

ミニレビュー

メダカの性的可塑性と環境中での内分泌かく乱現象の評価[#]

濱 口 哲*

新潟大学自然科学系環境共生科学系列

(平成 18 年 8 月 20 日受理)

Keywords: sex determination, endocrine disruptor, wild life, medaka.

はじめに

内分泌かく乱現象は、もともと野生生物に認められたさまざまな異常現象に端を発している。魚類に認められた精巣卵、は虫類や鳥類、軟体動物の外部生殖器や生殖にかかわる異常な諸現象や、精子数の減少をはじめとするヒトにかかわる問題などの原因として、環境中に放出された弱いホルモン活性を有する化学物質との関連が議論され、そこから、化学物質一般の微弱なホルモン活性を検定する問題に発展したものである。

筆者はメダカを研究対象として生殖細胞の形成と性分化の研究に携わってきた。メダカでは 20 世紀前半から性に関するさまざまな知見が得られており、その中には性決定様式、受精機構、精巣卵形成（生殖細胞の性分化制御機構）、ホルモン投与による性転換などの研究が含まれている。また、安価で多数個体を維持管理できること、また内温性動物であるほ乳類とは異なり、体温が環境温度に依存して変化する外温性動物であることなどの理由から、メダカを用いた（環境）毒性学的研究も 1970 年代より行われてきており、内分泌かく乱物質の生物検定用実験動物としても、その手法開発が積極的に進められてきたことはご承知のとおりである。

われわれの研究グループでは 2002 年にメダカの性決定遺伝子 *DMY* の同定に成功した。*DMY* は脊椎動物で 2 番目に同定された性決定遺伝子であり、*DMY* の発見は、下等脊椎動物に見られる多様な性決定様式を活用して、脊椎動物共通の性決定・分化機構を研究するうえで重要な画期となった。さらに、そうした観点に加えて、*DMY* を指標とすることにより、メダカの遺伝的な性を正確に把握することが可能になったことも重要であった。われわれは、後述するよ

うに、*DMY* を用いて野生メダカや種々開発されている実験用系統のメダカについて検討した結果、メダカの性はかなりの後天的および遺伝的性的“可塑性”を有していることを知った。この事実は、内分泌かく乱物質の生物検定を行う際に十分考慮に入れるべきことであると同時に、そもそも、野生状態におけるいろいろな“異常”の評価についてもさまざまな課題を投げかける情報となりえる。

ここでは、そもそもメダカがどのような生き物であるかについての概説からはじめ、メダカに認められる性的可塑性について述べ、さらに野生メダカに関してこれまでに得られている知見について解説する。

1. 実験動物としてのメダカ

メダカはヒトと同じ脊索動物門に属し、硬骨魚類、サンマやトビウオと同じダツ目に分類される。メダカの仲間の魚（メダカ属魚類）は東南アジアに 20 種が生息するが、メダカ以外はすべて熱帯域に生息しており、低温に耐えることはできない。メダカはメダカ属魚類で唯一低温耐性を獲得して温帯域に分布を広げた種であり、もともと温帯域で進化した魚種とは生殖特性など、やや性質が異なる部分がある。このことは、野生メダカの生活史などを考えるとき、留意すべきことなのかも知れない。

メダカの種分化については分子系統学的手法で詳細な研究が行われており、種間の系統関係はおおよそ明らかにされている。さらに、中国大陸、朝鮮半島、青森以南の日本列島に分布するメダカは、南日本集団、北日本集団、東韓国集団、中国・西韓国集団の 4 つの集団に分けられる。集団間の遺伝距離は比較的大きく、ほ乳類では種間の関係に相当するほどの遺伝的多型性が認められる。集団を異にする個体間でも十分な妊性をもった子孫が得られることから、この集団間の多型性を活用して、メダカの諸形質についての遺伝学的解析が可能である。また、同時に、いろいろな事象について、メダカ内には大きな集団差、個体差が内包されている可能性があることにも重要な意味がある。

[#] 第 31 回大会シンポジウム講演者による解説。

* 〒950-2181 新潟県新潟市五十嵐二の町 8050

E-mail: shamaguc@env.sc.niigata-u.ac.jp

© Pesticide Science Society of Japan

実験動物という観点でメダカを見ると、まず、小型で多数個体を低コストで扱うことができ、世代時間が比較的に短いことから遺伝学的解析を容易に行えることが一つの特徴である。また、卵生で、初期からの全個体発生過程について観察・実験が可能であることも挙げられるべきことである。さらに、1970年代以降、各集団に由来する近交系の整備が進められた結果、遺伝的内容を異にする複数の近交系を使うことが可能になったこと、さらに近年ゲノム情報の整備が進み、塩基配列レベルで比較ゲノム学的解析が有効な手段となりつつあること、また、自然由来の突然変異系統に加え、近年人為的に誘発された突然変異系統が蓄積されつつあり、それらを用いてゲノム情報を背景として各遺伝子の機能解析ができることも現代の実験動物としては重要であろう。さらに、わが国で行う実験という観点でいうと、上記の実験動物として整備された基盤上で、近縁種を含めた野生個体を実験に供することができることは、メダカを使った研究の見落とすことのできない利点である。

2. メダカの性に関する研究

メダカを用いた研究はメダカの体色の遺伝様式の研究に始まる。會田竜雄は1921年に江戸時代に愛玩用に開発されたヒメダカとシロメダカを用い、シロメダカ雌とヒメダカ雄のF1はヒメダカになり、そのF1雄をシロメダカ雌に戻し交配して得られる子供は緋色と白が1:1で、緋色はすべて雄、白はすべて雌であるという結果を得た。この結果から、黄色素胞の色を制御する遺伝子 R が性染色体上にあり、メダカの性決定様式はXX-XYであることを報告した¹⁾。この雄緋色、雌白の系統は、体色という極めて判りやすい表現型から性染色体型が推定できることから、その後のメダカの性にかかわる研究で頻用されることになったが、同時に R 遺伝子は極めて強く性決定遺伝子と連鎖していたことから、性決定遺伝子探索上極めて重要な位置マーカーとなった。なお、ヒメダカを緋色にしている黒色素胞の機能を制御する B 遺伝子は2001年に同定されているが²⁾、 R 遺伝子の実体は今なお明らかではない。

1940年代から50年代にかけて、性ステロイドをメダカの成魚、および稚魚に投与する実験が繰り返し行われた。一つは当時は直接計測する方法がなかった性ステロイドをメダカの第2次性徴を用いて“定量”する手法開発という目的で、もう一つは性分化機構への興味からであった。

メダカにエストロゲンを投与すると精巢中に卵母細胞様の細胞（精巢卵）が出現することが認められた。本来精母細胞に分化する精原細胞が卵母細胞様の細胞に分化する系は、生殖細胞の性分化の制御機構研究のモデルシステムと考えられたことから、江上信雄は性ステロイドによる精巢卵誘導について詳細な研究を行うとともに、性ステロイド以外の因子によっても精巢卵誘導が起こることを示してい

る³⁾。

また、山本時男は雌白-雄緋色のメダカ系統（d-rR系統）の稚魚にエストロゲンを投与することにより、機能的な緋（XY）雌を誘導できることを明らかにし、その後、同様にアンドロゲンを投与することにより機能的な白（XX）雄を作出することにも成功した。これにより、メダカのX染色体とY染色体は、雄を決める遺伝子を除くとほぼ同等の機能をもっていること、そして性ステロイドが生殖巣の性分化（ひいては個体の性分化）過程で重要な機能を果たしているに違いないことを主張した⁴⁾。この研究により、XX、XYの雌雄両者を得る方法、さらに交配と性転換によりYYの雌雄を得る方法が示されたことは、その後の性にかかわる基礎研究のみならず、水産分野への応用の観点からも重要であった。

なお、上記の第2次性徴、精巢卵、性転換にかかわる研究は、内分泌かく乱現象の研究分野においてメダカを使用するための基礎となっている。第2次性徴発現にかかわるステロイドの力価の研究は、指標が血中ビテログニン濃度に変わったものの考え方としては同様であり、また、エストロゲンによる精巢卵誘導についても同様である。「精巢卵」という表記は、卵と卵母細胞を区分しない、厳密さを欠く表現であり、1970年代から1980年代にかけてはやや控えめに使用されていた用語であったにもかかわらず、内分泌かく乱研究の中で再び息を吹き返した感があるのは、いささか皮肉な感想を否めない。

3. メダカの性決定遺伝子の探索

われわれは1990年代後半からメダカの性決定遺伝子を探索する研究に着手した。その方略は、メダカの性染色体を同定し、染色体上の性決定遺伝子の位置をできるだけ詳細に決定し、その領域のDNAの塩基配列を調べ、遺伝子を同定するという、典型的なポジショナルクローニングであった。その場合、メダカのX染色体とY染色体が性決定遺伝子の存否以外はほぼ同じであるということは、大きな障害であった。そこで、南日本集団由来の近交系（Hd-rR系統）と北日本集団由来の近交系（HNI系統）の間で交配を行い、HNI系統のY染色体をもったHd-rR-Y^{HNI}系統（Yコンジュニック系統）を作出した。先に述べたようにメダカの4集団間には、大きな遺伝距離が存在することから、この系統のY染色体とX染色体上の遺伝子間には遺伝的多型があり、それを手がかりに詳細な染色体地図を作製することができることになった。われわれは雄になるという表現型と R 遺伝子を手がかりに、性染色体に連載しているマーカーの同定を進めた。その結果、1998年には初めてメダカの性染色体を顕微鏡下で見ることに成功⁵⁾、2002年にメダカの性決定遺伝子 DMY を同定した⁶⁾。

DMY は極めて興味深い遺伝子であった。ショウジョウバ

エの性決定関連遺伝子 *doublesex* と線虫の性決定関連遺伝子 *mab3* はともに転写因子であり、両者は共通の DNA 結合ドメイン (DM ドメイン) をもつ。DM ドメインをもつ転写因子は脊椎動物にも存在し、DMRT 遺伝子と総称されているが、そのうちの *DMRT1* は脊椎動物でかなり共通に精巢分化の過程で発現するものであることが知られていた。分子系統解析が行われ、*DMY* は *DMRT1* が遺伝子重複し、その 1 コピーが別の染色体に飛び込んで、そこで性決定という新たな機能を獲得したものであることが判明した。

DMY の分子系統学的研究はもう一つ極めて興味深い事実も示した。それは *DMY* の起源は極めて新しいという事実である。メダカには 20 種の姉妹種があることは先に述べたが、*DMRT1* の重複が起こったのはメダカに一番近縁の姉妹種であるハイナンメダカとメダカの共通祖先がタイ東北部に生息するメコンメダカと種分化した後であることが示された。つまり、20 種のメダカ属魚類のうち *DMY* を性決定遺伝子としているのは 2 種だけでそれ以外の 18 種は別の遺伝子を性決定遺伝子として使っていることになる。われわれはメダカ近縁種の性決定遺伝子探索を進めているが、これまでに性染色体が同定されたメダカ属魚類はすべて互いに異なる遺伝子を性決定遺伝子としてしていると推測されている。つまり、メダカ属魚類を見る限り、性決定という種の維持に致命的重要性のある事象について、その遺伝的制御機構は極めて可塑的であることが示されていることになる。われわれは、このことは性決定/性分化機構を考えるうえで極めて重要なことであると思っている。

4. メダカの性的可塑性

メダカの性研究はそれまで体色による遺伝的性の識別ができる系統を使って進められてきていたが、*DMY* の発見によって、個体の遺伝的性を系統によらず、また、体色が識別可能になる以前の稚魚、および胚についても調べることが可能になった。そこで、われわれはメダカ卵を性ステロイドを含む溶液に浸けることによる性転換実験を、いくつかのメダカ近交系を用いて行った。その結果、系統により性転換率に顕著な差が存在することが判明した。例えば、エストラジオール溶液に浸けた場合、Hd-rR 系統では極めて容易に XY 雌が得られるが、HNI 系統の性転換率は低率に留まることが判った。また、山本時男はアンドロゲンによる雄化は極めてデリケートで、極めて限られた濃度においてのみ XX 雄が得られると報告しているが、山本が使用した d-rR 系統に由来する Hd-rR 系統は確かに雄方向への性転換はしにくい、HNI 系統では極めて容易に性転換することも判明した。さらに、東韓国集団由来の SOK 系統は Hd-rR 系統よりさらに雄性化が困難で、XX 雄がほとんど得られないことも判った。メダカ近縁種における性ステロイドによる性転換感受性も種により著しく異なるという知見

も得られている⁷⁾。

メダカの胚時期での高温処理によって、XX 雄、XY 雌が得られるという予備的な報告があったが、われわれは胚期の高温処理によっても雌から雄への性転換が誘導されることを確認した⁸⁾。しかし、われわれの結果では、XY 雌は出現せず、また、性転換率は系統により著しく異なっていた。

これらのことはいくつかの点で示唆的である。一つは、従来われわれがもっていたメダカ性転換のイメージは d-rR 系統という特定系統によるものであり、メダカ一般に敷衍することはできないものであることが明らかになったことである。d-rR 系統もクロズドコロニー系統であり、ある程度遺伝的背景の斉一化が進んでいるが、一般のヒメダカは極めて多型的であり、野生メダカはさらにということになる。したがって、性転換感受性が近交系間で大きく異なることは、メダカの種内には性転換能にかかわる多様な遺伝子が存在しており、その組み合わせにより個体の感受性にはいろいろなものがあることを意味する。したがって、再現性のある結果を得るためには、近交系のような遺伝的背景が均一なものを使う必要がある反面、それらで得られた結果を野生メダカに当てはめる際には極めて慎重な配慮が必要ということになる。

5. 野生生物モニタリング

メダカの性決定遺伝子 *DMY* の同定に成功したときに、われわれは野生メダカにおける *DMY* の存在と性の関係を検討することを計画した。そこにはいくつかの目的が考えられた。性転換実験の結果を考えると、メダカの性は極めて微妙で雌雄の遺伝的違いは極めて小さいこと、そして、最終的には雄、あるいは雌になり決して中途半端な雌雄同体個体にはならないことから、自然界には性分化関連遺伝子の突然変異による機能的な性転換個体が生息することが予想された。そこで、*DMY* の存否を指標として自然集団中の性転換個体を集め解析することで *DMY* 以外の性決定関連遺伝子に関する情報を得ることが一つの目的となった。二つめの目的は、メダカ種内の大きな多型性から、自然集団で *DMY* とは別の性決定遺伝子を採用している集団がある可能性が考えられ、その点について検証する必要であった。第三としては、性転換を指標とした内分泌かく乱物質の野生生物への影響評価の基礎的な手法を確立することであった。

野生メダカを採集し、そのヒレの一部から得られる DNA を調べ、*DMY* があるかないかを検討して、その個体の遺伝的性を決定した。それをその個体の表現型としての性と比較することにより、*DMY* の存否と雌雄性の関係を調べた。この方法では、仮に遺伝的性と表現型が不一致な個体を得られれば、その個体を交配して遺伝解析を行うことが可能である。

これまでに 72 地点 5517 個体の野生メダカ、加えて新潟

大学で系統保存されてきた日本各地の野生メダカ 84 系統 1156 個体, 合計 6673 個体について調べた結果, XY 雌 17 地点 100 個体と XX 雄 15 地点 25 個体を得た⁹⁾. この結果は, 自然界には機能的な性転換個体が 1~3% 程度存在していることを示した. それら性転換個体は多くの場所では散発的に認められており, 1 カ所で多数個体が見いだされていないことから, それらの性転換個体は内分泌かく乱物質によるとは考えにくいことも推測された. また, 少なくともこれまで調べた野生集団はすべて *DMY* を性決定遺伝子として採用していること, つまり, 集団単位で *DMY* 以外の遺伝子を性決定遺伝子としているものは現時点では見いだされなかった.

性転換個体については順次遺伝解析を行っている. XY* 雌については通常の XY 雄と交配し, 得られた XY* 個体の性を検討した. その結果, これまでに遺伝解析を行った十数地点の XY* 雌の子孫から XY* 雌が得られており, それら XY* 雌はすべて *DMY* にかかわる遺伝的要因による性転換であると推定できた. ただし, F1 で得られるすべての XY* 個体すべてが雌になる場合と, 雌雄両者が出現する場合があります. 遺伝子解析の結果, 前者の多くは *DMY* 遺伝子の欠失によるフレームシフト型突然変異によること, 一方, 後者は *DMY* のエキソ部分に正常で, 発現量の低下が認められることがわかり, 雄分化には一定量以上の *DMY* の発現が必要であることが推定された¹⁰⁾. なお, 雌雄両方の個体が見られるものの一部では常染色体上の遺伝子が当該個体が雄になるか雌になるかに関与している可能性も明らかになり, その遺伝子の所在を現在検討している.

一方, XX 雄については解析が進んでいるのは一部の個体に限られるが, 正常 XX 雌との交配で得られる個体はすべて雌になること, その F1 個体をもとの XX 雄と交配すると XX 雄が出現する結果が得られ, この XX 雄出現は遺伝的要因によることが明らかになっている. 新潟市白根で得られた XX 雄についてはその原因遺伝子がメダカの 8 番染色体の特定領域に存在することが判明しつつある.

以上より, メダカは先に述べた後天的な性的可塑性に加えて, 野生メダカ集団内には 1% 程度の性転換個体を生じようとする遺伝的多型性が保持されていることが明らかになった.

お わ り に

内分泌かく乱の現象は野生生物の異常に始まる. その意味で, 野生生物における異常現象を把握することは極めて重要であるに違いない. しかし, 過去, 日本の野生生物の確かな異常現象の報告は極めて少ない. その結果として, 内分泌かく乱現象の研究が, そもそもの現象なしの「評価手法」開発を目的とした研究中心になったきらいがある.

日本の野生生物にかかわる報告が少ない原因の一つは, “ヒト以外の” 野生生物を対象とした研究が少ないことがある. 今日, 多くの研究はモデル生物を使ったものである. 往々にしてその結果はその生物一般に適用可能だという暗黙の前提で行われ, そのため, 実験精度が期待できない野生生物に目を向けることが少なくなりつつあることは否定できない.

今回の野生メダカの例は, 生き物はその種内にいろいろな多型性を保持しているという, 極めて当然なことを教えている. つまり, ゲノムをはじめとするモデル生物の生物現象についての知見を野生の生き物で検証していくこと, 逆の言い方をすると, 一定以上の精度で野生生物の観察を行っていくことの重要性を教えてくれているように思う.

典型的な「正常」状態から逸脱した現象すべてが異常ではない. ある生物種が内包している多型性を十分考慮して, 異常現象を評価できるだけの野生生物に関するいろいろなレベルでの情報の蓄積が必要であろう.

引 用 文 献

- 1) T. Aida: *Genetics* **6**, 554–573 (1921).
- 2) S. Fukamachi, A. Shimada and A. Shima: *Nat. Genet.* **28**, 381–385 (2001).
- 3) N. Egami: *Japan. J. Zool.* **11**, 353–365 (1955).
- 4) T. Yamamoto: “Fish Physiology,” Vol. 3, ed. by W. S. Hoar and D. J. Randall, Academic Press, New York and London, pp. 117–175, 1969.
- 5) M. Matsuda, C. Matsuda, S. Hamaguchi and M. Sakaizumi: *Cytogenet. Cell Genet.* **82**, 257–262 (1998).
- 6) M. Matsuda, Y. Nagahama, A. Shinomiya, T. Sato, C. Matsuda, T. Kobayashi, C. Morrey, N. Shibata, S. Asakawa, N. Shimizu, H. Hori, S. Hamaguchi and M. Sakaizumi: *Nature* **417**, 559–563 (2002).
- 7) S. Hamaguchi, Y. Toyazaki, A. Shinomiya and M. Sakaizumi: *Zool. Sci.* **21**, 1015–1018 (2004).
- 8) T. Sato, T. Endo, K. Yamahira, S. Hamaguchi and M. Sakaizumi: *Zool. Sci.* **22**, 985–988 (2005).
- 9) A. Shinomiya, H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi and M. Sakaizumi: *Zool. Sci.* **21**, 613–619 (2004).
- 10) H. Otake, A. Shinomiya, M. Matsuda, S. Hamaguchi and M. Sakaizumi: *Genetics* **175**, 1–8 (2006).

略 歴

氏名: 濱口 哲 (はまぐちさとし)

生年月日: 1951 年 1 月 24 日

最終学歴: 1979 年 3 月 東京大学大学院理学系研究科博士課程修了 (理学博士)

テ ー マ: メダカ生殖細胞の起源と性分化

趣 味: 物見遊山の旅