

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04294

研究課題名(和文) 化学物質の有害性を予測する新規バイオマーカーの探索とその応用

研究課題名(英文) Gonadal soma-derived factor expression is a potential biomarker for predicting the effects of endocrine-disrupting chemicals on gonadal differentiation in medaka

研究代表者

堀江 好文 (Horie, Yoshifumi)

神戸大学・内海域環境教育研究センター・助教

研究者番号：60785137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では内分泌かく乱作用を示す化学物質を検出するための新規バイオマーカー遺伝子を調べた。その結果、女性ホルモン作用を示す化学物質をばく露した場合はXY個体のGsdF遺伝子の発現が抑制された。一方で、男性ホルモン作用を示す化学物質をばく露した場合はXX個体のGsdF遺伝子の発現が誘導された。性ホルモン作用を示さない内分泌かく乱化学物質や抗男性ホルモン作用を示す化学物質、一般化学物質をばく露した場合はXX個体、XY個体共にGsdF遺伝子の発現に変化は認められなかった。以上のことから、GsdF遺伝子は性ホルモン作用を示す内分泌かく乱化学物質の検出に有効な遺伝子マーカーであることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生態毒性試験を実施する際の「動物福祉」に関する問題が懸念されている。ヨーロッパでは、魚類の「胚期」は生物ではなく、胚期を用いた試験はin vitro試験として定義されており、最近の生態毒性試験では動物福祉の観点から、魚類の「胚期」のみを用いた試験が推奨されている。本研究結果によって、「胚期」のGsdF遺伝子を指標とすることで、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質を予測・検出できることがわかった。さらに、短期間で化学物質の特性(内分泌かく乱作用の有無)をスクリーニングできるため、今後の多種多様な新規化学物質のリスク管理にも対応できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Androgenic or estrogenic endocrine-disrupting chemicals induce intersex or sex reversal in various teleost fish. In the present study, we examined the potential of gsdF gene as a biomarker, various chemicals exposed to Japanese medaka. As a result, estrogenic activity EDCs exposure tended to suppress the gsdF expression in XY embryo. On the other hand, androgenic activity EDCs exposure induced increasing of gsdF expression in XX embryo. However, anti-androgenic EDCs or chemicals without endocrine disrupting exposure did not induce change of the gsdF expression in both XX and XY embryos. These suggests that the gsdF gene at the embryonic stage can be used as a useful biomarker for the predicting of the impact of, at least, androgenic or estrogenic EDCs on gonadal differentiation.

研究分野：生態毒性学

キーワード：メダカ gsdF スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の化学物質のリスク管理は、経済協力開発機構で国際的に同意された試験法 (OECD TG) などに基づいて行われている。しかし、新規化学物質の届出件数は年々増加しており (平成 26 年度の新規化学物質の届出件数は約 600 件 (経済産業省より))、従来の方法だけでは管理しきれないのが現状である。そこで、近年、化学物質の構造上の特徴や生物学的活性との相関関係を明らかにすることで、試験を実施せずに環境中、人健康、生態影響に関する毒性をコンピュータで予測する定量的構造活性相関 (QSAR) が注目されている。しかしこの手法では、化学物質の内分泌攪乱作用など、化学物質の生態 (特性) 影響を予測できても、化学物質のリスク管理に必要な不可欠な最小影響濃度 (LOEC) や無影響濃度 (NOEC) までを正確に予測することは難しい。そのため、今後の多種多様な新規化学物質を管理するためには、新規化学物質の特性を予測するだけでなく、生態影響に関わる LOEC や NOEC を正確に予測できる新たな手法を開発する必要がある。

## 2. 研究の目的

これまでに、分子生物学の観点から、「化学物質の内分泌攪乱作用が魚類に与える生物影響」に関する研究を実施してきた。その結果、内分泌攪乱作用のある化学物質が魚類に与える影響 (精巣卵や性転換の誘導) は、*Gsdf* という精巣分化決定遺伝子が鍵遺伝子であり、*Gsdf* 遺伝子は「胚期」からその発現が誘導されることを明らかにした (Horie et al, MCE, 2016)。そこで、本研究では、「胚期」の *Gsdf* 遺伝子を指標とすることで、化学物質の内分泌攪乱作用や最小影響濃度、無影響濃度を正確に予測できる新たな生態毒性試験法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) *Gsdf* 遺伝子が魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであるか? についての検討

本研究計画では、女性ホルモン作用を示す bisphenol A、4-nonylphenol、17beta-Estradiol、Ethinylestradiol、*p,p'*-DDE、4-*t*-Octylphenol、男性ホルモン作用を示す trenbolone、methyltestosterone、性ホルモン作用のない内分泌かく乱作用を示す Tributyltin chloride、Triphenyltin chloride、抗男性ホルモン作用を示す Fenitrothion、Flutamide、内分泌かく乱作用のない Amitrole、Endrin を用いた。孵化直前 (受精後 8 日目、Stage 38) に各濃度 20 個体ずつサンプリングし、PCR 法を用いた遺伝的雌雄の判別を行った。PCR に用いたプライマーは下記の通りである (*PG17.5* (5' -CCGGGTGCCCAAGTGCTCCCGCTG-3'), *PG17.6* (5' -GATCGTCCCTCCACAGACAAGAGA-3') )。次に、Total RNA 抽出・cDNA 合成後、リアルタイム定量 PCR 装置 (LightCycler® 96 システム、日本ジェネティクス株式会社) を用いて *Gsdf* 遺伝子の発現パターンの変動を明らかにした。リアルタイム定量 PCR に用いたプライマーは下記の通りである *gsdf* (Forward: GGCTGGGACAATTGGGTGATC)、(Reverse: TTTCATCCATGAAGACGATGG) ; *ef-1* (Forward: AGTACGCCTGGGTGTTGGAC)、(Reverse: AAACGGGCTGGCTGTAAG)。

(2) 生態毒性試験に用いる遺伝子組換えメダカの作出

上述した実験では、PCR 法を用いた遺伝的雌雄の判別を行った後、Total RNA 抽出・cDNA 合成後、リアルタイム定量 PCR 装置を用いて *Gsdf* 遺伝子の発現パターンの変動を明らかにする必要がある。特に、孵化直前の胚をサンプリングする場合、卵殻を破る作業に非常に時間と労力が掛かる。そこで、遺伝子型の性 (XX/XY) を赤色蛍光タンパク質 (RFP) の有無によって判別できる Y<sup>RFP</sup> 系統を作出する。CRISPR/Cas9 を用いた相同組み換え非依存的なノックイン法により、メダカの Y 染色体特異的遺伝子 (*Dmrt3p*) に *crystallin-mCherry* カセットを挿入した。ノックインメダカを作製する際には、*Dmrt3p* を標的とする sgRNA1 と、ドナープラスミドを標的とする sgRNA2、*crystallin-mCherry* ドナープラスミド DNA、Cas9 mRNA を受精卵に注入した。

(3) 作出した遺伝子組換えメダカの有用性の確認

遺伝子組換え生物を生態毒性試験に用いる場合、遺伝子操作が行われていることから、「遺伝子組換えによる生物学的影響は認められないか?」、「正確にリスク評価が行えるのか?」などの疑問が生じる。そこで作出した遺伝子組換えメダカの有用性を確認するため、bisphenol A と trenbolone を用いて *Gsdf* 遺伝子の発現パターンの変動が (1) の場合と同じか確認した。

(4) 実際の環境水中に含まれる内分泌攪乱作用を示す化学物質のスクリーニング

本研究計画では兵庫県明石川と福岡県西郷川の河川水を使用した。また、環境水中に bisphenol A と trenbolone を加えて *Gsdf* 遺伝子の発現が変化することを確認することで作出した遺伝子組換えメダカの有用性を最終確認した。

#### 4. 研究成果

(1) *Gsdf* 遺伝子が魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーである

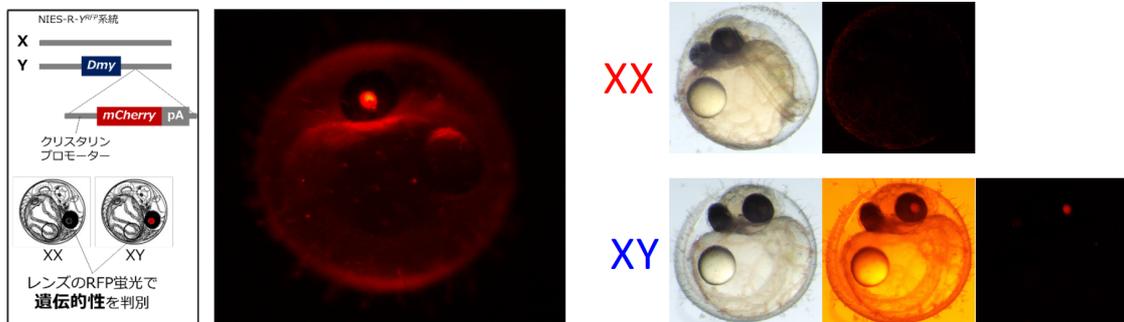
女性ホルモン作用を示す化学物質をばく露した場合は XY 個体の *Gsdf* 遺伝子の発現が抑制された。一方で、男性ホルモン作用を示す化学物質をばく露した場合は XX 個体の *Gsdf* 遺伝子の発現が誘導された。性ホルモン作用を示さない内分泌かく乱化学物質や抗男性ホルモン作用を示す化学物質、一般化学物質をばく露した場合は XX 個体、XY 個体共に *Gsdf* 遺伝子の発現に変化は認められなかった。

以上のことから、*Gsdf* 遺伝子は性ホルモン作用を示す内分泌かく乱化学物質の検出に有効な遺伝子マーカーであることが考えられた。

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

(2) 生態毒性試験に用いる遺伝子組換えメダカの作出

レンズにおける RFP 蛍光が確認された注入胚 (G0) を育成し、次世代 (G1) を得た。次に、RFP 蛍光が確認された G1 ペアから G2 世代を得ることで、レンズにおける RFP 蛍光があるものを XY 個体、ないものを XX 個体と簡便に判別できる系統が作出できた。



(3) 作出した遺伝子組換えメダカの有用性の確認

作出した遺伝子組換えメダカに bisphenol A と trenbolone をばく露して、孵化直前 (受精後 8 日目、Stage 38) の胚から Total RNA 抽出・cDNA 合成後、リアルタイム定量 PCR 装置を用いて *Gsdf* 遺伝子の発現パターンの変動を調べた結果、bisphenol A をばく露した場合は XY 個体の *Gsdf* 遺伝子の発現が抑制された。一方で、trenbolone をばく露した場合は XX 個体の *Gsdf* 遺伝子の発現が誘導された。以上のことから、作出した遺伝子組換えメダカは生態毒性試験に使用できることを確認できた。

(4) 実際の環境水中に含まれる内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング

兵庫県明石川と福岡県西郷川からは、内分泌かく乱作用を示す化学物質を検出できなかった。しかし、bisphenol A と trenbolone を加えた環境水では *Gsdf* 遺伝子の発現が有意に変化することを確認できた。

以上の本研究結果から、*Gsdf* 遺伝子を指標とすることで、化学物質の内分泌かく乱作用や最小影響濃度、無影響濃度を正確に予測できる新たな生態毒性試験法を開発できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horie Yoshifumi、Kanazawa Nobuhiko、Takahashi Chiho、Tatarazako Norihisa、Iguchi Taisen	4. 巻 41
2. 論文標題 Exposure to 4-nonylphenol induces a shift in the gene expression of and testis ova formation and sex reversal in Japanese medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 399 ~ 409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jat.4051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horie Yoshifumi、Chiba Takashi、Takahashi Chiho、Tatarazako Norihisa、Iguchi Taisen	4. 巻 242
2. 論文標題 Influence of triphenyltin on morphologic abnormalities and the thyroid hormone system in early-stage zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology	6. 最初と最後の頁 108948 ~ 108948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpc.2020.108948	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horie Yoshifumi、Yonekura Kei、Suzuki Ayaka、Takahashi Chiho	4. 巻 230
2. 論文標題 Zinc chloride influences embryonic development, growth, and Gh/Igf-1 gene expression during the early life stage in zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology	6. 最初と最後の頁 108684 ~ 108684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpc.2019.108684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horie Yoshifumi、Kanazawa Nobuhiko、Takahashi Chiho、Tatarazako Norihisa、Iguchi Taisen	4. 巻 -
2. 論文標題 Bisphenol A induces a shift in sex differentiation gene expression with testis ova or sex reversal in Japanese medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jat.3945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horie Yoshifumi、Kanazawa Nobuhiro、Takahashi Chiho、Tatarazako Norihisa、Iguchi Taisen	4. 巻 -
2. 論文標題 <i>Gsd</i> expression may be useful to predict EDC effects	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Environmental Toxicology and Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/etc.5353	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horie Yoshifumi、Nomura Miho、Okamoto Konori、Takahashi Chiho、Sato Tomomi、Miyagawa Shinichi、Okamura Hideo、Iguchi Taisen	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of thyroid hormone disrupting chemicals on swim bladder inflation and thyroid hormone related gene expression in Japanese medaka and zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jat.4302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horie Yoshifumi、Takahashi Chiho	4. 巻 30
2. 論文標題 Influence of salinity on physiological development and zinc toxicity in the marine medaka <i>Oryzias melastigma</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ecotoxicology	6. 最初と最後の頁 1138 ~ 1149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10646-021-02429-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山岸 隆博  (Yamagishi Takahiro)  (30379333)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康領域・主任研究員    (82101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鐘迫 典久 (Tatarazako Norihisa)  (40370267)	愛媛大学・農学研究科・教授  (16301)	
研究分担者	竹花 佑介 (Takehana Yusuke)  (60432093)	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授  (34204)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関