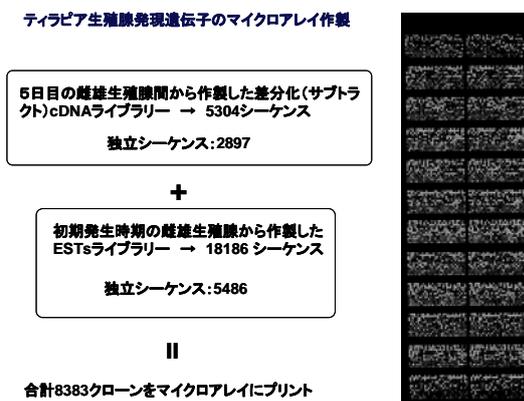


図37 性分化期生殖腺のマイクロアレイ

次に、孵化後5日目の雄および雌の生殖腺から調整したRNAサンプルを別々の色素で標識し（2色法）、それぞれを金粒子（Au）、または銀粒子（Ag）で検出した。2色法によるバイアスを解消するために色素とサンプルの組み合わせを入れ替えたダイスワップ実験も同時に行った。

まず、雄の生殖腺で優勢的に発現している遺伝子を探索した。雄生殖腺のRNAをAu、雌のRNAをAgで検出したマイクロアレイ解析では、シグナル/ノイズ比が1.0以上かつAu/Ag比が2.0以上のスポットは737個検出された。雄のRNAをAg、雌のRNAをAuで検出したダイスワップ実験では、シグナル/ノイズ比が1.0以上かつAu/Ag比が0.4以下のスポットは106個検出された。このうち、両実験で同時に選択されたスポットは35個であった（図38）。

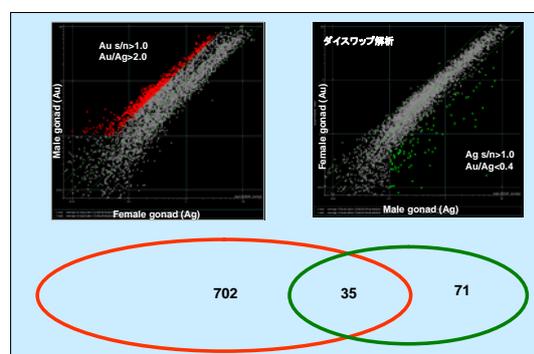


図38 ティラピア性分化期生殖腺のマイクロアレイ

次に、選択された35スポットの遺伝子の初期発生時期の生殖腺における発現をリアルタイムPCR法で厳密に調べたところ、雄の生殖腺で雌に比べて数百～数千倍高く発現している遺伝子が特定された(図39)。この遺伝子はブラスト解析では既知の遺伝子にヒットしないため現時点で正体は明らかではないが、今後全長を決定することでどのような分子であるかは明らかにされるだろう。一方、他の多くの遺伝子も雄生殖腺で2～3倍程度高く発現していた。

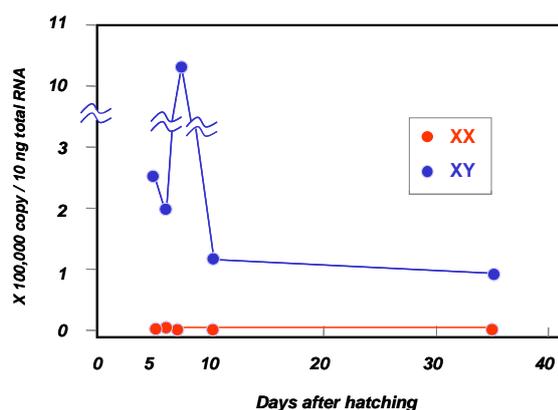


図39 性分化期XY生殖腺で発現が上昇する遺伝子

以上の結果から、本マイクロアレイを用いたスクリーニング法は、雌雄生殖腺間で特異的に発現している遺伝子を特定する強力なツールになると期待され、内分泌かく乱物質のスクリーニングにも非常に有効であると考えられる。特に、雌雄生殖腺間でサブトラクトされたcDNAをプリントしてあることが特徴であり、この点が利用効率の向上につながったと判断される。

4) 器官培養系

生殖腺の性分化に及ぼす性ホルモンや内分泌かく乱物質の影響を直接的に解析する実験系が必要である。その点ティラピアは、遺伝的全雌、全雄が作出できること、生殖腺の扱いが容易であること、加えてホルモン投与による実験系が確立していることなどから、内分泌かく乱物質の生殖腺の性分化に与える影響を研究するための実験動物として適していると言える。テ

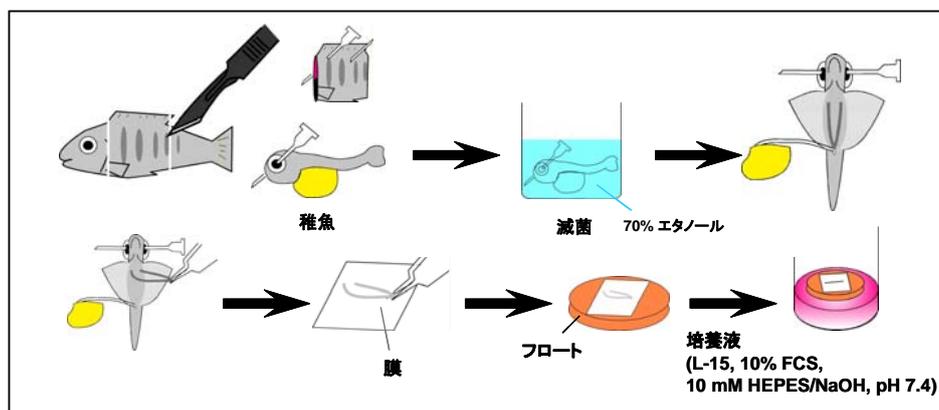


図40 ティラピアの性分化期生殖腺の器官培養系

ィラピアの生殖腺の形成過程を観察すると、孵化後3-4日で体腔上皮の肥厚として観察され、4～5日には、体腔内に垂れ下がり一対の生殖腺となる。この時の生殖腺の大きさは、およそ、幅20 μm、長さ1 mmである。この時期には、雌雄の形態的な差異は見とめられない。その違いが認められるようになるのは、雌において卵巣腔が形成される23-25日になってからであ

る。従って、この時期の生殖腺を未分化生殖腺と呼ぶ。しかし、形態的な変化に先立ち、雌においてエストロゲンの産生が孵化後7日には開始されることがエストロゲン合成に重要なステロイド合成酵素である芳香化酵素の特異抗体による免疫染色により明らかになった。それゆえ、5-7日までの性分化過程に及ぼす内分泌かく乱物質の影響を明らかにすることが重要である。

本研究で、分化した生殖腺はもとより、これまで困難とされてきたきわめて微小な孵化後5日の未分化生殖腺を取り出すことに成功するとともに、その生殖腺を用いての短期・長期器官培養が可能となった。孵化後5日の生殖腺を摘出し、15日間以上の培養が可能であり、培養後には生殖細胞と体細胞ともに増殖する(図40、41)。しかし、雌分化の指標となる芳香化酵素は検出されなかった。これに対し、すでに芳香化酵素が検出される、分化の進んだ孵化後21日以降の生殖腺の培養では、培養後も芳香化酵素の反応は維持された。さらに、卵巢腔形成期や孵化後4ヶ月の生殖腺でエストロゲン処理を行った結果、卵巢腔の形成やエストロゲン産生細胞への影響が観察された。このことから、我々の確立した培養系は、生体内を反映し、内分泌かく乱物質の性分化への影響を調べる良い系を立ち上げられたと考えられる。また、エストロゲン添加によって卵巢腔の形成が促進されることがわかった。これにより、エストロゲンは卵巢腔の形成にも直接的に作用することが示唆された。



図41 ティラピアの性分化期生殖腺の器官培養。孵化後5日のXX生殖腺を15日間器官培養したものと(左)とその対照群(右)。

以上述べてきたように、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、今回報告した培養系は、エストロゲンだけではなく、性分化における内分泌かく乱物質を含めた様々物質まで範囲を広げ、生殖腺分化に対してその作用機構の詳細を調べられる系と考えられる。

5) トランスジェニックメダカ系統

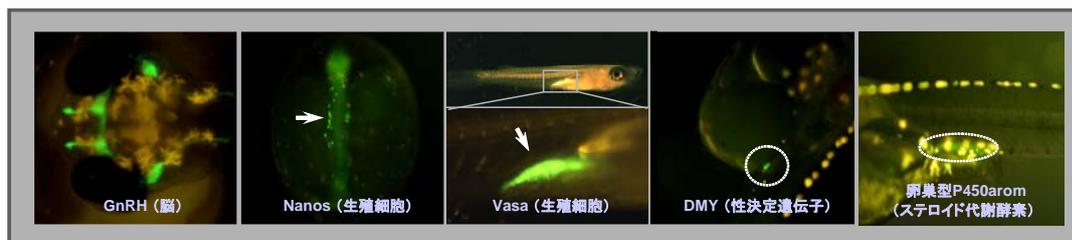


図42 メダカのGFPトランスジェニック系統

本研究で、魚類の生殖系に及ぼす性ホルモンや内分泌かく乱物質の影響を生きのまま同一個体でモニターすることができるトランスジェニックメダカを数系統作出することができた。メダカは胚や稚魚が透明であることから発生生物学的研究には格好の小型魚類である。目的とする遺伝子の制御領域にGFPをつなぎ、メダカ受精卵にマイクロマニピュレーターにより導入した。導入した遺伝子は、発現が生殖細胞に特異的な*Vasa*と*Nanos*をはじめとして、性分化の制御（精巣分化）に関わる遺伝子である*DMY*と*DMRT1*、さらには芳香化酵素遺伝子と生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）などである（図42）。

このようなGFP-トランスジェニックメダカ系統が環境中の内分泌かく乱物質を含む化学物質の影響を調べるための有益なツールになり得ることを示す一例として*Vasa*遺伝子を用いた実験例を示す。*Vasa*は哺乳類や魚類をはじめとして多くの動物において生殖細胞に特異的に発現することが知られているが、その機能についてはまだ明らかではない。*Vasa*のGFP-トランスジェニック系統の遺伝的雌雄をそれぞれアンドロゲン（メチルテストステロン）とエストロゲン（エストラジオール-17β）で数日間処理し、処理中及び処理後の期間について蛍光顕微鏡で観察した。その結果を図43に示すが、XX個体における生殖細胞数の増加がアンドロゲン処理により抑制され、XY個体における生殖細胞の分裂停止がエストロゲン処理により解除され、正常の雌と同様に生殖細胞の数の増加が観察された。

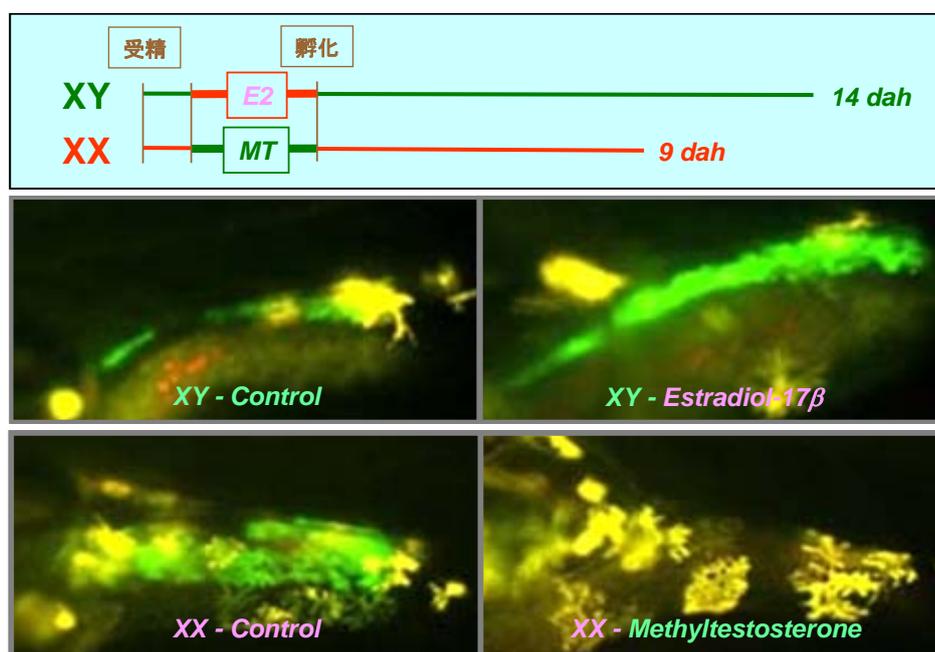


図43 性ホルモン処理によるメダカ生殖細胞数の増減（*Vasa*トランスジェニック系統）。
緑色で示される部分が*Vasa*陽性の生殖細胞。

2) 研究成果の今後期待される効果

研究代表者のグループの研究に関する今後における主な効果については研究全般のところで述べたのでここでは繰り返さない。本研究を遂行するにあたってこの研究グループは、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の分子、細胞レベルについての基礎的知見を収集することを目的とした。その結果、当初に計画された性決定/分化、精子形成及び卵成熟に関する分子、細胞レベルについての重要な知見をいくつか得ることができた。なかでも、メダカの性決定遺伝子*DMY*の発見と生殖腺の性分化カスケードを制御する2つの主要

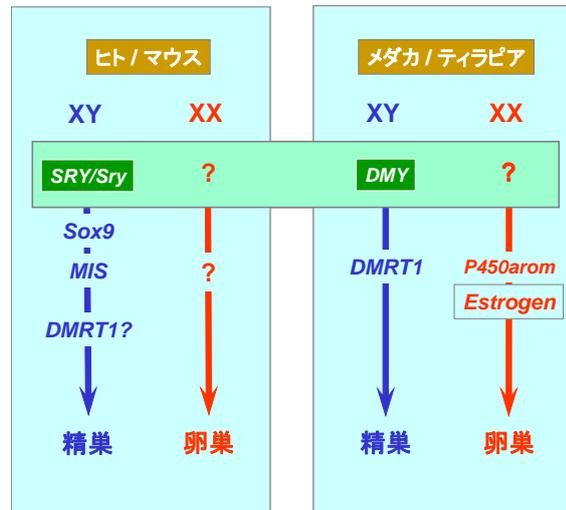


図44 哺乳類と魚類の性決定/分化のメカニズム

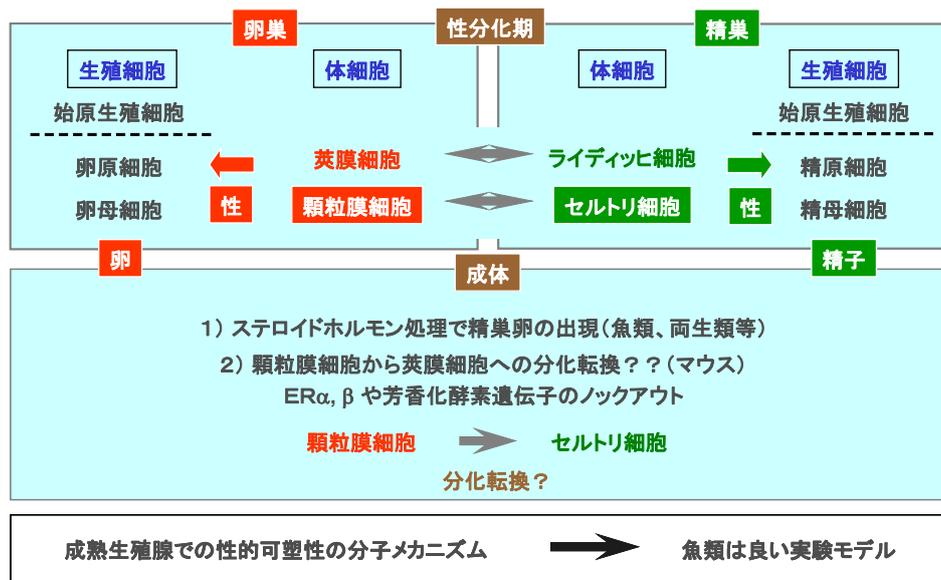


図45 脊椎動物における生殖腺の性的可塑性の分子メカニズム

因子 (*DMRT1*とエストロゲン) を同定することができたのは大きな成果である。その結果、魚類の性決定/性分化に関する知見は脊椎動物のなかでも哺乳類と並ぶほどになったといえる (図 4 4)。今後、性決定/分化の研究がもっとも進んでいる哺乳類でもまだ明らかにされていない性決定遺伝子の下流カスケードを解明する研究が、メダカをモデルに展開されることが期待される。一方、卵巣分化メカニズムに関する研究に関しても哺乳類ではまだ鍵因子が同定されていないので、エストロゲンによる卵巣分化の分子メカニズムの解明が期待される。また、本研究で新しく見出された成体 (魚) の生殖腺と性行動 (脳) における性的可塑性の保持については、脊椎動物における性の可塑性についてのこれまでの定説を翻す大きな発見であり、今後当

該分野で大きな反響を呼ぶことであろう。性分化期と成熟後の生殖腺に保持される性的可塑性の基本的メカニズムに主役を果たすのが生殖腺の体細胞であることが本研究ではじめて明らかにされた。今後、これら生殖腺体細胞（莢膜細胞、顆粒膜細胞、ライディッヒ細胞、セルトリ細胞）における細胞分化、脱分化、分化転換の可能性について詳しく追求する必要がある（図45）。内分泌かく乱物質の基本的作用メカニズムについての解答もこのような魚類を実験対象とした基礎的研究から生まれるかもしれない。

最後に、メダカでクローニングされた3種の新規プロゲステロン膜受容体に関する研究の重要性についても強調したい（図46）。本研究により、内分泌かく乱物質の一つ（DES）が、新規のステロイド膜受容体との結合を介して作用することがはじめて明らかにされた。近年、性ステロイドホルモンが関与していると考えられる生殖行動を含めた多くの内分泌現象が遺伝子発現では説明ができない時間的経過で発揮されるケースが知られている。内分泌かく乱物質の作用にもこのような例がいくつも報告されている。今後、このような問題の解決に、本研究で見出された膜受容体とそれに連結する細胞内情報伝達系の働きが大きく注目されることになる。

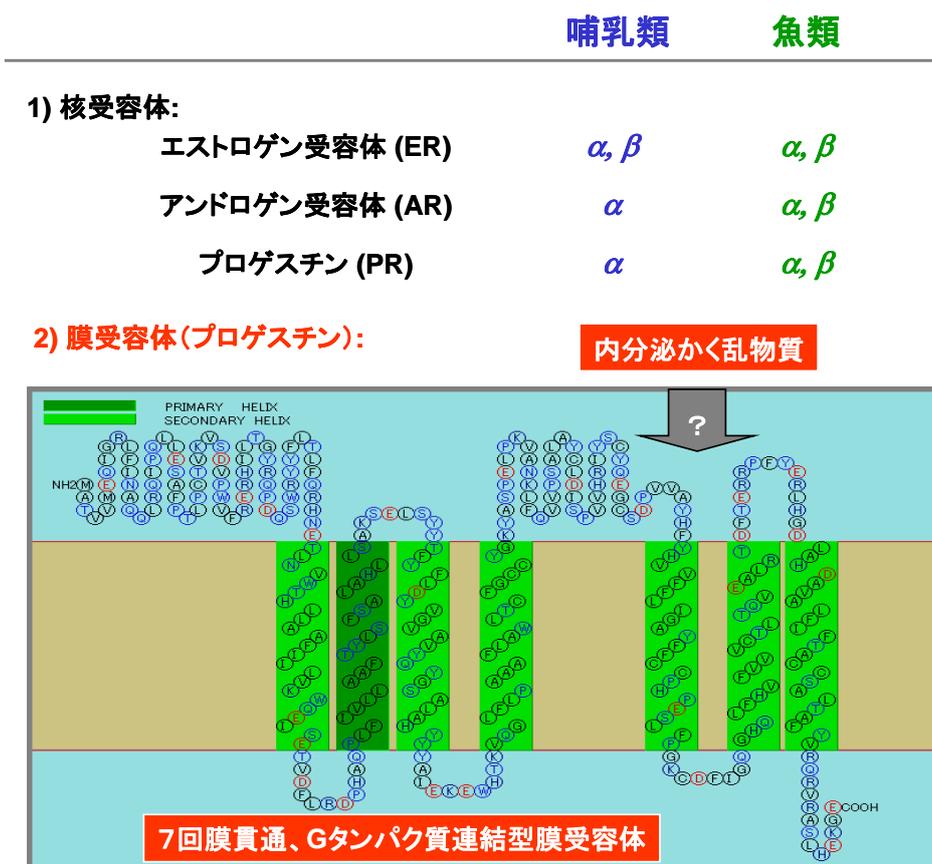


図46 ステロイド核受容体と新規にみつかったステロイド膜受容体

3. 2 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 (琉球大学、性転換・中村グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

1) 研究のねらい

魚類には性転換する種が多く知られている。性転換も多様で雌から雄に性転換する種（雌性先熟魚）、雄から雌に性転換する種（雄性先熟魚）、雌雄どちらに何度でも性転換する種（両方向性転換）などがある。性転換は群やハレム内の雌または雄が不在になることがきっかけとなって開始することが知られている。この社会的要因が視覚を通して脳に到達し、脳下垂体、神経系を介して生殖腺に到達して生殖細胞、および体細胞の分化の劇的変化を引き起こすものと考えられている。引き続いて、生殖輸管系、泌尿生殖突起、体色などの二次性徴も転換する（図47）。この性転換は、脳—脳下垂体—生殖腺系を中軸とした内分泌機構により調節されているものと考えられている。このため、性転換魚は外因性性ホルモンや内分泌かく乱物質の暴露に対して感受性が高いものと予想される。魚類の性転換現象は性分化後の成体で見られることから、卵巣または精巣として機能するために必要最小限の因子を調べるのに適している。比較的個体数を集め易く、飼育の容易な性転換魚の基本的機構を明らかにすることができれば、内分泌かく乱物質の影響や作用メカニズムの研究のための優れた実験系となることが期待される。

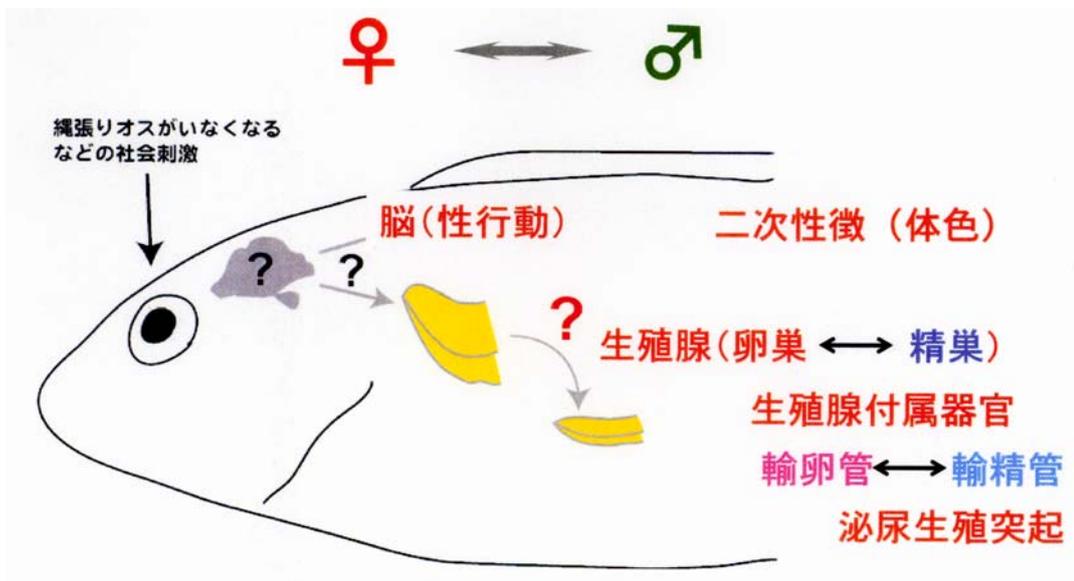


図47 魚類の性転換

性転換は、生殖腺の形態的な劇的な変化、つまり卵巣から精巣、精巣から卵巣へと変化する。その際、性転換に関連する遺伝子の発現の上昇、低下が起り性転換を調節しているものと考えられる。内分泌かく乱物質はこれらの遺伝子群をかく乱することで性転換を引き起こしたり、抑制するものとする。はじめに、正常な雄と雌の生殖腺および性転換の形態的な変化、内分泌調節機構を明らかにすること、次に、内分泌かく乱物質を暴露させ形態的な変化、関連遺伝子の発現変化を明らかにすることにより内分泌かく乱物質の影響評価の確立を目指した。

2) 研究実施方法

雌性先熟魚のミツボシキウセン (*Halichoeres trimaculatus*) とハワイ産ベラ (*Thalassoma duperrey*)、両方向性転換魚のオキナワベニハゼ (*Trimma okinawae*)、さらには雄性先熟魚のクマノミ (*Amphiprion clarkii*) を実験材料として使用した。はじめに、雌性先熟魚、雄性先熟魚および両方向性転換魚の生殖腺の発達、成熟及び性転換過程を形態的に明らかにし、次いで、生殖腺発達、成熟、性転換に関連する遺伝子クローニングを行った。また、性転換に関連する脳と脳下垂体に発現する遺伝子についてもあわせてクローニングした。これらの遺伝子群の脳、生殖腺での発現、性転換に伴う発現変動パターンについて解析した。さらに、性ホルモンや内分泌かく乱物質を *in vivo* と *in vitro* の系を用いて暴露させ、主に生殖腺の形態的な変化に及ぼす影響と遺伝子発現変化について調べることにより、作用メカニズムについて解析した。以上の様に、本研究では形態学的アプローチを中心として、細胞・器官培養系、分子生物学的研究手法を併用して内分泌かく乱物質の性転換に及ぼす影響を解析した。

3) 研究成果

I. 雌性先熟魚

1) ベラの生殖腺成熟と性転換に果たす生殖腺刺激ホルモンの役割

本研究に用いるベラ科の多くは雌から雄へ性転換する。ハワイ産ベラでは視覚的認識が鍵となり性転換が起きることは証明されているが、その後の性転換の内分泌制御機構については不明な点が多い。視覚的刺激は脳、脳下垂体を経て脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン (GTH) の働きにより性転換が誘導されると考えられる。魚類でも、GTHは2種類 (FSH、LH) あり生殖腺の発達、成熟に重要な働きを示すことが分かっている。本研究ではまず、ベラにおけるGTHのクローニングを行ない、生殖腺の発達、成熟および性転換に果たす2種のGTHの役割について明らかにすることを目的とした。

A) 生殖腺の発達と成熟におけるGTHの役割

ハワイ産ベラの雌雄を生殖活動が異なる2つの時期に採集した。生殖腺と脳下垂体を摘出し、生殖腺は組織観察、脳下垂体はリアルタイムPCR法によりFSH α 、LH β 鎖の発現量を定量した。

雌はこれら2つの時期で発達が大きく異なり様々な発達段階の卵巣組織が得られた。FSH β 鎖の発現量は卵巣の発達期に既に高く、LH β 鎖は成熟期に高かった。このことから、FSHは卵巣の発達に重要であり、LHは卵巣の成熟に重要であると考えられた。一方、雄における2つの時期での精巣の大きさに明確な違いはみられなかった。しかし、精巣サイズの僅かの変化とGTH β 鎖の変化が一致していたことから、雄においても生殖腺の発達と成熟にGTHが重要であることが示唆された。GTH β 鎖の発現量を雌雄で比較すると雌が未熟な生殖腺であった時期では違いがないものの雌雄ともに生殖腺が発達していた時期ではFSH β 、LH β 鎖ともに雌の発現量の方が雄に比べ約4倍高く、雌の生殖腺を発達させるには雄よりも多量のGTHが必要であると考えられた。

B) 性転換におけるGTHの役割

ミツボシキウセンの雌を芳香化酵素阻害剤（ファドロゾール）で2週間処理することにより雄への性転換を誘導することができた。芳香化酵素はエストロゲン合成酵素であり、これを阻害することでエストロゲンの減少を促し雌から雄へ性転換させることができることを明らかにした。対照群、芳香化酵素阻害剤群および芳香化酵素阻害剤+エストロゲン群を設け、各処理2週間後、生殖腺、脳下垂体を摘出し組織観察およびFSH β 、LH β 鎖の発現量を定量した。その結果、2週間にわたる芳香化酵素阻害剤処理により性転換の初期過程を誘導できることが分かった。FSH β 鎖の発現量は対照群と芳香化酵素阻害剤群の間に有意差は無かった。一方、LH β 鎖は対照群に比べ芳香化酵素阻害剤群は有意に減少した。この変化が芳香化酵素阻害剤+エストロゲン群では見られないことから、エストロゲンの減少による変化であると考えられた。以上の結果から、エストロゲンによりLHが減少することで卵巣の退縮消失を促進し、FSHは精巣の発達を促進していると考えられた。

2) 性ステロイド合成酵素の遺伝子発現調節

魚類性転換を制御する分子機構の解明のため、社会的刺激により性転換を行うハワイ産ベラ *Thalassoma duperrey* を用いて下記の性ステロイド合成酵素の遺伝子発現を解析した。

A) 卵巣型および脳型芳香化酵素遺伝子の発現比較

ハワイ産ベラから2種類の芳香化酵素遺伝子、卵巣型と脳型が単離された。先ずこのどちらが生殖腺で重要なのかを調べるため、リアルタイムPCR法を用いてそれぞれの遺伝子について発現解析を行った。その結果、卵巣型遺伝子の発現量は、成熟した卵巣で成熟した精巣よりも約100倍高かった。一方、脳型遺伝子の発現量は卵巣と精巣で差が認められず、卵巣型よりもはるかに低い値を示した。また、卵巣型遺伝子の発現量は卵巣の成熟に伴い上昇したが、脳型遺伝子の発現量は変化しなかった。以上の結果から、この種の卵巣成熟には脳型ではなく卵巣型の芳香化酵素が重要であることが示唆された。

B) 脳における芳香化酵素遺伝子の発現分布

性ステロイドは脳でも作られているが、魚類ではそれが生殖腺に比肩するほどであることが知られている。このことを調べる手始めとして、脳における芳香化酵素遺伝子の発現分布を、*in situ* ハイブリダイゼーションにより解析した。プローブには脳型・芳香化酵素cDNAの3'側非翻訳領域を用い（ネガティブコントロールにはセンス鎖）、その特異性はサザンブロットで確認した。ベラ雌の脳を用いた解析により、芳香化酵素遺伝子を発現する細胞は脳内に広く分布することが明らかになった。特に、多くの神経ホルモン産生ニューロンが存在する視索前野の脳室付近および視床下部で強い発現が見られた。このことは、生殖腺の発達や生殖行動に重要なこれらの領域でエストロゲンが活発に産生されていることを示す。また、視蓋においても強い発現が見られたことから、視覚情報を統御する領域でもエストロゲンが積極的に作られていると考えられる。

3) 性転換に及ぼすホルモンと内分泌かく乱物質の影響 (in vivo)

A) 芳香化酵素阻害剤処理の影響

雌から雄への性転換の開始時に血中のエストラジオール-17 β (E2) 量が急激に減少し、アンドロゲンである11-ケトテストステロン (11KT) は性転換後期に上昇することを明らかにした。従って、この性転換開始時に見られるE2の急激な低下が性転換開始の引き金として働くものと考えられた。このことを確かめるために、成熟雌に芳香化酵素阻害剤 (ファドロゾール) を投与することにより人為的にE2を低下させたところ、性転換を誘導させることに成功した。さらに、ファドロゾールと共にE2を雌ベラに投与し、その性転換が誘導されるかどうかを調べた。実験は6週間行われた。その結果、ファドロゾールのみを投与した群では全て性転換が見られたのに対し、E2を同時投与した群では性転換が抑制された。従って、ベラではE2が雌性 (卵巣) の維持に重要な役割を果たし、もし何らかの原因で血中E2量が低下すると、雌性からの脱却、そして性転換が起こることが強く示唆された。従って、芳香化酵素遺伝子のオン、オフが性転換誘起の重要な要因であると考えられた。

B) アンドロゲン処理の影響

雌性先熟魚 (ベラ等) の性転換時にE2の低下と11KT量の上昇が見られる。11KTの性転換における役割を調べるため、雌ベラに11KTを6週間投与した。その結果、11KTを投与した全ての個体で性転換が見られた。興味深いことに、11KTとE2を同時投与した群では性転換は抑制された。これらの結果は、性転換誘起はE2量の低下が基本的要因となり、さらに11KTも促進的に働くことを示している。このことから、アンドロゲン様作用を持つ内分泌かく乱物質が作用すると雌から雄への性転換が促進されるものと推察される。

ハワイ産ベラでは、雌が雄になる性転換とIP雄がTP雄となる変態、どちらにも血中の11-KT量の増加が見られる。この増加の分子機構を調べるため、生殖腺における11 β -水酸化酵素遺伝子の発現をリアルタイムPCR法により解析した。その結果、TP雄ではIP雄に比べて約16倍、雌に比較しても約7倍多く発現していた。すなわち、雌から雄への性転換、雄の変態どちらにおいても、生殖腺における11 β -水酸化酵素遺伝子の発現上昇が重要な鍵となることが示唆された。

C) コルチゾル処理の影響

内分泌かく乱物質の暴露がストレスとなり性転換を誘導している可能性が考えられる。成熟した一次雌にコルチゾル1 mg/gを6週間処理した。その結果、処理終了時には、全ての個体の生殖腺は、性転換して成熟した精巣か未熟な卵巢組織内に精子形成する精巣組織の生殖腺が観察された。このことから、コルチゾルは卵巢を精巣へと性転換させることが明らかとなった。内分泌かく乱物質の暴露がストレスとなりコルチゾルを介して性転換を誘導する可能性が示唆された。

4) 生体外卵巢培養による精巣への転換の試み (in vitro) (長濱グループとの共同研究)

A) 生体外卵巢培養による精巣への転換の成功,

内分泌かく乱物質の生殖腺への直接的な影響を明らかにするためには、生体外生殖腺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。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巢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。ミツボシキウセンの卵巢を断片化し、L-15培地にアン

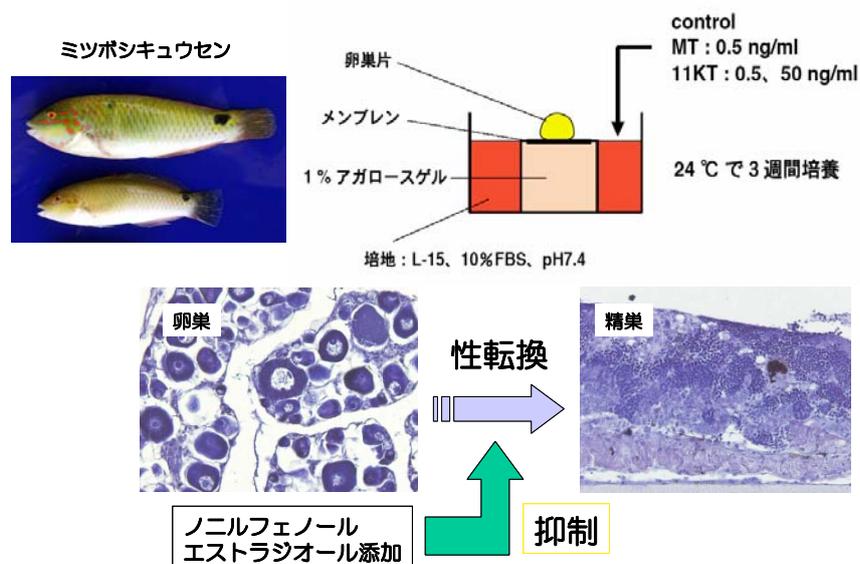


図48 卵巢の組織培養による精巣への転換と内分泌かく乱物質の影響

ドロンであるメチルテストステロン (MT) 0.5 ng/ml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、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。4週間目では尾部を持つ成熟した精子の分化が確認された。この実験は、生体外において卵巢から精巣への全過程を誘導することにはじめて成功した例である (図48)。

B) 生体外卵巢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についての検討を行った。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標準培地及びL-15標準培地に10%子牛血清 (FBS)、アミノ酸 (プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸)、インスリンを添加して培養を行った、その結果、標準培地で培養する方が効率よく性転換を誘導することが分かった。次に、培地の最適pHの検討を行った。pH7.2、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、pH7.2-7.6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。

5) 生体外組織培養系を用いたエストロゲンと内分泌かく乱物質の影響

A) エストロゲン処理の影響

生体外卵巣培養系にメチルテストステロンと共にエストロゲンのエストラジオール (E2) を種々の濃度 (0.5, 5, 50 ng/ml) 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。

B) ノニルフェノール処理の影響

培養系にエストロゲン様働きをもつことが知られているノニルフェノール (NP) を種々の濃度 (50, 500, 500 ng/ml) で添加した。その結果、卵巣組織の状態が維持され性転換が抑制された。

以上のことから、卵巣の維持のためにはエストロゲンが重要であることが結論された。卵巣の組織培養による精巣への実験系はエストロゲン様の働きを持つ内分泌かく乱物質のアッセイ系として有用であることが示された。

6) エストロゲンと内分泌かく乱物質の精巣への影響 (in vivo)

A) エストロゲン処理による精巣への影響

成熟した完全な精巣をエストロゲン (E2) 処理により成熟した卵巣へと転換することは不可能とされていた。ミツボシキウセンの性成熟した一次雄 (生まれつきの雄) にE2 (20, 200 µg/g餌料) を6週間処理した。その結果、200 µg/g処理した終了時における全ての個体の生殖腺は、ほとんどが周辺仁期及び染色仁期の卵母細胞で占められており、精子および精子形成のための生殖細胞は著しく少ないか、全く認められなかった。また、通常は雄の精巣には認められない卵巣腔も形成され、ほぼ正常の卵巣構造を呈していた。20 µg/g 処理では、成熟した精巣をほぼ完全に成熟した卵を持つ卵巣を持つ雌が出現した。このことから、性分化後でもE2は成熟精巣を成熟卵巣へ性転換を誘導することが可能であることを始めて明らかになった。

7) 性転換に関わる遺伝子群のクローニング

本研究により、ベラの性転換を芳香化酵素阻害剤、アンドロゲン、エストロゲンにより人為的に性を制御することがはじめて可能となったことから、今後は性転換の基本的制御機構についての解析が加速されるものと期待される。そこで先ず、ミツボシキウセンの性転換に重要と考えられる遺伝子群のクローニングを行い、これまでに主要な遺伝子群（芳香化酵素、 11β 水酸化酵素、2種類のアンドロゲン受容体、3種類のエストロゲン受容体、3種類のGTHサブユニット、そして脊椎動物の性決定に重要なDMRT1の遺伝子）のクローニングを完了した。現在、性転換に伴うこれらの遺伝子の発現をリアルタイム定量PCR及びin situ ハイブリダイゼーション法を用いて解析している。このうち、DMRT1遺伝子はハワイ産ベラを用いて発現解析を行った。DMRT1遺伝子の発現は、雌の卵巣ではほとんど見られないが、性転換が始まり血中E2量が低下したような個体の退縮した卵巣の卵巣薄板上皮で上昇した。これらのDMRT1遺伝子の発現を示す細胞は性転換が進むにつれ、卵巣薄板上皮より内部へと広がっていた。これらの結果は、DMRT1遺伝子が卵巣から精巣への性転換に重要であることを示唆するとともに、この遺伝子が雄化を検定するための優れたバイオマーカーとして使えることを示すと考えられる。

II. 両方向性転換魚

1) オキナワベニハゼ (*Trimma okinawae*) の性転換

オキナワベニハゼは体長が3cm程の小型のハゼで、全身が鮮やかなオレンジ色をしている。沖縄から鹿児島にかけての亜熱帯サンゴ礁域に分布しており、ふだんは、サンゴや岩棚の天井で腹部を上にした逆さの状態生活している。オキナワベニハゼの婚姻システムは複数の雌が特定の一尾の雄とだけつがいになる一夫多妻（ハレム）型であり、ハレム内の雌の数は1〜6尾で大きな雄ほどたくさんの雌を獲得する。

オキナワベニハゼのハレム内で最大の個体、つまり雄を除去することにより、ハレム内で雄の次に体長の大きい雌が、雌から雄への性転換を行う。ここまでは、ベラなどで見られる雌性先熟型の性転換と変わらないが、性転換後のハレム内に、再び体長の大きな雄を戻すことによって、先ほど雌から雄へと性転換した個体が、逆に雄から雌へと二回目の性転換を行い再び雌になる。

今まで報告されている雌性先熟、及び雄性先熟型の性転換様式は、一方向性で、またその転換は不可逆的なものであるのに比べ、繰り返し何度も両方向に性転換するオキナワベニハゼの性転換様式は、脊椎動物の性の可塑性、および内分泌かく乱物質の影響を調べるには大変良い実験モデルを提供する。

A) 生殖腺の組織学的、微細構造学的観察

最初に、オキナワベニハゼの生殖腺構造を詳細に観察した。その結果、オキナワベニハゼは

同一個体内に精巣と卵巣を同時に持つことが明らかになった。メスとして機能しているときは卵巣が成熟し、精巣は未発達であった。逆に機能的オスでは精巣が発達し、卵巣が未熟であることが分かった。性転換とは、成熟していた卵巣又は精巣が退行し、未熟な精巣又は卵巣が成熟して完了することを組織学的に明らかにした。他の性転換魚と異なり退行した生殖腺が消失・吸収されなかったことから、この特殊な生殖腺構造がオキナワベニハゼの短時間での両方向性転換を可能にしていると考えられた。

B) 両方向性転換誘起実験系の確立

オキナワベニハゼの性転換は、外界の環境変化(相手との相対的大きさの違い)が直接因となり起こることが明らかにされているが、その転換過程にはどの程度の期間が必要とされるのかは明らかにされていなかった。そこで、飼育実験により両方向性転換を誘起し、性転換時の行動変化と性転換に要する期間を調べた。その結果、再現性の高い性転換誘起実験系を確立できた。大きな雌と小さな雌を同じ水槽に入れると、大きな雌が性転換し雄になり、逆に雄のペアを飼育すると、小さな雄が、雄から雌への性転換を行った。この際、ペア同士の大きさの差が0.2 mm以下でも、性転換は見られ、大きな個体が必ず雄として振る舞っていた。この実験では、性行動は性転換の方向に関係なく約30分以内で転換し、脳の性転換を素早く行っていると考えられた。また、その後の求愛行動の頻度を調べたところ、実験開始後には、かなりの頻度で求愛行動が観察されたが、時間の経過に従って、その回数は減少し、最終的には20分当たり一回程の求愛行動が観察された。最初の活発な求愛行動は、雄がテリトリー内の雌確保の為にしているのではないかと考えられる。また、最終的な生殖腺の性転換は雌から雄へは5日間で、雄から雌へは10日間で完了していた。ちなみにこの性転換に要する期間は、現在報告されている他の性転換魚に比べ著しく短く、性転換時の生理変化を調べる上で大変都合がよい。

C) 両方向性転換過程に伴う GtH-受容体 (R) の発現変化

脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン (GtH) は、受容体 (GtH-R) を介して生殖腺の機能/発達を調節している。しかし、精巣と卵巣を同時に持つオキナワベニハゼでは、GtH が、どのようにして片方だけの生殖腺に作用するのかは不明である。そこで2種類のGtH-R(FSH-R, LH-R) をクローニングし、生殖腺での発現を調べた。その結果、2種類の GtH-R 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、卵巣での発現は極めて低かった。逆に、雌として機能しているときには、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初めて明らかにした。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(ペアにしてから18時間以内)に切り替わった。この遺伝子発現の変動は非常に顕著で、性転換の引き金役の役割をGtH-Rが担っている可能性を強く確信させるものであった。

D) 生殖腺の性転換に対する性ホルモンの役割

性ホルモンの性転換に果たす役割を明らかにするために性転換時における性ホルモン合成に関与する3種の酵素、コレステロール側鎖切断酵素 (P450_{scc})、3β-水酸化酵素 (3β-HSD) および女性ホルモン合成に必須な芳香化酵素について特異抗体を用いてその発現を調べた。その結果、P450_{scc}および3β-HSD は共に性転換中には変化が見られなかった。しかしながら、芳香化酵素は雌から雄への性転換時にその発現が急減し、逆に雄から雌への性転換時には、その発現が上昇していた。このことから、芳香化酵素つまりエストロゲンが性転換に重要な働きを持つと考えられた。

E) 芳香化酵素とその転写調節因子Ad4BP/SF-1のmRNA発現変化

免疫組織化学的観察の結果、エストロゲンの増減、つまり芳香化酵素が両方向性転換に重要な働きを持つことを明らかにした。そこで、オキナワベニハゼの芳香化酵素遺伝子を単離し、その機能を詳細に解析した。その結果、オキナワベニハゼは、前述したティラピア等と同じように、主に脳で発現する脳型芳香化酵素と卵巣で発現する卵巣型芳香化酵素の二種類の遺伝子を持つことを確認した。また、*In situ* ハイブリダイゼーション法により両者の組織発現部位を明らかにした。また、同時に芳香化酵素遺伝子の転写調節因子の一つであるAd4BP/SF-1のクローニングも行い、両方向性転換過程における発現変化をリアルタイムPCR法により調べた。その結果、卵巣でのAd4BP/SF-1遺伝子は、雌機能時には高く、雄機能時には低い発現を示した。また、それらの発現は、性転換の方向に従って変化し、雌から雄への性転換時には減少し、逆に雄から雌への性転換時には増加していた。これらの結果は、芳香化酵素やAd4BP/SF-1の発現は、社会環境の変化による刺激により調節されており、そのことが卵巣の活性化や生殖腺の性転換と関係があると考えられた。

F) 内分泌かく乱物質の影響

可塑性に富んだオキナワベニハゼの生殖腺に及ぼすエストロゲン (E2)と内分泌かく乱物質であるノニルフェノール(NP)の影響を*in vitro*培養系により調べた。その結果、雌機能時の卵巣では、E2とNPを添加し培養することにより卵巣型アロマトーゼの発現を上昇させた。この結果から、やはりNPにはエストロゲン様の効果があることが明らかとなり、遺伝子発現も調節することが明らかとなった。しかしながら、雄機能時の卵巣では、E2、NP投与によって卵巣型芳香化酵素の発現が上昇することはなかった。このことは、雄として活動している個体の生殖腺にはエストロゲンの感受性すなわちエストロゲン受容体が発現していないと推測された。今後、性転換過程の個体を用いて、エストロゲン感受性について調べる必要があると考えられた。

III. 雄性先熟魚

1) 雄性先熟魚クマノミの性分化と性転換

クマノミ *Amphiprion clarkii* は、雄から雌へと性転換する雄性先熟魚である。雌期の生殖腺は、発達した卵を含む卵巣組織のみから成るが、雄期の生殖腺は、成熟した精巣組織と未熟な卵母細胞を含む卵巣組織が同時に存在する両性生殖腺である。本研究では、クマノミの生殖腺の性分化過程の組織学的観察とステロイド合成酵素2種（コレステロール側鎖切断酵素：P450_{scc}と11 β -水酸化酵素：P450_{c11}）に対する特異抗体を用いて免疫組織化学的観察を行った。

クマノミでは、未分化生殖腺を経て全ての個体の生殖腺は卵巣へと分化する。その後、かなり遅れて、卵巣組織内に精巣組織が分化し、未熟な卵巣組織と成熟精巣組織を同時に持つ両性生殖腺が形成される。生まれつきの雄はいなかった。雄期の成熟した精巣と卵巣を同時に持つ両性生殖腺では、2種の抗体に対する免疫陽性反応を示す細胞が両組織中に観察されたが、雌期の卵巣には、P450_{scc}に対する陽性反応を示す細胞しか観察されなかった。また、性分化過程においては、2種類のステロイド合成酵素に対する免疫陽性反応を示す細胞は、性的未分化期の生殖腺で既に認められ、その後、卵巣分化及び精巣組織の分化に伴い、強い陽性反応を示す様になった。これらのことから、性転換、性分化に内因性性ホルモンが重要であるものと考えられた。現在、性分化機構、精巣組織の分化機構、性転換機構の解明をおこなっている。

(3) 研究成果の今後期待される効果

ベラを用いての生殖腺内の性転換機構を詳細に明らかにすることが出来た。女性ホルモン合成に関与する卵巣型アロマトーゼ遺伝子は卵巣で精巣と比べて著しく発現量が多い。性転換過程の初期でエストロゲンが急激に低下する。このエストロゲン低下がきっかけとなり精巣への転換が開始するものと考えられた。このことは、芳香化酵素の酵素活性の阻害剤により雌のエストロゲンの合成を阻害すると精巣への完全な転換を誘導することからも支持される。性転換魚は、エストロゲンが低下すると性転換する機能を獲得しているものとする。このことから、卵巣状態を維持するには卵巣で自身で作るエストロゲンが一定以上の濃度で絶えず卵巣に働きかけることが重要であると考えられた。雌のエストロゲンの著しい低下は、卵巣状態を維持出来なくなるばかりか精巣へと転換を開始する。この機構は、雌雄異体魚のティラピアの成体雌の卵巣がアロマトーゼ阻害剤により女性ホルモンを低下させると完全な成熟した精巣へと転換する現象と共通している。ティラピアのような成魚で性転換することのない雌雄異体魚であっても卵巣から精巣へ転換する能力は一生持ち続けているものとする。換言すれば、成熟した卵巣中には、いつまでも精子に分化できる生殖細胞、あるいはライディッシュ細胞、セルトリ細胞へ分化できる体細胞が存在することを示している。他の雌雄異体魚にもこのような能力があるのか、今後検証が必要となる。芳香化酵素の酵素活性の阻害剤による性転換法は、性転換魚のみならず雌雄異体魚の生殖細胞と体細胞の両性能を研究する方法としても期待される。

雌のエストロゲンの合成阻害による精巣への完全な転換の誘導方法の確立は、単に性転換機構の解明を容易にしたばかりでなく、水産増養殖上重要な魚の雌雄産み分け手法となることが期待される。実際、水産増養殖場重要魚種であるハタでは雄が不足して養殖の障害となっているが、この方法により雌から雄への性転換が可能であることを応用的な観点からも証明すること

に成功した。

本研究で始めて成功した卵巣の生体外培養による完全な精巣への性転換の誘導は特筆に値するものとする。生体外卵巣培養系の確立は、内分泌かく乱物質の生殖への影響、作用機構の分子解明を容易にし、しかも同時に大量に評価することができるアッセイの簡便な方法として今後有効となろう。試験管の中で卵巣が精巣へと変わることは、卵巣維持に関与する遺伝子の発現が低下し、代わって精巣分化に関連する遺伝子の発現が上昇してくるものとする。生体外卵巣培養系を用いて今回クローニングした遺伝子群（芳香化酵素、 11β 水酸化酵素、2種類のアンドロゲン受容体、3種類のエストロゲン受容体、3種類のGTHサブユニット、そして脊椎動物の性決定に重要なDMRT1の遺伝子）やその他の新規の性決定関連遺伝子の発現変化を調べたり、遺伝子の発現を人為的に制御することが可能となれば、生殖細胞や生殖腺体細胞の分化、脱分化、分化転換の基本的機構の解明に貢献するものと期待される。しかし、現在までのところ、逆方向の転換である精巣培養による卵巣への転換については何度も試みたにも関わらず成功していない。In vivoでは成熟した精巣を女性ホルモン処理により成熟した卵巣へと転換させることが出来ることを証明している。このことから生体外培養系でも精巣を卵巣に変えることが可能であるものとする。今後のエストロゲンの作用機構の解明、性の可塑性研究にも有効な手法となるものと期待されるので、さらに研究を続けて行く必要がある。

両方向性転換魚のオキナワベニハゼは他の性転換魚に比べて極めて容易に性転換する。雌雄両方向の性転換を実験室内で確実に誘導できることが明らかとなった。すなわち、本種を一つのモデルとして雌雄両方向の性転換に関する全過程についての解析が可能となった。したがって現在、本種は国内外を通じて性転換の生理機構を解析する上で最もよいモデル魚であるといえる。本研究により種々の遺伝子（Ad4BP/SF-1、2種の芳香化酵素、FSH-R, LH-R）のクローニングに成功した。このうち特に2種の生殖腺刺激ホルモンの受容体遺伝子（FSH-R, LH-R）が性転換の開始に伴い生殖腺内の発現が18時間までに急激に増減することが明らかとなった。性転換に脳下垂体-生殖腺の関係が重要であることを始めて示した例として注目される。今後は、2種の遺伝子の発現調節機構を解明することにより生殖腺と脳の性的可塑性の分子機構を解明する大きな手がかりとなるものと期待される。

3. 3 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（熊本大学、海産魚・北野グループ）

（1）研究実施内容及び成果

1) 研究のねらい

近年、多くの内分泌かく乱物質が環境中に存在していることが知られている。内分泌かく乱物質による生物への影響の程度については生物種で様々であるものの、生殖系への攪乱を通じて人間を含めた野生生物の種の保存への影響が懸念されている。内分泌かく乱物質の中には、特にエストロゲンと同様の働きをする物質が多く見つかっているが、これらの物質がどのような生物種にどのような影響を与えるのか、また作用メカニズムはどのようなのかなど、不明な点が多いのが現状である。

北野らは、日本全国の沿岸域に生息するカレイ目魚類であるヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) を実験材料に選び、この魚種の性分化時期に飼育水温を調節することにより、遺伝的雌を生理的全雌、全雄に誘導できることを見出した。これらの研究成果を基盤として本研究では、爬虫類、両生類、及び一部の魚類で知られている温度（水温）依存性の性決定/分化の基本的機構を明らかにし、更にこの特徴的な生殖システムを活用して、生殖系に及ぼす性ホルモンや種々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することを目指す。

ヒラメは、性分化期の高水温により遺伝的雌が雄へと性転換するなど、環境要因に対して感受性が非常に高い。したがって、内分泌かく乱物質の影響を詳細に調べるためには、大変優れた実験材料である。本研究では、この魚種を用いて内分泌かく乱物質の影響と作用メカニズムを解明すると同時に、魚類特有の内分泌かく乱物質のモニタリングシステムの開発を行うことを目的とする。

2) 研究実施方法

水温依存性の性決定システムを示すヒラメを実験材料に選び、性決定・性分化の基本的メカニズム、内分泌かく乱物質の生殖腺の性分化過程に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用メカニズムについて研究する。具体的には、以下の項目について研究を実施する。

1. ヒラメの性分化に与えるエストロゲンと抗エストロゲン剤の影響、
2. ヒラメの性分化に与えるアンドロゲンと抗アンドロゲン剤の影響、
3. 性分化におけるミューラー管抑制物質の生理的機能、
4. 芳香化酵素遺伝子及びミューラー管抑制物質遺伝子の転写調節機構の解析、
5. ヒラメの性分化に与える内分泌かく乱物質の影響と作用メカニズム、
6. 内分泌かく乱物質の *in vitro* 評価系の開発、
7. 内分泌かく乱物質の *in vivo* 評価系（トランスジェニック系統）の開発。

3) 研究成果

ヒラメの性は、メダカなどと同様に遺伝的 (XX/XY) に決定されると考えられており、前述したティラピアなどと同様に卵巣分化にエストロゲンが重要な役割を果たしている。しかしヒラメでは、遺伝的に決定された性でも性分化期に飼育水温によって大きく影響を受ける。すなわち、遺伝的全雌集団を高水温で飼育すると、全てが雄に性転換する。染色体数は $2n=48$ であり、その中に常染色体と性染色体があると考えられているが、染色体の形態でそれらを区別することはできない。ヒラメ遺伝的全雌(XX)は、性分化時期の水温が $17.5\text{--}22.5^\circ\text{C}$ であれば雌へと分化するが、 15°C 以下または 25°C 以上では、雄へと性転換する個体が出現する。北野ら(1999)は、

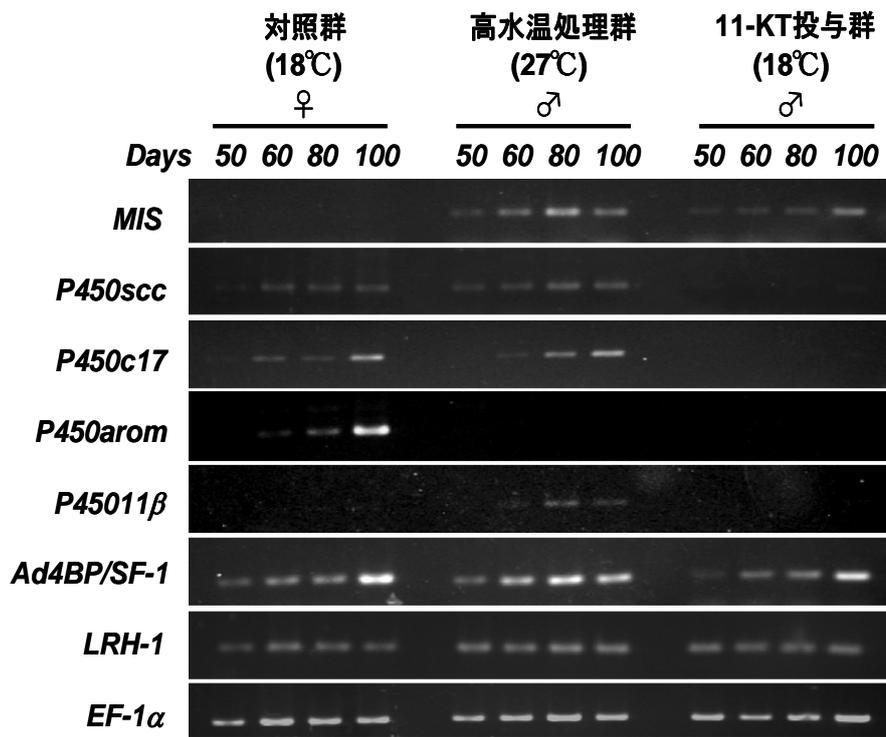


図49 RT-PCRによるヒラメ生殖腺での性分化関連遺伝子の発現解析

XXヒラメ集団を用いて、性分化時期に 18°C で飼育することにより全雌へ、 27°C で飼育することにより全雄へと誘導することに成功し、この実験系を利用して温度依存性性決定機構の解析を行った。

まず、性分化時期における雌雄の生殖腺でのMIS (Mullerian inhibiting substance)、ステロイド合成酵素 (P450scc、P45017 α 、P45011 β 、芳香化酵素)、転写因子(Ad4BP/SF-1、LRH-1) 遺伝子の発現を調べた結果、MIS 遺伝子の発現は雄特異的であり、芳香化酵素遺伝子の発現は雌特異的であることが分かった。また、Ad4BP/SF-1及びLRH-1遺伝子の発現には、性差が認められなかった。一方、11-ケトテストステロンを投与して雄へと誘導した個体では、ステロイド合成酵素遺伝子の発現が抑制されていたが、投与終了後20日以内には芳香化酵素遺伝子以外の発現は

回復していた。これらのことから、芳香化酵素遺伝子及びMIS遺伝子は、雌または雄へと分化したかどうかを確認するための大変優れたマーカーとなりうると考えられた（図49）。

I. ヒラメの性分化に与えるエストロゲンと抗エストロゲン剤の影響

ヒラメの性分化におけるエストロゲンの役割を詳細に調べるため、性分化時期に、遺伝的全雌集団(XX)を通常水温(雌へと誘導)で飼育して抗エストロゲン剤(タモキシフェン、TAM)を投与した群、TAMとエストラジオール-17 β (E2; 1 μ g/g餌)を同時に投与した群、XXヒラメに高水温飼育(27 $^{\circ}$ C水温飼育)下でE2(1 μ g/g餌)を投与した群を設定し、性比調査及び性分化関連遺伝子の発現パターンをRT-PCR及びin situハイブリダイゼーション法により解析した。その結果、TAM濃度0、1、10、100 μ g/g飼料における雄の割合は、それぞれ2.2、18.8、25.0、56.8%であり、TAMの濃度依存的に雄の割合が増加したが、TAM+E2投与群では100%雌になった。一方、XXヒラメを高水温(雄へと誘導)で飼育した群では100%雄になったが、高水温飼育下(HT)でのE2投与群では100%雌になった。次に、これらの群における各個体の生殖腺での芳香化酵素、ミューラー管抑制物質(MIS)、エストロゲン受容体- α (ER α)、ER β 遺伝子の発現パターンを調べた結果、ER α とER β 遺伝子の発現量は各個体間でほとんど差が認められなかったが、芳香化酵素遺伝子の発現は雌化したTAM+E2投与群、HT+E2投与群及び対照群(雌の割合:97.8%)でのみ認められ、MIS遺伝子の発現は雄化したTAM投与群及びHT処理群でのみ検出された。これらのことから、エストロゲンは、ヒラメにおける雌への性分化に不可欠であるのと同時に、芳香化酵素及びMISの遺伝子発現を制御することが明らかになった。

II. ヒラメの性分化に与えるアンドロゲンと抗アンドロゲン剤の影響

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全雌(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 μ g/g餌)処理または高水温(27 $^{\circ}$ 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(P450 $_{sc}$ 、P450 $_{c17}$ 、P450 $_{11\beta}$ 、芳香化酵素)、転写因子(Ad4BP/SF-1、LRH-1)及びMIS mRNAの発現パターンをRT-PCR及びin situハイブリダイゼーション法により調べた。その結果、高水温処理個体の生殖腺では、処理期間中、芳香化酵素以外のステロイドホルモン産生酵素、Ad4BP/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、Ad4BP/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、芳香化酵素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。

次に、ヒラメ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、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* ハイブリダイゼーション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* mRNAは支持細胞で強く発現し、芳香化酵素及び*P45011β* 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、芳香化酵素 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。

III. 性分化におけるミューラー管抑制物質の生理的機能

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* ハイブリダイゼーション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ことが分かった。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(5*mis*-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5*mis*-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、ヒラメの性分化における*MIS*の生理的役割を解明する必要がある。

IV. 芳香化酵素遺伝子及びミューラー管抑制物質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芳香化酵素遺伝子及びMIS遺伝子の転写調節機構を解析するため、転写因子Ad4BP/SF-1 (Ad4 binding protein/Steroidogenic factor 1) 及び LRH-1 (Liver receptor homologue 1) cDNAを単離し、これらによる芳香化酵素遺伝子及びMIS遺伝子の転写調節機構を調べた。まず、ヒラメ精巣からAd4BP/SF-1及びLRH-1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、ヒラメの芳香化酵素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、Ad4BP/SF-1またはLRH-1の強制発現ベクターをHepa-E1細胞に導入した。その結果、Ad4BP/SF-1またはLRH-1のどちらを導入しても、ルシフェラーゼ活性が上昇した。このことから、Ad4BP/SF-1、LRH-1ともに芳香化酵素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。さらに、Ad4BP/SF-1及びLRH-1の結合部位を同定するため、芳香化酵素遺伝子プロモーター領域の変異分析及びゲルシフト分析を行った結果、少なくとも2ヶ所のAd4BP/SF-1及びLRH-1の結合部位が存在することが明らかになった。

一方、ヒラメのMIS遺伝子5'上流域を単離した結果、翻訳開始点から139 b上流に1つのAd4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分析で調べた結果、両者ともにこの配列特異的に結合することが分かった。したがって、転写因子Ad4BP/SF-1 及び LRH-1は、両方ともに芳香化酵素遺伝子及びMIS遺伝子の5'上流域のAd4配列に結合することが証明され、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。

V. ヒラメの性分化に与える内分泌かく乱物質の影響と作用メカニズム

遺伝的全雌集団を高水温(雄へと誘導)で飼育し、性分化時期にノニルフェノール、ビスフェノールA、ゲニステイン(植物エストロゲン)を経口与して雌化するかどうか調べた。その結果、100 µg/g飼料の濃度において、ノニルフェノールでは30%、ビスフェノールAでは57%、ゲニステインでは96.7%の雌化率を示したことから、これらの物質は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。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、芳香化酵素 mRNAの発現が検出され、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、芳香化酵素 mRNAの発現を誘導、MIS mRNAの発現を抑制して雌への分化を誘導するのではないかと考えられた。

また、本研究において、Tributyltin oxide (TBTO) はXXヒラメを雄化させることを初めて明らかにした(図50)。TBTがイボニシ等の無脊椎動物を雄化させることは以前から知られていたが、脊椎動物で証明されたのは初めてである。TBTO投与終了直後に、生殖腺における芳香化酵素 mRNAの発現をRT-PCRにより調べた結果、TBTO群の半数近くの個体において発現が

認められなかった。従って、芳香化酵素遺伝子の発現が抑えられることにより、雄へと性転換したと考えられる。

さらに、魚類の性分化における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。その結果、 p,p' -DDE濃度0、10、100 $\mu\text{g/g}$ 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

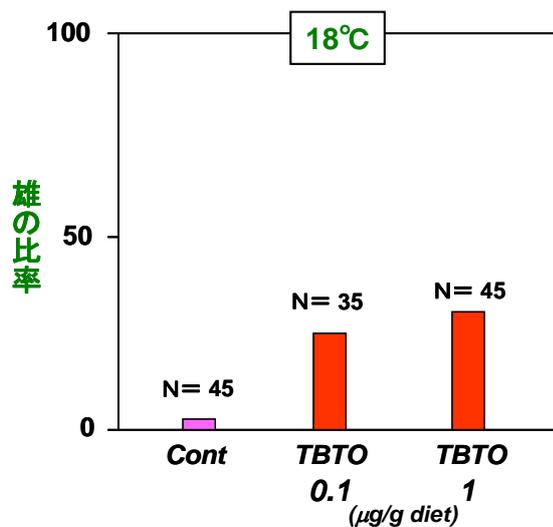


図50 TBTO投与によるヒラメ遺伝的雌(XX)の雄化

遺伝子の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した結果、3個体中1個体においては、27°C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、芳香化酵素 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°C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、芳香化酵素、*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。これらの結果から、 p,p' -DDEはヒラメに対して雌化作用があることが証明された。

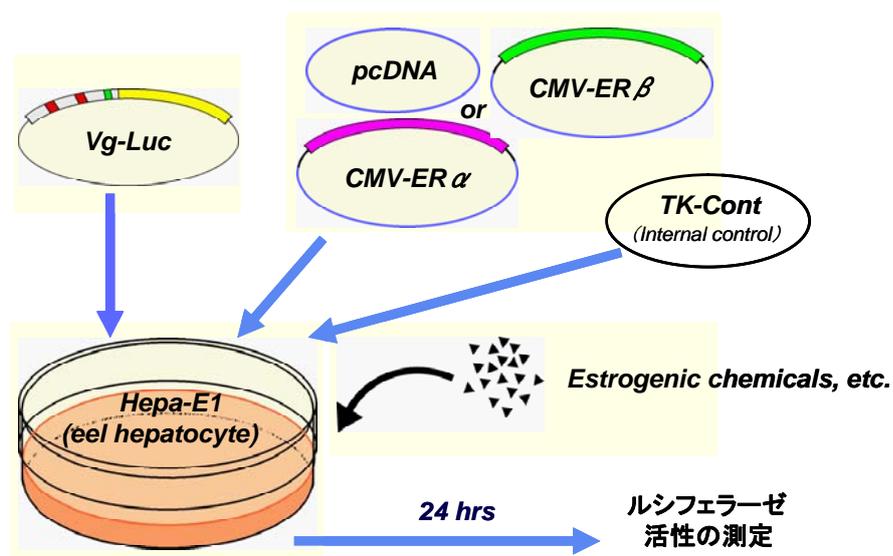


図51 魚類の内分泌かく乱物質の高感度の *in vitro* 評価系の確立

VI. 内分泌かく乱物質の in vitro 評価系の開発

魚類における内分泌かく乱物質の in vitro 評価系を開発するため、まず、エストロゲンにより誘導されることが明らかになっているビテロゲニン遺伝子の発現制御機構を調べた。ヒラメのビテロゲニン遺伝子の5'上流域を単離した結果、5'上流域 880 bp以内に2つのエストロゲン応答配列 (ERE) を確認した。次に、この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ER α またはER β の強制発現ベクターをサル腎臓由来培養細胞(COS-7)に導入した。その結果、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上昇したが、ER α とER β を導入した時のルシフェラーゼ活性に大きな違いが認められた。そこで、これらのベクターをウナギ肝臓培養細胞 (Hepa-E1) に導入した。その結果、ER α とER β のどちらを導入しても、E2の濃度依存的にルシフェラーゼ活性が誘導され、その誘導はタモキシフェン(抗エストロゲン剤)により抑制された。この魚類培養細胞を用いた 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、COS-7 細胞を用いたシステムに比べて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 (図 5 1)。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調べた結果、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。

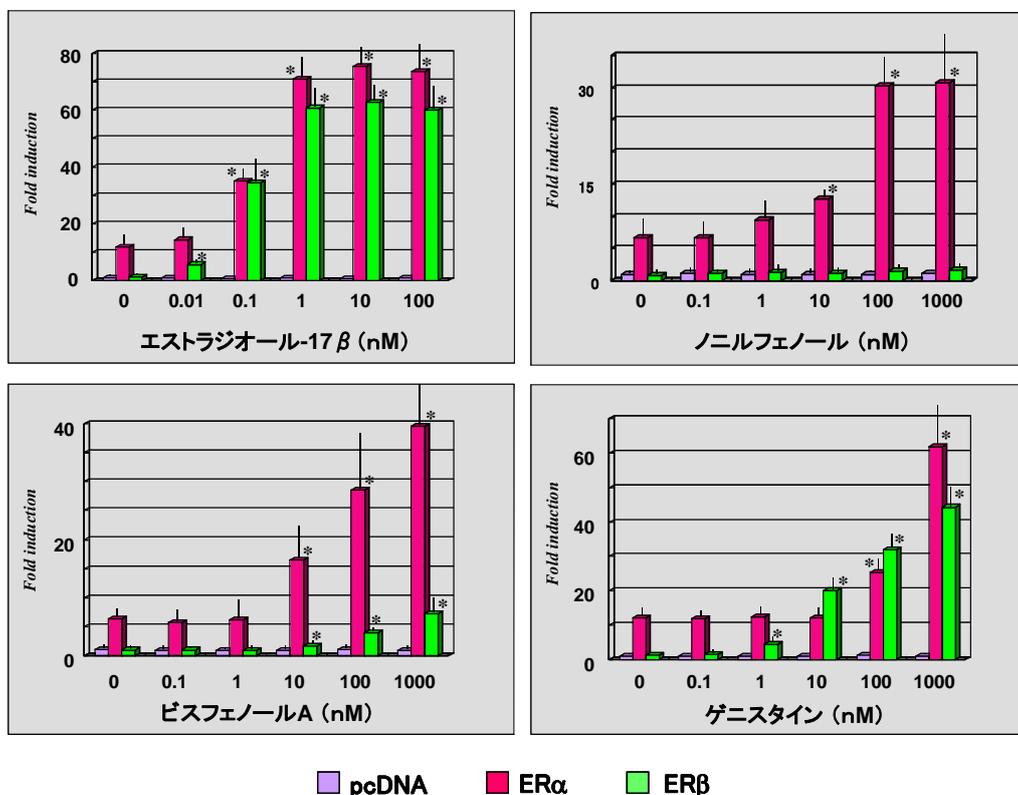


図5 2 各種の内分泌かく乱物質のルシフェラーゼ活性

次に、この魚類培養細胞を用いた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 α よりもER β 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（図5 2）。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。

さらに、アンドロゲン応答性ルシフェラーゼベクター、ヒラメのAR α またはAR β の強制発現ベクターをHepa-E1細胞へとトランスフェクションし、アンドロゲン応答レポーターアッセイ系を構築した。ルシフェラーゼ活性は、11-KTにより濃度依存的に上昇したが、フルタミド(抗アンドロゲン剤)により抑制されることが確認された。さらに、*p,p'*-DDEの作用機構を解明すべく、本研究で開発した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明らかになった。

VII. 内分泌かく乱物質の in vivo 評価系（トランスジェニック系統）の開発

エストロゲン様物質に応答するトランスジェニック魚を作製するため、ヒラメのビテロゲニン遺伝子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(名古屋大学の若松祐子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確認されたが、孵化後30日以内に全ての個体が死亡したため、系統化することができなかった。一方、メダカにおいては、トランスジェニックメダカ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-17 β （ 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発現は弱かったため、今後は導入ベクターの再構築等を検討し、エストロゲン及びエストロゲン様物質に反応してGFPを高発現するトランスジェニック魚を作製する必要があると思われる。

(3) 研究成果の今後期待される効果

本研究では、まず、ヒラメを用いて水温依存性性決定/分化の基本的メカニズムを明らかにした（図5 3、5 4）。すなわち、ヒラメ遺伝的雌は、通常水温では、生殖腺での芳香化酵素の遺伝子発現が誘導され、芳香化酵素により生合成されるエストロゲンによりMISの遺伝子発現

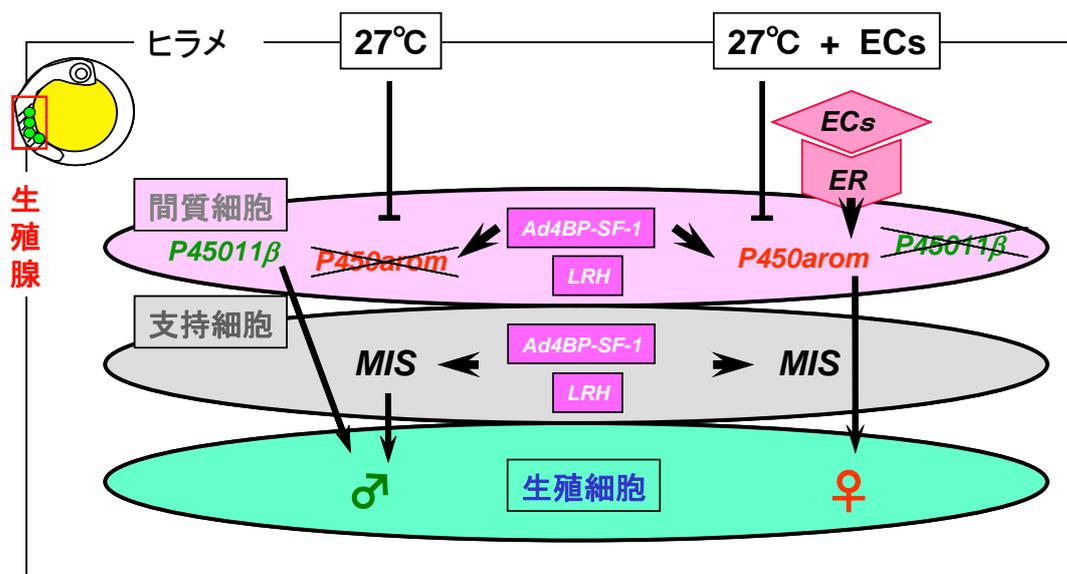


図53 ヒラメ性分化におけるエストロゲン様物質(ECs)の作用メカニズム

が抑制されて雌へと分化する。一方、高水温飼育下では、生殖腺での芳香化酵素の遺伝子発現が抑制され、代わりにMISの遺伝子発現が誘導されて雄へと性転換する。芳香化酵素及びMISの遺伝子発現は、ともに転写因子であるAd4BP/SF-1及びLRH-1により正の制御を受けているため、他の因子により負の制御を受けない限り、発生に伴い発現量が増加すると考えられる。さらに、高水温飼育下でのエストロゲン処理では、生殖腺での芳香化酵素の遺伝子発現が誘導、MISの遺伝子発現が抑制されて雌へと分化する。このように、ヒラメ性分化の基本的メカニズムの解明は、内分泌かく乱物質の影響の作用メカニズムを理解する上で、大変有効な情報を提供してくれるだけでなく、生物が保有する基本的な「性を決めるしくみ」を解明するための重要な知見となるであろう。

次に、水温依存性性決定機構を持つヒラメを用いて、TBT、ノニルフェノール、ビスフェノールA、ゲニスタイン、*p,p'*-DDEが及ぼす性分化への影響を明らかにした。すなわち、TBTは遺伝的雌ヒラメを雄へと分化誘導し、他の物質は高水温飼育による遺伝的雌の雄化を阻害し、雌へと分化誘導した。これらの物質が性転換を誘導した原因として、これらの物質が生殖腺での芳香化酵素及びMISの遺伝子発現に影響を与えたためであるということをRT-PCR及びin situ

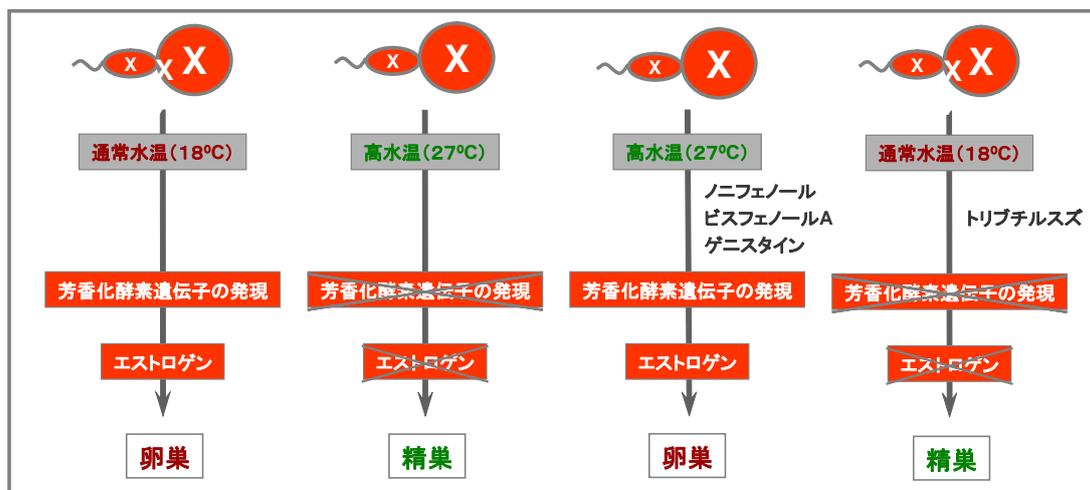


図54 ヒラメの温度依存性の性決定と内分泌かく乱物質の影響

ハイブリダイゼーション法による発現解析により明らかにした。したがって、芳香化酵素及びMISは、内分泌かく乱物質の影響を評価するための大変有効なマーカーとなりうると思われる。今後は、内分泌かく乱物質の影響を詳細に評価するため、性比を調べるだけでなく、これらのマーカー遺伝子の発現を調べることで、より低濃度での内分泌かく乱物質の影響を評価できるのではないかと考えられる。

最後に、本研究において、魚類における高感度な内分泌かく乱物質のin vitro評価系の開発に成功した。このin vitro評価系は、ヒラメのビテログニン遺伝子の5'上流域とルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクター、ヒラメのER α またはER β の強制発現ベクターをウナギ肝臓培養細胞 (Hepa-E1) にトランスフェクションしてルシフェラーゼ活性を測定するものであり、哺乳類培養細胞であるCOS-7細胞を用いたシステムに比べて100分の1のE2濃度でも評価できることから、非常に高感度なin vitro 評価系として大変有効であると考えられる。今後、このシステムは、内分泌かく乱物質が及ぼす魚類への影響を調べるための高感度なin vitro評価系として、広く利用されることが期待される。

3. 4 卵成熟に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用機構 (静岡大学、卵成熟研究・徳元グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

1) 研究のねらい

徳元らはこれまで、一貫して主にキンギョを用いて卵成熟のホルモン調節機構に関する研究を行ってきた。特に、ステロイド性の卵成熟誘起ホルモン（ $17\alpha,20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン、 $17\alpha,20\beta$ -DP）による卵成熟促進因子（MPF）の活性化、受精刺激によるMPFの不活性化について先駆的研究成果を挙げている。本研究では、これまでの自身の研究成果を基盤として、卵成熟に及ぼす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。特に、ステロイドの膜受容体を介したノンゲノミック作用について重点的に解析する。

2) 研究実施方法

キンギョを主な実験材料に選び、細胞・器官培養系を駆使して、卵成熟誘起に及ぼす内分泌かく乱物質の影響と作用メカニズムを分子、細胞レベルで解析する。

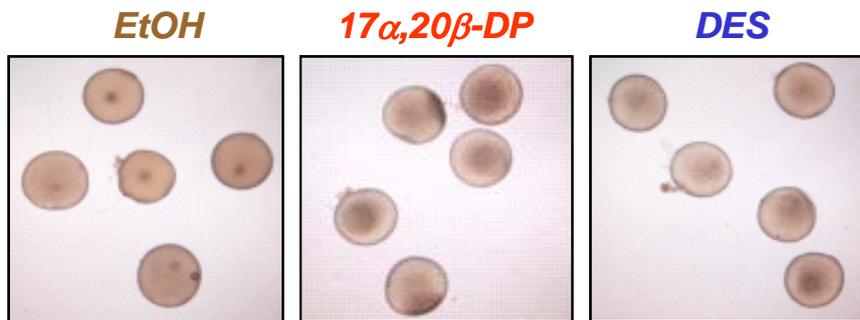


図55 卵成熟誘起ホルモンとDESによる in vitro 卵成熟誘起

3) 研究成果

I. 卵成熟誘起に及ぼす内分泌かく乱物質の影響 — DESは単独で卵成熟を誘起する —

魚類卵の最終成熟は、LHの働きにより卵濾胞組織でつくられるステロイド性の卵成熟誘起ホルモン（ $17\alpha,20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン、 $17\alpha,20\beta$ -DP）の作用により誘起される（図55）。しかし、この $17\alpha,20\beta$ -DPは、通常のステロイドホルモンとは異なり、卵表に局在すると考えられるステロイド膜受容体に結合して、ノンゲノミックに作用すると考えられている。 $17\alpha,20\beta$ -DPがこの膜受容体に結合することにより、卵細胞内のcAMP濃度の減少 → サイクリンBタンパク質の翻訳 → cdc2のリン酸化が順次起こり、その結果卵成熟促進因子（MPF）が活性化され卵核胞が崩壊（GVBD）して、卵は成熟する。

種々の内分泌かく乱物質について魚類の卵成熟誘起作用、あるいは天然の卵成熟誘起ホルモンである $17\alpha,20\beta$ -DPの卵成熟誘起作用に対する阻害効果についてin vitro 実験系により調べた。その結果、試みた十数種類の内分泌かく乱物質のうちで、ジエチルstilbestロール (DES) が唯一、単独で卵成熟誘起作用を持つことが分かった。また、このDESで誘起される卵成熟は、 $17\alpha,20\beta$ -DPで誘起される卵成熟の場合と同様に、MPFの活性化を介して誘起されていることが確認された (図55、56、57、58)。

次に、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、

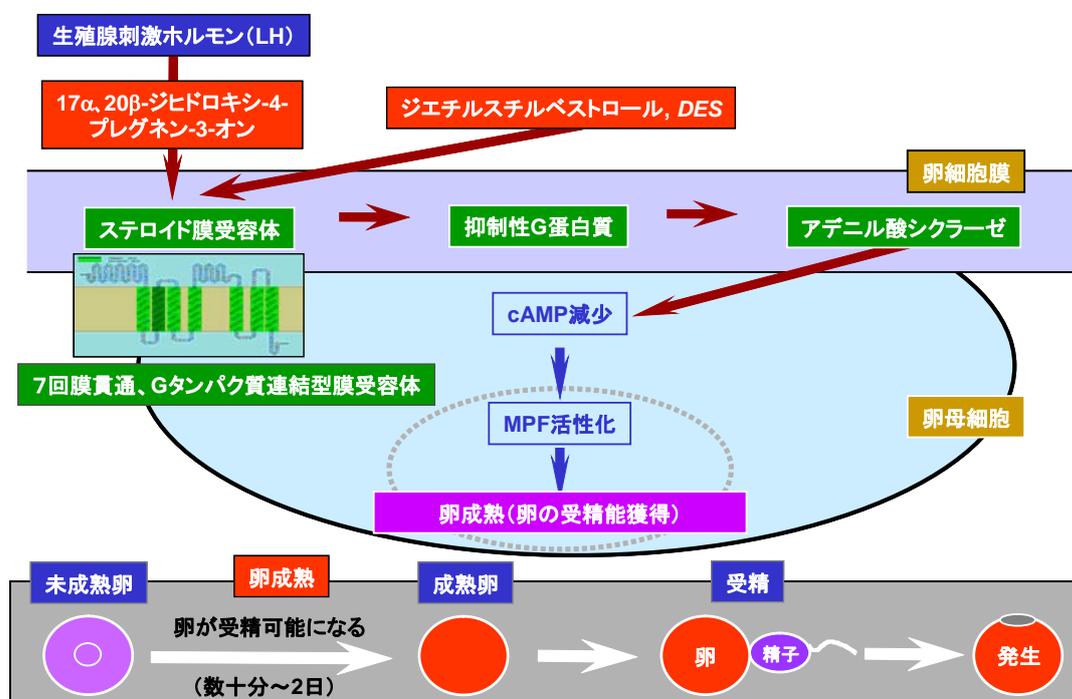


図56 魚類における卵成熟のホルモン制御メカニズムとDESの作用

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分かった。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。

DESの両端の水酸基が受容体との結合において $17\alpha,20\beta$ -DPの水酸基や3位の酸素原子と類似の役割を果たしていることは、分子軌道計算による最小エネルギーコンフォメーションの推定結果からも支持された。軌道計算によるとDESは多様な立体構造を取り得ることが明らかになったが、 $17\alpha,20\beta$ -DPとDESの最小エネルギーコンフォメーションの何通りかは両分子の両端の

酸素原子の原子間距離がよく一致した。このことからDESの両端の水酸基が受容体との結合に関与していると推定される。

DESの誘導体を用いたこれらの実験から卵成熟誘起作用を示す化学構造の一つが明らかになった。そこで、このような構造をもつ物質を検索したところタモキシフェン類が見つかった。タモキシフェン類についても卵成熟誘起活性を調べたところ、低いながらも卵成熟を直接誘起する活性がみられた。この結果から、エチル基のついたスチルベン構造が卵成熟誘起の標的分子との相互作用に必要であることが確認された。

さらに、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誘起する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。

| Treatment | GVBD (%) | | |
|---------------------------|--------------------------|------|------|
| | Concentration (μ M) | | |
| | 0.1 | 1 | 2 |
| $17\alpha,20\beta$ -DH | 83.3 | 98.3 | 98.3 |
| Diethylstilbestrol (DES) | 0 | 18.3 | 85.0 |
| Estradiol- 17β | 0 | 0 | 0 |
| Estradiol- 17α | 0 | 0 | 0 |
| Ethynylestradiol | 0 | 0 | 0 |
| Resveratrol | 0 | 0 | 0.8 |
| o,p'-DDT | 0 | 0 | 0 |
| p,p'-DDT | 0 | 0 | 0 |
| Buthyl benzyl phthalate | 0 | 0 | 0 |
| Di(2-ethylhexyl)phthalate | 0 | 0 | 0 |
| Bisphenol A | 0 | 0 | 0 |
| p-Nonylphenol | 0 | 0 | 0 |
| 4-Octylphenol | 0 | 0 | 0 |
| Pentachlorophenol | 0 | 0 | 0 |

$17\alpha,20\beta$ -DH: $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one

図57 In vitro 卵成熟誘起に及ぼす性ホルモンと内分泌かく乱物質の影響

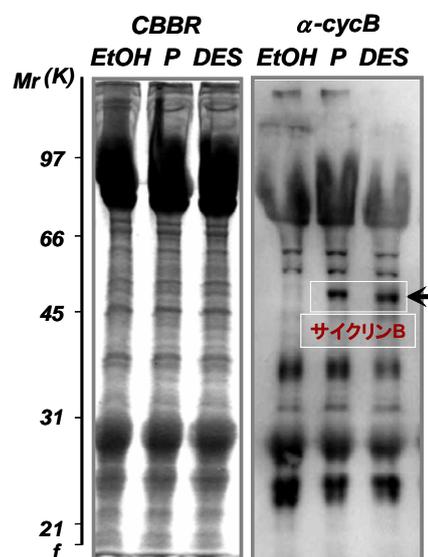


図58 DESと $17\alpha,20\beta$ -DPとの卵成熟誘起作用の比較 (サイクリン合成)

II. 卵成熟誘起に及ぼす内分泌かく乱物質の影響 — ペンタクロロフェノールは卵成熟を阻害する —

一方、十数種類の内分泌かく乱物質について卵成熟誘起に対する阻害作用を示すかどうかについても検討した。その結果、各物質を $17\alpha,20\beta$ -DPと同時に添加した場合、他の物質がほとんど作用を示さなかったのに対してペンタクロロフェノールのみが極めて高い阻害活性を示し、卵成熟を完全に阻害した。また、内分泌かく乱物質により卵を前処理した場合にはメトキシクロルとペンタクロロフェノールが阻害活性を示した。メトキシクロルは前処理した場合に卵成

熟を阻害することがアフリカツメガエルですでに報告されていたが、魚類でも同様の結果となった。同時添加では阻害活性がみられなかったことからこの物質の場合は卵内に浸透し、ステロイド膜受容体以後のシグナル伝達経路を阻害するものと推定される。これに対してペンタクロロフェノールは $17\alpha,20\beta$ -DPと同時添加の場合も作用することからステロイド膜受容体に作用している可能性が高い。ペンタクロロフェノールの阻害効果は $17\alpha,20\beta$ -DP、DESそしてタモキシフェンによる卵成熟全てに対してみられた。このことはこれらの物質が同じ経路に作用していることを示唆している（図59）。

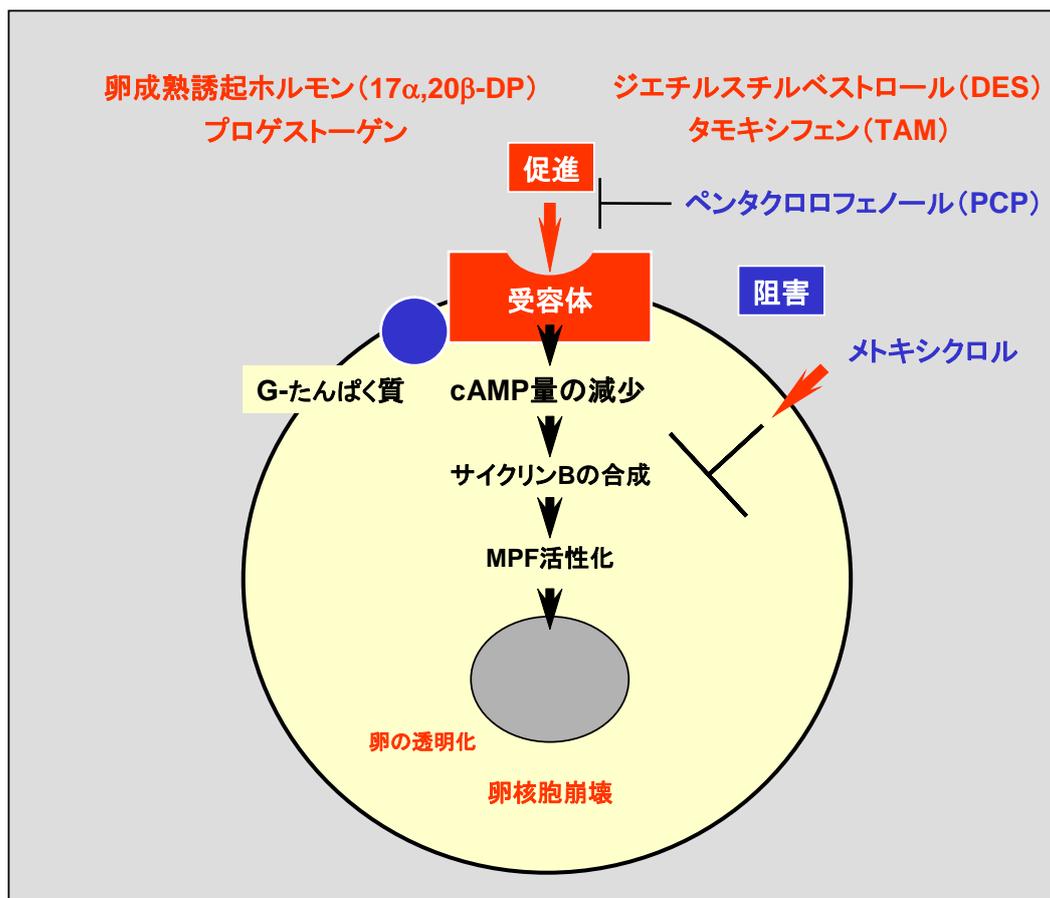


図59 ペンタクロロフェノールによる卵成熟誘起の抑制作用

III. ステロイド膜受容体分子の同定 — 内分泌かく乱物質は膜受容体に作用する —

ステロイド膜受容体はその存在については25年前に示されていたが、実体がかめないままであった。しかし、最近ついにその遺伝子配列がアメリカの研究者らによって報告された。早速我々も、そのステロイド膜受容体遺伝子(mPR)のキンギョホモログ遺伝子のクローニングを

開始した。mPRには α 、 β 、 γ の3タイプが存在することがヒトやマウスのゲノム情報より明らかにされていたが、キンギョ卵巣cDNAライブラリーのスクリーニングの結果、キンギョ卵巣

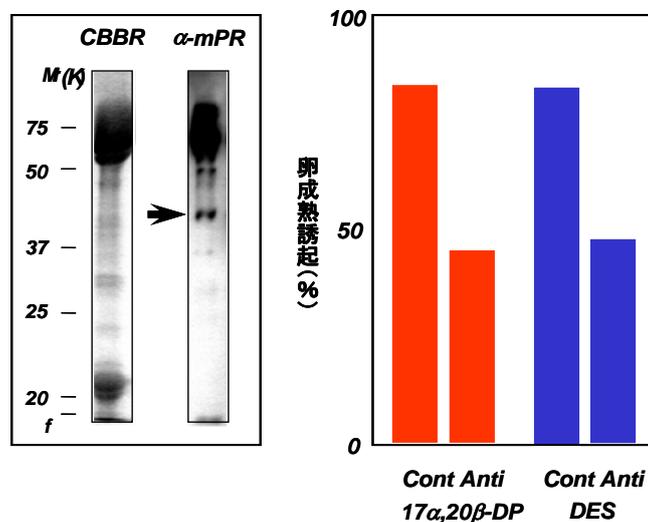


図60 ステロイド膜受容体抗体による卵成熟誘起の抑制作用

には α 、 β の他、 γ については2タイプ (γ -1、 γ -2)、計4タイプが存在することが明らかになった。

4つのタイプのうち、mPRそのものとして最初に同定された α タイプについて機能解析を進めた。mPR α はそのアミノ酸配列から7回膜貫通型の膜タンパク質であることが予測されている。そこで、N末端の細胞外領域、中央の細胞外領域のGST融合リコンビナントタンパク質を作製し、これらを不溶性画分から電気泳動法により精製したものを抗原としてポリクローナル抗体の作製を行なった。その結果、N末端の細胞外領域、中央の細胞外領域を抗原にした場合に目的のステロイド膜受容体の40 kDaのバンドと反応する抗体が得られた (図60)。この抗体を用いた解析で、卵の卵成熟誘起能とmPR α タンパク質の発現量に相関がみられたことや、モルフオリノアンチセンスオリゴヌクレオチドの卵内への微量注入によるノックダウン実験から卵成熟の阻害率とmPR α タンパク質の減少が一致してみられたことから、mPR α がキンギョステロイド膜受容体の一つであることが示唆された。そこで、ステロイドホルモンとの相互作用部位である可能性の高い、mPR α N末端の細胞外領域に対するポリクローナル抗体の卵成熟誘起に対する阻害効果を調べた。その結果、この抗体を作用させた卵では17 α ,20 β -DPによる卵成熟誘起が阻害された他、DESによる卵成熟もほぼ同じ率に阻害された (図60)。この結果はmPR α がステロイド膜受容体であることを示すと同時にDESの標的分子がmPR α であることを強く支持する。

IV. In vivo評価系の確立 — DESはin vivoにおいても卵成熟を誘起する —

一方、ステロイドホルモンや内分泌かく乱物質を飼育水に直接に添加し、サカナの生体そのものに作用させる実験を試みたところ、DESが*in vivo*においても実際に卵成熟誘起活性を示す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。さらにこの*in vivo*の系では卵成熟のみならず受精可能な卵に変化する排卵の過程についてもアッセイすることができる。17 α ,20 β -DPをゼブラフィッシュの生体そのものに作用させた場合、約4時間で排卵まで進行し、受精可能な卵が得られた。これに対し、DESの場合は卵成熟のみが進行し、排卵は起きなかった。そこで、DESと17 α ,20 β -DPの作用時間を変化させた共培養実験を行った。その結果、まずDESにより卵成熟を開始させ、その後、短時間（2時間）だけ17 α ,20 β -DPを作用させた場合にも排卵が誘導されることが明らかになった。このことは二つの重要なことを示している。一つはDESが正常な卵成熟を誘起していることが確認されたこと、もう一つは17 α ,20 β -DPは排卵に必要な別の経路も活性化しており、その経路の反応は卵成熟に要する時間（3時間）に比べて短時間（2時間）であるということである。また、DES添加後、時間差をつけて17 α ,20 β -DPを作用させたところ排卵誘導が起きるためにはDES添加後2-2.5時間以内に17 α ,20 β -DPを作用させなければ排卵が起きなくなることから、卵成熟誘起と排卵誘起の反応は連続的に進行する必要があることが明らかになった。同様の実験を各種ステロイドホルモンについて行ったところプロゲステロン類には排卵まで進行させる活性がみられたが、テストステロンについては*in vitro*と同様に*in vivo*においても卵成熟誘起活性を示したが、排卵は誘導できなかった。これらの結果から、卵成熟から排卵に至る過程には卵成熟を活性化する経路と排卵に必要な経路を活性化する別の経路が存在し、プロゲステロン類は卵成熟受容体に作用する他、排卵を誘起する別の標的分子にも作用することを示唆する。一方、DESやテストステロンは卵成熟にのみ作用すると考えられる。

（3）研究成果の今後期待される効果

これまでステロイドホルモンの受容体としては核内受容体が古くから同定され、一般にステロイドホルモンは核内受容体を介して作用するものと考えられてきた。しかし、卵成熟誘起においてはステロイドホルモンは核内受容体ではなく細胞膜表面のステロイド膜受容体を介して作用することが提唱されてきた。ステロイド膜受容体分子の発見は細胞膜表面のステロイド膜受容体を介したシグナル伝達経路という新しい概念をもたらすものとしてその存在の提唱から数十年間、同定が待たれていたが、ついにその候補遺伝子が発見された。発見された受容体候補遺伝子は卵だけではなく、そのサブタイプを含めると脳や腎臓をはじめあらゆる組織で発現していることが明らかになった。このことから細胞膜表面のステロイド受容体を介したシグナル伝達経路が卵成熟だけではなく一般的なステロイドの作用機構の一つであることが示唆されており、今後その構造・機能の解明に向けて多くの研究が進められるものと予想される。本研究で開始した卵膜のステロイド膜受容体分子の機能解析をさらに進め、

この新規分子の機能解明に貢献できればと考えている。

卵成熟は様々な生物種において研究されており、いずれもエストロゲンでは誘導されない、あるいはエストロゲンにより阻害を受ける種も存在することが明らかにされている。このことから我々の発見したDESによる卵成熟誘起はこれまでに明らかにされているDESのエストロゲン様の作用とは全く別の作用であり、内分泌かく乱物質のプロゲステロン様作用として注目すべき知見である。ペンタクロロフェノールの強い卵成熟阻害作用についても同様に抗プロゲステロン作用として新しい知見である。今後、DESやペンタクロロフェノールとこの新規ステロイド膜受容体との関連について、受容体とDESの結合実験により詳細に検討する予定である。そして、このような内分泌かく乱物質のプロゲステロン様作用あるいは抗プロゲステロン作用が証明されれば内分泌かく乱化学物質の作用機構に新しい概念をもたらすものと考えられる。

一方、本研究で確立した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*in vivo*実験系はプロゲステロン様物質あるいは抗プロゲステロン様物質の*in vivo*評価系として応用が期待される（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。また、この系を用いて明らかになった卵成熟誘起にのみ有効であるDESの特性が未だ未解明な部分の多い排卵誘導の分子メカニズムの解明の糸口になることが期待される。

4 研究参加者

① 長濱グループ（基礎の研究）

| 氏名 | 所属 | 役職 | 研究項目 | 参加時期 |
|-------------------|----------|----------|-----------------|-----------------------|
| 長濱 嘉孝 | 自然科学研究機構 | 教授 | 生殖系と環境ホルモン | 平成12年12月～ |
| 吉国 通庸 | 自然科学研究機構 | 助教授 | 卵成熟と環境ホルモン | 平成12年12月～ |
| 小林 亨 | 養殖研究所 | 主任研究員 | 性分化と精子形成 | 平成12年12月～ |
| 大久保 範聡 | 自然科学研究機構 | 助手 | 魚類の内分泌 | 平成15年04月～ |
| 小林 弘子 | 自然科学研究機構 | 技官 | 精子形成 | 平成12年12月～ |
| 松田 勝 | 自然科学研究機構 | さきがけ研究員 | 性決定・性分化と環境ホルモン | 平成12年12月～ 平成14年10月 |
| 柴田 安司 | 自然科学研究機構 | 研究員 | 卵成熟と環境ホルモン | 平成12年12月～ 平成17年03月 |
| 池内 俊貴 | 長浜バイオ大学 | 非常勤職員 | 性分化・精子形成と環境ホルモン | 平成13年04月～ |
| 司馬 桂君 | 自然科学研究機構 | CREST研究員 | 性分化と環境ホルモン | 平成13年04月～ |
| 酒井 章衣 | 自然科学研究機構 | CREST研究員 | 性分化と環境ホルモン | 平成13年04月～ |
| 井尻 成保 | 自然科学研究機構 | CREST研究員 | 性決定・性分化と環境ホルモン | 平成16年04月～ |
| B. Senthilkumar | 自然科学研究機構 | CREST研究員 | 卵成熟 | 平成12年12月～ 平成15年10月 |
| C. C. Sudhakumari | 自然科学研究機構 | 研究補助員 | 卵成熟 | 平成12年12月～ 平成15年10月 |

| | | | | |
|---------------|----------|----------|--------------------|-----------------------|
| X. T. Chang | 自然科学研究機構 | 外国人特別研究員 | 性分化・卵成長 | 平成12年12月～ 平成13年10月 |
| Wang De Shou | 自然科学研究機構 | CREST研究員 | 性決定・性分化 | 平成14年04月～ |
| Paul Bindhu | 自然科学研究機構 | 研究員 | 性分化と環境ホルモン | 平成16年04月～ |
| Basu Dipanjan | 自然科学研究機構 | 研究員 | 性分化と環境ホルモン | 平成17年04月～ |
| 宇佐美 剛志 | 自然科学研究機構 | 研究員 | 性転換 | 平成17年04月～ |
| 鈴木 亜矢 | 自然科学研究機構 | 研究員 | 性決定・性分化と 環境ホルモン | 平成17年04月～ |
| 金子 裕代 | 自然科学研究機構 | 研究員 | 性分化と環境ホルモン | 平成17年04月～ |
| 易 梅生 | 自然科学研究機構 | 外国人特別研究員 | 性分化と環境ホルモン | 平成15年04月～ 平成17年06月 |
| 松岡 陽 | 自然科学研究機構 | 特別協力研究員 | 精子形成 | 平成14年04月～ 平成15年03月 |
| 矢野 晶大 | 自然科学研究機構 | 特別協力研究員 | 精子形成 | 平成15年04月～ 平成16年03月 |
| 田中 将樹 | 自然科学研究機構 | 特別協力研究員 | 精子形成 | 平成16年04月～ 平成17年03月 |
| 堀口 涼 | 自然科学研究機構 | 大学院生 | 卵成熟・受精 | 平成12年12月～ 平成15年03月 |
| 范 海光 | 自然科学研究機構 | 特別協力研究員 | 性分化・性転換 | 平成12年12月～ 平成17年03月 |
| 小林 靖尚 | 北海道大学 | 大学院生 | 性転換と環境ホルモン | 平成12年12月～ 平成16年03月 |
| 大室 有紀 | 自然科学研究機構 | 大学院生 | 性決定・性分化 | 平成14年04月～ 平成17年09月 |

| | | | | |
|--------|----------|--------------|----------------|-----------------------|
| 栗田 加代子 | 自然科学研究機構 | 大学院生 | 精子形成 | 平成15年04月～ |
| 周 林燕 | 自然科学研究機構 | 大学院生 | 性決定・性分化と環境ホルモン | 平成15年04月～ |
| 松田 千香 | 自然科学研究機構 | 特別協力 研究員 | 性決定 | 平成12年12月～ 平成16年03月 |
| 提髪 玲子 | 自然科学研究機構 | CREST技術 員 | 卵成熟 | 平成13年04月～ 平成16年01月 |
| 早川 利枝 | 自然科学研究機構 | 研究補助 員 | 性決定・性分化と環境ホルモン | 平成12年12月～ |
| 原 郁代 | 自然科学研究機構 | 研究補助 員 | 卵成熟と環境ホルモン | 平成16年04月～ |
| 平川 恵里 | 自然科学研究機構 | 研究補助 員 | 性決定・性分化と環境ホルモン | 平成13年03月～ |
| 嶋田 ゆう | 自然科学研究機構 | 研究補助 員 | | 平成12年12月～ |

② 中村グループ（性転換の研究）

| 氏名 | 所属 | 役職 | 研究項目 | 参加時期 |
|-------|-----------------|-------|--------------|-----------------------|
| 中村 將 | 琉球大学熱帯生物圏研究センター | 教授 | 性転換と環境ホルモン | 平成12年12月～ |
| 竹村 明洋 | 琉球大学熱帯生物圏研究センター | 助教授 | 生理・分子生物学 | 平成12年12月～ 平成13年03月 |
| 比嘉 幹彦 | 琉球大学熱帯生物圏研究センター | 特別研究員 | 脳の性分化と環境ホルモン | 平成13年04月～ 平成17年03月 |
| 小林 靖尚 | 琉球大学熱帯生物圏研究センター | 研究員 | 性転換と環境ホルモン | 平成16年04月～ |

| | | | | |
|--------|-----------------|----------|------------|-----------------------|
| 小笠原 敬 | 琉球大学熱帯生物圏研究センター | CREST技術員 | 生態・行動・形態 | 平成13年04月～ 平成14年03月 |
| 田辺 ひさ代 | 琉球大学熱帯生物圏研究センター | 大学院生 | 生態・行動・形態 | 平成13年04月～ 平成17年03月 |
| 三浦 さおり | 琉球大学熱帯生物圏研究センター | 大学院生 | 性転換と環境ホルモン | 平成17年04月～ |
| 榊 克子 | 琉球大学熱帯生物圏研究センター | 大学院生 | 性転換と環境ホルモン | 平成17年04月～ |
| 大橋 広義 | 琉球大学熱帯生物圏研究センター | CREST技術員 | 組織培養 | 平成15年04月～ 平成16年03月 |
| 屋富祖 妙子 | 琉球大学熱帯生物圏研究センター | 研究補助員 | | 平成13年07月～ |

③ 北野グループ（海産魚の研究）

| 氏名 | 所属 | 役職 | 研究項目 | 参加時期 |
|--------|----------|----------|------------|-----------------------|
| 北野 健 | 熊本大学理学部 | 助教授 | 性決定と環境ホルモン | 平成12年12月～ |
| 曳野 泰子 | 熊本大学自然科学 | CREST技術員 | 性決定と環境ホルモン | 平成13年04月～ 平成14年03月 |
| 今里 栄男 | 熊本大学自然科学 | 大学院生 | 性決定と環境ホルモン | 平成13年04月～ 平成15年03月 |
| 古柳 貴史 | 熊本大学自然科学 | 大学院生 | 性決定と環境ホルモン | 平成13年04月～ 平成15年03月 |
| 山口 紗貴子 | 熊本大学自然科学 | 大学院生 | 性決定と環境ホルモン | 平成14年04月～ 平成16年03月 |
| 吉永 憲史 | 熊本大学自然科学 | 大学院生 | 雄化マーカーの探索 | 平成14年04月～ 平成16年03月 |

| | | | | |
|----------|----------|-------|------------|-----------------------|
| 大森 智子 | 熊本大学自然科学 | 研究補助員 | 性決定と環境ホルモン | 平成14年04月～ 平成17年03月 |
| 安達 竜太 | 熊本大学自然科学 | 大学院生 | 性決定と環境ホルモン | 平成15年04月～ 平成17年03月 |
| 白石 絵史 | 熊本大学自然科学 | 大学院生 | 性決定と環境ホルモン | 平成15年04月～ |
| 田中 有香 | 熊本大学自然科学 | 大学院生 | 性決定と環境ホルモン | 平成17年04月～ |
| Jun Yang | 熊本大学自然科学 | 大学院生 | 性決定と環境ホルモン | 平成17年04月～ |

④ 徳元グループ（卵成熟の研究）

| 氏名 | 所属 | 役職 | 研究項目 | 参加時期 |
|-------|---------------|----------|------------|-----------|
| 徳元 俊伸 | 静岡大学理学部 生物 | 助教授 | 卵成熟と環境ホルモン | 平成12年12月～ |
| 徳元 美佳 | 静岡大学理学部 生物 | CREST研究員 | 卵成熟と環境ホルモン | 平成13年04月～ |
| 堀口 涼 | 静岡大学理学部 生物 | 研究学生 | 卵成熟と環境ホルモン | 平成15年04月～ |

5 成果発表等

(1) 論文発表 (国内・和文 4 件、海外・国際 128 件)

2000:

- 1) Guan, G., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2000). Sexually dimorphic expression of DM (Doublesex/Mab-3)-domain genes during gonadal differentiation in tilapia. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 272, 662-666.
- 2) Guan, G., Todo, T., Tanaka, M., Young, G. and Nagahama, Y. (2000). Isoleucine-15 of rainbow trout carbonyl reductase-like 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase is critical for coenzyme (NADPH) binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3079-3083.
- 3) Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T. and Fujita, K. (2000). Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine Environmental Research* 49, 37-53.
- 4) Kajiura-Kobayashi, H., Yoshida, N., Sagata, N., Yamashita, M. and Nagahama, Y. (2000). The Mos/MAPK pathway is involved in metaphase II arrest as a cytostatic factor but is neither necessary nor sufficient for initiating oocyte maturation in goldfish. *Dev. Genes Evol.* 210, 416-425.
- 5) Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y. and Abe, S. (2000). Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone causes sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol. Reprod. Develop.* 56, 1-5.
- 6) Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H. and Nagahama, Y. (2000). Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis of a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mech. Develop.* 99, 139-142.
- 7) Nakayama, Y., Yamamoto, T., Oba, Y. and Nagahama, Y. (2000). Molecular cloning, functional characterization, and gene expression of a follicle-stimulating hormone receptor in the testis of newt *Cynops pyrrhogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 275, 121-128.
- 8) Oba, Y., Hirai, T., Yoshiura, Y., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2000). Cloning, functional characterization, and expression of thyrotropin receptors in the thyroid of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 276, 258-263.
- 9) Okida, N., Tokumoto, M., Tokumoto, T., Nagahama, Y., Ohe, Y., Miyamoto, K. and Ishikawa, K. (2000). Cloning of cDNA encoding thimet oligopeptidase from *Xenopus* oocytes and regulation of the mRNA during oogenesis. *Zool. Sci.* 17, 431-436.
- 10) Shibata, Y., Iwamatsu, T., Oba, Y., Kobayashi, D., Tanaka, M., Nagahama, Y., Suzuki, N. and Yoshikuni, M. (2000). Identification and cDNA cloning of alveolin, an extracellular metalloproteinase

responsible for chorion hardening of medaka (*Oryzias latipes*) eggs upon fertilization. J. Biol. Chem. 275, 8349-8354.

11) Shinomiya, A., Tanaka, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y. and Hamaguchi, S. (2000). The vasa-like gene, *olvas*, identifies migration path of primordial germ cells during embryonic formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. Develop. Growth Differ. 42, 317-326.

12) Todo, T., Ikeuchi, T., Kobayashi, T., Kajura-Kobayashi, H., Suzuki, K., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2000). Characterization of a nuclear $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (a spermiation-inducing steroid in fish) receptor cDNA from the testis of a teleost, Japanese eel (*Anguilla japonica*). FEBS Letters 465, 12-17.

13) Tokumoto, M., Horiuchi, R., Nagahama, Y., Ishikawa, K. and Tokumoto, T. (2000). Two proteins, a goldfish 20S proteasome subunit and the protein interacting with 26S proteasome, change in the meiotic cell cycle. Eur. J. Biochem. 267, 97-103.

14) Tokumoto, M., Nagahama, Y. and Tokumoto, T. (2000). Molecular cloning of cDNA encoding a ubiquitin-activating enzyme (E1) from goldfish (*Carassius auratus*) and expression analysis of the cloned gene. Bioch. Biophys. Acta 1492, 259-263.

15) Tokumoto, M., Yamaguchi, A., Nagahama, Y. and Tokumoto, T. (2000). Identification of the goldfish 20S proteasome $\alpha 6$ subunit bound to nuclear matrix. FEBS Letters 472, 62-66.

2001:

16) Ikeuchi, T., Todo, T., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2001). Two subtypes of androgen and progesterone receptors in fish testes. Comp. Physiol. Biochem. Part B 129, 449-455.

17) Imahara, J., Tokumoto, M., Nagahama, Y., Ishikawa, K. and Tokumoto, T. (2001) Reconstitution of sperm nuclei of zebrafish, *Danio rerio*, in *Xenopus* egg extracts. Marine Biotechnology 3, 53-57.

18) Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y. and Abe, S. (2001). Role of P450 aromatase in gonadal sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Environmental Sciences 8, 1-11.

19) Liu, S.J., Govoroun, M., D'Cotta, H., Ricordel, M.J., Lareyre, J.J., McMeel, O.M., Smith, T., Nagahama, Y. and Guiguen, Y. (2001). Expression of P450 11β (11β -hydroxylase) genes during gonadal sex differentiation and spermatogenesis of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 75, 291-298.

20) Matsuda, M., Kawato, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Nagahama, Y., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. and Hori, H. (2001). Construction of a BAC library derived from the inbred Hd-rR strains of the teleost fish, *Oryzias latipes*. Gene Genetic Systems 76, 61-63.

21) Matsuyama, M., Sasaki, A., Nakagawa, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y. and Chuda, H. (2001).

Maturation-inducing hormone of the tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Tetraodontidae, Teleostei): biosynthesis of steroids by the ovaries and the relative effectiveness of steroid metabolites for germinal vesicle breakdown *in vitro*. *Zool. Sci.* 18, 225-234.

22) Mita, M., and Nakamura, M. (2001). Energy metabolism of sea urchin spermatozoa: the endogenous substrate and ultrastructural correlates. *Echinoderm Studies* (Eds. Jangoux, M., and Lawrence, J.M.). Vol. 6. pp.85-110. A.A. Balkema Publishers, Rotterdam, Netherlands.

23) Nakahata, S., Katsu, Y., Mita, K., Inoue, K., Nagahama, Y. and Yamashita, M. (2001). Biochemical identification of *Xenopus* Pumilio as a sequence-specific cyclin B1 mRNA-binding protein that physiologically interacts with a Nanos homolog, Xcat-2, and a cytoplasmic polyadenylation element-binding protein. *J. Biol. Chem.* 276, 20945-20953.

24) Nakahata, S., Mita, K., Katsu, Y., Nagahama, Y. and Yamashita, M. (2001). Immunological detection and characterization of poly(A) polymerase, poly(A)-binding protein and cytoplasmic polyadenylation element-binding protein in goldfish and *Xenopus* oocytes. *Zool. Sci.* 18, 337-343.

25) Nakamura, M., Nagoya, H. and Hirai, T., (2001). Effects of Nonylphenol on the gonadal sex differentiation in male Amago salmon. *Perspective in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity*. Editors H. J. Th. Goos, R. K. Rastogi, H. Vaudry and R. Pierantoni, Monduzzi Editore. 1285-289.

26) Oba, Y., Hirai, T., Yoshiura, Y., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2001). Fish gonadotropin and thyrotropin receptors: The evolution of glycoprotein hormone receptors in vertebrates. *Comp. Physiol. Biochem. Part B* 129, 441-448.

27) Tanaka, M., Kinoshita, M. and Nagahama, Y. (2001). Establishment of medaka (*Oryzias latipes*) transgenic lines with the expression of GFP fluorescence exclusively in germline cells: a useful model to monitor germline cells in a live vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2544-2549.

28) Tokumoto, M., Nagahama, Y. and Tokumoto, T. (2001). Molecular cloning of cDNA encoding polypeptide chain elongation factor 1 α from goldfish (*Carassius auratus*). *DNA Seq.* 12, 419-424.

29) Yamaguchi, A. and Nagahama, Y. (2001). Somatic lamins in germinal vesicles of goldfish vitellogenic oocytes. *Cell Struc. Func.* 26, 693-703.

30) Yamaguchi, A., Yamashita, M., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2001). Identification and molecular cloning of germinal vesicle B3 in goldfish (*Carassius auratus*) oocytes. *Eur. J. Biochem.* 268, 932-939.

2002:

31) 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.

- 32) Ikeuchi, T., Todo, T., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2002). A novel progesterone receptor subtype in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. FEBS Letters 550, 77-82.
- 33) 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.
- 34) Kim, S.I., Ogasawara, K., Park, I.G., Takemura, A. and Nakamura, M. (2002). Sequence and expression of androgen receptor and estrogen receptor gene in the sex types of protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus* Gen. Comp. Endocrinol. 127, 165-173.
- 35) Kim, B.H., Takemura, A. and Nakamura, M. (2002). Comparison of in vitro vitellogenin synthesis among different nonylphenol products using primary cultures of tilapia hepatocytes. Fish. Sci. 68, 838-842.
- 36) 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.
- 37) Kusakabe, M., Kobayashi, T., Todo, T., Lokman, P.M., Nagahama, Y. and Young, G. (2002). Molecular cloning and expression during spermatogenesis of a cDNA encoding testicular 11 β -hydroxylase (P45011 β) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mol. Reprod. Develop. 62, 456-469.
- 38) Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C.E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori, H., Hamaguchi, S. and Sakaizumi, M. (2002). *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. Nature 417, 559-563.
- 39) Mita, M., Uehara, T. and Nakamura, M. (2002). Comparative studies on the Energy Metabolism in Spermatozoa of Four Closely Related Species of Sea Urchins (Genus *Echinometra*) in Okinawa. Zool. Sci. 19, 419-427.
- 40) 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.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) 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.

44) 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.

45) Tanaka, M., Nakajin, S., Kobayashi, T., Fukada, S., Guan, G., Todo, T., Senthilkumaran, B. and Nagahama, Y. (2002). Teleost ovarian carbonyl reductase-like 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Potential role in the production of maturation-inducing hormone during final oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 66, 1498-1504.

46) Tokumoto, M., Nagahama, Y. and Tokumoto, T. (2002). A major substrate for MPF: cDNA cloning and expression of polypeptide chain elongation factor 1 γ from goldfish (*Carassius auratus*). *DNA Sequence* 13, 27-31.

47) 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.

48) 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.

49) 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.

2003:

50) Bhandari, R.K., Komuro, H., Nakamura, S., Higa, M. and Nakamura, M. (2003). Gonadal restructuring and correlative steroid honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). *Zool. Sci.* 20, 1399-1404.

51) 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 schlegeli*. *Biol. Reprod.* 69, 455-461.

52) 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 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 cDNAs from the testes of Japanese eel (*Anguilla japonica*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Mol. Endocrinol.* 31, 305-315.

53) 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.

54) 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.

55) 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.

56) Nakamura, M., Bhandari, R.K. and Higa, M. (2003). The role estrogens play in sex differentiation and in sex changes of fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 28: 113-117.

57) Okubo, K., Ishii, S., Ishida, J., Mitani, H., Naruse, K., Kondo, M., Shima, A., Tanaka, M., Asakawa, S., Shimizu, N. and Aida, K. (2003). A novel third gonadotropin-releasing hormone receptor in the medaka *Oryzias latipes*: evolutionary and functional implications. *Gene* 314, 121-131.

58) Shimasaki, Y., Kitano, T., Oshima, Y., Inoue, S., Imada, N. and Honjo, T. (2003). Tributyltin causes masculinization in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 141-144.

59) 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 oocyte maturation. *BMC Biochem.* 4, 6.

60) Watanabe, K., Tokumoto, T. and Ishikawa, K. (2003). 1,10-Phenanthroline phosphorylates (activates) MAP kinase in *Xenopus* oocytes. *Cell. Signal.* 15, 1139-1147.

61) 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.

62) 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. Reprod. Develop.* 66, 60-66.

63) Yoshiura, Y., Senthilkumaran, B., Watanabe, M., Oba, 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.

2004:

64) 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.

- 65) Bhandari, R.K., Komuro, H., Higa, M. and Nakamura, M. (2004). Sex inversion of sexually immature honecomb grouper (*Epinephelus merra*) by aromatase inhibitor. *Zool Sci.* 21, 305-310.
- 66) 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.
- 67) 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.
- 68) 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.
- 69) Mita, M., Uehara, T. and Nakamura, M. (2004). Speciation in four closely related species of sea urchins (genus *Echinometra*) with special reference to acrosome reaction. *Inverteb. Reprod. Develop.* 45, 169-174.
- 70) 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.
- 71) 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.
- 72) 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. *Environ. Poll.* 133, 415-429.
- 73) Senthilkumaran, B. and Nagahama, Y. (2004). A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 215, 11-18.
- 74) 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.
- 75) 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.
- 76) 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.

77) 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.

78) 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, 18-25.

79) 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.

80) 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.

2005:

81) Ashraful, M.A., Komuro, H., Bhandari, R. K., Nakamura, S., Soyano, K. and Nakamura, M. (2005). Immunohistochemical evidence possibly identifying the site of androgen production in the ovary of the protogynous grouper *Epinephelus merra*. Cell Tissue Res. 320, 323-329.

82) Bhandari, R. K., Ashraful, M. A., Higa, M., Soyano, K. and Nakamura, M. (2005). Evidence that estrogen regulates the sex change of honeycomb grouper (*Epinephelus merra*), a protogynous hermaphrodite fish. J. Exp. Zool. 303A, 497-503.

83) Bhandari, B.K., Nakamura, M., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2005). Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Gen. Comp. Endocrinol. (in press).

84) Chiba, H., Ijiri, S., Iwata, M., Nakamura, M., Adachi, S. and Yamauchi, K. (2005). Changes in serum steroid hormones during ovarian development in the captive common Japanese conger *Conger myriaster* (Brevoort). Aquacul. Sci. 53, 189-198.

85) Horiguchi, R., Tokumoto, M., Nagahama, Y. and Tokumoto, T. (2005). Molecular cloning and expression of cDNA coding four spliced isoforms of casein kinase I α in goldfish oocytes. Biochim. Biophys. Acta 1727, 75-80.

86) Horiguchi, R., Yoshikuni, M., Tokumoto, M., Nagahama, Y. and Tokumoto, T. (2005). 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.

- 87) Kitano, T., Koyanagi, T., Adachi, R., Sakimura, N., Takamune, K. and Abe S.-I. (2005). Assessment of estrogenic chemicals using an estrogen receptor α (ER α)- and ER β -mediated reporter gene assay in fish. *Mar. Biol.* (In press).
- 88) Kobayashi-Kajiura, H., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2005). Cloning of cDNAs and the differential expression of A-type cyclins and Dmc1 during spermatogenesis in the Japanese eel, a teleost fish. *Dev. Dyn.* 232, 1115-1123.
- 89) 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.
- 90) Kobayashi, Y., Sunobe, T., Kobayashi, T., Nakamura, M., Suzuki, N. and Nagahama, Y. (2005). Molecular cloning and expression of *Ad4BP/SF-1* in the serial sex changing gobiid fish *Trimma okinawae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 332, 1073-1080.
- 91) Komatsu, T., Nakamura, S. and Nakamura, M. (2005). A sex cord-like structure and some remarkable features in early gonadal sex differentiation in a marine teleost, golden rabbitfish *Siganus guttatus* (Bloch). *J. Fish. Biol.* (in press).
- 92) Nakamura, I., Evans, J.C., Kusakabe, M., Nagahama, Y. and Young, G. (2005). Changes in steroidogenic enzyme and steroidogenic acute regulatory protein messenger RNAs in ovarian follicles during ovarian development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* (in press).
- 93) Nakamura, N., Tokumoto, T. and Iwao, Y. (2005). The cytoskeleton-dependent localization of cdc2/cyclin B in blastomere cortex during *Xenopus* embryonic cell cycle. *Mol. Reprod. Develop.* 72, 336-345.
- 94) 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. *Environ. Pollut.* 133, 415-429.
- 95) Nakata, H., Nasu, T., Abe, S., Kitano, T., Fan, Q., Li, W. and Ding, X. (2005). Organochlorine contaminants in human adipose tissues from China: mass balance approach for estimating historical Chinese exposure to DDTs. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4714-4720.
- 96) Sunobe, T., Nakamura, M., Kobayashi, Y., 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. Part A* 141, 54-59.
- 97) Sunobe, T., Nakamura, M., Kobayashi, Y., Kobayashi, T. and Nagahama, T. (2005). Gonadal structure and P450_{scc} and 3-HSD-like immunoreactivity in the gobiid fish *Trimma okinawae* during

bidirectional sex change. *Ichthyol. Res.* 52, 27-32.

98) Tokumoto, M., Nagahama, Y., Thomas, P. and Tokumoto, T. (2005). Cloning and identification of a membrane progesterin receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* (in press).

99) Wayne, N.L., Kuwahara, K., Aida, K., Nagahama, Y. and Okubo, K. (2005). Whole-cell electrophysiology of gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons that express green fluorescent protein (GFP) in the terminal nerve of transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *Biol. Reprod.* (in press).

100) 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.* 35, 103-116.

2) Proceedings:

101) Bhandari, R.K., Higa, M., Komuro, H., Nakamura, S. and Nakamura, M. (2003). Treatments with an aromatase inhibitor induces complete sex in protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). *Fish Physiol. Biochem.* 28, 141-142.

102) Fan, H.G., Wang, D.S., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Sudhakumari, C.C., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2003). Molecular cloning of the three gonadotropin subunits and early expression of FSH β during sex differentiation of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 143-144.

103) Higa, M., Ogasawara, K., Sakaguchi, A., Nakamura, Y. and Nakamura, M. (2003). Role of steroid hormones in sex change of protogynous wrasse. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 149-150.

104) Higa, M., Ogasawara, K., Sakaguchi, A., Nagahama, Y. and Nakamura, M. (2003). Role of steroid hormones in sex change of protogynous wrasse. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 149-150.

105) Ikeuchi, T., Kobayashi, T., Todo, T. and Nagahama, Y. (2003). Transgenic cell lines which stably express progesterone receptors (PRs) a and b and the PR-responsive reporter genes. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 151.

106) Kajiura-Kobayashi, H., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2003). Estrogen-induced and suppressed gene expression during XY sex reversal in a teleost fish, tilapia. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 153.

107) Kajiura-Kobayashi, H., Matsuda, M., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2003). Partial cloning of the 17 β HSD-I from the Nile tilapia ovary and its expression pattern during then spawning cycle. *Fish Physiol. Biochem.* 28,

- 108) 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.
- 109) Kobayashi-Kajiura, H., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2005). Cloning of cDNAs and the differential expression of A-type cyclins and Dmc1 during spermatogenesis in the Japanese eel, a teleost fish. Fish Physiol. Biochem. 28, 157.
- 110) Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H. and Nagahama, Y. (2003). Germ cells during gonadal differentiation in the teleost. Fish Physiol. Biochem. 28, 157.
- 111) Matsuda, N., Nagahama, Y., Kobayashi, T., Hamaguchi, S. and Sakaizumi, M. (2003). The sex determining gene of medaka: A Y-specific DM domain gene (DMY) is required for male development. Fish Physiol. Biochem. 28, 135-139.
- 112) Miura, S., Higa, M., Bhandari, R.K., Nakamura, S. and Nakamura, M. (2003). Gonadal sex differentiation in protandrous anemone fish *Amphiprion clarkii*. Fish Physiol. Biochem. 28, 165-166.
- 113) Miuri, S., Komatsu, T., Bhandari, R.K., Nakamura, S., Nakamura, M. (2003). Gonadal sex differentiation in protandrous anemone fish, *Amphiprion clarkii*. Fish Physiol. Biochem. 28, 165-166.
- 114) Nakamura, M., Bhandari, R.K. and Higa H. (2003). The role estrogens play in sex differentiation and in sex changes of fish. Fish Physiol. Biochem. 28, 113-117.
- 115) Nakamura, M., Kobayashi, T., Yoshiura, Y. and Nagahama, Y. (2000). Role of endogenous steroid hormones on gonadal sex differentiation in fish. In: Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. p. 247-249. Edited by B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson and S. O. Stefansson. Fish Symp 99, Bergen Norway.
- 116) Ohmuro-Matsuyama, Y., Matsuda, M., Kobayashi, T., Ikeuchi, T. and Nagahama, Y. (2003). Expression of DMY and DMRT1 in the various tissues of the medaka, *Oryzias latipes*. Fish Physiol. Biochem. 28, 171.
- 117) Ohta, K., Sundaray, J.K., Okida, T., Sakai, M., Kitano, T., Yamaguchi, T., Takeda, T. and Matsuyama, M. (2003). Bi-directional sex change and its steroidogenesis in the wrasse, *Pseudolabrus sieboldi*. Fish Physiol. Biochem. 28, 173-174.
- 118) Senthilkumaran, B., Yoshiura, Y., Oba, Y., Sudhakumari, C.C., Wang, D.S., Kobayashi, T., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2003). Steroidogenic shift is a critical event for ovarian follicles to undergo final maturation. Fish Physiol. Biochem. 28, 313-315.
- 119) Soyano K., Masumoto, T., Tanaka, H., Takushima, M. and Nakamura, M. (2003). Lunar-related spawning in honeycomb grouper, *Epinephelus merra*. Fish Physiol. Biochem. 28, 447-448.
- 120) Sudhakumari, C.C., Senthilkumaran, B., Kobayashi, T., Wang, D.S., Chang, X.T. and Nagahama, Y.

(2003). Expression of cytochrome P-450 aromatases in the sex-reversed Nile tilapia. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 177-178.

121) Tokumoto, T., Tokumoto, M., Ishimatsu, M., Horiguchi, R., Nagahama, Y. and Ishikawa, K. (2003) Purification of anaphase promoting complex/cyclosome from goldfish oocytes. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 371.

122) Wang, D.S., Senthilkumaran, B., Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Matsuda, M., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2003). Molecular cloning and gene expression of the riboflavin binding protein in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 225-226.

123) Zhou, L.Y., Senthilkumaran, B., Wang, D.S., Sudhakumari, C.C., Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Matsuda, M., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2003). Partial cloning of the 17 β -HSD-I from the Nile tilapia ovary and its expression pattern during the spawning cycle. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 381-382.

3) Reviews:

124) Devlin, R.H. and Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish. *Aquaculture* 208, 191-366.

125) Horiguchi, R. and Tokumoto, T. (2005). Modifications to proteasomal subunits during meiotic cell cycle-implications in the regulation of fertilization through proteasome activity. *New impact on protein modifications in the regulation of reproductive system* 37-60.

126) Nagahama, Y., Nakamura, M., Kitano T. and Tokumoto, T. (2004). Sexual plasticity in fish: a possible target of endocrine disruptor action. *Environmental Sciences* 11, 73-82.

127) 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.

128) Tokumoto, T. (2002) Multiple modifications and factors of proteasome regulation. *Recent Res. Develop. Biochem.* 3, 287-296.

和文論文：

129) 中村将 (2000)。魚類の性分化と生殖に関する内分泌学的研究 (平成11年度日本水産学会賞進歩賞受賞) *日本水産学会誌*、66, 376-379.

130) 北野健、山本栄一、高宗和史、安部眞一 (2000)。アロマターゼmRNAの検出によるヒラメ人工種苗の早期性判別について。 *日水誌* 66, 300-301.

131) 中村將、小林靖尚、三浦さおり (2005)。サンゴ礁魚類を用いた魚類の性分化、性転換機構の形態学的、生理学的研究、水研センター報告 (印刷中)。

132) 平井俊朗、中村將 (2005)。魚類の性分化と内分泌かく乱物質 (共著)、水産学シリーズ、恒星者厚生閣 (印刷中)。

(2) 口頭及びポスター発表

招待、口頭講演 (国内 109件、海外・国際 72件)

ポスター発表 (*印) (国内 45件、海外・国際 58件)

(各グループの活動がわかるようにグループ毎にまとめたために一部重複がある)

1) 長濱グループ:

- 1) 梶浦弘子、小林 亨、長濱嘉孝 (2001)。ウナギの精子形成の開始・進行におけるサイクリンの挙動。日本動物学会第72回大会、九州産業大学、平成13年10月6-8日、福岡。
- 2) 小林 亨、梶浦弘子、長濱嘉孝 (2001)。精巣分化過程における生殖細胞支持細胞の分化。日本動物学会第72回大会、九州産業大学、平成13年10月6-8日、福岡。
- 3)*小林 亨、長濱嘉孝 (2001)。ティラピア生殖腺の性分化過程においてエストロゲンは何をしているのか?。日本比較内分泌学会第26回大会、早稲田大学、平成13年12月1-2日、東京。
- 4) 松田勝、松田千香、長濱嘉孝、濱口哲、酒泉満 (2001)。Yコンジェニック系統を用いたメダカ性決定遺伝子のポジショナルクロニング。日本動物学会第72回大会、九州産業大学、平成13年10月6-8日、福岡。
- 5)*三田雅敏、柴田安司、吉国通庸、長濱嘉孝 (2001)。イトマキヒトデ生殖巣の神経ネットワーク様構造。日本動物学会第72回大会、九州産業大学、平成13年10月6-8日、福岡。
- 6) 中村將、比嘉幹彦、Craig Morrey、小林亨、長濱嘉孝 (2001)。Endocrine differences between initial-phase and terminal-phase males in the protogynous fish, *Tharassoma duperrey* 日本動物学会第72回大会、平成13年10月6-8日、福岡。
- 7) 徳元俊伸、近藤章実、美輪純子、石川勝利、徳元美佳、堀口涼、長濱嘉孝 (2001)。アフリカツメガエル卵内26Sプロテアソーム結合タンパク質の同定。日本動物学会大会、平成13年10月6-8日、福岡。
- 8)*吉国通庸、提髪玲子、長濱嘉孝 (2001)。卵成熟能獲得におけるメダカ卵母細胞のプロテオーム解析。日本動物学会第72回大会、九州産業大学、平成13年10月6-8日、福岡。
- 9)*Hashimoto, Y., Maegawa, S., Kobayashi, T., Nagahama, Y. Yasuda, K. and Inoue, K. (2001). Mechanisms of germ cell determination in zebrafish. 14th International Congress of Developmental Biology, July 8-12, 2002, Kyoto, Japan.

- 10)*Ikeuchi, T., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2001). Androgen receptor α and β in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) gonad. 14th International congress of Comparative Endocrinology, May 26-30, 2001, Sorrento, Italy.
- 11)*Kajiura-Kobayashi, H., Kobayashi, T. and Nagahama Y. (2001). Dynamics o cyclins and cdk during spermatogenesis in a teleost, *Anguilla japonica*. 14th International Congress of Comparative Endocrinology, May 26-30, 2001, Sorrento, Italy.
- 12) Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y. and Abe S-I. (2001). Role of estrogen in gonadal sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). 14th International Congress of Comparative Endocrinology, May 26-30, 2001, Sorrento, Italy.
- 13) Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y. and Abe, S.-I. (2001). Gonadal sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). International Commemorative Symposium: 70th Anniversary of JSFS, October 1-5, 2001, Yokohama, Japan.
- 14)*Kobayashi, T., Guan G., Kajiura-Kobayashi, H. and Nagahama, Y. (2001). Evidence of sexual bipotentiality of germ cell-surrounding cells during gonadal sex differentiation in a teleost, tilapia. 14th International Congress of Developmental Biology (Kyoto), July 8-12, 2002, Kyoto, Japan.
- 15)*Kobayashi, T., Nakamura M., Yoshiura, Y., Kajiura-Kobayashi, H. and Nagahama, Y. (2001). Expression of steroidogenic factor 1 (SF-1/Ad4BP) and steroidogenic enzymes during gonadal formation in *Oreochormis niloticus*. 14th International Congress of Comparative Endocrinology, May 26-30, 2001, Sorrento, Italy.
- 16) Mita, M., Hirai, T., Oba, Y., Yoshikuni, M., and Nagahama, Y. (2001). Glycoprotein hormone-receptor family in ovaries of starfish *Asterina pectinifera*. 14th International Congress of Comparative Endocrinology, May 26-30, 2001, Sorrento, Italy.
- 17) Nagahama, Y. (2001). Molecular endocrinology of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. 3rd IUBS Symposium on Molecular Aspects of Fish Genomes and Development, February 18-21, 2001, Singapore.
- 18) Nagahama, Y. (2001). Sex steroid hormones in fish gonads: Synthesis and actions. IMBS 2001, International Marine Biotechnology Symposium, April 12-13, 2001, Taipei, Taiwan.
- 19)*Sakai F., Kobayashi, T., Matsuda M. and Nagahama, Y (2001). Organ culture of the undifferentiated gonad in tilapia. 14th International Congress of Comparative Endocrinology, May 26-30, 2001, Sorrento, Italy.

- 20)*Shibata, Y., Nagahama, Y. and Yoshikuni, M. (2001). Alveolin, an astacin- like protease, is exocytosed from cortical vesicle during fertilization in medaka (*Oryzias latipes*) eggs. 14th International Congress of Comparative Endocrinology, May 26-30, 2001, Sorrento, Italy.
- 21) Yoshikuni, M., Sagegami, R. and Nagahama, Y. (2001). Proteome analysis of medaka (*Oryzias latipes*) oocytes during the acquisition of maturational competence. 14th International Congress of Comparative Endocrinology, May 26-30, 2001, Sorrento, Italy.
- 22) 比嘉幹彦、坂口あゆみ、小笠原敬、長濱嘉孝、中村將 (2002)。アロマターゼ阻害剤によるベラの性転換。日本動物学会第73回大会、平成14年9月24-27日、金沢。
- 23)*平井俊朗、柴田安司、長濱嘉孝 (2002)。メダカ生殖腺における下垂体糖蛋白質ホルモン受容体。日本比較内分泌学会、平成14年11月29-30日、岡山。
- 24)*池内俊貴、小林 亨、東藤 孝、長濱嘉孝 (2002)。二種類のプロゲステロンレセプターサブタイプのリガンド特異性。日本比較内分泌学会、平成14年11月29-30日、岡山。
- 25) 小林 亨、梶浦弘子、長濱嘉孝 (2002)。エストロゲンによるXYティラピアの卵巣分化誘起に伴って発現の変化する遺伝子の検索。日本動物学会第73回大会、平成14年年9月24-27日、金沢。
- 26)*小林 亨、長濱嘉孝 (2002)。ティラピア生殖腺の性分化過程におけるエストロゲンの機能。日本比較内分泌学会、平成14年11月29-30日、岡山。
- 27) 小林靖尚、小林 亨、中村 將、須之部友基、Craig Morrey、鈴木範男、長濱嘉孝 (2002)。オキナワベニハゼの双方向性転換過程における芳香化酵素の発現。日本動物学会第73回大会、平成14年9月24-27日、金沢。
- 28)*小林靖尚、小林 亨、中村 將、須之部友基、Craig E. Morrey、鈴木範男、長濱嘉孝(2002)。オキナワベニハゼの双方向性転換過程におけるAromataseの発現変化。日本比較内分泌学会、平成14年11月29-30日、岡山。
- 29) 松田勝、長濱嘉孝、四宮愛、佐藤忠、松田千香、小林亨、濱口哲、酒泉満 (2002)。メダカ性決定遺伝子のポジショナルクローニング。日本発生生物学会、平成14年5月21-23日、横浜。
- 30) 松田勝 (2002)。メダカ性決定遺伝子の同定：Y染色体の性決定領域から見つかったDMドメイン遺伝子。日本動物学会第73回大会、平成14年9月24-27日、金沢。
- 31) 三田雅敏、柴田安司、吉国通庸、M. Thorndyke、長濱嘉孝 (2002)。イトマキヒトデ卵巣及び精巣の神経ネットワーク構造。日本動物学会第73回大会、平成14年9月24-27日、金沢。

- 32) 長濱嘉孝 (2002)。第5回機器分析センター講演会「メダカの性決定遺伝子」岡山大学、平成14年11月28日、岡山。
- 33) 中本 正俊、松田 勝、小林 亨、長濱 嘉孝、酒泉 満、濱口 哲、柴田直樹 (2002)。メダカにおける精巢決定遺伝子候補DMYの発現解析。日本動物学会第73回大会、平成14年9月24-27日、金沢。
- 34) 酒井章衣 (2002)。ティラピア生殖腺の器官培養。琉球大学熱帯生物圏研究センター平成14年研究会・魚類の性と生殖に関する研究会、琉球大学、平成14年12月12-13日、西表。
- 35) 柴田安司、長濱嘉孝、吉国通庸 (2002)。メダカ卵受精後の卵膜の変化について。日本動物学会第73回大会、平成14年9月24日、金沢。
- 36) 吉国通庸、提髮玲子、長濱嘉孝 (2002)。メダカ卵母細胞のプロテオーム解析：成熟能の獲得と卵成熟情報伝達機構の解析。日本動物学会第73回大会、平成14年9月24-27日、金沢。
- 37)*Higa, M., Ogawawara, K., Nagahama, Y. and Nakamura. Y. (2002). Androgen receptor expression in the brain of a protogynous hermaphrodite. Society for Neuroscience, November 2002, Orland, USA.
- 38) Mita, M., Shibata, Y., Yoshikuni, M., Thorndyke M. and Nagahama, Y. (2002). Neural network structures in ovaries and testes of starfish *Asterina pectinifera*. 21st Conference of European Comparative Endocrinologists, September 2002, Bonn, Germany.
- 39) Nagahama, Y., Kobayashi, T., Matsuda, M., Guan, G., Ikeuchi, T., Sakai, F., Sudhakumari, C.C., Wang, D.S., Nakamura, M. (2002). Molecular mechanisms of sex differentiation and gonadal sex differentiation in fish. Molecular Mechanisms of Sex Differentiation, 48th NIBB Conference, October 18-20, 2002, Okazaki, Japan.
- 40) Nagahama, Y. (2002). Effects of environmental factors on sex determination and differentiation. Minamata International Symposium of Environmental Risk Assessment, March 21-22, Minamata Moyai-naoshi Center, Minamata, Japan.
- 41) Nagahama, Y. (2002). Shift in follicular Steroidogenesis in fish ovaries prior to oocyte maturation. International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer, October 21-25, 2002, Fukuoka, Japan.
- 42) Nagahama, Y. (2002). Aromatase and gonadal sex differentiation in fish. VI International Aromatase Conference, October 26-30, 2002, Kyoto, Japan.

43) Nagahama, Y. (2002). Molecular mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish. Fourth Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, October 8-11, 2002, Guangzhou, China.

44) Nagahama, Y. (2002). Molecular mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish. 2002 Annual Retreat WSU/UI Center for Reproductive Biology, June 13-14, 2002, Camp Larson – Coeur d'Alene Lake, Idaho, USA.

45) Nagahama, Y. (2002). Molecular mechanisms of sex determination and differentiation in fish. 35 Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction, August 28-31, 2002, Baltimore, USA.

46)*Yoshikuni, M., Sagegami, R. and Nagahama, Y. (2002). Proteome analysis of medaka oocytes: Studies of acquisition of maturational competence and signal transduction of oocyte maturation. Fourth Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, October 8-11, 2002, Guangzhou, China.

47) 榎本匡宏、藤井由紀子、池本忠弘、遠藤大輔、大久保範聡、会田勝美、朴民根（2003）。Guinea pig GnRH受容体の同定とリガンド反応性の解析。第74回日本動物学会、平成15年9月17-19日、函館。

48) 比嘉幹彦、小笠原敬、坂口あゆみ、長濱嘉孝、中村將（2003）。ベラ性転換の人為的制御。日本水産学会、平成15年4月2-4日、東京。

49) 比嘉幹彦、大橋広義、小笠原敬、坂口あゆみ、酒井章衣、Ramji Bhandari、長濱嘉孝、中村將（2003）。魚類の卵巣培養による精子形成。日本動物学会第74回大会、平成15年9月17-19日、函館。

50) 堀口涼、吉国通庸、徳元美佳、長濱嘉孝、徳元俊伸（2003）。キンギョ卵母細胞における26Sプロテアソーム $\alpha 4$ サブユニットのリン酸化酵素の同定。日本動物学会第74回大会、平成15年9月17-19日、函館。

51) 池内俊貴、小林 亨、長濱嘉孝（2003）。ニホンウナギプロゲストゲン受容体におけるプロゲストゲンとアンドロゲンの相互作用。日本動物学会第74回大会、平成15年9月17-19日、函館。

52) 梶浦弘子、小林 亨、長濱嘉孝（2003）。ウナギの精子形成過程において精原細胞期から減数分裂期に発現する遺伝子の挙動。日本動物学会第74回大会、平成15年9月17-19日、函館。

53) 小林 亨（2003）。魚類の性決定と性分化。公募シンポジウム「性決定の多様性と普遍性」。日本動物学会第74回大会、平成15年9月17-19日、函館。

- 54) 小林靖尚、小林 亨、須之部友基、中村 將、鈴木範男、長濱嘉孝 (2003)。オキナワベニハゼの双方向性転換過程におけるAd4BP/SF-1の発現。日本動物学会第74回大会、平成15年9月17-19日、函館。
- 55) 松田勝、四宮 愛、木下政人、小林 亨、濱口 哲、酒泉 満、長濱嘉孝 (2003)。Y染色体特異的なDM domain遺伝子*DMY*はメダカの性決定遺伝子である。日本動物学会第74回大会、平成15年9月17-19日、函館。
- 56) 松田勝、四宮愛、木下政人、小林亨、劉恩良、濱口哲、酒泉満、長濱嘉孝 (2003)。メダカ性決定遺伝子*DMY*の同定とその機能解析。日本遺伝学会第75回大会、東北大学、平成15年9月24-26日、仙台。
- 57) 長濱嘉孝 (2003)。メダカの性決定遺伝子。日本分子生物学会第3回春季シンポジウム。平成15年5月12-13日、日米子コンベンションセンター、米子。
- 58) 長濱嘉孝 (2003)。魚類における配偶子形成の内分泌調節機構。第21回内分泌・代謝学サマーセミナー。平成15年7月24-26日、箱根。
- 59) 長濱嘉孝 (2003)。魚類の生殖腺機能に及ぼす内分泌攪乱化学物質の影響の作用メカニズム。内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム。平成15年6月13-14日、湘南国際村センター国際会議場、葉山。
- 60) 長濱嘉孝 (2003)。卵巣機能と性ステロイドホルモンー特にステロイド膜受容体を介した作用について。第11回日本ステロイドホルモン学術総会・学術講演会。平成15年11月、岐阜長良川国際会議場、岐阜。
- 61)*岡弘子、柴田安司、吉国通庸、長濱嘉孝、三田雅敏 (2003)。SALMFamide-1によるイトマキヒトデ放射神経からのGSS分泌の抑制。日本動物学会第74回大会、平成15年9月17-19日、函館。
- 62) 大久保範聡、会田勝美 (2003)。GnRHはその遺伝子に隣接するフォスファターゼ遺伝子の発現を抑制する。平成15年度日本水産学会大会、平成15年4月2日、東京水産大学、東京。
- 63) 大久保範聡、会田勝美 (2003)。GnRH遺伝子とチロシンフォスファターゼ遺伝子の物理的・機能的リンク。日本動物学会第74回大会、平成15年9月17-19日、函館。
- 64) 大久保範聡 (2003)。メダカのゴナドトロピン放出ホルモン。琉球大学熱帯生物圏研究センター平成15年度シンポジウム「水棲生物の生理と生態に関するシンポジウム」、平成15年11月、沖縄県美ら海水族館、沖縄。

- 65) 柴田安司、大野薫、Peter Thomas、長濱嘉孝、吉国通庸 (2003)。メダカ7回膜貫通型プロゲスチン受容体のクローニング。日本動物学会第74回大会、平成15年9月17-19日、函館。
- 66) 末武弘章、荒木亨介、大久保範聡、会田勝美、鈴木譲 (2003)。トラフグは3種類のGnRH受容体をもつ。平成15年度日本水産学会大会、平成15年4月1-5日、東京水産大学、東京。
- 67) 徳元俊伸、徳元美佳、堀口涼、石川勝利、長濱嘉孝 (2003)。ジエチルスチルベストロール(DES) による魚類卵成熟の誘起。日本動物学会第74回大会、平成15年9月17-19日、函館。
- 68) Amano, M., Okubo, K., Yamanome, T., Oka, Y., Kitamura, S., Ikuta, K., Takahashi, A., Aida, K., Yamamori, K. (2003). GnRH systems in masu salmon and barfin flounder. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.
- 69)*Fan, H. G., Wang, D. S., Kobayashi, T., Senthilkumalan, B., Sudhakumari, C.C., Yoshikuni, M., and Nagahama, Y. (2003). Molecular cloning of the three gonadotropin subunits and its possible involvement in early sex differentiation in the tilapia *Oreochromis niloticus*. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.
- 70) Guan, G., Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2003). Specific DNA preference of tilapia Dmrt1. Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, March 24-28, 2003, Kona, Hawaii, USA.
- 71) Higa, M., Ogasawara, K., Sakaguchi, A., Nagahama, Y. and Nakamura, M. (2003). Hormonal regulation of sex change in wrasse. 3rd International Symposium on sex determination in vertebrates, Mar. 23-28, 2003, Kona, Hawaii, USA.
- 72) Higa, M., Ogasawara, K., Sakaguchi, A., Nagahama, Y. and Nakamura, M. (2003). The role of steroid hormones in sex change of protogynous wrasse. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of fish, March 18-23, Mie, Japan.
- 73)*Hirai, T., Shibata, Ya., Matsuda, M., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2003). Glycoprotein hormone receptor family in medaka (*Oryzias latipes*). 7th International Symposium on reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.
- 74) Horiguchi, R., Yoshikuni M., Tokumoto, M., Nagahama Y. and Tokumoto, T. (2003). Identification of a protein kinase which phosphorylate $\alpha 4$ subunit of the 26S proteasome in goldfish oocytes. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.
- 75)*Ikeuchi, T., Kobayashi, T., Todo, T. and Nagahama, Y. (2003). Transgenic cell lines which stably express progesterone receptors (PR) α and β and the PR-responsive reporter genes. 7th International

Symposium on Reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

76)* Kajiura-Kobayashi, H., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2003). Gene expression after the induction of XY sex reversal by estrogen in a teleost, tilapia. Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, March 24-28, 2003, Kona, Hawaii, USA.

77)* Kajiura-Kobayashi, H., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2003). Estrogen-induced and suppressed gene expression during XY sex reversal in a teleost fish, tilapia. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

78)* Kawaguchi, N., Okubo, K., Aida, K. (2003). The expression and localization of corticotropin-releasing hormone and urotensin I transcripts in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

79)* Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi H. and Nagahama, Y. (2003). Germ cell differentiation during gonadal sex differentiation in a teleost fish, the tilapia. Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, March 24-28, 2003, Kona, Hawaii, USA.

80)* Kobayashi, Y., Kobayashi, T., Nakamura, M., Sunobe, T., Morrey, C., Suzuki, N. and Nagahama, Y. (2003). Two types of P450 aromatase during seasonal sex change in gobid fish *Trimma okinawae*: cDNA isolated and mRNA expression. Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, March 24-28, 2003, Kona, Hawaii, USA.

81)* Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H. and Nagahama, Y. (2003). Germ cells during gonadal differentiation in the teleost. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

82)* Lau E-L., Matsuda, M., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2003). Expression of fluorescent proteins controlled by DMY and DMRT1 regulatory regions in medaka (*Oryzias latipes*). Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, March 24-28, 2003, Kona, Hawaii, USA.

83) Masaru Matsuda (2003). The sex determining gene of the teleost fish, medaka. 日本生化学会第76回大会、パシフィコ横浜、平成15年10月15-18日、横浜。

84) Matsuda, N., Nagahama, Y., Kobayashi, T., Hamaguchi, S. and Sakaizumi, M. (2003). The sex determining gene of medaka fish: A Y-specific DM domain gene (DMY) is required for male development. Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, March 24-28, 2003, Kona, Hawaii, USA.

85) Matsuda, N., Nagahama, Y., Kobayashi, T., Hamaguchi, S. and Sakaizumi, M. (2003). The sex

determining gene of medaka: A Y-specific DM domain gene (DMY) is required for male development. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

86) Nagahama, Y. (2003). Molecular mechanisms of sex determination and differentiation. International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neuroendocrinology, November 4-6, 2003, Cheju National University Park, Korea.

87) Nagahama, Y. (2003). Sex Determination and Differentiation in Fish. XXI Symposium of the Society for Reproductive Biology and Comparative Endocrinology. Recent Advances in Endocrinology & Reproduction: Evolutionary, Biotechnological and Clinical Implications, February 10-13, 2003, Banaras Hindu University, Varanasi, India.

88) Nagahama, Y. (2003). Sex Determination and Gonadal Sex Differentiation in Fish. The 3rd International Medaka Symposium, 2003 – Development of Test Methods with Medaka to Detect Endocrine Disrupting Chemicals, February 27-28, 2003, Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan.

89) Nagahama, Y. (2003). Genetic, hormonal and environmental components of sex determination and differentiation in fish. Third International Symposium on Vertebrate Sex Determination, March 24-28, 2003, Kona, Hawaii, USA.

90) Nagahama, Y. (2003). A shift in steroidogenesis occurring in fish ovarian follicles prior to oocyte maturation. Molecular Steroidogenesis Workshop, April 24-27, Bath, UK.

91)*Ohmuro, Y., Matsuda, M., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2003). Expression Of DMY and DMRT1 in medaka, *Oryzias latipes*. Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, March 24-28, 2003, Kona, Hawaii, USA.

92)*Ohmuro-Matsuyama, Y., Matsuda, M., Kobayashi, T., Ikeuchi, T. and Nagahama, Y. (2003). Expression of DMY and DMRT1 in the various tissues of the medaka, *Oryzias latipes*. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

93) Okubo, K., Aida, K. (2003). GnRH gene products downregulate their neighboring genes encoding protein tyrosine phosphatases. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

94)*Sakai, F., Kobayashi, T., Matsuda, M. and Nagahama, Y. (2003). Stage- and site-dependent expression of aromatase in XX gonads of tilapia: an organ culture study. Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, March 24-28, 2003, Kona, Hawaii, USA.

95)*Senthilkumaran, B., Sudhakumari, C.C., Ikeuchi, T., Kobayashi, T., Wang, D.S., Yoshikuni, M. and

Nagahama, Y. (2003). Ontogeny of sex steroid receptors in brain and gonads during sex differentiation in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, March 24-28, 2003, Kona, Hawaii, USA.

96) Senthilkumaran, B., Yoshiura, Y., Oba, Y., Sudhakumari, C. C., Wang D S., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2003). Steroidogenic shift is a critical event for ovarian follicles to under go final maturation. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

97)*Shibata, Y., Nagahama, Y. and Yoshikuni, M. (2003). An astacin-like protease, Alveolin, is released from cortical vesicles and induces changes in egg envelope proteins during fertilization of medaka (*Oryzias latipes*) eggs. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

98)*Shibata, Y., Ohno, K., Thomas, P., Nagahama, Y. and Yoshikuni, M. (2003). Multiple expressions of membrane progesterin receptors in medaka (*Oryzias latipes*) ovary. 3rd International Meeting on Rapid Responses to Steroid Hormones, September 12-14, 2003, Florence, Italy.

99)*Sudhakumari, C.C., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Ikeuchi, T., Wang, D.S., Kajiura-Kobayashi, H., Chang, X.T., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2003). Ontogeny of P450 aromatases, Ad4BP/SF-1, Dax1 expressions in brain and gonads during sex differentiation the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, March 24-28, 2003, Kona, Hawaii, USA.

100)*Sudhakumari, C. C., Senthilkumaran, B., Kobayashi, T., Wang, D. S., Chang, X. T. and Nagahama, Y. (2003). Expression of cytochrome P-450 aromatase in the sex-reversed Nile tilapia. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

101) Tokumoto, T., Tokumoto, M., Ishimatsu, M., Horiguchi, R., Nagahama, Y. and Ishikawa, K. (2003). Purification of anaphase promoting complex/cyclosome from goldfish oocytes. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

102)*Wang, D.S., Senthilkumaran, B., Kobayashi, T., Sudhakumari, C.C., Kobayashi, H.K., Zhou, L.Y., Matsuda, M., Sakai, F., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2003). Molecular cloning of 11 β -hydroxylase and 11 β -HSD2 cDNAs and their possible involvement in the sex differentiation and spermatogenesis in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, March 24-28, 2003, Kona, Hawaii, USA.

103)*Wang, D. S., Senthilkumaran, B., Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Matsuda, M. Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2003). Molecular cloning and gene expression of the riboflavin binding protein in

the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

104)*Yoshikuni, M., Sagegami, R. and Nagahama Y. (2003). Proteome analysis: A new approach to identify key proteins involved in acquisition of maturational competence and oocyte maturation. 7th International Symposium on reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

105) * Zhou L. Y., Senthilkumaran, B., Wang, D. S., Sudhakumari, C. C., Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Matsuda, M., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2003). Partial cloning of 17 β -HSD-I from the Nile tilapia ovary and its expression pattern during spawning cycle. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

106) 比嘉幹彦、大橋広義、小笠原敬、坂口あゆみ、酒井章衣、Ramji K Bhandari、長濱嘉孝、中村將 (2004)。魚の卵巣培養による精子形成。平成16年度日本水産学会大会、平成16年4月2-4日、鹿児島。

107)*堀口 涼、吉国通庸、徳元美佳、長濱嘉孝、徳元俊伸 (2004)。キンギョ卵の減数分裂における26Sプロテアソーム α 4サブユニットのリン酸化機構の解析。日本動物学会第75回大会、平成16年9月10-12日、神戸。

108) 松原創、平井俊朗、杉浦あおい、寺島由宇、柴田安司、三田雅敏、吉国通庸、中村將、長濱嘉孝 (2004)。魚類における膜貫通型黄体ホルモン受容体の分子進化。平成16年度日本水産学会大会、平成16年4月2-4日、鹿児島。

109) 松田勝 (2004)。メダカ生殖腺の器官形成～未分化生殖腺からの精巣・卵巣形成。日本発生物学会第37回大会、平成16年6月4-6日、名古屋。

110) 三田雅敏、吉国通庸、柴田安司、Pichayawasin Suthasinee、磯部稔、長濱嘉孝 (2004)。ヒトデの生殖巣刺激ホルモン (GSS)の精製。第75回日本動物学会、平成16年9月10-12日、神戸。

111) 三田雅敏、吉国通庸、Pitchayawasin Suthasinee、磯部稔、長濱嘉孝 (2004)。Purification of starfish gonadotropin, gonad-stimulating substance (GSS). 第77回日本生化学会、平成16年10月13-16日、横浜。

112) 長濱嘉孝 (2004)。動物の性が決まるしくみ。第31回岡崎市民大学、平成16年8月7日、岡崎。

113) 長濱嘉孝 (2004)。魚類の性決定と性分化。第14回遺伝医学セミナー、平成16年9月3-5日、大阪。

114) 中村將、小室裕樹、仲村茂夫、Ramji K. Bhandari、小林亨、征矢野清 (2004)。カンモンハタの生殖腺の11 β -水酸化酵素の発現。平成16年度日本水産学会大会、平成16年4月2-4日、

鹿児島。

115) 大室 (松山) 有紀、大久保範聡、松田勝、関桂君、鈴木大河、山誠、王徳寿、小林亨、諸橋憲一郎、長濱嘉孝 (2004)。魚類特有の脳型アロマターゼに対する転写制御因子 ; LRH-1. 第27回日本分子生物学会年回、平成16年12月8-11日、神戸。

116) 大西泰志、中村将 (2004)。オジサンの生殖年周期。北大—京大—琉大連携水圏フィールド科学シンポジウム、平成16年12月4日、沖縄。

117) 太田耕平、坂井雅巳、J.K. Sundaray、山口明彦、松山倫也、長濱嘉孝 (2004)。ステロイドホルモン投与によるホシササノハベラの双方向性転換の誘導。第37回日本魚類学会年会、平成16年9月24-27日、沖縄。

118) 柴田安司、長濱嘉孝、吉国通庸 (2004)。新規膜結合型プロゲスチン受容体。日本動物学会中部支部大会。平成16年7月23-24日、静岡。

119) 徳元美佳、Peter Thomas、長濱嘉孝、石川勝利、徳元俊伸 (2004)。キンギョプロゲスチンレセプター (mPR) のクローニングと発現の解析。日本動物学会大会第75回大会、平成16年9月10-12日、神戸。

120) 徳元俊伸、徳元美佳、溝呂木直美、相原淳一、石川勝利、長濱嘉孝 (2004)。内分泌かく乱物質によるゼブラフィッシュ卵成熟の誘起と阻害。日本動物学会第75回大会、平成16年9月10-12日、神戸。

121) 吉国通庸、柴田安司、長濱嘉孝 (2004)。魚類卵成熟誘起ステロイドホルモンのノンゲノミックな作用。第75回日本動物学会シンポジウム「ステロイドホルモン研究の進歩と展望」、平成16年9月10-12日、神戸。

122) Alam, M.A., Bhandari, R.K., Kobayashi, Y., Nakamura, S., Soyano, K. and Nakamura, M. (2004). 11-ketotestosterone dynamics during the natural sex change of a protogynous hermaphrodite. 北大—京大—琉大連携水圏フィールド科学シンポジウム、平成16年12月4日、沖縄。

123) Bhandari, R.K., Komuro, H. and Higa, M., Nagahama, Y. and Nakamura, M. (2004). Induction of sex change of female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, by aromatase inhibitor Fadrozole, March 1-5, 2004, Hawaii, USA.

124) Bhandari, R.K., Nakamura, M. and Nagahama, Y. (2004). Estrogen: master of the sexes? A Satellite Symposium on Physiology of Fish, November 4-5, 2004, Okinawa, Japan.

125) Bhandari, R., Higa, M., Nagahama, Y. and Nakamura, M. (2004). Sex reversal of adult gonochoristic fish. The 5th International Symposium on Fish Endocrinology, September 5-9, 2004,

Castellon, Spain.

126) Guan, G.J., Ijiri, S., Tanaka, M., Kobayashi, T., Yi, M.S. and Nagahama, Y. (2004). Cloning and characterization of Dmrt genes in a teleost fish, the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). International Workshop on Fish Genetics and Development – Chinese Academy of Sciences, October 11-14, 2004, Wuhan, China.

127) Hirai, T., Matsubara, H., Shibata, Y., Yoshikuni, M., Nagahama, Y., Itakura, R. and Mita, M. (2004). cDNA cloning of a novel member of the glyco-protein hormone receptor family from a sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. 5th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, March 26-30, 2004, Nara, Japan.

128) Horiguchi, R., Yoshikuni, M., Tokumoto, M., Nagahama, Y. and Tokumoto, T. (2004). Meiotic cell cycle regulated phosphorylation of α subunit of the 26S proteasome by casein kinase. 4th International Symposium on the Molecular and Cell Biology of Egg-and Embryo-Coats, November 8-13, 2004, Toba, Japan.

129)* Kamei, H., Okubo, K., Yoshiura, Y., Kajimura, S., Kawaguchi, N., Aida, K. (2004) Structural characterization of gonadotropin beta subunit genes in a teleost, the medaka *Oryzias latipes*. 5th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology in Conjunction with the Annual Meeting of the Japan Society for Comparative Endocrinology, March, 2004, Nara, Japan.

130) Matsubara, H., Hirai, T., Shibata, Y., Yoshikuni, M., Nakamura, M. and Nagahama, Y. (2004). The evolutionary aspects of membrane progesterin receptors. 第109回日本解剖学会、平成16年8月、京都。

131) Nagahama, Y. (2004). The plasticity of fish gender: an evolutionary basis for sex determination and differentiation in vertebrates. SICB 2004 Annual Meeting, January 5-9, New Orleans, USA

132) Nagahama, Y. (2004). Sex determination and differentiation in fish. International Symposium on The Biology of Sperm Cell - from basic to clinics, February 25-26, 2004, Tokyo.

133) Nagahama, Y. (2004). Sex determination and gonadal sex differentiation in fish. The XIX International Congress of Zoology, August 23-27, Beijing, China.

134) Nagahama, Y. (2004). Sex determination and gonadal sex differentiation in fish. The 5th International Symposium on Fish Endocrinology, September 5-9, 2004, Castellon, Spain.

135) Nagahama, Y. (2004). Molecular mechanisms of sex determination and differentiation in fish. International Workshop on Fish Genetics and Development – Chinese Academy of Sciences, October 11-14, 2004, Wuhan, China.

136) Nagahama, Y. (2004). Molecular mechanisms of sex determination and differentiation in fish. The 4th International Symposium on the Molecular and Cell Biology of Egg- and Embryos-Coats, November 8-13, 2004, Ise-Shima, Japan.

137) Nagahama, Y. (2004). Sex determination and differentiation in fish. Bilateral Symposium Italy and Japan, November 16-19, 2004, Mie, Japan.

138) Nakamura, M., Higa, M., Oohashi, H. and Nagahama, Y. (2004). In Vitro spermatogenesis in fish ovary. The 37th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, August 1-4, Vancouver, Canada.

139) Ohta, K. Sakai, M. Sundaray, J.K. Yamaguchi, A. and Matsuyama, M. (2004). Induction of bi-directional sex change by steroid hormones in the protogynous wrasse *Pseudolabrus sieboldi*. Satellite Meeting of 10th International Coral Reef Symposium "Sex allocation and sexual conflict in coral reef organisms", July 3-5, 2004, Okinawa, Japan.

140) Ohta, K. Yoshino, Y. Tanioka, S. Hirai, T. Yamaguchi, A. and Matsuyama, M. (2004). Sexually dimorphic expression of pituitary glycoprotein hormone subunit genes in the protogynous wrasse (*Pseudolabrus sieboldi*), 5th International Symposium on Fish Endocrinology, September 5-9, 2004, Castellon, Spain.

141) Ohta, K. Sakai, M. Sundaray, J.K. Yamaguchi, A. and Matsuyama, M.(2004). Bi-directional sex change induced by the implantation of steroid hormones in the protogynous wrasse (*Pseudolabrus sieboldi*) 5th International Symposium on Fish Endocrinology, September 5-9, 2004, Castellon, Spain.

142) Okubo, K., Sakai, F., Lau, E., Aida, K. and Nagahama, Y. (2004). Characterization of embryonic development of forebrain gonadotropin-releasing hormone neurons using transgenic medaka. 5th International Symposium on Fish Endocrinology, September 5-9, 2004, Castellon, Spain.

143) Shibata, Y., Nagahama, Y. and Yoshikuni, M. (2004). The hardening of the egg envelope following fertilization is caused by cortical granule-derived protease in medaka fish. The 4th International Symposium on the Molecular and Cell Biology of Egg- and Embryo-Coats, November 8-13, 2004, Ise-Shima, Japan.

144) Yi, M.S., Matsuda, M., Wang, D.S., Guan, G.J. and Nagahama, Y. (2004). DMY down-regulates the expression of *dax2* in an *in vitro* system. International Workshop on Fish Genetics and Development – Chinese Academy of Sciences, October 11-14, 2004, Wuhan, China.

145)*松田勝、Bindhu Paul-Prasanth、劉恩良、長濱嘉孝 (2005)。メダカ性決定遺伝子DMYの機能解析。日本動物学会第76回大会、つくば国際会議場、平成17年10月6-8日、つくば。

- 146) 三田雅敏、吉国通庸、柴田安司、Suthasinee Pitchayyawasin、磯部稔、長濱嘉孝 (2005)。イトマキヒトデ生殖腺刺激ホルモン (GSS) : 合成ペプチドの生理活性。日本動物学会第75回大会、平成17年10月6-8日、つくば。
- 147) 長濱嘉孝 (2005)。メダカの性決定。恋愛物語展、平成17年7月17日、日本科学未来館、東京。
- 148) 長濱嘉孝 (2005)。環境と性の決定・分化。平成17年度日本学術会議夏季部会公開シンポジウム、平成17年7月19日、函館。
- 149) 大久保範聡、会田勝美、長濱嘉孝 (2005)。トランスジェニックメダカを用いたGnRHニューロンの発生機構解析。平成17年度日本水産学会大会、平成17年3月31-4月4日。東京水産大学、東京。
- 150) 大久保範聡 (2005)。トランスジェニックとノックダウンを用いたメダカ生殖中枢の発生解析。基礎生物学研究所研究会「小型魚類のさらなる発展を求めて」、平成17年5月12日、岡崎、愛知。
- 151) 大久保範聡、長濱嘉孝 (2005) メダカ生殖中枢の発生機構：トランスジェニックとノックダウンを用いた新アプローチ。日本発生生物学学会第38回大会、平成17年6月2-4日、仙台。
- 152) 太田耕平、J.K. Sundaray、北野健、柴田安司、松田勝、小林亨、山口明彦、松山倫也、長濱嘉孝 (2005)。性ステロイドホルモンによるホシササノハベラの双方向性転換と17 β -HSD遺伝子の雌雄特異的な発現。平成17年度日本水産学会大会、平成17年3月31- 4月4日、東京。
- 153) 太田耕平 (2005)。生殖生理。平成17年度日本水産学会大会シンポジウム「ブルー その資源・生産・消費」、平成17年4月4日、東京。
- 154)* 鈴木亜矢、劉恩良、長濱嘉孝 (2005)。メダカ生殖巣における DMY-EGFP および DMRT1-DsRed 導入遺伝子の発現。日本動物学会第 76 回大会、つくば国際会議場、平成 17 年 10 月 6-8 日、つくば。
- 155) 吉国通庸、三田雅敏、大野薫、Suthasinee Pitchayyawasin、磯部稔、長濱嘉孝 (2005)。ヒトデの生殖腺刺激ホルモン (GSS) の分子構造。日本生化学会第78回大会、平成16年10月19-22日、神戸。
- 156) 吉国通庸、三田雅敏、大野薫、長濱嘉孝 (2005)。ナマコ卵成熟に対するヒトデ神経抽出物と合成GSSの作用。日本比較内分泌学会第30回大会、平成17年11月12-13日、熊本。
- 157) Nagahama, Y. (2005). Sex determination and differentiation in fish. The first COE Symposium on Potential and Perspective of Marine Bio-Manupulation, February 26-27, 2005, Sapporo, Japan.

158) Nagahama, Y. (2005). *DMY*: The second sex-determining gene in vertebrates. 15th International Congress of Comparative Endocrinology, May 22-27, 2005, Boston, USA.

159) Ohta, K., Sundaray, J.K., Kitano, T., Shibata, Y., Matsuda, M., Yamaguchi, A., Matsuyama, M., Nagahama, Y. (2005). Involvement of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the sex change of a protogynous wrasse, *Pseudolabrus sieboldi*. 15th International Congress of Comparative Endocrinology, May 22-27, 2005, Boston, USA.

160) Okubo, K., Aida, K., Nagahama, Y. (2005) Forebrain GnRH neuronal development: insights from transgenic medaka and the relevance to reproductive disease. 15th International Congress of Comparative Endocrinology, May 22-27, 2005, Boston, USA.

161) Okubo, K., Nagahama, Y. (2005). Embryonic development of forebrain neurons controlling reproduction: insights from the medaka. The 11th Japanese medaka and zebrafish meeting, September 30-October 1, 2005, Okazaki, Japan.

162) Zhou, L.Y. (2005). Cloning, expression and characterization of three types of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases from the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. 日本動物学会・平成16年度中部支部大会、平成16年7月23-24日、静岡。

2) 中村グループ:

163) 中村將 (2001)。魚類の性分化、性決定。長崎大学水産学部附属海,洋資源教育研究センターシンポジウム、平成13年1月13-14日、長崎。

164) 中村將 (2001)。魚類の性分化に及ぼす環境ホルモンの作用機構の解析。農林水産業における内分泌攪乱物質の動態と作用機構に関する総合研究、研究成果と計画の検討及び評価、釜石、平成13年2月1-2日、宮城。

165) 中村將 (2001)。魚類の性と性転換。日本動物学会、関東支部大会、平成13年3月30日、千葉。

166) 中村將 (2001)。環境ホルモンの魚類性分化に及ぼす影響。熱帯生物圏研究センター研究会、兼農林水産技術会議、環境ホルモンプロジェクト、水域チーム作用機構サブチーム検討会兼熱生研研究会、平成13年7月13日、沖縄。

167)*中村將、比嘉幹彦、Craig Morrey、小林亨、長濱嘉孝 (2001)。Endocrine differences between initial-phase and terminal-phase males in the protogynous fish, *Tharassoma duperrey* 日本動物学会、平成13年10月6-8日、福岡。

168)*Hirai, T., Kiyose, S., Sato, S., Iguchi, T. and Nakamura, M. (2001). Nonylphenol induced feminization of gonad in genetically controlled male common carp. NIBB seminar, March 3-5, 2001, Okazaki, Japan.

169)*Hirai, T., Kiyose, S., Sato, S., Iguchi, T. and Nakamura, M. (2001). Nonylphenol induced feminization of gonad in genetically controlled male common carp. Setac, Asia • Pacific Symposium, November 1-2, 2001, Kanazawa, Japan.

170) Nakamura, M. (2001). Gonadal sex differentiation in fish and the effects of environmental endocrine disrupters. NIBB Seminar, March 3-5, 2001, Okazaki, Japan.

171) Nakamura, M., Higa, M., Nagoya, H. and Hirai, T. (2001). An evaluation method for the effects of environmental endocrine disrupters on gonadal sex differentiation in fish, ,Setac, Asia • Pacific Symposium, November 1-2, 2001, Kanazawa, Japan.

172) 比嘉幹彦、坂口あゆみ、小笠原敬、クレーグ、モレー、中村將 (2002)。雄ベラの性二型における性ステロイド合成酵素の発現とその役割。日本水産学会、平成14年4月2-4日、奈良。

173)*比嘉幹彦、坂口あゆみ、小笠原敬、長濱嘉孝、中村將 (2002)。アロマターゼ阻害剤によるベラの性転換。日本動物学会、平成14年9月24-27日、金沢。

174)*平井俊朗、名古屋博之、中村將 (2002)。Nonylphenol induced feminization of gonad in genetically controlled male common carp. 環境ホルモン学会、平成14年12月14-15日、広島。

175)*小林靖尚、小林亨、中村將、須之部友基、Craig Morrey、鈴木範男、長濱嘉孝 (2002)。オキナワベニハゼの双方向性転換過程における芳香化酵素の発現。日本動物学会、平成14年9月24-27日、金沢。

176) 増本貴士、中村將、比嘉幹彦、竹村明洋、東藤孝、柗矢野清 (2002)。カンモンハタの成熟・産卵と月例周期との関係。日本水産学会、平成14年4月2-4日、奈良。

177) 中村將、比嘉幹彦 (2002)。ハワイ産ベラの性転換に伴うステロイド代謝酵素の発現。日本水産学会、平成14年4月2-4日、奈良。

178)*中村將、比嘉幹彦、名古屋博之、平井俊朗 (2002)。アマゴ雄の性分化に及ぼすノニルフェノールとエストラジオールの複合影響。環境ホルモン学会、平成14年12月14-15日、広島。

179) 中村將 (2002)。琉球大学熱帯生物圏研究センターの概要と魚類研究の紹介。魚類の性と生殖に関する研究会、熱帯生物圏研究センター、平成14年12月12-13日、沖縄。

180)*米山健太、原彰彦、松原孝博、石橋弘志、有菌幸司、大嶋雄治、福留清秀、久保清、中村將、征矢野清 (2002)。ボラ (*Mugil cephalus*) を対象生物とした環境ホルモンの影響調査。環境ホルモン学会、平成14年12月14-15日、広島。

181)*Bhandari, R.K., Ando, H., Nakamura, M., Urano, A., Ueda, H. (2002). Effects of GnRHa on expression genes encoding gonadotropin subunits and growth hormone prolactin/somatolactin in the pituitary of masu salmon. 日本動物学会、平成14年9月24-27日、金沢。

182)*Higa, M., Ogawawara, K., Nagahama, Y. and Nakamura, Y. (2002). Androgen receptor expression in the brain of a protogynous hermaphrodite. Society for Neuroscience, November 2002, Orland, USA.

183) Bhandari Ramji, 中村將, 比嘉幹彦 (2003)。雌雄異体魚ナイルティラピアの卵巣分化後における機能的性転換：内分泌変化。日本動物学会、平成15年9月17-19日、函館。

184) 比嘉幹彦、小笠原敬、坂口あゆみ、長濱嘉孝、中村將 (2003)。ベラ性転換の人為的制御。日本水産学会、平成15年4月2-4日、東京。

185) 比嘉幹彦、大橋広義、小笠原敬、坂口あゆみ、酒井章衣、Ramji Bhandari、長濱嘉孝、中村將 (2003)。魚類の卵巣培養による精子形成。日本動物学会、平成15年9月17-19日、函館。

186) 平井俊朗、佐藤将、名古屋博之、北浦優、原彰彦、井口泰泉、中村將 (2003)。遺伝的全雄個体群を用いた環境ホルモンの影響評価。特定領域、内分泌攪乱物質の環境リスク、平成15年1月20-23日、松山。

187) 平井俊朗、佐藤将、名古屋博之、北浦優、原彰彦、中村將。魚類遺伝的全雄群を用いた環境ホルモンの影響評価。環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同発表会、平成15年8月、東京。

188) 中村將, Bhandari Ramji, 比嘉幹彦 (2003)。アロマトラーゼ・インヒビターによるティラピアの性分化後の機能的性転換。日本動物学会、平成15年9月17-19日、函館。

189) 征矢野清、増本貴士、田中英洋、東藤孝、中村將 (2003)。月周期と関連したカンモンハタの性成熟と産卵。日本水産学会、平成15年4月2-4日、東京。

190)*Bahandari, R.K., Higa, M., Nakamura, S. and Nakamura, M. (2003). Aromatase inhibitor induces complete sex change in protogynus fish, *Epinephelus merra*. Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, Mar. 24-28, 2003, Hawaii, USA.

191) Bhandari, R.K., Higa, M., Nakamura, S. and Nakamura, M. (2003). Endocrine changes during sex

change in a protogynous hermaphrodite fish, *Epinephelus merra*. 日本水産学会、平成15年4月2-4日、東京。

192)*Higa, M., Ogasawara, K., Sakaguchi, A., Nagahama, Y. and Nakamura, M. (2003). Hormonal regulation of sex change in wrasse. 3rd International Symposium on sex determination in vertebrate, Mar. 23-28, 2003, Hawaii, USA.

193)*Higa, M., Ogasawara, K., Sakaguchi, A., Nagahama, Y. and Nakamura, M. (2003). The role of steroid hormones in sex change of protogynous wrasse. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of fish, May 18-23, Mie, Japan.

194)*Miura, S., Komastu, T., Bhandari R.K. Nakamura, S. and Nakamura, M. (2003). Gonadal sex differentiation in protandrous anemone fish *Amphiprion clarkii*. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, March 18-23, Mie, Japan.

195) Nakamura, M. (2003). The role of estrogens in sex differentiation and sex change in fish. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of fish, March 18-23, Mie, Japan.

196)*Soyano, K., Masumoto, T., Tanaka, H., Takushima, M. and Nakamura, M. (2003). Luna-related spawning in honeycomb grouper, *Epinephelus merra*. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, March 18-23, Mie, Japan.

197) 比嘉幹彦、大橋広義、小笠原敬、坂口あゆみ、酒井章衣、Ramji K Bhandari、長濱嘉孝、中村將 (2004)。魚の卵巣培養による精子形成。平成16年度日本水産学会大会、平成16年4月2-4日、鹿児島。

198) 平井俊朗、松原創、寺島由宇、佐藤将、榊克子、原彰彦、中村將 (2004)。コイ全雄の生殖腺形成に及ぼすエストロゲン様物質の影響2。平成16年度日本水産学会大会、平成16年4月2-4日、鹿児島。

199)*小島豊、比嘉幹彦、中村將 (2004)。雌性先熟魚ミツボシキウセン*Helichoeres trimaculatus*におけるホルモン投与による性転換誘導。北大—京大—琉大連携水圏フィールド科学シンポジウム、平成16年12月4日、沖縄。

200) 松原創、平井俊朗、寺島由宇、佐藤将、榊克子、原彰彦、中村將 (2004)。コイ全雄の生殖腺形成に及ぼすエストロゲン様物質の影響1。平成16年度日本水産学会大会、平成16年4月2-4日、鹿児島。

201) 松原創、平井俊朗、杉浦あおい、寺島由宇、柴田安司、三田雅敏、吉国通庸、中村將、長濱嘉孝 (2004)。魚類における膜貫通型黄体ホルモン受容体の分子進化。平成16年度日本水産

学会大会、平成16年4月2-4日、鹿児島。

202)*松原創、平井俊朗、佐藤将、中村将 (2004)。コイのエストロゲン受容体遺伝子の単離と外因性エストロゲンによる影響。平成16年度日本動物学会大会。平成16年10月10-12日、神戸。

203)*松原創、平井俊朗、寺本由宇、佐藤将、榊克子、原彰彦、中村将 (2004)。エストロゲン様内分泌攪乱化学物質暴露によるコイ全雄の生殖腺形成不全。平成16年度日本動物学会大会、平成16年10月13日、神戸。

204) 三浦さおり、里見信子、仲村茂夫、R.K. Bhandari、比嘉幹彦、足立伸次、中村将 (2004)。雄性先熟魚のクマノミ *Amphiprion clarkii* の性分化とステロイド合成酵素の発現。平成16年度日本水産学会大会、平成16年4月2-4日、鹿児島。

205) 中村将、小室裕樹、仲村茂夫、Ramji K. Bhandari、小林亨、征矢野清 (2004)。カンモンハタの生殖腺の11 β -水酸化酵素の発現。平成16年度日本水産学会大会、平成16年4月2-4日、鹿児島。

206)*大西泰志、中村将 (2004)。オジサンの生殖年周期。北大—京大—琉大連携水圏フィールド科学シンポジウム、平成16年12月4日、沖縄。

207)*榊克子、松原創、原彰彦、中村将 (2004)。ベンゾフェノンのコイ (*Cyprinus carpio*) の精巢分化に及ぼす影響。北大—京大—琉大連携水圏フィールド科学シンポジウム、平成16年12月4日、沖縄。

208) 武井則雄、山口直広、井尻成保、東藤孝、足立伸次、中村将、山内皓平 (2004)。魚類におけるステロイド合成酵素の免疫組織化学的解析。平成16年度日本水産学会大会、平成16年4月2-4日、鹿児島。

209) 宅島めぐみ、田中英洋、増本貴士、中村将、征矢野清 (2004)。飼育環境下におけるカンモンハタの卵成熟と産卵。平成16年度日本水産学会大会、平成16年4月2-4日、鹿児島。

210)*Alam, M.A., Bhandari, R.K., Kobayashi, Y., Nakamura, S., Soyano, K. and Nakamura, M. (2004). 11-ketotestosterone dynamics during the natural sex change of a protogynous hermaphrodite. 北大—京大—琉大連携水圏フィールド科学シンポジウム、平成16年12月4日、沖縄。

211)*Bhandari, R.K., Komuro, H. and Higa, M., Nagahama, Y. and Nakamura, M. (2004). Induction of sex change of female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, by aromatase inhibitor Fadrozole, March 1-5, 2004, Hawaii.

212) Bhandari, R.K., Nakamura, M. and Nagahama, Y. (2004). Estrogen: master of the sexes? A Satellite Symposium on Physiology of Fish, November 4-5, 2004, Okinawa, Japan.

213) Bhandari, R., Higa, M., Nagahama, Y. and Nakamura, M. (2004). Sex reversal of adult gonochoristic fish. The 5th International Symposium on Fish Endocrinology, September 5-9, 2004, Castellon, Spain.

214)*Matsubara, H., Hirai, H., Teramoto, T., Sato, S., Hikuma, M. and Nakamura, M. (2004). The gene expression of estrogen receptors in male carp. 第109回日本解剖学会、平成16年8月、京都。

215)*Matsubara, H., Hirai, H., Shibata, S., Yoshikuni, M., Nakamura, M. and Nagahama, Y. (2004). The evolutionary aspects of membrane progesterin receptors. 第109回日本解剖学会、平成16年8月、京都。

216)*Nakamura, M., Higa, M., Oohashi, H. and Nagahama, Y. (2004). In Vitro spermatogenesis in fish ovary. The 37th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, August 1-4, Vancouver, Canada.

217) Ashraful, M. A., Bhandari R. K., 小林靖尚、仲村茂夫、征矢野清、中村將 (2005)。 Sex change of Honeycomb grouper *Epinephelus merra* with special regards to role of sex hormone. 平成17年度日本水産学会、平成17年3月31日-4月4日、東京。

218) 小林靖尚、小林亨、須之部友基、長濱嘉孝、中村將、(2005)。オキナワベニハゼの両方向性転換時における生殖腺刺激ホルモン受容体の発現変化。平成17年度日本水産学会、平成17年3月31日-4月4日、東京。

219) 小林靖尚、小林亨、須之部友基、長濱嘉孝、中村將、(2005)。オキナワベニハゼ *Trimma okinawae* の両方向性転換時における生殖腺刺激ホルモン受容体の発現変化。日本動物学会九州支部（第58回）、日本植物学会九州支部（第55回）、日本生態学会九州支部（第50回）沖縄生物学会（第42回）合同沖縄大会 平成17年5月14-15日、沖縄。

220)*小林靖尚、須之部友基、長濱嘉孝、中村將 (2005)。両方向性転換魚オキナワベニハゼ *Trimma okinawae* の生殖腺における内分泌かく乱物質の影響。内分泌かく乱物質、第六回領域シンポジウム、平成17年9月21日、東京。

221)*小島豊、比嘉幹彦、中村將、(2005)。雌性先熟魚ミツボシキウセンにおけるホルモン投与による性転換誘導。平成17年度日本水産学会、平成17年3月31日-4月4日、東京。

222)*小島豊、中村將、(2005)。雌性先熟魚ミツボシキウセン *Halichoeres trimaculatus* のホルモン投与による性転換誘導。内分泌かく乱物質、第六回領域シンポジウム、平成17年9月21日、東京。

223) 小松徹、仲村茂夫、中村將、(2005)。アロマターゼ阻害剤による雌雄異体魚ゴマアイゴの性

転換。日本動物学会九州支部（第58回）、日本植物学会九州支部（第55回）、日本生態学会九州支部（第50回）沖縄生物学会（第42回）合同沖縄大会、平成17年5月14-15日、沖縄。

224) 松原創、平井俊朗、天野春菜、関戸沙由里、寺本由宇、佐藤将、榊克子、引馬基彦、原彰彦、中村将、(2005)。コイ全雄の稚魚期における生殖腺形成関連因子の発現に及ぼす雌性ホルモンの影響。平成17年度日本水産学会、平成17年3月31日-4月4日、東京。

225) 松山倫也、米田道夫、向野優子、中村将、田畑正志・毛利孝之、(2005)。マトウダイは精細胞を排精する。平成17年度日本水産学会、平成17年3月31日-4月4日、東京。

226)*三浦さおり、中村将、(2005)。雄性先熟魚クマノミの性分化とステロイド合成酵素。内分泌かく乱物質、第六回領域シンポジウム、平成17年9月21日、東京。

227)*中村将、比嘉幹彦、(2005)。生体外培養による卵巣から精巣への転換と内分泌かく乱物質の影響。内分泌かく乱物質、第六回領域シンポジウム、平成17年9月21日、東京。

228) 中村将 (2005)。魚類の性転換。日本動物学会（第76回）平成17年10月6-8日、つくば。

229)*榊 克子、松原 創、原 彰彦、樋口正彦、中村 将 (2005)。コイ (*Cyprinus carpio*) の精巣分化に及ぼすベンゾフェノンの影響。内分泌かく乱物質、第六回領域シンポジウム、平成17年9月21日、東京。

230) 田中英洋・宅島めぐみ・中村将・征矢野清 (2005)。ステロイド及びLHRHaの複合投与による非繁殖期カンモンハタ *Epinephelus merra* 雌の生殖腺発達誘導。平成16年度日本水産学会九州支部総会・大会、九州大学、平成17年1月22日、福岡。

231) 山口直宏、市川真幸、中村将、武井則雄、東藤孝、足立伸次、山内皓平 (2005)。魚類のステロイド合成酵素の免疫組織化学的検出。平成17年度日本水産学会、平成17年3月31日-4月4日、東京。

232) Bhandari R. K., Nakamura, M. and Nagahama, Y. (2005). Estrogen is essential for the maintenance of female sex in fish.平成17年度日本水産学会、平成17年3月31日-4月4日、東京。

233)*Bhandari, R.K, Nakamura, M. and Nagahama Y. (2005).Functional sex reversal of an adult cichlid suggests the existence of sexual plasticity in adult gonochoristic fishes. 内分泌かく乱物質、第六回領域シンポジウム、平成17年9月21日、東京。

234)* Kobayashi, Y., Sunobe, T., Kobayashi, T., Nagahama, Y. and Nakamura, M. (2005). Quantification of FSH and LH receptors mRNA in gobiid fish (*Trimma okinawae*) during serial sex change. 琉球大学21世紀COEプログラム第一回国際シンポジウム、平成17年3月10-11日、沖縄。

235)*Komatsu, T., Nakamura, S. and Nakamura, M. (2005)。Sex differentiation and the expression of cytochrome P450 in the gonads during early gonadal differentiation in the golden rabbitfish, *Siganus guttatus*. 琉球大学 21世紀COEプログラム第一回国際シンポジウム、平成17年3月10-11日、沖縄。

236) Nakamura, M. (2005). Sex change in fish, 21st Marine Bio-Manipulation COE Frontier Food Production, Oct, 8-11,2005, Hakodate, Japan.

3) 北野グループ:

237)*今里栄男、吉永憲史、安部眞一、北野 健 (2001)。ヒラメの性分化に及ぼすノニルフェノール、ビスフェノールAの影響。環境ホルモン学会、平成13年12月14-15日、つくば。

238) 北野健、安部眞一 (2001)。ヒラメの性分化における11 β -水酸化酵素の役割。日本水産学会、平成13年4月1-5日、藤沢。

239) 古柳貴史、山口紗貴子、安部眞一、北野 健 (2001)。ヒラメのビテロジェニン遺伝子の発現制御機構について。環境ホルモン学会、平成13年12月14-15日、つくば。

240)*Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y. and Abe S-I. (2001). Role of estrogen in gonadal sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). 14th International Congress of Comparative Endocrinology, May 26-30, 2001, Sorrento, Italy.

241) Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y. and Abe, S.-I. (2001). Gonadal sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). International Commemorative Symposium: 70th Anniversary of JSFS, October 1-5, 2001, Yokohama, Japan.

242)*Nakayama, K., Oshima, Y., Tashiro, K., Nagafuchi, K., Kang, I.J., Kitano, T., Kishida, M., Mita, K. and Honjo, T. (2002). Construction of a DNA microarray with cDNAs expressed in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). SETAC, November 16-20, 2002, Salt Lake City, USA.

243) 安達竜太、吉永憲史、木村武志、安部眞一、北野健 (2003)。ヒラメの性分化におけるアンドロゲンレセプターの役割、第74回日本動物学会、平成15年9月17-19日、函館。

244)*北野健、古柳貴史、安部眞一 (2003)。ヒラメにおけるビテロジェニン遺伝子の発現制御機構の解析。第28回日本比較内分泌学会大会、平成15年8月8-9日、富山。

245) 島崎洋平、大嶋雄治、横田佳子、北野健、中尾実樹、川畑俊一郎、今田信良、本城凡夫 (2003)。

トリブチルスズの魚類血液への蓄積とそれに関与するタンパク質。日本水産学会、平成15年4月1-5日、奈良。

246) 島崎洋平、北野健、大嶋雄治、井上英、今田信良、本城凡夫 (2003)。トリブチルスズによるヒラメの雄化。日本水産学会、平成15年4月1-5日、奈良。

247) 白石絵吏、今里栄男、横井勇人、山本卓、安部眞一、北野健 (2003)。メダカにおけるTransformer-2 cDNAの単離と発現解析。第74回日本動物学会、平成15年9月17-19日、函館。

248) 山口紗貴子、安部眞一、北野健 (2003)。ヒラメのFTZ-F1によるアロマターゼ遺伝子の転写制御機構の解析。平成15年度日本水産学会大会、平成15年4月1-5日、東京。

249) Kitano, T., Yamaguchi, S. and Abe, S.-I. (2003). The mechanism of transcriptional regulation of P450 aromatase gene by two FTZ-F1 homologues in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, March 24-28, 2003, Kona, Hawaii, USA.

250) Kitano, T., Koyanagi, T. and Abe, S.-I. (2003). The mechanism of transcriptional regulation of vitellogenin gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (Invited), May 18-23, 2003, Mie, Japan.

251) 安達竜太、吉永憲史、山口紗貴子、安部眞一、木村武志、北野健 (2004)。ヒラメの性分化におけるフルタミドの作用機構。平成16年度日本水産学会大会、平成16年4月2日、鹿児島。

252)*金玉姫、内田一郎、安部恵祐、北野健、江頭恒、安部眞一 (2004)。イモリ精巣におけるoccludinタンパク質の発現。日本動物学会第75回大会、平成16年9月10-12日、神戸。

253)*白石絵吏、今里栄男、山本卓、横井勇人、安部眞一、北野健 (2004)。メダカの性分化過程におけるTransformer-2ホモログの発現パターン。日本発生生物学会第37回大会、平成16年6月5日、名古屋。

254)*李瑜文、北野健、安部恵祐、江頭恒、安部眞一 (2004)。イモリ精原細胞の増殖と分化に対するEstradiol-17b(E2)の効果。日本動物学会第75回大会、平成16年9月10-12日、神戸。

255) 吉永憲史、安達竜太、山口紗貴子、安部眞一、木村武志、北野健 (2004)。ヒラメの性分化における11-ケトテストステロンの作用機構。平成16年度日本水産学会大会、平成16年4月3日、鹿児島。

256) 吉永憲史、白石絵吏、安部眞一、井口泰泉、北野健 (2004)。魚類におけるミューラー管抑制物質(MIS) cDNAの単離と発現解析 平成16年度日本水産学会大会、平成16年4月4日、鹿児島。

257)*吉永憲史、白石絵吏、安部眞一、横井勇人、井口泰泉、北野健(2004)。魚類の性分化過程におけるミューラー管抑制物質(MIS)ホモログの発現解析。日本発生生物学会第37回大会、平成16年6月5日、名古屋。

258)*Kawakami, Y., Kitano, T., Adachi, S., Yamauchi, K. and Ohta, H. (2004). Transcriptional activity of conger eel thyroid hormone receptors with thyroid hormone. 5th International Symposium on Fish Endocrinology, September 5-9, 2004, Castellon, Spain.

259)*Kitano, T., Yoshinaga, N., Adachi, R. and Abe, S. (2004). Action of 11-ketotestosterone in gonadal sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). 5th International Symposium on Fish Endocrinology, September 5-9, 2004, Castellon, Spain.

260) Kitano, T. (2004). Effects of hormones and endocrine disrupting chemicals on temperature-dependent sex determination in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Bilateral Symposium Italy and Japan, November 16-19, 2004, Mie, Japan.

261)*蛭原智美、白石絵吏、平井俊朗、安部眞一、北野健(2005)。メダカにおける生殖腺刺激ホルモン受容体の発現及び機能解析。日本比較内分泌学会第30回大会、平成17年11月12-13日、熊本。

262)*金玉姫、内田一郎、北野健、江頭恒、安部眞一(2005)。イモリ精巣における選択的バリアーについて。日本動物学会第76回大会、平成17年10月6-8日、つくば。

263) 白石絵吏、三浦猛、若松佑子、安部眞一、北野健(2005)。ミューラー管抑制物質ホモログはメダカ性分化過程における生殖細胞の増殖に必須である。日本発生生物学会第38回大会、平成17年6月4日、仙台。

264)*白水剛、白石絵吏、吉永憲史、金森章、久保優子、堀寛、安部眞一、北野健(2005)。魚類におけるミューラー管抑制物質の発現制御機構の解析。日本比較内分泌学会第30回大会、平成17年11月12-13日、熊本。

265)*山口寿哉、吉永憲史、平井俊朗、安部眞一、北野健(2005)。ヒラメ性分化における*Fox12* mRNAの発現解析。日本比較内分泌学会第30回大会、平成17年11月12-13日、熊本。

266)*Kitano, T., Adachi, R., Yoshinaga, N. and Abe, S. (2005). Role of androgen in gonadal sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). 15th International Congress of Comparative Endocrinology, May 22-27, 2005, Boston, USA.

267) Shiraiishi, E., Yoshinaga, N., Miura, T., Wakamatsu Y., Ozato, K., Abe, S. and Kitano T. (2005). Müllerian inhibiting substance is required for sexually dimorphic proliferation of germ cells during gonadal sex differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). 15th International Congress of Comparative

Endocrinology, May 22-27, 2005, Boston, USA.

268) Yang, J., Adachi, R., Yoshinaga, N., Abe, S. and Kitano T. (2005). Effects of estrogen and estrogenic chemicals on gonadal sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). 15th International Congress of Comparative Endocrinology, May 22-27, 2005, Boston, USA.

4) 徳元グループ:

269) 徳元俊伸、近藤章実、美輪純子、石川勝利、徳元美佳、堀口涼、長濱嘉孝 (2001)。アフリカツメガエル卵内26Sプロテアソーム結合タンパク質の同定。日本動物学会大会、平成13年10月6-8日、福岡。

270) 堀口涼、吉国通庸、徳元美佳、長濱嘉孝、徳元俊伸 (2003)。キンギョ卵母細胞における26Sプロテアソーム α 4サブユニットのリン酸化酵素の同定。日本動物学会大会、平成15年9月17-19日、函館。

271) 徳元俊伸、徳元美佳、堀口涼、石川勝利、長濱嘉孝 (2003)。ジエチルスチルベストロール(DES)による魚類卵成熟の誘起。日本動物学会大会、平成15年9月17-19日、函館。

272) * Horiguchi, R., Yoshikuni M., Tokumoto, M., Nagahama Y. and Tokumoto, T. (2003). Identification of a protein kinase which phosphorylate α 4 subunit of the 26S proteasome in goldfish oocytes. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

273) *Tokumoto, T., Tokumoto, M., Ishimatsu, M., Horiguchi, R., Nagahama, Y. and Ishikawa, K. (2003). Purification of anaphase promoting complex/cyclosome from goldfish oocytes. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of fish, May 18-23, 2003, Mie, Japan.

274) *堀口涼、吉国通庸、徳元美佳、長濱嘉孝、徳元俊伸 (2004)。キンギョ卵の減数分裂における26Sプロテアソーム α 4サブユニットのリン酸化機構の解析。日本動物学会大会、平成16年9月10-12日、神戸。

275) *徳元美佳、Peter Thomas、長濱嘉孝、石川勝利、徳元俊伸 (2004)。キンギョプロゲステロンレセプター (mPR) のクローニングと発現の解析。日本動物学会大会、平成16年9月10-12日、神戸。

276) *徳元俊伸、徳元美佳、溝呂木直美、相原淳一、石川勝利、長濱嘉孝 (2004)。内分泌かく乱物質によるゼブラフィッシュ卵成熟の誘起と阻害。日本動物学会大会、平成16年9月10-12日、神戸。

277)*Horiguchi, R., Yoshikuni M., Tokumoto, M., Nagahama Y. and Tokumoto, T. (2004). Meiotic cell cycle regulated phosphorylation of a subunit of the 26S proteasome by casein kinase. 4th International Symposium on the Molecular and Cell Biology of Egg-and Embryo-Coats, November 8-13, 2004, Toba, Japan.

278)*Tokumoto, T. (2004). Fractionation of cyclin B restricted digestion activity. 4th International Symposium on the Molecular and Cell Biology of Egg-and Embryo-Coats, November 8-13, 2004, Toba, Japan.

279) 徳元俊伸 (2005)。環境ホルモンによるサカナの卵成熟誘起とその阻害。静岡大学ライフサイエンスシンポジウム、平成17年1月31日、静岡。

280) 徳元俊伸 (2005)。サカナを用いた物質のホルモン作用の評価法。新技術説明会 静岡大学・科学技術振興機構、平成17年6月2-3日、東京。

281)*堀口涼、道羅英夫、徳元美佳、長濱嘉孝、徳元俊伸 (2005)。キンギョ卵成熟過程におけるプロテアソームサブユニットの変化の解析。日本動物学会大会、平成17年10月6-8日、つくば。

282)*蜂須賀香里、井伊早苗、山口寿哉、徳元美佳、徳元俊伸 (2005)。in vivo 実験系による内分泌かく乱物質の魚類の卵成熟に及ぼす影響の解析。日本動物学会大会、平成17年10月6-8日、つくば。

283)*井伊早苗、蜂須賀香里、徳元美佳、徳元俊伸 (2005)。in vivo 実験系による内分泌かく乱物質の魚類の排卵誘導に及ぼす影響の解析。日本動物学会大会、平成17年10月6-8日、つくば。

284)*徳元美佳、長濱嘉孝、徳元俊伸 (2005)。キンギョプロゲステロンレセプターサブタイプ群 (mPR) のクローニングと発現の解析。日本動物学会大会、平成17年10月6-8日、つくば。

(3) 特許出願 (国内3件、国外4件)

① 国内出願 (3 件)

発明の名称：黄体ホルモン受容体ポリペプチド、当該ポリペプチドをコードする遺伝子を導入した遺伝子導入細胞およびそれを用いた攪乱物質検出

発明者：長濱嘉孝、池内俊貴、小林亨、東藤孝

出願人：自然科学研究機構

出願日：平成13年8月3日

出願番号：特願2001-235725

発明の名称：内分泌攪乱性物質のスクリーニング方法

発明者：徳元 俊伸

出願人：国立大学法人 静岡大学

出願日：平成17年1月21日

出願番号：特願2005-014006

発明の名称：内分泌攪乱性物質のスクリーニング方法

発明者：徳元 俊伸

出願人：国立大学法人 静岡大学

出願日：平成17年9月15日

出願番号：特願2005-267894

② 海外出願 (4 件)

発明の名称：遺伝子導入細胞及びそれを用いた攪乱物質の検出法

発明者：長濱嘉孝、池内俊貴、小林亨、東藤孝

出願人：自然科学研究機構

出願日：平成14年6月21日

出願番号：10/175, 822 米国

発明の名称：遺伝子導入細胞及びそれを用いた攪乱物質の検出法

発明者：長濱嘉孝、池内俊貴、小林亨、東藤孝

出願人：自然科学研究機構

出願日：平成14年6月25日

出願番号：02014185. 9 EP

発明の名称：黄体ホルモン受容体ポリペプチド、当該ポリペプチドをコードする遺伝子を導入した遺伝子導入細胞およびそれを用いた攪乱物質検出法

発明者：長濱嘉孝、池内俊貴、小林亨、東藤孝

出願人：自然科学研究機構
出願日：平成14年7月26日
出願番号：10/202,846 米国

発明の名称：黄体ホルモン受容体ポリペプチド、当該ポリペプチドをコードする遺伝子を導入した遺伝子導入細胞およびそれを用いた攪乱物質検出法
発明者：長濱嘉孝、池内俊貴、小林亨、東藤孝
出願人：自然科学研究機構
出願日：平成14年8月1日
出願番号：02016964.5 EP

(4) 受賞など

① 受賞

中村 将：平成11年4月 日本水産学会進歩賞

長濱嘉孝：平成16年1月 バーンレクチャー賞(米国統合・比較生物学会連合)

② 新聞報道

メダカの性決定遺伝子の発見(平成14年5月)

読売新聞、朝日新聞、毎日新聞、日本経済新聞、中日新聞、他(添付記事参照)

③ その他

なし

(5) その他特記事項

なし

6 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

なし

(2) 招聘した研究者等

| 氏名(所属、役職) | 招聘の目的 | 滞在先 | 滞在期間 |
|-----------------------------|---------|----------|-------------------------------|
| Annerose Anders (ギーゼン大学・教授) | 研究発表を依頼 | 基礎生物学研究所 | 2003. 10. 01～ 2003. 10. 10 |

7 結び

平成12年11月に、それまでの研究成果を基盤として申請した戦略的創造研究推進事業「魚類生殖内分泌系に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響の分子メカニズム」が採択され、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に関する研究を開始することができた。それ以来5年間、素晴らしい共同研究者と本事業で雇用した多くの研究員と研究補助員からなる強力な研究体制のもとに、ほぼ当初の計画通りに研究を遂行することができたと考えている。また、本研究で新しく開始したマイクロアレイ解析やプロテオーム解析のための機器を本事業の支援を受けて完備することができたことも、本研究の推進に非常に有効であった。この間、多くの若手研究者が国外で開催された関連の学会や研究集会に出席する機会を得ることができたことは、今後の我が国における当該分野のさらなる活性化に大きく貢献するものと考えられる。

研究の開始当時は世界各地で性的異常魚の発見が報告されていたが、その作用メカニズムはほとんど不明であった。本研究の開始1年後にメダカの性決定遺伝子*DMY*を同定することができたことは、生殖腺における性ホルモンや内分泌かく乱物質の作用点が性決定過程ではなく、性分化過程であることを突き止めることに有効であった。また、この性決定遺伝子の発見は基礎生物学研究、特に動物における性決定/分化の研究に大きなインパクトを与えることになった。哺乳類の性決定遺伝子*SRY/Sry*と遺伝子構造が全く異なることは驚きであったし、また*DMY*がメダカ種間に共通な性決定遺伝子でないことも予想していなかったことである。この新知見は動物における性決定の仕組みが生物種間で著しく多様性に富むことを示唆しておりきわめて興味深い。一方、成熟魚の生殖腺でも性的可塑性が保持されているという新知見は、生殖腺に及ぼす性ホルモンや内分泌かく乱物質の影響を調べる過程で見出された。我々も当初、発生初期や性転換魚の生殖腺が性的可塑性を示すことは十分に考えていたが、成熟後の雌雄異体魚（メダカ、ティラピア）の生殖腺までが性的可塑性を保持していることはまったく予想していなかったもので大きな驚きであった。この発見がもとになり *in vitro* での生殖腺の性転換にも世界に先駆け成功したのである。これらの研究成果を昨年から本年にかけて開催された国内外の学会、研究会等で発表し、高い評価を受けたが、特に哺乳類の性分化研究者からの反響が大きかった。

本研究を終えるにあたっての反省点の一つは、個々の内分泌かく乱物質の作用メカニズムそのものを詳しく解析するところまでに至らなかったことである。この点に関しては今後も是非研究を継続したいと思っている。本研究の成果から、魚類の生殖腺が内分泌かく乱物質の影響を受けるか否かは、雌雄生殖腺の体細胞が保持する性的可塑性により決まる場合が多いことが明らかになった。従って、内分泌かく乱物質の作用メカニズムを突き止めるためには、生殖腺の体細胞が生涯にわたって保持すると考えられる性的可塑性のメカニズムを分子、細胞レベルで明らかにすることが不可欠である。この研究を行うための分子、細胞レベルの知見とツールは十分に整ったと判断される。遺伝子プローブは勿論のこと、**GFP**で標識されたトランスジェニックメダカ系統を駆使することによって性的可塑性の分子・細胞的基盤が解明できるものと確信している。内分泌かく乱物質の作用メカニズムを解明するためにはこのような基礎的研究を着実に集積することが必要であると考えられる。

謝辞

本研究は、クレスト「内分泌かく乱物質」の「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」において実施されたものであり、中村 将（琉球大学、性転換研究グループ）、北野 健（熊本大学、海産魚研究グループ）、徳元俊伸（静岡大学、卵成熟研究グループ）の諸先生方との共同研究によるものである。最後に、本研究を推進するにあたり励ましとご指導をいただいた鈴木継美研究統括をはじめとする領域アドバイザーの先生方（井上達先生、井村伸正先生、加藤順子先生、紫芝良昌先生、松下秀鶴先生、安野正之先生）、さらにはこの研究を暖かく支えていただいた独立行政法人科学技術振興機構の皆様、特に「内分泌かく乱物質」領域事務所の岸本文貴技術参事、福田美哉事務参事、堀 元事務参事をはじめとする皆さんに深く感謝申し上げます。

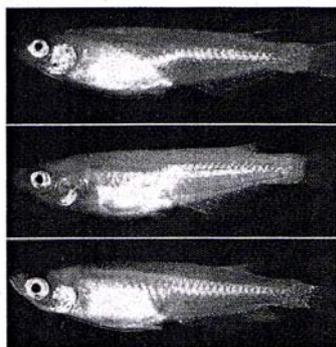
読者新聞

2002年(平成14年)5月13日 月曜日

メダカの性決定遺伝子発見

メダカで雌雄の性を決めるの長浜嘉孝教授(発生物学 新潟大の酒泉満教授(魚類遺伝子)を突き止めることに、学、松田勝・博士研究員(伝学)ら。

愛知県岡崎市の岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所、新潟大の研究グループが成功した。その成果は、十三日付の英科学誌「ネイチャー」電子版に発表される。性決定遺伝子は、これまでヒトを含む一部の哺乳類で見つかっただけで、他の脊椎動物では初めて。性分化の解明や進化の過程などを明らかにできると期待されている。



(上から)メス、赤い色をしているがオスの性決定遺伝子を欠いたメダカ、オス—岡崎国立共同研究機構提供

岡崎国立共同研究機構など

ヒトの場合、性決定遺伝子(SRY)を持つY染色体が関与すると男になる。マウスでも同様の遺伝子が確認されている。

長浜教授らがメダカを用いたのは、性についての研究が通ずるかどうかも調べたい、国内外で取り組まれてきたため。体の色が赤色となるオスと白色のメスの交配を繰り返して体は赤色でありながら、結果は白く、卵巣を持つメダカを発見。このメダカでは、性決定にかかわる染色体の一部の遺伝子が欠けていた。一部の領域には、オス特有の遺伝子の進化の過程を解く手掛りがあった。

哺乳類外で初めて

尾里達一郎・名古屋大名誉教授(発生物学)の話「性決定遺伝子が、下等な脊椎動物で見つかったことは画期的だ。どのようかオス、メスになるかの古来からの謎や、遺伝子の進化の過程を解く手掛りがあった。」

メダカの性決定遺伝子発見

解説

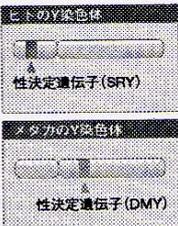
一九九〇年、ヒトのは、メダカの性決定遺伝子「D」もなる。Y染色体のなかに性決定遺伝子「SRY」が発見された。その後、マウスにも同じような遺伝子「SRY」があることが確かめられたが、哺乳類以外の脊椎動物では、これまで成果らしいものはなかった。

環境ホルモン調査に期待

これは、生物によって性決定遺伝子が異なっている場合もあることを示しており、その進化の過程を明らかにする突破口に

今回の研究で重要な点の一つの過程を明らかにする突破口に

ヒトとメダカの性決定遺伝子の違い



メスになる現象が現れれば、要因についても研究を進めており、性決定遺伝子との関係がつかめるかも知れない。

長浜教授グループは、オス、メスに分化していく際に重要な

〈赤塚 堅、本文記事一面〉

メダカ性決定遺伝子特定

環境の影響、解明へ一歩

岡崎国立共同研

岡崎国立共同研究機構
基礎生物学研究所（愛知
県岡崎市）の長浜嘉孝教
授らの研究グループが、
メダカのオスとメスの性
を決める遺伝子を突き止
めた。13日発売の英国の
科学雑誌「ネイチャー」
に発表される。メダカの
性が遺伝的に決まったの
か、環境などの影響で変
化したのかが分かるよう

になり、長浜教授らは
「環境ホルモンなどが遺
伝子に与える影響も解明
できる」としている。
最近では、環境ホルモン
などの影響とみられる魚
類や両生類などの性転換
や性分化の異常が国内外
で報告され、野生メダカ
も特にオスの減少が心配
されている。環境ホルモ
ンが性決定に与える影響

の解明は絶滅の恐れがあ
る野生メダカの種の保存
にも役立つことになる。
研究グループは、新潟
大理学部自然環境科学科
の酒泉満教授らの協力
で、約3年間かけて約50
万個あるメダカの遺伝子
の中から生殖腺の性分化
が起る時期に発現する
三つの遺伝子を突き止め
た。

研究の結果、うち一つ
の遺伝子が、メダカのX
染色体には存在せず、オ
スを特徴づけるY染色体
だけに存在することを発
見。90年にイギリスの研
究者が発見したヒトの性
を決める「SRY遺伝
子」に相当する性決定遺
伝子として「DMY遺伝
子」と名付けた。

中村グループ（琉球大学）



北野グループ（熊本大学）



徳元グループ（静岡大学）



長濱グループ（基礎生物学研究所）

