

(様式第9 別紙2：公開版)

## 養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 阿 部 達 雄 印/署名

2. 養成カリキュラム名： ビテロジェニン産生を指標とした内分泌攪乱物質のスクリーニング法の検討

3. 養成カリキュラムの達成状況

今年度の研究では、4-ニトロトルエン(4-NT)のメダカパーシャルライフサイクル試験(PLCT)において、精巣卵をもつ個体のメダカの性決定遺伝子(DMY)により性遺伝子型を確認した。平成13~15年の研究により確立したビテロジェニンアッセイ法と組み合わせ、内分泌攪乱作用の有無を評価し、性遺伝子型を用いたPLCTの有用性を実証することができている。また、メダカの性決定遺伝子のDNAシーケンサーやサザンブロット法による分析、PCRのプライマー設計を通して遺伝子工学的な手法を習得できている。

4. 成果(A4版3枚程度)

1) 確立したビテロジェニンアッセイ法の有効性の検討

本検討では、確立したビテロジェニンアッセイ法の有効性を検討するため、内分泌攪乱作用が疑われている物質のひとつである4-ニトロトルエンについて、メダカPLCTの結果から内分泌攪乱評価における適用性について解析した。4-ニトロトルエンを用いたPLCTは、0.954、3.05、9.77、31.3、100 µg/L(設定濃度)の範囲で行った。試験終了時(ふ化後60日令)においては、精巣中に卵母細胞を持つ、生殖腺がいわゆる精巣卵であるメダカが9.77 µg/L区において2個体観察された。しかしながら、出現した精巣卵の程度は軽く、精巣卵中の卵母細胞の数も数個程度と低いものであった。これら精巣卵を持つ個体は、十分なオスの二次性徴を呈しており、精巣卵を有していた個体を性遺伝子マーカーで調べた結果、遺伝子型の性別はオス型(XY型)であった(別紙1、図1)。また、この2個体の肝臓中ビテロジェニン濃度は、検出下限値(0.24 ng/mg以下)あるいは0.94 ng/mgと低レベルであった。さらに、精巣卵の出現はこの2個体のみで、本濃度範囲において濃度依存性は認められなかった。生殖腺の組織学的観察においては、性比の偏りに統計学的な有意差は認められなかった。対照区は、雌雄とも正常な生殖腺組織であり、性比の偏りはみられなかった。ビテロジェニン産生について統計学的に有意差が認められた濃度区はなく、濃度依存的影響はみられなかった。以上のような結果から、精巣卵を有していた個体は、卵母細胞が精巣中に稀に出現した可能性が考えられ、この精巣卵の出現と内分泌攪乱作用の間に関連性が低いと評価することができた。この際、DMY性遺伝子型の判別とビテロジェニンアッセイ法の組み合わせは、精巣卵の判断基準として有効であった。

以上、有効性の検討において内分泌攪乱評価法の習得につとめた。

## (2) 魚類の遺伝子マーカーを用いた評価手法の開発

今年度までの研究において、魚類の遺伝子マーカーであるDMYを用いた方法が、内分泌攪乱評価に有効であることを示してきた。PLCT試験に用いたヒメダカが、既報の配列 (GenBank No. AB071534.1) と相同であることを確認するために、DNAシーケンシングおよびサザンブロットングを行った。DNAのシーケンシングでは、尾ヒレより抽出したDNAサンプルを精製し、既報の文献<sup>1</sup>によりDMY遺伝子が増幅する条件に基づきPCRを行った。増幅したPCR産物は、アガロースゲル電気泳動を行った後にUV吸収のある部分をゲルより切り出し、Min Elute Gel Extraction Kit (Qiagen)を用いて精製した。配列の確認は、所定の前処理を行いDNA自動シークエンサー (ABI Prism377、Applied Biosystems) を用いて行った。相同性の確認は、BLASTのホモロジー検索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) により行い、90%以上の配列が一致していることを確認した(別紙2、図2)。また、DMY遺伝子の構造的な相同性を確認するため、サザンブロット分析を行った。DMY遺伝子の相同性の確認は、純系のメダカであるFLF系統を対照に用いた。サザンブロットでは、Alk Phos Direct Labeling system (Amersham Pharmacia)を利用し、DNAはキャピラリーブロットングによりプロトンチャージしたニトロセルロースメンブレンフィルター (Hybond N<sup>+</sup>、Amersham Pharmacia) にブロットさせた。ブロットしたメンブレンは、固定化を行った後にハイブリダイズさせた。ヒメダカ(PLCTに使用のもの)およびFLFのDNAプローブは、PCR増幅産物をアガロースゲルによる電気泳動を行った後にゲルを切り出し、Min Elute Gel Extraction Kitによる精製を行った。得られたDNAは、プローブラベルしてハイブリダイゼーションに使用した。ハイブリダイズしたDNAは、CDP-star detection reagentにより反応した蛍光をECLカメラ(Amersham Pharmacia)を用いて、ポラロイドフィルムに感光させることにより検出した。FLFのDNAをプローブとして、ヒメダカのDNAをブロットした場合は、相同性を示す結果が得られた(別紙2、図3)。同様に、ヒメダカのDNAをプローブとして、FLFのDNAをブロットした場合においても相同性を示す結果が得られ、構造的な相同性の確認することができた。

さらに、メダカの性決定遺伝子 (DMY) における新規プライマーの設計検討を行った。既往の文献<sup>1</sup>によるプライマーは、PG17.19 (gaaccacagctgaagaccccgtga, M.W.=7934, Tm=66)、PG17.20 (gcatctgctgtagctgctgtagtg, M.W.=8024, Tm=64) の組み合わせである(別紙3、図4)。増幅した範囲は、DMY遺伝子の第2エキソン中盤から第4エキソンまでの範囲であることが解っている。しかし、このプライマーセットを解析すると、プライマーPG17.20の配列がDMY遺伝子の第4エキソンから第5エキソンに跨るような形になっており、改善の必要があると判断した。本検討では、DMY遺伝子による性遺伝子型の判定における精度の向上を目指し、プライマーの再設計を行った。設計には、プライマー設計プログラム (<http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/web-primer>) を用い、PG17.A1 (aggaagattccatcccgc, M.W.=5468, Tm=70) とPG17.A2 (acagacagaggattgggggt, M.W.=6246, Tm=72) およびPG17.A3 (ggtactgctgtagtgtacaggttt, M.W.=8231, Tm=64) とPG17.A4 (aaccacagctgaagaccccgtgaaa, M.W.=8063, Tm=61) の2つの組み合わせが、予測されるプライマーの構造・性状から有力な候補として挙げられた。PG17.A1、PG17.A2の組み合わせは、DMY遺伝子の第2エキソン前半から第3エキソン後半の設計であるが、雌雄いずれの場合もPCRによる増幅はみられず、性遺伝子型の判別には適用できなかった。一方、PG17.A3、PG17.A4の組み合わせは、DMYの第2エキソンの中盤から第4エキソン後半までの範囲で設計したものである。このブ

ライマーセット (PG17.A3、PG17A4) による性遺伝子型の判別の結果では、既往の文献<sup>\*1</sup>によるブライマーセット (PG17.19、PG17.20) の結果と完全に一致し、性遺伝子型の判別が可能であることを確認した (別紙3、図5)。また、本検討に用いたメダカ (ヒメダカ、およびFLF2種) の外観二次性徴とDMYによる遺伝子型は完全に一致していた。本検討により、より高精度の内分秘攪乱評価を行うことが可能であることを示した。

以上、評価法開発において遺伝子工学的手法を習熟できた。

<sup>\*1</sup>Matsuda, M.et al., 2002. Nature 417, 559-63.

## 5. 成果の対外的発表等

### (1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。)

Nozaka T., T. Abe, M. Sakamoto, N. Nakano, M. Maeda, K. Kobayashi, Development of vitellogenin assay for endocrine disruptors using medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Sciences (査読済)

### (2) 口頭発表 (発表済を対象。)

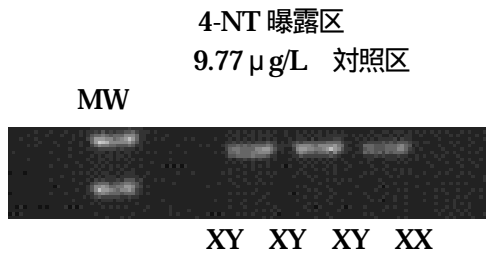
平成 16 年 11 月 第 24 回米国環境毒性学会年会 (テキサス、米国)  
口頭発表で申請したが、応募多数のためポスターとして発表

### (3) 特許等の出願件数

なし

(別紙 1)

図1 4-トリニトロトルエンの精巣卵が観察された個体のDMYによる遺伝子型の判別



MW:分子量マーカー (500bp ラダーマーカー。上から 2.0kb、1.5kb)

(別紙 2)

図2 ヒメダカより得られたDNAのDMY部分をシーケンスした一例

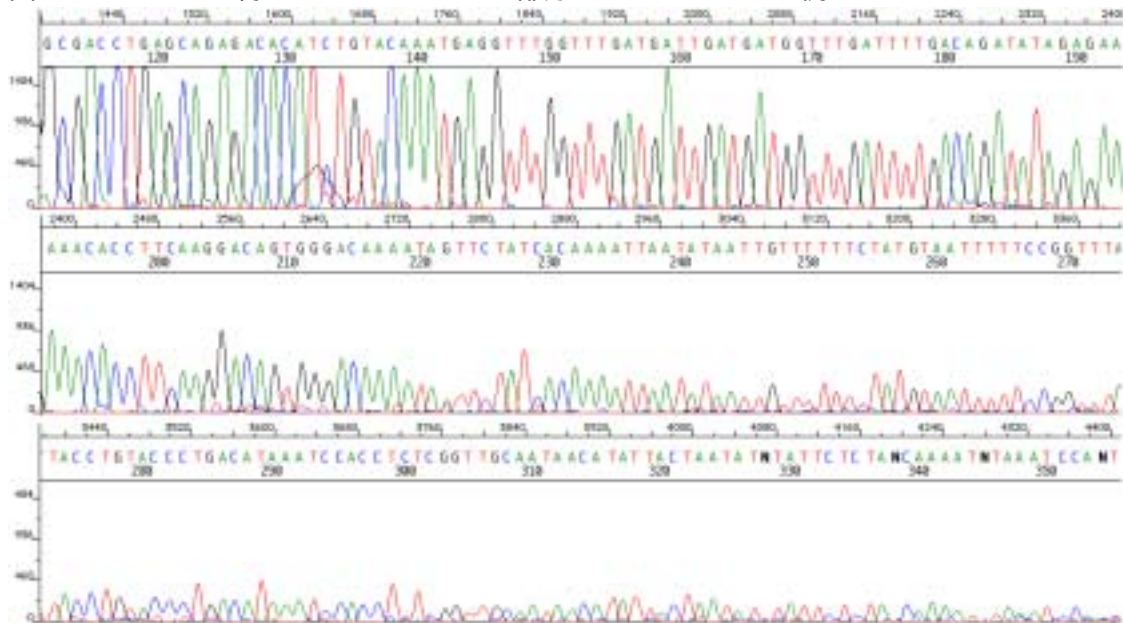
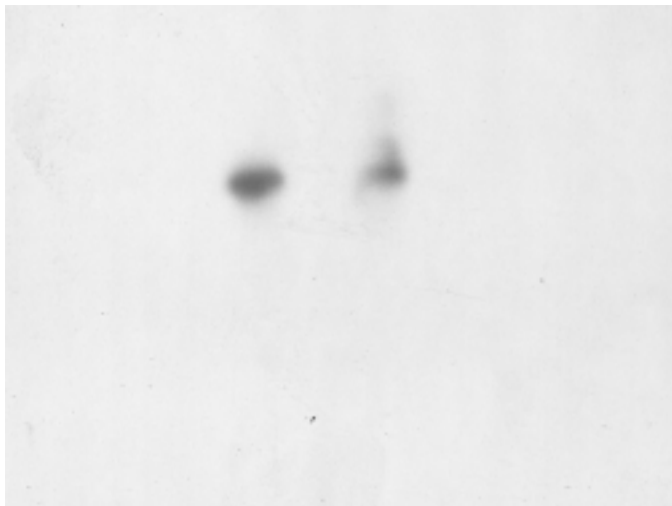
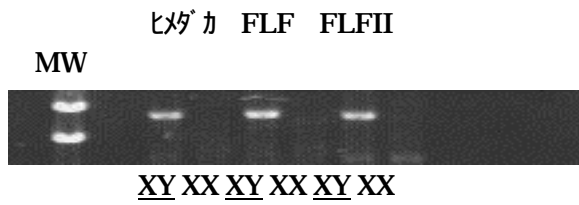


図3 FLFのDNAをプローブとしたヒメダカDNAのDMY遺伝子マーカのサザンブロット分析 (いずれもヒメダカDNA)



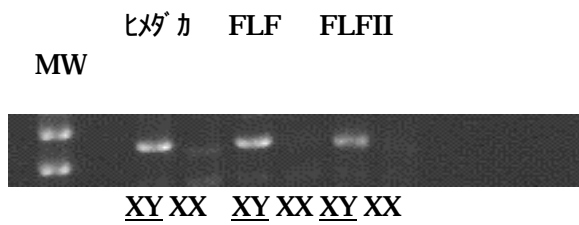
(別紙3)

図4 プライマーをPG17.19、PG17.20としたときのDMYによる性遺伝子型の判定



MW:分子量マーカー(上から 2.0kb、1.5kb)

図5 プライマーをPG17.A3、PG17.A4としたときのDMYによる性遺伝子型の判定



MW:分子量マーカー(上から 2.0kb、1.5kb)