

Influence of Exogenous Steroids on Reproductive Phenomena in the Self-fertilizing Mangrove Killifish, *Kryptolebias marmoratus*

(自家受精魚マングローブキリフィッシュの生殖現象に及ぼす外因性ステロイドの影響解明)

長崎大学大学院生産科学研究科
朴 昶範

マングローブキリフィッシュは脊椎動物唯一の自家受精魚であり、機能的な卵巣と精巣を同時に発達させる。この特徴は性ホルモン作用を有する外因性化学物質（環境ホルモン）の精巣および卵巣への影響を同時に観察するのに適している。また同一生殖腺における雌性ホルモンおよび雄性ホルモンの感受機構を探る上でも有効な特徴である。さらに本種では様々な生殖関連遺伝子（生殖腺刺激ホルモン、雌性ホルモンレセプター、雄性ホルモンレセプター、卵黄タンパク質前駆物質など）の情報が既に得られている。このような性的に特徴ある魚類を用いることによって、これまで局所的・断片的にしか捉えることのできなかった魚類生殖現象に及ぼす環境ホルモンの影響を雌性ホルモン及び雄性ホルモンの両側面から同時に把握することが可能である。

本研究では、マングローブキリフィッシュを魚類生殖現象に及ぼす環境ホルモンの影響とその作用機序を解明するモデル生物として確立するために、本種の生殖腺発達過程を生理学的・内分泌学的・分子生物学的に明らかにすることを目的として、以下の実験を行った。まず、水温・光周期・塩分を人為的に調節した環境下でマングローブキリフィッシュを飼育し、卵巣および精巣発達の過程を組織学的に観察するとともに、自家受精能力の確認とステロイドホルモンの分析を行った。また、環境ホルモンは魚類によって雌性化および雄性化効果を持つことから、本種における各種環境ホルモンの影響を正確に判断するために、様々な濃度の雌性ホルモンのエストラジオール 17 β (E2) と雄性ホルモンのメチルテストステロン (MT) を投与して、生殖腺発達に及ぼす両ホルモンの影響を組織学的に観察するとともに、これらの魚を用いて生殖腺の成熟にかかわる遺伝子 [生殖腺刺激ホルモン (LH β , FSH β , GPH α)、ステロイドレセプター (ER α , ER β および AR)、ステロイド代謝酵素 aromatase、卵黄タンパク質前駆物質 (VTG)] の mRNA 発現を測定した。また、性ステロイドの度の測定を行った。

生殖腺発達と繁殖に及ぼす環境要因（水温・光周期・塩分）の影響（第1章）

各種環境要因の影響を明らかにするために、日長 10, 12, 14L、水温 18, 25, 30 $^{\circ}$ C、塩分 12, 17, 22ppt の組み合わせにより実験を行った。その結果、低水温では生殖腺発達の阻害が、また、高塩分では精巣発達促進が起こった。高水温では精巣発達、血中 E2 の増加、自家受精率の減少が起こった。14L の高塩分条件では奇形個体や雄の誘発が認められた。この結果より、水温は本種の生殖腺発達に関与するとともに自家受精に影響し、長日と高塩分は精巣発達促進および雄を誘導することがわかった。

生殖腺発達に及ぼす各種環境ホルモンの影響

■ 雌性ホルモンの E2 投与実験 1（第2章）

本種に低濃度 (1 μ g) と高濃度 (100 μ g) の E2 を注射により 1 回投与して、生殖現象

と繁殖力を観察した。その結果、E2 低濃度区では7日目にER α mRNAの発現量が増加したが、E2 高濃度区では処理後の時間経過とともにGSIの減少、成熟卵母細胞の減少、抱卵数の減少が確認された。また、E2投与魚の血中テストステロン(T)濃度は30日目に対照区と比べて減少し、E2高濃度投与によって、30日目にVTG mRNAの発現量の減少が確認された。以上の結果より、投与したE2は2種類の反応を示すこと、投与直後に急速な反応を示した後、時間経過とともにそれは緩やかになることが分かった。

■ 雌性ホルモンのE2投与実験2(第3章)

雌性ホルモンのE2をマングローブキリフィッシュに様々な濃度(0.1, 1, 5, 10, 50, 100 μ g)で1回注射した。投与後、10, 20 および40日目に肝臓、生殖腺、脳を摘出し、total RNAの抽出を行った。その後、リアルタイムPCR法を用いて、VTG mRNA およびエストロゲンレセプター(ER) α , β とアンドロゲンレセプター(AR)の発現量をそれぞれ測定した。その結果、E2高濃度区(50, 100 μ g)では投与後40日目に肝臓でVTG mRNAの減少が示した。投与後10日目には全てE2処理区の生殖腺でER α , β mRNAの発現量が減少したが、ARの発現量は変化しなかった。また、脳では10日目にE2の1 μ gでER α , β mRNAの発現量が増加、10日目に10 μ g以上E2処理でER α mRNAの発現量が減少したが、ER β mRNAの発現量は変化しなかった。そのことから、本種に投与したE2は、VTG mRNAの合成やERの発現を阻害することが分かった。また、投与したE2は分子生物学的にも2種類の反応を示すことが分かった。

■ 合成雄性ホルモンMT投与実験(第4章)

雄性ホルモンのMTをマングローブキリフィッシュに様々な濃度(0.1, 1, 5, 10, 50, 100 μ g)で1回投与して、投与後、7, 15 および30日目に生殖現象に及ぼす影響を観察した。その結果、生殖腺刺激ホルモン(LH β)の分泌の減少とともにGSI減少、成熟な卵母細胞発達の阻害が示された。また、全てMT処理区の肝臓でVTG mRNAの減少し、投与後7日目には肝臓でER α mRNAの発現量が減少したが、30日目にER α mRNAとER β mRNAの発現量は変化しなかった。しかし、7日目にMT高濃度区でER α mRNA発現量は増加あるいは毒性効果が示したが、30日目にMT高濃度区でER β mRNA発現量は減少した。ところが、ARの発現量は実験中変化しなかった。したがって、マングローブキリフィッシュに投与したMTは視床下部～下垂体～生殖腺系を中心とした内分泌系に影響を及ぼし、肝臓でVTG mRNAの合成を阻害することが分かった。また、MTは2種類の反応でERの発現を攪乱する可能性があることが分かった。

本研究により魚類の繁殖に及ぼす環境およびホルモンの影響について重要な情報を得た。特に、雌性ホルモンおよび雄性ホルモンが、肝臓における生殖関連遺伝子の発現に強く影響を与えることが示された。本研究におけるもう一つの特徴は、機能的両性を有するマングローブキリフィッシュをモデルとしたことにあるが、これによって、卵巣及び精巣発達に及ぼす環境ホルモンの影響を同時に解析するための基礎情報が得られたことは意義深い。さらに、本種の生殖腺発達に影響を及ぼす環境要因の役割についても情報が得られたことは、環境ホルモン研究のみならず、魚類の繁殖機構を解明するための貴重な知見となる。