

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	倉内 幹太
論文題目	Development of simple and continuous detection methods for estrogen-like substances using transgenic medaka (遺伝子導入メダカを用いた簡便・連続的なエストロゲン様物質の検出方法の開発)		
(論文内容の要旨)			
近年、環境水中の汚染物質が魚類をはじめとする水棲生物に対して内分泌攪乱作用を示すことが問題になっている。例えば、エストロゲン様物質（Estrogen-like Substances; ELSs）は、メダカにおける性分化および生殖行動の異常を生じさせることが報告されている。ELSsを検出する従来の手法として、機器分析法や生体への影響評価を行うバイオアッセイが用いられてきたが、これらは分析手順が煩雑で、かつ高額な費用を要する問題があった。これらの問題を解決するために、本論文では環境水中におけるELSsの存在を肝臓からの蛍光によって検知できる遺伝子導入メダカを作出し、これを用いて迅速・簡便で定量的な検出法の開発を行った。本論文は以下のように要約される。 1. エストロゲン応答遺伝子の遺伝子発現制御領域をセンサーとし、緑色蛍光タンパク質遺伝子(GFP)をレポーターとした遺伝子導入メダカを作出した。すなわち、体内で分泌されるエストロゲン（17β-Estradiol；E2）に応答するメス特異的タンパク質である魚類卵膜タンパク質前駆体コリオジェニンH（Choriogenin H：ChgH）の発現制御領域5' 上流域1.8 kbpおよび3' 下流域0.5 kbpをクローニングし、GFP遺伝子に結合して導入遺伝子(pChgH-GFP)を構築した。ついで、導入遺伝子をメダカ受精卵に顕微注入により導入した。作出した遺伝子導入メダカはE2に暴露した孵化仔魚および成魚のオスにおいて肝臓特異的にGFPを発現したことから、E2を蛍光として検出できることを確認した。また、ELSs検出のために最適な系統を選抜するため、確立した5系統の遺伝子導入系統（B, C, D, E, F-line）からGFPの蛍光観察ならびに導入遺伝子のコピー数およびmRNAの発現量を測定した結果から、以降の試験にはCおよびD-lineを用いることが適切であることを示した。 2. メダカ仔魚を用いた小規模で迅速簡便な試験方法を確立した。ELSsの分析に供される水試料は、内容物の濃度を高めるために通常濃縮処理を行う必要がある。濃縮により試料量が減少することから、メダカ成魚は使用しにくい。そこで、成魚に比べて少量の水試料で試験が可能である孵化仔魚を用いる検出方法を検討した。CCDカメラを搭載した蛍光顕微鏡および画像解析装置でメダカの肝臓のGFP蛍光強度を数値化した。孵化仔魚をマイクロプレート上でE2、ethynylestradiol, nonylphenolに200 μL/尾で24時間暴露したところ、E2濃度依存的に肝臓蛍光強度が増加することがわかった。また、濃縮処理された環境水の試料として下水放流水中のELSsを			

分析した。メダカ仔魚を用いて算出された試料中のE2換算濃度は、従来の測定法である組み換え酵母アッセイ、ELISAおよびGC/MSの測定結果と同様であることを示した。

3. 体色素の発現を抑制することにより、体外から内臓を透視できる「透明化」された成魚オスの遺伝子導入メダカを作出し、この透明メダカを用いて環境水の連続評価が可能な試験方法を開発した。メダカを用いる暴露試験として、ELSsの濃度が時々刻々変化する流水環境中で一定期間暴露をおこなう方法がある。通常のメダカを用いて本暴露試験を行った場合、ELSsの検知は暴露期間終了後においてのみ可能であり、連続的なモニターは不可能である。

そこで、連続的にELSsの評価が可能な検出法の開発を行った。遺伝子導入メダカ系統と全身の色素が欠失したST-II系統のメダカを交配し、肝臓における蛍光の視認性を向上させた遺伝子導入透明メダカ系統を確立した。また、水中で遊泳しているメダカの腹部から肝臓の蛍光強度を測定するために、底面がガラス板の円筒型ホルダーとその下方に励起光光源とカメラが設置された蛍光撮影装置を開発した。本装置により、メダカを遊泳させたまま、肝臓の蛍光強度を連続的に撮影することが可能であることを確認した。本測定法を用いて、一定濃度のE2に対して14日間の連続測定を行った。その結果、1.5 ng/LのE2で蛍光が観察され、100 ng/Lまで濃度依存的に蛍光値が増加した。また短時間の暴露に対しては、100 ng/LのE2で30分間の暴露に反応することがわかった。このことから、流水域において高濃度のELSs汚染水が一時的に流入した場合でもそれが検出可能であることが示された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて

て、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し

審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

環境水中には、魚類等の水棲生物にエストロゲン様作用を示す内分泌攪乱物質(ELs)が存在していることがある。このため、ELsの簡便、迅速な測定法の開発は重要な問題である。本論文は、環境水中におけるELsの存在を肝臓からの蛍光によって検知できる遺伝子導入メダカを作出し、これを用いて迅速・簡便で定量的な検出法を開発を行ったものである。評価すべき主要な点は以下のようである。

1. ChgH遺伝子の発現制御領域に制御されたGFP遺伝子を保持した遺伝子導入メダカを作出した。遺伝子導入系統は孵化仔魚および成魚のオスにおいてエストロゲン暴露により肝臓にGFPを発現したことから、本メダカにより水中のエストロゲンを肝臓中のGFP蛍光シグナルとして検出できることを確認した。

2. ELsの検出に最適なメダカを作出するため、系統選抜および体色素の除去を行った。すなわち、作出した複数の系統から導入遺伝子の発現様式を検証し、導入遺伝子のコピー数および発現量等から判断して最適な系統を選抜した。さらに、肝臓における蛍光の視認性を向上させるため、遺伝子導入メダカ系統と色素が欠失したメダカ系統を交配させて、遺伝子導入透明メダカを作出した。

3. 濃縮処理された水試料中のELsの分析法として、仔魚を用いた試験方法を確立した。すなわち、孵化仔魚を24時間暴露した後、肝臓で発現したGFPの蛍光強度を蛍光顕微鏡を通じてCCDカメラで測定することにより、小規模な暴露系で評価可能で迅速、簡便かつ定量的なELsの分析が可能であることを明らかにした。

4. 透明系統化した成魚のオスを用いて連続的にELsの測定が可能な試験方法を開発した。すなわち、遊泳状態のままでメダカ腹部の蛍光画像を撮影できる装置を開発し、これを用いて透明化したメダカ肝臓の蛍光強度を測定することで、環境水暴露期間中の連続的なELsの評価が可能であることを明らかにした。

以上のように、本論文はELsを簡便に検知できる遺伝子導入メダカを作出し、検出に最適な系統を確立するとともに、開発したメダカ系統を用いる2種類の検出方法の開発を行ったものであり、海洋生物生産利用学、水圏環境分析学、遺伝子工学の発展に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成22年2月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降