

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510077

研究課題名(和文)カエル精巣卵形成に対する内分泌かく乱物質のエストロゲン作用とは異なる遺伝子発現

研究課題名(英文)Studies on genes relating to the formation of the testis-ovum in the testis of amphibians by the non-estrogenic action of environmental chemicals

研究代表者

高瀬 稔(Takase, Minoru)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80226779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：カエルにおける精巣卵(精巣の中にできる卵)の形成に対する環境化学物質影響について解析した。まず、精巣卵を誘導するための環境化学物質の曝露方法を検討し、精巣卵ができやすいモデルとなるカエルの選択を行った。そして、ツチガエルを実験モデルとしてビスフェノールAなどの環境化学物質の曝露により精巣卵が形成される過程を観察し、精巣卵形成に関連すると思われる遺伝子の探索を行ったところ、ビテロゲニンA1(卵黄タンパク質の一種)およびERRgamma(ビスフェノールAの受容体)の遺伝子が候補として考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, the formation of the testis-ovum has been investigated in amphibians exposed to environmental chemicals, such as bisphenol A (BPA), nonylphenol (NP), and estradiol benzoate (EB). Firstly, exposure experiments were performed using three species of amphibians. Abnormal testes were observed more remarkably in the tadpoles and metamorphosed froglets of the frog *Rana rugosa* than in those of the other species. Thus, *R. rugosa* was used as a model of an experimental animal in further experiments. Next, the testes were analyzed histologically in the tadpoles exposed to environmental chemicals to know the process of testis-ovum formation. Finally, genes expressed differentially in the tadpoles exposed to BPA were analyzed during the formation of the testis-ova. Genes encoding vitellogenin A1 and ERRgamma were isolated as candidates relating to the formation of testis-ova induced by the non-estrogenic action of the environmental chemical.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：精巣卵 両生類 性転換 性分化 生殖腺 ビスフェノールA ノニルフェノール

### 1. 研究開始当初の背景

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 幼生へのエストロゲン連続投与では雄から雌への性転換が誘導され、精巣卵形成が認められる。その特徴に着目し、アフリカツメガエル幼生を用いた内分泌かく乱物質影響の評価方法が報告されている (Kloas *et al.*, 1999)。そして、ビスフェノール A の連続投与によりエストロゲン投与と同様の作用が認められることから、ビスフェノール A の作用はエストロゲン様作用によると考えられている (Levy *et al.*, 2004)。

一方、日本における数種類の野外両生類では、精巣卵が報告されている (Iwasawa and Asai, 1964)。トノサマガエル (*Pelophylax nigromaculata*) では、精巣卵の消長が年周期を示すことから、精巣卵は生理的な現象であると考えられていた (Sato, 1971)。しかし、地方集団によりその精巣卵の出現率が異なる事から (高瀬, 未発表)、精巣卵形成が単なる生理的な現象とは異なることが考えられた。トノサマガエル成体へのエストロゲン投与実験 (Sato and Iwasawa, 1969) および精巣卵を持っている野生トノサマガエル成体の血中エストロゲン濃度測定 (環境省による平成 13, 14 年度環境実態調査報告書) の結果からは、精巣卵形成とエストロゲン作用との間に相関関係は認められなかった。そこで、予備実験として、トノサマガエルの幼生および変態後の未成熟個体にエストロゲンおよびノニルフェノール、ビスフェノール A を連続投与したところ、エストロゲン処理では観察されなかった精巣卵形成がノニルフェノールおよびビスフェノール A の処理では誘導されることが確かめられた (高瀬, 未発表)。従って、トノサマガエルにおける内分泌かく乱作用を持つ化学物質はエストロゲンとは異なる作用メカニズムにより精巣卵形成を誘導することが推察された。

### 2. 研究の目的

ノニルフェノールおよびビスフェノール A は主にそのエストロゲン様作用により内分泌かく乱作用を持つと考えられている。しかし、それらの内分泌かく乱物質による両生類の精巣卵形成に対する作用が、エストロゲン様の作用とは異なることを示す結果を得た。その作用メカニズムの解明に向けて、最初に、数種の両生類を用いて、その誘導作用に必要な濃度および処理期間を調べ、精巣卵形成が容易に誘導されるモデル両生類一種および精巣卵形成に有効な投与条件を決定する。次に、モデル両生類を用いて、精巣卵形成過程を組織学的に解析し、精巣卵形成過程において発現変化する遺伝子を解析することにより、精巣卵形成関連遺伝子の単離・同定を行った。また、野外で観察される精巣卵が遺伝的による可能性があるのかを調べるために、精巣卵が観察された個体の子孫における精巣卵の有

無を調べた。

### 3. 研究の方法

材料には、性ホルモン処理により雌雄どちらにも性転換し易いツチガエル (*Rana rugosa*) および機能的な雄への性転換が容易に誘導されるトノサマガエル、機能的な雌への性転換が容易に誘導されるネッタイツメガエル (*Silurana tropicalis*) の両生類 3 種を用いた。まず、それら 3 種の性分化後の幼生または変態完了個体に対して、ビスフェノール A (BPA) およびノニルフェノール (NP)、エストラジオールベンゾエイト (EB) を投与した。それぞれの投与物質を DMSO に溶解し、ストック液を作製した後に、終濃度が 1 または 10, 100 nM になるように飼育水に添加した。対照群には DMSO を処理した。曝露後に生殖腺を取り出し、ブアン液に固定した後にパラフィン薄切切片を作成し、ヘマトキシリン染色後、精巣卵の有無を光学顕微鏡により調べた。次に、生殖腺異常が顕著に観察された性分化後のステージ X ツチガエル幼生を用いて、BPA (終濃度 10 nM) を曝露し、投与後 15 および 30, 60 日目の個体から生殖腺を取り出し、精巣卵の有無を組織学的に解析した。また、BPA (終濃度 10 nM) の曝露後 60 日目の精巣を取り出し、RNA を抽出した。対照群では DMSO を処理した個体の精巣から RNA を抽出した。抽出したそれぞれの RNA から cDNA を合成した後に、24 種類のフォワードプライマーと 3 種類のリバースプライマーを用いた計 72 通りのプライマーペアを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離した。対照群と曝露群との間で異なる泳動パターンを示すバンドを回収し、TA クローニングベクターにサブクローニングした後にインサートの cDNA の塩基配列を解析した。得られた塩基配列のデータを BLAST 解析し、既知の遺伝子との相同性を調べた。さらに、ツチガエルから ERRgamma (ERRg) および 42Sp50 をコードする遺伝子を単離し、塩基配列を解析した。その塩基配列を基に設定したプライマーを用いてリアルタイム PCR 解析を行い、DMSO または BPA、EB 曝露後の ERRg および 42Sp50 の遺伝子発現を定量的に解析した。

精巣卵が遺伝するのか否かを調べるために、まず富山県の野外トノサマガエルを採集し、摘出した片側精巣をブアン固定した後に精巣卵の有無を組織学的に解析した。次に、精巣卵が観察された個体の残った片側精巣を用いて精子懸濁液を作成し、脳下垂体を腹腔内注射した雌から得られた未受精卵に対して人工媒精を行った。以後、得られた受精卵を発生させ、変態するまで飼育した後に精巣を取り出し、精巣卵の有無を組織学的に解析した。

#### 4. 研究成果

まず、性ホルモンによって誘導される性転換タイプが異なる 3 種の両生類を用いて、性分化完了幼生または変態完了個体に対する化学物質 3 種の曝露実験を行ったところ、ツチガエルおよびトノサマガエルに対して 10 nM 以上の BPA または NP を曝露すると精巣卵が形成されることを確かめた。特にツチガエルでは、精巣卵形成に加えて、生殖細胞の減少および精細管の形成不全、卵巣の発達抑制や退化がトノサマガエルに比べて顕著に観察された。一方、ネツタイツメガエルでは精巣卵が全く観察されなかった。従って、モデル両生類としてツチガエル性分化完了幼生（ステージ X）を以後の実験に用いた。精巣卵形成関連遺伝子の探索を行うために、まず精巣卵形成過程を組織学的に観察したところ、BPA の 30 日間曝露では精巣卵は観察されなかったが、60 日間曝露では精巣卵が形成されることを確かめた。そこで、BPA を 60 日間曝露した幼生の精巣において発現変化する 25 個の遺伝子を単離し、それらの塩基配列を解析した。その結果、ピテロゲニン A1 遺伝子配列と相同性を持つ遺伝子が含まれていることを確認した。ネツタイツメガエルを用いた研究から、ピテロゲニン B に比べてピテロゲニン A はエストロゲン応答性が低いことが確かめられている（高瀬，未発表）。従って、ツチガエルのピテロゲニン A1 遺伝子発現についてもエストロゲン応答性が低いことが予想され、エストロゲンとは異なる作用経路による BPA の精巣卵形成にピテロゲニン A1 が関与していることが期待される。また、ほ乳類では ERRg が BPA の受容体として知られており、ネツタイツメガエルでは 42Sp50 が女性ホルモンによる精巣卵形成関連遺伝子の候補として 2013 年に報告されている。そこで、ツチガエルの ERRg および 42Sp50 をコードする遺伝子を単離し、リアルタイム PCR 法による発現解析を行った。その結果、EB 曝露では遺伝子発現に変化が認められなかったが、BPA 曝露では ERRg 遺伝子発現が増加する傾向が見られた。一方、42Sp50 遺伝子発現はいずれの曝露によっても変化が見られなかった。従って、BPA は ERRg を介して精巣卵形成に作用している可能性が考えられた。

精巣卵を持つ親の子孫における精巣卵の有無を調べたところ、精巣卵は観察されなかった。従って、野外両生類個体に見られる精巣卵は、遺伝的な可能性よりは化学物質による影響がより強く反映されている可能性が考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者，研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Oka, T., Mitsui-Watanabe, N., Tatarazako, N., Onishi, Y., Katsu, Y., Miyagawa, S., Ogino, Y., Yatsu, R., Kohno, S., Takase, M., Kawashima, Y., Ohta, Y., Aoki, Y., Guillette, L. J. Jr., Iguchi, T. Establishment of transactivation assay systems using fish, amphibian, reptilian and human thyroid hormone receptors. *J. Appl. Toxicol.* 33, 991-1000, 2013. 査読有り。
2. Takase, M., Shinto H., Takao, Y., Iguchi, T. Accumulation and pharmacokinetics of estrogenic chemicals in the pre- and post-hatch embryos of the frog *Rana rugosa*. *In Vivo* 26, 913-920, 2012. 査読有り。
3. Nakajima, K., Nakajima, T., Takase, M., Yaoita, Y. Generation of albino *Xenopus tropicalis* using zinc-finger nuclease. *Dev. Growth Differ.* 54, 777-784, 2012. 査読有り。

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Takase, M. Sex reversibility in amphibian and its applications: sex-hormone-inducible sex reversal in *Rana rugosa*, sex determination in *Silurana tropicalis*, and model amphibians as environmental indicators. International Symposium Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing. Hiroshima, Japan, 27-28<sup>th</sup> March, 2014.
2. 小林 亨, 高瀬 稔, 熊倉雅彦, 山本 潤, 長坂洋光, 大西悠太, 井口泰泉 「トノサマガエルの生殖腺分化におけるエチニルエストラジオールの影響」 環境ホルモン学会, 2013 年 12 月 12 日, 東京
3. 高瀬 稔, 田澤一朗, 矢尾板芳郎, 井口泰泉 「甲状腺ホルモンにより誘導されるネツタイツメガエル甲状腺ホルモン受容体遺伝子発現に対する化学物質抑制作用の肝臓と尾における違い」 環境ホルモン学会, 2013 年 12 月 12 日, 東京
4. 高瀬 稔, 井口泰泉 「性分化後のツチガエルおよびトノサマガエルの生殖腺に対するノニルフェノールおよびビスフェノール A の影響」 環境ホルモン学会, 2012 年 12 月 19 日, 東京。
5. 高瀬 稔, 井口泰泉 「ツチガエル性転換過程における LMO2 および LMO4 の遺伝子発現」 日本分子生物学会, 2011 年 12 月 14 日, 横浜
6. 高瀬 稔 「ツチガエルの 2 集団間雑種へのアンドロゲン投与による性転換の誘導」 日本動物学会, 2011 年 9 月 21 日, 旭川

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高瀬 稔 (Takase Minoru)  
広島大学・理学研究科・准教授  
研究者番号：80226779

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：