



Title	オオミジンコを用いたエクダイソン様活性の可視化
Author(s)	浅田, 実希
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34478
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

オオミジンコを用いた
エクダイソン様活性の可視化

浅田 実希

2014 年 1 月

大阪大学大学院工学研究科

目 次

第 1 章 緒論	1
1-1. はじめに	1
1-2. 化学物質と内分泌かく乱作用	3
1-3. EXTEND2010	5
1-4. オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>) と脱皮ホルモン (エクジステロイド)	9
1-5. エクジステロイドとその応答	12
1-6. 本研究の目的	14
第 2 章 初期胚におけるエクジステロイドの作用の解明	15
2-1. 緒言	15
2-2. 実験方法	18
2-2-1. 動物	18
2-2-2. 飼育方法	18
2-2-3. 餌	18
2-2-4. オオミジンコからの cDNA 合成	18
2-2-5. <i>EPPase</i> 遺伝子のクローニング	19
2-2-6. 5'末端配列の決定	23
2-2-7. 3'末端配列の決定	26
2-2-8. <i>EPPase</i> の分子系統学的解析	26
2-2-9. リアルタイム RT-PCR	28
2-2-10. RNA 干渉によるノックダウン	30
2-2-11. EcRE コンセンサス配列の検索	30
2-3. 結果	31
2-3-1. オオミジンコにおける <i>EPPase</i> 遺伝子の単離	31

2-3-2.	<i>EPPase</i> 遺伝子の発現解析	37
2-3-3.	エクジステロイド受容体遺伝子の発現解析	42
2-3-4.	初期応答遺伝子の発現解析	47
2-4.	考察	49
第 3 章 初期胚におけるエクジステロイド応答レポーターの評価		52
3-1.	緒言	52
3-2.	実験方法	54
3-2-1.	動物	54
3-2-2.	飼育方法	54
3-2-3.	餌	54
3-2-4.	レポーターベクターの作製	54
3-2-5.	顕微注入	54
3-2-6.	GFP シグナルの定量化	55
3-3.	結果	55
3-3-1.	レポーターベクターの応答性の評価	55
3-3-2.	曝露によるレポーターベクターの応答性の評価	59
3-4.	考察	61
第 4 章 総括		64
4-1.	全体を通じた考察	64
4-2.	終わりに	69
引用文献		71
発表論文		79
謝辞		

第1章 緒論

1-1. はじめに

レイチェル・カーソンの『沈黙の春』やシーア・コルボーンの『奪われし未来』といった書籍に見られるように、環境ホルモンは我々人類が気付かぬうちに、弱いところからじわじわと蔓延している。こういった物質の生物、とりわけ、ヒト以外への生物に対する影響を正しく評価することが、現存する環境を残すために重要である。

人類は狩猟生活から農耕生活へと切り替えることで、人口が爆発的に増加した。そして人類は、増加した人口の食物を調達するために、農作物を効率的に得る方法を考え始めた。その結果の産物が農薬である。農薬には、意図的に環境ホルモン、内分泌かく乱物質を扱ったものがある。田畑に内分泌かく乱物質である農薬が散布されることで、害虫の内分泌系がかく乱され、駆除される。ここで疑問が生まれる。この農薬は、果たして、田畑だけに留まっているものなのか。自然環境への影響はないのか。

物質は、最終的には水系へと入ってくる。水系に農薬の流出があるかどうかは、化学的検出系でどのような物質が、どれぐらいの濃度存在しているのかを簡単に知ることができる。しかし、思いがけない物質が、生理的機能を持っている可能性がある。それらの物質が生物に対して影響するかどうかは生物を用いた検出系でないと分からない。

オオミジンコは、昆虫と同じ節足動物の甲殻類に属する生物である。そのため、昆虫と同じホルモンの存在が確認されている。言うまでもなく、ミジンコは水中の生物であり、また、化学物質に対する感受性が高いという特徴を持つ。

以上のような理由から、私は、オオミジンコを用いて内分泌かく乱物質、特に、昆虫や甲殻類のライフサイクルに深く関わるホルモン様物質の簡単なアッセイ系を確立しようと考えた。アッセイ方法は、ホルモンに対する遺伝子の応答に着目したレポーターアッセイ系を発案した。最終的には、試料の中に、ホルモン様物質の検出が可能な遺伝子組換えミ

ジンコを泳がせると、ミジンコが光ることでホルモン様物質の検出が可能となる方法が理想の形である。

前述したように、私たちの生活には様々な化学物質が氾濫している。それらは、その有用性から我々の生活を豊かにしてきた。しかしその一方で、化学物質が適切に扱われない場合には、人々の健康や生態系へ悪影響を及ぼすことが懸念されている。この中でも、化学物質による内分泌かく乱作用が人や生態系へ与える影響は、科学的に未解明な部分が多い。そのため環境省では、化学物質の内分泌かく乱作用に伴う環境リスクを適切に評価し、必要に応じて管理することを目標とし、評価手法の確立と評価の実施を加速化することを狙いとして、EXTEND2010 プログラムを対応方針として決定し、取り組みが進んでいる (<http://www.env.go.jp/chemi/end/extend2010.html>)。その中では、内分泌かく乱作用に関する試験対象となる化学物質を選択するために、各種のホルモン活性に対する試験管内試験と生物試験が提唱されている。内分泌かく乱作用との関連が想定されるホルモンとしては、哺乳類などで重要な働きをするエストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモンの他に、節足動物における重要なホルモンである幼若ホルモンと脱皮ホルモン（エクジステロイド）が挙げられている。幼若ホルモン、エクジステロイドの作用や影響の評価には、化学物質への鋭敏性や、現在までの知見からオオミジンコが選択されている (Canton & Adema, 1978; Tatarazako & Oda, 2007; Tsui & Wang, 2007; OECD, 2011)。幼若ホルモンについては、試験管内試験、生物試験ともに試験法が確立されたが、エクジステロイドでは、簡便な生物試験の手法が確立されていない。一般にエクジステロイド様活性を評価するためには、その重要な作用点である脱皮が1つのメルクマールとなるが、脱皮は単にエクジステロイドだけでなく栄養不足をはじめとして、必ずしもホルモン様作用に限らず様々な要因で阻害がかかる。そのため、直接的なホルモン作用の評価が困難であった。また脱皮や生殖などのエンドポイントに着目しホルモン活性を評価する場合には、時間と手間がかかるため、そのハイスループット性にも問題があった。

そこで、本研究では、生体内でのエクジステロイド様活性を可視化し検出するためのレポーターベクターの開発を目的とした。具体的には、エクジステロイド応答配列の下流に緑色蛍光タンパク質遺伝子を挿入したレポーターベクターをオオミジンコ初期胚に導入し、エクジステロイド依存的な緑色蛍光タンパク質の発現を検出することによりエクジステロイド活性を評価した。

1-2. 化学物質と内分泌かく乱作用

化学物質は、それぞれの特性から原材料や、製品の加工など様々な形で私たちの生活を豊かにしている。例えば、化粧品や薬用化粧品には、美白、しわ予防、にきび予防、育毛などの効果のために生理活性成分が含まれている。食品ではチーズ、食肉製品、漬物などの保存料としてソルビン酸が使用され、野菜や果物に含まれる天然物のキシリトールは、ガムや清涼飲料水に甘味料として用いられている。日常的に身につける衣服は、染色のために染料、顔料が使われ、防水や撥水、防虫といった加工を施すために様々な化学物質が用いられている。このように私達の身の回りは化学物質で溢れており、その恩恵無しには生活が成り立たない。しかしその一方で、規制量を超えて排出されたり、分解産物が毒性を持つ場合や、他の化学物質と反応して毒性を持った場合には、人々の健康や生態系に悪影響を及ぼすことが懸念されている。現在では、公害のような特定の化学物質による重い環境汚染はみられないが、汚染の実態は、複雑かつ深刻になっている(内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について - 環境ホルモン戦略計画 SPEED' 98-, 2000; 化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について - ExTEND2005-, 2005; EXTEND2010 における内分泌かく乱作用に関する試験及び評価の基本的な流れ, 2013)。この中の1つに、化学物質による内分泌かく乱作用がある。

化学物質による内分泌かく乱作用とは、生体に取り込まれた化学物質が内分泌系の働きに影響を与えることである。このため、内分泌かく乱作用を持つ化学物質は、内分泌かく

乱物質と呼ばれる。通常は、内分泌細胞（Endocrine cell）により産生されたホルモンが血液を介して標的細胞の受容体に結合し、特定の応答を引き起こす（図 1-1, a）。しかし、内分泌かく乱物質がホルモンの受容体と結合し、本来より過剰な応答を引き起こしたり（図 1-1, b）、また、内分泌かく乱物質が受容体へと結合したりすることで、ホルモンが受容体に結合できず、障害が起こる（図 1-1, c）。この他にも、内分泌細胞に内分泌かく乱物質が作用し、ホルモンの過剰合成、もしくはホルモンの合成を阻害する、また、本来、生体に備わっているフィードバック機構が内分泌かく乱物質によって阻害されるということがあ
る（EXTEND2010 における内分泌かく乱作用に関する試験及び評価の基本的な流れ, 2013; <http://www.env.go.jp/chemi/end/extend2010.html>）。化学物質による内分泌かく乱作用は、現在までに多く報告されている。イギリスでは、1980 年代に雌雄同体のコイ科の魚（ローチ）が発見された（Tyler & Jobling, 2008）。この原因と考えられるのが、上流の下水施設から流れ出た天然のエストロゲンや、合成エストロゲンの 1 つであるエチニルエストラジオールである。これらホルモンやホルモン様物質がオスのローチへと作用し、雌雄同体の個体が出現したと推定されている。日本でも、巻貝の一種であるイボニシにおいて、メスのオス化が確認された（Horiguchi et al., 1994）。この現象の原因は、船底の防汚塗料として用いられるトリブチルスズ化合物であった。このような事実を受け、環境省は化学物質による環境リスクの適切な評価と化学物質の管理を課題として EXTEND2010 プログラムを提唱した。

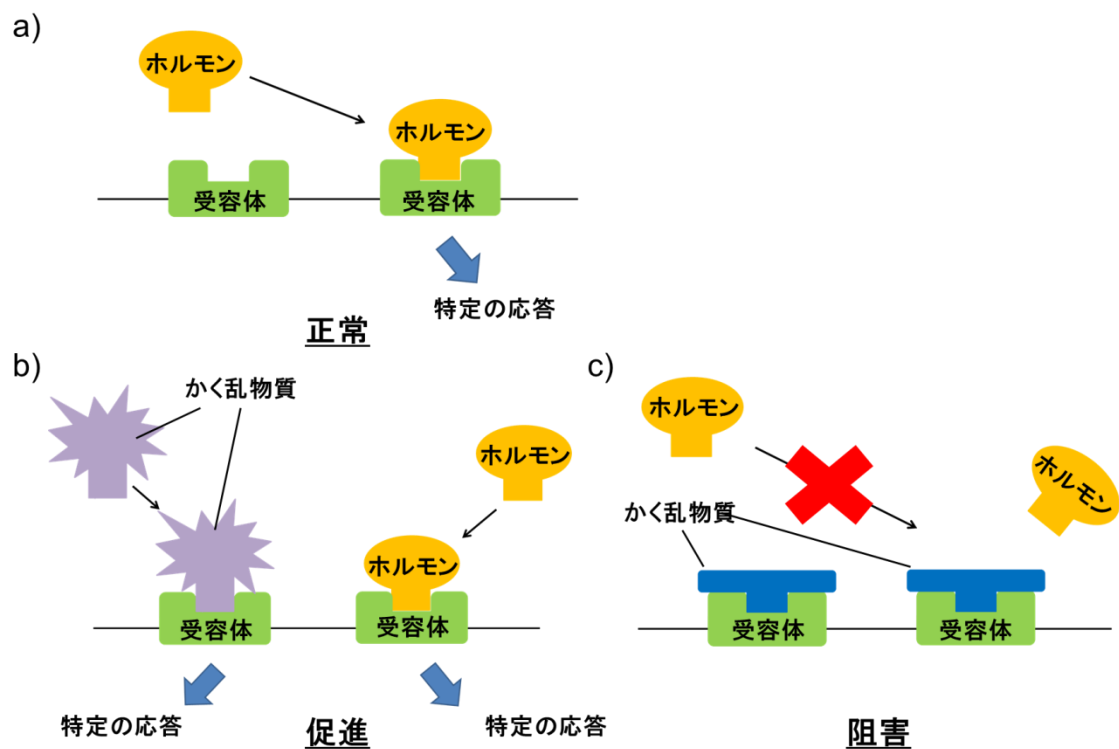


図 1-1. ホルモン作用と化学物質による内分泌かく乱作用

ホルモンと内分泌かく乱物質の作用メカニズムを図示した。正常な場合、ホルモンは特異的な受容体へと結合し、特定の応答を引き起こす(a)。内分泌かく乱物質がホルモンの受容体へと結合し、特定の応答を過剰に引き起こす(b)。内分泌かく乱物質がホルモンの受容体へと結合し、本来、結合するはずのホルモンが受容体へと結合できず、特定の応答を阻害する(c)。

1-3. EXTEND2010

現在までに Chemical Abstracts Service (<http://www.cas.org/>) に登録された化学物質は、7500 万件にもなる (2013 年 11 月 11 日)。これらの化学物質が生物の内分泌系をかく乱することにより、人々の健康や、野生生物に及ぼす影響を適切に評価するため、環境省は EXTEND2010 (Extended Task on Endocrine Disruption) を策定した (<http://www.env.go.jp/chemi/end/extend2010.html>)。EXTEND2010 は、化学物質によるヒトの健康と生態系に対する有害性の評価と化学物質の環境経路の曝露量を見積もる曝露

評価を行い、両方の結果を比較することでリスクの程度を判定する、環境リスク評価（化学物質の環境リスク評価 第1巻, 2002）を行い、必要に応じて管理することを目標とし、評価手法の確立と評価の実施を加速化することを狙いとしている。このプログラムにおける生体影響評価は2段階で行われており、第1段階の内容は、以下のようになっている（図1-2）。試験対象と判断された物質には、当該物質を使用した動物試験に関する文献、当該物質を使用した試験管内試験に関する文献、当該物質を対象とした疫学調査に関する文献から信頼性の評価が行われる。続いて、試験管内試験、生物試験に関する情報が十分に得られていない物質についてはそれぞれの試験が行われる。このとき、試験管内試験に関する情報は得られているが、生物試験に関する情報が得られていない物質については、生物試験が行われる。第1段階は、このように試験管内試験と、比較的短期の生物試験により構成されている。第2段階は、第1段階で用いた生物種と同種の生物による多世代への影響を調査する生物試験である。この試験により、その物質の有害性が評価されることとなる（EXTEND2010における内分泌かく乱作用に関する試験及び評価の基本的な流れ, 2013）。

EXTEND2010にバイオアッセイが採用されている理由は、化学物質に対する生物の応答性を解析できるという点が大きい。バイオアッセイとは、生物を用いてその応答性から化学物質や環境試料の有害性を評価する手法である。化学分析は、既に化学構造や物性に関する知見が得られているものに対しては有効であるものの、未知の化学物質の検出が困難であるという技術面での問題点、年々増加する化学物質を個別に測定することが困難であるといったコスト面での問題点を持つ。そして何よりも重要な点は、化学物質の濃度が検出できても、それだけでは、生物や生態系に与える影響を評価することが不可能ということである（庄司と迫田, 2004）。バイオアッセイの場合、物質そのものの特定や、濃度の測定はできないが、特定の化学物質による生物への影響評価はもちろん、微量有害物質、環境に放出されたことによって変化した物質、未知物質、有害性未評価な物質や複数の化学物質の相互作用による複合毒性の生物の応答性による評価が可能である。そのため、

EXTEND2010 では、バイオアッセイの試験管内試験と生物試験による 2 本立てで、化学物質の有害性の評価が行われている。

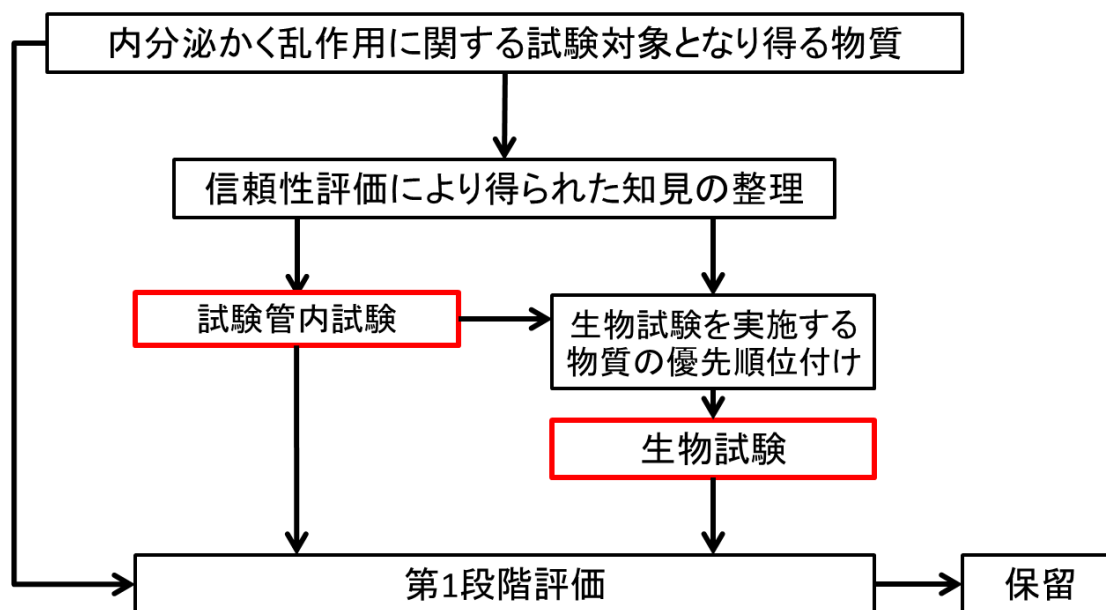


図 1-2. EXTEND2010 における内分泌かく乱作用に関する試験及び評価の基本的な流れ (第 1 段階)

試験対象物質は、これまでの知見を詳細に調べられた(信頼性評価)後、試験管内試験と生物試験を実施される。それぞれの結果を総合して第 1 段階評価とする。

試験法は、基本的には、経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development; OECD) においてテストガイドライン化された試験法を優先するが、試験法がないものについては評価法の確立の必要がある。OECD は、加盟国における経済の持続的成長と自由かつ多角的な貿易を目的として設立された経済機関であり、日本も参加している。OECD テストガイドラインは、化学物質の安全対策として、化学物質の有害性を評価するために作成された「テストガイドライン」である。その目的は、化学物質の有害な

影響からヒトの健康と環境の保護を促進すること、化学物質の貿易障害を回避すること、化学物質規制に関わる加盟国の経済的、行政的な負担の軽減、化学物質に関する国際的な情報交換を強化することである（化学物質と生体毒性, 2003）。この OECD テストガイドラインには、生態系への影響を評価する試験が 30 種類以上存在するが、このうち化学物質による内分泌かく乱作用の試験に使えるものは、4 つのみである。内分泌かく乱作用と関連が想定される作用メカニズムには、以下のようなものがある。

- ・ エストロゲン作用
- ・ 抗エストロゲン作用
- ・ アンドロゲン作用
- ・ 抗アンドロゲン作用
- ・ 視床下部－下垂体－生殖腺軸への作用
- ・ 甲状腺ホルモン作用
- ・ 抗甲状腺ホルモン作用
- ・ 視床下部－下垂体－甲状腺軸への作用
- ・ 幼若ホルモン作用
- ・ 脱皮ホルモン作用

このうち、幼若ホルモン作用と脱皮ホルモン作用については、試験動物としてオオミジンコが選択されている。これは、前述の OECD テストガイドラインのうち、化学物質による内分泌かく乱作用の試験に使える 4 つのうちの 1 つが、オオミジンコ繁殖阻害試験であり、この試験法が幼若ホルモンの生物試験に採用されていること、幼若ホルモンと脱皮ホルモンが昆虫や甲殻類に存在し、哺乳類をはじめとする脊椎動物には存在しないという理由からである。幼若ホルモンについては、試験管内試験、生物試験ともに試験法が確立された（表 1-1）。しかし、脱皮ホルモンについては、オオミジンコの受容体を使用するミジンコ脱皮ホルモン受容体レポーター遺伝子試験の試験管内試験のみで、生物試験が確立されて

いない。

ホルモン	試験管内試験	生物試験
幼若ホルモン (Juvenile Hormone)	○	○
脱皮ホルモン (Ecdysteroid)	○	×

表 1-1・ホルモン作用・影響評価の方法

EXTEND2010 における幼若ホルモン作用と脱皮ホルモン作用の影響評価方法の有無。

1-4. オオミジンコ (*Daphnia magna*) と脱皮ホルモン (エクジステロイド)

甲殻類の一種であるオオミジンコ (*Daphnia magna*) は、その体長が 1 mm - 5 mm と、比較的大きなミジンコで観察しやすく、飼育も簡単な動物である。オオミジンコは幼体時にはおよそ 1 日に 1 回の頻度で脱皮する。生まれた時を 1 齢とすると、3 齢には成熟し卵産生を開始し、5 齢で育房に産卵する (図 1-3)。単為生殖の場合、産卵された卵は育房内で発生し、幼体となって親個体の脱皮前に泳ぎ出る。脱皮した親個体 (図 1-3, a) は、その直後、次の卵を育房内へと産卵する。これを繰り返す、一生を終える。脱皮ホルモンであるエクジステロイドは、その名の通り脱皮に深く関係している。オオミジンコと同じ節足動物である昆虫では、体液中でのエクジステロイド量がピークをむかえた後に、脱皮が起ることが確認されている。オオミジンコにおいても、高濃度のエクジステロイドに曝露すると、脱皮に失敗すること (Baldwin et al., 2001) から脱皮にエクジステロイドが関与していると考えられている。また、オオミジンコは、普段は雌のみの単為生殖を行っているが、

水温の低下や餌環境の悪化、日長の変化などにより、オオミジンコにとって生育が難しい環境へと転じると両性生殖を行う（図 1-4・両性生殖部分）。雄を生じる雌個体と休眠卵を生じる雌個体が発生し、その雄（図 1-4, a）と休眠卵を持つ雌とが交尾をして休眠卵を産むようになる。産卵された休眠卵はすぐには発生を始めず、環境が好転した時に雌個体が生まれる。そして、その雌個体が単為生殖を繰り返し、子孫を増やすのである。

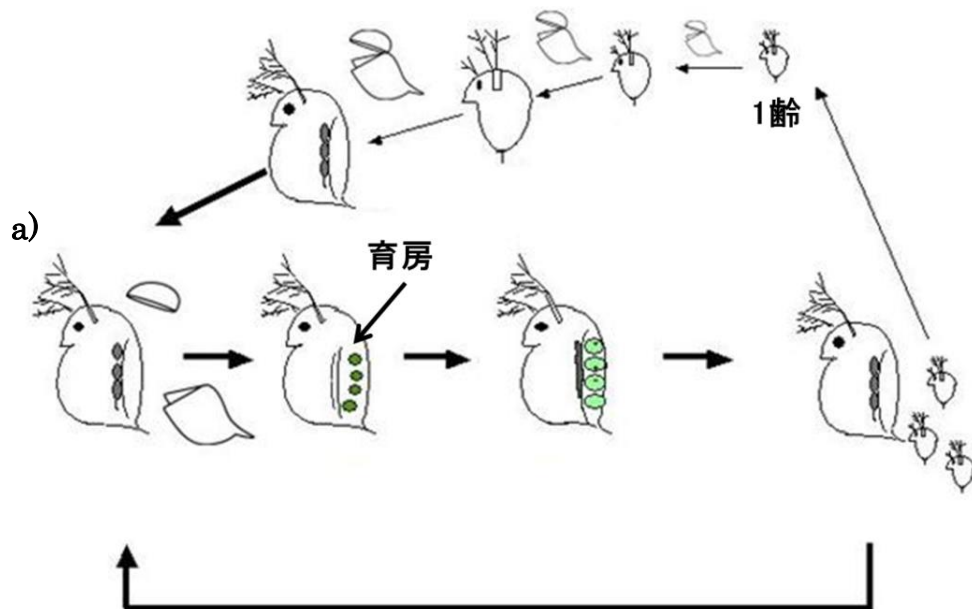


図 1-3. オオミジンコの単為生殖

図、右下の成体(♀)から泳ぎでた幼体は、脱皮を繰り返し、成体になる(a)。成体は、卵巣が成熟し、育房へと卵を産み、子孫を増やす。

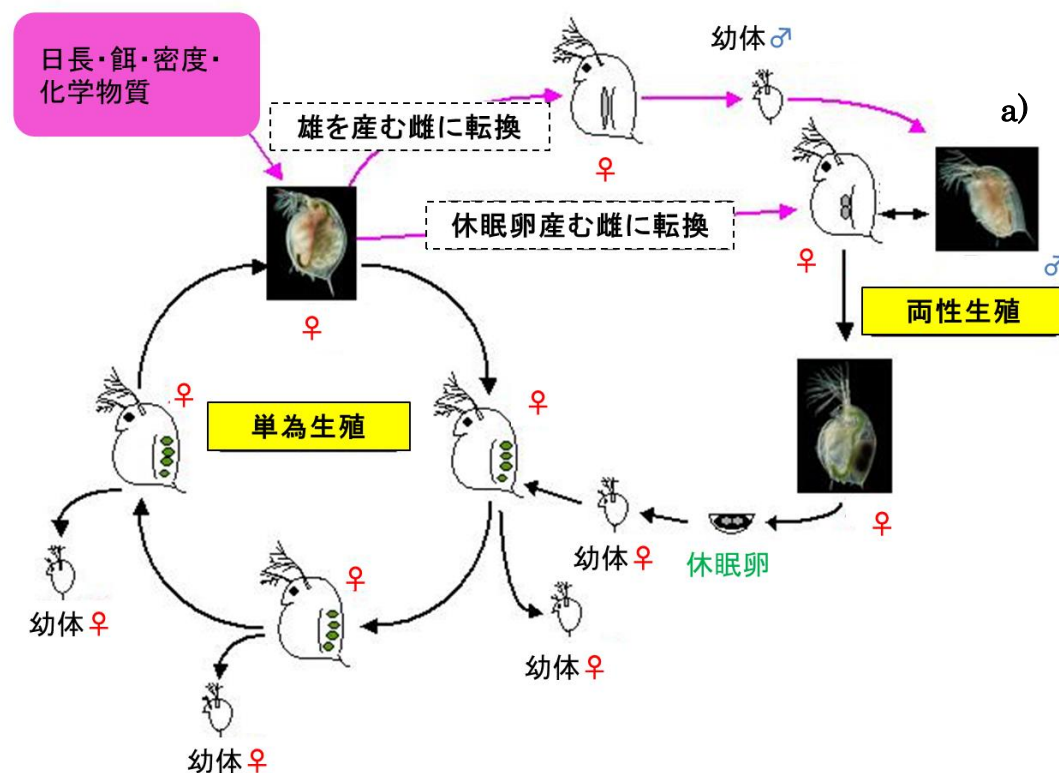


図 1-4. オオミジンコの生活環

通常は図、左の単為生殖で生活しているが、周囲の環境が悪化すると両性生殖へと切り換わる(図右)。休眠卵を産む雌と雄(a)が交尾することで休眠卵が産み落とされる。環境が好転すると、この休眠卵から単為生殖雌が生まれる。

近縁種である *Daphnia pulex* については、全ゲノムの解読が既に終了しており (Colbourne et al., 2011)、オオミジンコについても終了した (未発表: Daphnia Genome Consortium 私信)。動物性プランクトンであるミジンコは植物食生であるため、一次生産者と高次の消費者を結ぶ食物連鎖の中間に位置する生物として重要である。化学物質に対する感受性が高く (Canton & Adema, 1978)、化学物質などが自然環境に及ぼす影響を評価する環境指標動物として広く扱われており、蓄積されているデータが多い (Tatarazako & Oda, 2007; Tsui & Wang, 2007)。以上のような点も EXTEND2010 の試験生物として選択

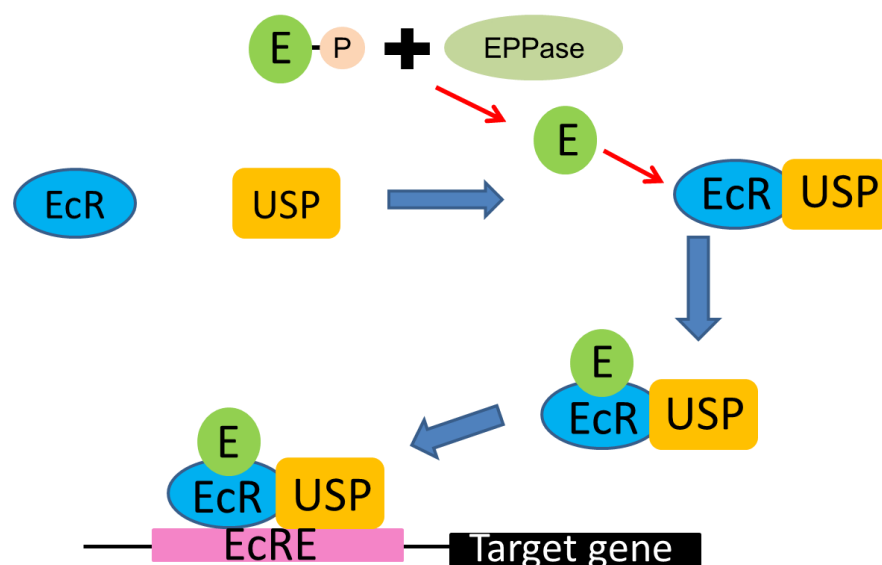
された理由である。

1-5. エクジステロイドとその応答

脱皮ホルモンとその前駆体や代謝産物などを総称してエクジステロイドという。エクジステロイドは、昆虫では、主に前胸腺と卵巢で合成され、胚発生、脱皮、変態などのライフサイクル全般にわたり、様々な生理作用に関与している。このエクジステロイドの受容体は脊椎動物には認められていないため、ヒトを含むエクジステロイドを持たない生物種に対しては、致死的な効果はほぼない。そのため、エクジステロイドの機能をかく乱する物質は、選択性の高い昆虫成長制御剤 (Insect Growth Regulator; IGR) として活用できると考えられた。実際、エクジステロイドの類似体であるジベンゾイルヒドラジン類はすでに実用化され、農薬として用いられている(Nakagawa et al., 2005)。

エクジステロイドによる調節には、いくつかの過程が存在する (図 1-5)。活性型のエクジステロイド 20-hydroxyecdysone (20E) が必須となる。甲殻類では、20E は Y 器官で複雑な工程を経て合成される。この工程には、昆虫でのエクジステロイドの合成に関与する *Neverland* や *Halloween* 遺伝子群が関与していると考えられており、ミジンコ (*D. pulex*) のゲノムでは、それぞれの遺伝子のオーソログが確認されている(Mykles, 2011; Rewitz & Gilbert, 2008)。甲殻類では、合成器官を持たない胚には、母性由来のエクジステロイドが卵形成の時点で蓄積され、産卵後、そのエクジステロイドを用いて胚発生が進むことが分かっている(Subramoniam, 2000)。昆虫では、母性由来のエクジステロイドが不活性型のリン酸抱合体が初期胚に蓄積される。不活性型のリン酸抱合体のエクジステロイドを活性型のエクジステロイドへと転換するために、エクジステロイド脱リン酸化酵素 (Ecdysteroid phosphate phosphatase, EPPase) が存在する(Yamada & Sonobe, 2003)。エクジソンが結合する受容体である Ecdysone Receptor (EcR) と偏在する核内レセプターである Ultraspiracle (USP) がヘテロダイマーを形成する。EcR は、USP と結合することで EcR

のリガンド結合部位の構造が安定化する(Kumar et al., 2002)。このヘテロダイマーの形成については、誘導メカニズムなどは明らかになっていないが、エクジソンの存在下で、その形成が進むことが分かっている(Yao et al., 1993)。続いて、EcR にエクジソン (E) が結合し、E·EcR·USP の複合体が特定の DNA 配列へと結合する。E·EcR·USP の複合体がエクジステロイド応答配列 (Ecdysone Response Elements, EcRE) へと結合すると下流の遺伝子の転写が始まり、エクジステロイドへの応答が引き起こされる(Thummel, 2002; Yao et al., 1993)。このように、エクジステロイドによる転写活性の開始には、様々な要素が存在することが必要である。



EcR : Ecdysone Receptor USP : Ultraspiracle E : Ecdysone

EcRE : Ecdysone response element EPPase : Ecdysteroid phosphate phosphatase

図 1-5・昆虫で確認された初期胚におけるエクジステロイドの作用メカニズムモデル

エクジステロイドの受容体である EcR-USP へと EPPase によって活性型に転換されたエクジステロイド E が結合する。E·EcR·USP 複合体は EcRE へと結合し、下流の遺伝子の転写を活性化する。(Thummel, 2002)

1-6. 本研究の目的

現在、EXTEND2010 では、内分泌かく乱作用に関与すると想定されるホルモンのメカニズムの中で、エクジステロイドにおいては、簡易の生物試験の手法が確立されていない。本研究では、生体内でのエクジステロイド様活性を可視化し、検出するためのレポーターベクターの開発を目的とした。具体的には、**EcRE** の下流に緑色蛍光タンパク質 (**Green fluorescence protein, GFP**) 遺伝子を配置したレポーターベクターをオオミジンコ初期胚へと導入し、エクジステロイド依存的な緑色蛍光タンパク質の発現を検出することで、エクジステロイド活性を評価することとした。

第2章 初期胚におけるエクジステロイドの作用の解明

2-1. 緒言

エクジステロイドは、節足動物において脱皮ホルモンとして発見されたが、実際の作用は、脱皮のみでなく、生殖、胚発生など甲殻類のライフサイクル全般に深く関わりがあることが分かっている (Nagaraju, 2011; Subramoniam, 2000)。オオミジンコでは、エクジステロイドの1つである 20E を 1 μ M 曝露したミジンコの幼体が曝露開始から4日間のうちに 100 %が脱皮できずに死ぬこと (Baldwin et al., 2001)がわかっている。また、エクジステロイド生合成経路の阻害剤であるフェナリモル 4 μ M をオオミジンコ初期胚に曝露すると 100 %の確率で触角の先端の欠損した個体や、殻刺が曲がった個体などの奇形が生まれる、もしくは、胚発生が停止することが知られている (Mu & LeBlanc, 2002)。

昆虫では、エクジステロイドの合成器官を持たない胚では、母性由来のエクジステロイドが不活性型のリン酸抱合体として蓄積されている。エクジステロイドのリン酸抱合体は、昆虫であるカイコではじめて発見された。カイコでは、母親の卵巣において生産されたエクジステロイドはエクジステロイドリン酸化酵素 (Ecdysteroid kinase; EcKinase) によってリン酸化され (Ito et al., 2008)、不活性型のリン酸抱合体として、卵の卵黄細胞へと蓄積される (Yamada et al., 2005)。産卵後、リン酸抱合体は、エクジステロイド脱リン酸化酵素 (EPPase) によって脱リン酸化され活性型のエクジステロイドとなり、胚の発生、分化へと用いられることが分かっている (Yamada et al., 2003)。昆虫では、このように EPPase の機能や存在が確認されているが、甲殻類では全く確認されていない。

活性型のエクジステロイドは、分泌細胞から放出されると血リンパ液を介して、標的細胞へと運ばれる。標的細胞内に入ると、核内レセプターである Ecdysone Receptor (EcR) (Koelle et al., 1991) と Ultraspiracle (USP) (Mangelsdorf et al., 1992, 1995; Henrich et al.,

1994)からなるヘテロダイマー(Yao et al., 1992; Yao et al., 1993)へと結合し、ホルモンに対する応答が促される(Horner et al., 1995; Stone & Thummel, 1993)。昆虫では、*EcR* 遺伝子は3つのアイソフォーム (*EcR-A*, *EcR-B1*, *EcR-B2*) をつくる(Koelle et al., 1991; Talbot et al., 1993)。構造的には、共通の DNA 結合領域、リガンド結合領域を持ち、N 末端のみが異なる。*EcR* のアイソフォームの研究に関しては、キイロショウジョウバエで進んでいる。Talbot et al. (1993) は、*EcR* のアイソフォームである *EcR-A*、*EcR-B1* について抗体を作製し、*EcR-A* は、成虫原基や唾液腺などのキイロショウジョウバエの成虫に特異的な組織で強く発現していること、*EcR-B1* は、中腸や組織芽細胞で発現していることを明らかにした。また、*EcR-A* の mRNA は、蛹の間、*EcR-B1* に比べて強く発現しており、タンパク質もそれに従い発現していた。*EcR-B1* の mRNA は、1 齢から 2 齢幼虫になる脱皮の際に発現しており、タンパク質もそれに従い発現していた(Talbot et al., 1993)。Bender et al. (1997)は、*EcR* にランダムにアミノ酸を置換する変異をいれることで *EcR* の機能を解析した。リガンド結合領域に変異が入った系統が孵化する確率は、0 %で、*EcR* の共通領域や DNA 結合領域に変異が入った場合、2-54 %の確率で孵化できるものの、3 齢幼虫になるまで生きる系統はなかった。*EcR-B1* 特異的な領域に変異が入った個体は、36-54 %の確率で 3 齢幼虫まで生きるものの、その後、蛹に変態できる確率は 0 %であった。Schubiger et al. (1998)は、*EcR-B* のコーディング領域の開始メチオニン (M) 付近を欠失することで、*EcR-B1* と *EcR-B2* ともに発現しない系統を 6 系統作製した。この 6 系統は、それぞれ違いがあるもののほとんどが 1 齢幼虫から 2 齢幼虫への脱皮時、もしくは 2 齢幼虫から 3 齢幼虫への脱皮時に死に、3 齢幼虫になれた個体についても蛹には変態できなかった。一方、*in vitro* 実験では、*EcR* アイソフォームのそれぞれの転写能の違いが報告されている。Mouillet & Henrich (2003)は、HeLa 細胞を用いた CAT アッセイの結果、*EcR-B1* の転写能を 100 % とすると、*EcR-B2* が約 80 %、*EcR-A* が約 30 %であることを示した。昆虫細胞や CHO 細胞を用いた同様の実験からも同様の結果が得られている(Beatty et al., 2006; Hu et al.,

2003)。以上のような結果から EcR による転写活性は、時間的にも空間的にも調節を受けていると考えられた。

オオミジンコにおいても、EcR のアイソフォームは 3 つ (EcR-A1, EcR-A2, EcR-B) 存在している。オオミジンコ成体では、EcR-B の mRNA 発現が脱皮時に高くなる。その発現量は、EcR-A1 と EcR-A2 を合わせたものの約 5 倍にもなる。CHO 細胞を用いたレポーターアッセイによってオオミジンコの EcR、USP が遺伝子の転写活性に関与していることも明らかとなっている (Kato et al., 2007)。

昆虫では EcR は、単体では DNA への結合能が低く、USP とヘテロダイマーを形成することでエクジステロイドの受容体として機能する (Yao et al., 1992; Yao et al., 1993)。USP は、脊椎動物の retinoid X receptor (RXR) のホモログである (Mangelsdorf et al., 1992, 1995)。USP の mRNA 発現は、胚、幼虫、蛹、成虫、全てのステージにおいて発現していることが確認されている (Henrich et al., 1994)。

オオミジンコにおいても、USP は存在している。USP の mRNA の発現量は、脱皮と脱皮の間隔で EcR の発現と比べると、大きな変化はなかった。しかし、脱皮の直前に mRNA の発現が上昇し、脱皮を終えると発現量が下がっていた。 (Kato et al., 2007)。

エクジステロイドは、受容体 (EcR-USP) → 初期応答遺伝子群 → 後期遺伝子群 と順次階層的にその情報を伝えていき、最終的にはその細胞でエクジステロイドに特異的な応答を引き起こすと考えられている (Thummel, 2002; Yao et al., 1993)。その初期応答遺伝子のいくつかは、核内受容体などの重要な転写因子をコードしている。そのなかでも、HR3 と E75 は胚発生に重要な転写因子であり (Bialecki et al., 2002; Carney et al., 1997)、その存在は、昆虫同様、オオミジンコでも確認されている (Hannas et al., 2010)。

本章では、初期胚発生におけるエクジステロイドの作用の解明を行った。具体的には、オオミジンコ初期胚におけるエクジステロイド作用を解明するため、EPPase、EcR、USP、そして、初期応答遺伝子である *HR3*、*E75* に注目し、それぞれについて解析を行った。

2-2. 実験方法

2-2-1. 動物

オオミジンコ(*Daphnia magna*)は、国立環境研究所より分与された NIES 系統を使用した。NIES 系統は、米国環境保護庁 (US EPA) より国立環境研究所に分与され、20 年以上継代されているオオミジンコである。

2-2-2. 飼育方法

飼育水には Aachener Daphnien Medium (ADaM) (Klittitgen et al., 1994)を使用した。飼育条件は、80 daphnids/5 L で、1 週齢のミジンコには餌として、クロレラ 4.8×10^8 cell/day、ドライイースト 3 mg、2 週齢以降のミジンコにはクロレラ 9.6×10^8 cell/day、ドライイースト 6 mg を与えた。飼育温度は室温 23 °C、明暗条件が 16 時間明 8 時間暗である。

2-2-3. 餌

クロレラは、日海センターより濃縮クロレラを購入し、ドライイーストは、マルサンパントリーより購入した。

2-2-4. オオミジンコからの cDNA 合成

初期胚からの RNA 抽出

適切な時間の初期胚を実体顕微鏡下で摘出し、1 ml Sepasol®-RNA I Super G (Nacalai Tesque) にビーズ (ジルコニア、3.0 φ、1.0 φ) とともにチューブに入れた。Micro Smash MS-100 (TOMY) を用いて、300 rpm、30 秒間を 3 回繰り返し破碎した。その後、5 分間、室温でインキュベートし、200 μl クロロホルム (Nacalai Tesque) を加え、転倒混和した。4 °C、12,000×*g* で 15 分間、遠心したのち、上層 (水相) を別のチューブに移した。そこに等量の 2-プロパノール (Nacalai Tesque) を加え、混和し、10 分間、室温で静置した。その後、4 °C、12,000×*g* で 10 分間、遠心し、上清を除去した。そこに 1 ml 75 %エタノール

ールを加え、沈殿を再懸濁し、洗浄した。4 °C、12,000×*g*で5分間、遠心した後、上清を除去し、風乾させた。沈殿を10 µl Ultra Pure Distilled Water (DNase, RNase Free、Invitrogen)に融解し、NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)でRNA量を測定した。

卵巣からのRNA抽出

500 µl RNeasy Lysis Buffer (QIAGEN) と 500 µl MilliQ の混合液内にオオミジンコの成体を入れ、動きが完全に停止するまで待った。動きが停止した後、頭、外殻、腸管の順番で除去した。一度、混合液を交換し、残りの脚や爪の部分除去し、卵巣のみにし、再度混合液を交換して卵巣を洗浄した。その後、初期胚と同様にしてRNAを抽出した。

cDNA 合成

抽出した Total RNA 4 µl に Oligo(dT)₂₀ (10 pmol/µl、Invitrogen)、4 µl 2.5 mM dNTP mix (Invitrogen) を加え、65 °Cで5分間、静置した。その後、1分間以上、氷上に置いた後、軽く遠心し、4 µl 5×First-Strand Buffer (Invitrogen)、1 µl 0.1 M DTT (Invitrogen)、1 µl RNase Out (Invitrogen) と Super ScriptIII (200 units/µl、Invitrogen) を加え、混和し、50 °Cで60分間、70 °Cで15分間、静置した。合成した cDNA は以下の Actin プライマーを用いて PCR にかけて、アガロースゲル電気泳動にて、ゲノムのコンタミネーションがないかを確認した。

Primer

Actin forward : 5'-GGCAAGGAATAGTTCGATAC-3'

Actin reverse : 5'-CACCGACGTACGAATCCTTCTGACC-3'

2-2-5. *EPPase* 遺伝子のクローニング

EPPase 遺伝子の検索

NCBI のデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) よりカイコ (*Bombyx mori*) の *EPPase* 遺伝子のアミノ酸配列を取得し、オオミジンコ EST データベース (Watanabe et al., 2005) を使って BLAST による関連遺伝子の検索を行った。その結果、1 つの *EPPase* 遺伝子に類似の配列が得られた。

PCR と PCR 産物の抽出

得られたカイコ *EPPase* 遺伝子類似配列から以下に記すプライマーをデザインし、TaKaRa ExTaq (TaKaRa) を用いて、オオミジンコ初期胚 cDNA より PCR で類似配列の増幅を行った。

Primer

EPPase 1 : 5'-GAACTACCACCCAGGAAGA-3'

EPPase 2 : 5'-GCGCATTGGGTGACGTAAT-3'

得られた PCR 産物をアガロース電気泳動にかけ、確認し、ゲルの切り出しを行った。PCR 産物の抽出には、Mini Elute Gel Extraction kit (QIAGEN) を用い、常法に従い、以下を行った。切り出したゲルを 1.5 ml チューブに移し、ゲルの 3 倍量の QG Buffer を加え、50 °C で 10 分間、静置した。その際、2-3 度チューブをボルテックスで混和した。その後、ゲルと等量の 2-プロパノールを加え、静かに混和した。溶液を付属のカラム (MiniElute column) に添加し、室温、15,000 rpm で 1 分間、遠心した。コレクションチューブ内のろ液を捨て、500 µl QG Buffer をカラムに添加し、室温、15,000 rpm で 1 分間、遠心した。コレクションチューブ内のろ液を捨て、カラムの洗浄のため、750 µl PE Buffer をカラムに添加し、室温、15,000 rpm で 1 分間、遠心した。コレクションチューブ内のろ液を捨て、300 µl PE Buffer をカラムに添加し、室温、15,000 rpm で 1 分間、遠心した。コレクションチューブ内のろ液を捨て、室温、15,000 rpm で 3 分間、遠心した。カラムを新しい 1.5 ml チューブに移し、10 µl MilliQ をカラムに添加し、1 分間、静置した。静置後、室温、15,000

rpm で 1 分間、遠心し、得られた溶液を NanoDrop 2000 で測定した。

TA クローニング

得られた PCR 産物をサブクローニングするために、TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) を用いた。用いる pCR4-TOPO vector と PCR 産物のモル比が 1:3 になるように調整し、そこに 1 μ l 10 \times Ligation Buffer、1 μ l T₄ DNA Ligase (4.0 Weiss unit) を加え、さらに MillQ を総量が 10 μ l になるように加えた。その後、そのサンプルを 14 $^{\circ}$ C で 16 時間、静置した。

Transformation

5 μ l Ligation 反応溶液を 50 μ l competent cells に加え、タッピングで静かに混和した。それを 60 分間、氷上で静置した後、90 秒間、42 $^{\circ}$ C で静置し、すみやかに氷上に移動させた。その 3 分間後、サンプルに 250 μ l S.O.C.培地 (室温) を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間、振盪培養した。その後、室温に置いた LB プレート培地 (Amp⁺, IPTG⁺, X-gal⁺) に 200 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ C で 16 時間、静置した。いくつか白いコロニーを選抜し、コロニーPCR を行い、アガロースゲル電気泳動によって目的断片が挿入されたコロニーを確認した。

プラスミドの精製

目的断片の挿入が確認されたコロニーを 2 ml LB 培地 (Amp⁺) に植菌し、37 $^{\circ}$ C 振盪培養で 16 時間、静置した。1.5 ml チューブに移し、室温、15,000 rpm で 10 分間、遠心し、集菌した。上清を捨て、QIA Prep Spin Mini kit (QIAGEN) を用いてプラスミドの精製を行った。ペレットに 250 μ l P1 Buffer を加え、再懸濁した後、250 μ l P2 Buffer を加え、静かに混和した。その後 5 分間以内に 350 μ l N3 Buffer を加え、静かに混和し、室温、13,000 rpm で 10 分間、遠心した。得られた上清をカラム (QIAprep Spin column) に加え、室温、

15,000 rpm で 1 分間、遠心した。ろ液を捨て、500 μ l PB Buffer をカラムに加え、室温、15,000 rpm で 1 分間、遠心した。その後、ろ液を捨て、室温、15,000 rpm で 3 分間、カラムを遠心した。カラムを新しい 1.5 ml チューブにセットし、50 μ l MilliQ をカラムに加え、1 分間、静置した。静置後、室温、15,000 rpm で 1 分間、遠心し、溶出液におけるプラスミド量を NanoDrop 2000 にて測定した。

シーケンシング

得られたプラスミドを用いてシーケンシングを行った。シーケンシングには BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用した。150 ng プラスミド DNA に 0.5 μ l プライマー (3 μ M)、0.5 μ l 5 \times sequencing Buffer、1 μ l Premix (BigDye) を加え、MilliQ で 5 μ l になるように調整した（プライマーについては、最後に示す）。これを以下の条件でサーマルサイクラーにかけた。

反応条件

95 °C 10 sec

50 °C 5 sec

60 °C 4 min

以上の条件を 25 サイクル繰り返す。

PCR 反応後の溶液を 1.5 ml チューブへと移し、エタノール沈殿によって精製した。精製後の PCR 産物に 20 μ l HiDi formamide (Applied Biosystems) を加え、ボルテックスで攪拌した。それを 95 °C で 2 分間、静置し、5 分間以上氷上で置いた後、96-well プレートに移し、シーケンサー (ABI3130xl, Applied Biosystems) にてシーケンシングを行った。

Primer

EPPase 3 : 5'-GATCGGCAGAAGAATGTGGT-3'

EPPase 4 : 5'-GGCGCCATTTCTACCACATT-3'

EPPase 5 : 5'-GCCTCTGCTGCAATGTCTAA-3'

EPPase 6 : 5'-CGGGAAGATGACCTTGTAACA-3'

EPPase 7 : 5'-GACGAGTTGGAAGCTGCTTCT-3'

EPPase 8 : 5'-CATGCTTCCGGATCGACAT-3'

EPPase 9 : 5'-GGATCGACTTCACATTTGGT-3'

EPPase 10 : 5'-CGATTCTGGGTGATCCTTGT-3'

EPPase 11 : 5'-CAGGATTCAGCACGTCTACT-3'

2-2-6. 5' 末端配列の決定

5' 末端の配列を決定するために、Gene Racer Kit (Invitrogen) を用いた。

RNA の脱リン酸化

前述の方法で抽出した Total RNA 1.6 µg に 1 µl 10×CIP Buffer、1 µl RNase Out (40 U/µl)、1 µl CIP (10 U/µl) を加えた後に、DEPC 水で溶液が 10 µl になるよう調整した。ピペッティングで静かに混和し、50 °C で 1 時間、静置した。静置後、軽く遠心し、氷上に置換した。

RNA 精製

90 µl DEPC 水と 100 µl フェノール:クロロホルム (kit 付属品) を加え、ボルテックスで 30 秒間、混和した。それを室温、15,000 rpm で 5 分間、遠心し、上清を新しいチューブへと移した。そこに 2 µl mussel glycogen (10 mg/ml)、10 µl 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加え、十分に混和した。さらに、220 µl 95 %エタノールを加え、ボルテックスで攪拌した後、ドライアイス中で 10 分間、静置した。静置後、4 °C、15,000 rpm で 20 分間、遠心し、ペレット部分に印をつけ、上清を取り除いた。そこに 500 µl 70 %エタノールを加え、

チューブを転倒混和し、さらにボルテックスで攪拌した。その後、4 °C、15,000 rpm で 5 分間、遠心し、ペレット部分に印をつけ、上清を取り除いた。もう一度、500 µl 70 %エタノールを加え、同様に混和、遠心し、上清を取り除いて、ペレットを風乾させた。そこに DEPC 水を 7 µl 加えた。

mRNA Cap の除去

脱リン酸化処理を行った RNA 7 µl に 1 µl 10×TAP Buffer、1 µl RNase Out (40 U/µl)、1 µl TAP (0.5 U/µl) を加え、ピペッティングで静かに混和した。サンプルを 37 °C で 1 時間静置した。その後、サンプルは再度 RNA 精製処理を行った。

Decapped RNA への RNA oligo のライゲーシオン

乾燥した GeneRacer RNA Oligo (0.25 µg) が入ったチューブに Cap を除去し、精製した RNA 7 µl を添加し、ピペッティングによって数回静かに混和した。65 °C で 5 分間、静置した。その後、2 分間、氷上に静置し、軽く遠心を行った。その後、そのサンプルに 1 µl 10×Ligase Buffer、1 µl 10mM ATP、1 µl RNase Out (40 U/µl)、1 µl T₄ RNA ligase (5 U/µl) を加え、ピペッティングで混和し、37 °C で 1 時間、静置した。軽く遠心後、氷上へと移し、再度 RNA 精製処理を行った。その際、最終的に DEPC 水を 10 µl 加えた。

cDNA 合成

PCR チューブに 10 µl ライゲーシオン後のサンプル、1 µl Random primer、1 µl dNTP mix (25 mM)、1 µl Ultra Pure Distilled Water (DNase, RNase Free) を加え、軽くピペッティングした後、65 °C で 5 分間、静置した。静置後、1 分以上氷上に静置し、4 µl 5×First Strand Buffer、1 µl 0.1 M DTT、1 µl RNase Out (40 U/µl)、1 µl SuperScript III RT (200 U/µl) を加え、ピペッティングで混和した。サンプルを 25 °C で 5 分間、静置

し、軽く遠心し、50 °Cで1時間、70 °Cで15分間、静置した。その後、2分間以上氷上で静置し、4 °C、15,000 rpm で素早く遠心した。そこに1 µl RNase H (2 U) を加え、37 °Cで20分間、静置した後、20 µl TE Buffer を加えた。保存は -20 °Cで行った。

Touch down PCR

合成した cDNA 断片から 5' 末端の配列を増幅するために Touch down PCR を行った。以下に記すプライマーをデザインし、TaKaRa ExTaq (TaKaRa) を用いて、得られた cDNA より 5' 末端配列の増幅を行った。

Primer

EPPase 5'-RACE : 5'-CTGGCCCAAAATTCCTGCAGCTGACT-3'

(Forward は GeneRacer kit 内のものを使用)

反応条件

95 °C	2 min	
94 °C	30 sec	5 サイクル
72 °C	3 min	
94 °C	30 sec	
70 °C	3 min	5 サイクル
94 °C	30 sec	
68 °C	30 sec	
72 °C	3 min	25 サイクル
72 °C	10 min	

得られた PCR 産物はアガロースゲル電気泳動にかけ、Mini Elute Gel Extraction kit を用いて精製し、TA クローニング、Transformation、プラスミド精製、シーケンシングを行った。それぞれは前述の通りに行った。

2-2-7. 3' 末端配列の決定

3' 末端の配列を決定するために、SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いた。

cDNA 合成

1.6 µg Total RNA に 1 µl 3'-CDS primerA (50 µM)、4 µl dNTP mix (2.5 µM) を加え、最終量が 13 µl になるように Ultra Pure Distilled Water (DNase, RNase Free) で調節した。そのサンプルを 65 °C で 15 分間、静置した後、2 分間以上氷上で静置した。その後、サンプルに 4 µl 5×First Strand Buffer、1 µl 0.1 M DTT、2 µl SuperScriptIII (200 U/µl) を加え、ピペッティングで混和した。サンプルを 55 °C で 90 分間、70 °C で 15 分間、静置した。静置後、サンプルに 80 µl TE Buffer を加え、-20 °C で保存した。

Touch down PCR

合成した cDNA 断片から 3' 末端の配列を増幅するために Touch down PCR を行った。Touch down PCR は前述の通りに行った。用いたプライマーは以下に示す。

Primer

EPPase 3'-RACE : 5'-CGTGAGTCAGCCGAGCAGTACTAT-3'

(Reverse は SMART RACE cDNA Amplification kit 内のものを使用)

得られた PCR 産物はアガロースゲル電気泳動にかけ、Mini Elute Gel Extraction kit を用いて精製し、TA クローニング、Transformation、プラスミド精製、シーケンシングを行った。それぞれは前述の通りに行った。

2-2-8. EPPase の分子系統学的解析

以下に示す設定で、Clustal W (Thompson et al., 1994) を用いてマルチプルアラインメ

ントを行った。用いた生物種とタンパク質については、最後に記した。

Clustal W 設定・条件

○The pairwise alignment parameters

Gap opening penalty : 17.00

Gap extension penalty : 0.1

Identity protein weight matrix

○The multiple alignment parameters

Gap opening penalty : 17.00

Gap extension penalty : 0.2

Delay divergent cutoff : 30%

Gap separation distance : 4

この結果得られたマルチプルアラインメントをもとに、MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011) を使用し、以下の条件で系統樹を作成した。

MEGA 5.05 設定・条件

○Statistical Method : Neighbor-joining

○Phylogeny Test

Test of Phylogeny : Bootstrap method

No. of *Bootstrap Replications* : 100

○Substitution Model

Substitution type : Amino Acid

Model/Method : p-distance

○Data Subset to Use

Gaps/Missing Data Treatment : Pairwise deletion

生物種	タンパク質
<i>Daphnia magna</i>	ecdysone phosphate phosphatase (GI : 402169217)
<i>Daphnia pulex</i>	hypothetical protein DAPPUDRAFT_318481 (GI : 321469372)
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	PREDICTED: protein UBASH3A homolog (GI : 328705576)
<i>Aedes aegypti</i>	hypothetical protein AaeL_AAEL007387 (GI : 157115943)
<i>Drosophila melanogaster</i>	CG13604, isoform B (GI: 161078566)
<i>Bombyx mori</i>	ecdysteroid-phosphate phosphatase (GI : 112982782)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Protein T07F12.1 (GI : 71995934)
<i>Homo sapiens</i>	Cbl-interacting protein Sts-1 variant, partial (GI: 62897245)
<i>Xenopus tropicalis</i>	ubiquitin associated and SH3 domain containing B (GI : 156717782)

Daphnia magna EPPase は本研究で単離した。

2-2-9. リアルタイム RT-PCR

前述の方法で約 2 µg の RNA から cDNA を合成した。装置は Mx3005P (Agilent Technologies)、試薬は SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Invitrogen)、プライマーは以下を用いた。

Primer

EPPase Forward : 5'-GCCGTCTCTTCGCTCCTTAC-3'

EPPase Reverse : 5'-GAATAATCCCGGTTCCAAACAA-3'

EcR-A Forward : 5'-CCATGTCGATGAGGGCAGA-3'

EcR-A Reverse : 5'-CCGAAGGCGGTAAGGTAGAA-3'

EcR-B Forward : 5'-CACCAACAACCAACTGCATTTAC-3'

EcR-B Reverse : 5'-CCATTAATGTCAAGATCCCACA-3'

USP Forward : 5'-TAGGCCACTCGGGTTACTTAAA-3'

USP Reverse : 5'-GATGGGTGGTTAGGTGGATAA-3'

HR3 Forward : 5'-AGCCGGACGTGTCTCTTCA-3'

HR3 Reverse : 5'-ACCTTTGGGCGCATTCTAAC-3'

E75 Forward : 5'-GCTGGCCGAAGACGATAAAG-3'

E75 Reverse : 5'-TTGACCATTCAAGCACAGCA-3'

反応は、1 サンプルに対して 3 回行い平均を出した。反応条件は以下のようにした。

反応条件

50 °C 2 min

95 °C 10 min

以下の条件を 40 回繰り返す

95 °C 15 sec

60 °C 1 min

増幅産物は、アガロースゲル電気泳動によってサイズの確認と非特異的なバンドがないかを確認した。また、融解曲線解析によっても増幅産物の確認を行った。発現量は、初期胚の数、もしくは *ribosomal protein gene L32* によって標準化した。

2-2-10. RNA 干渉によるノックダウン

当研究室で所有する HG2 ライン (Kato et al., 2012) のオオミジンコの産卵後 1 時間以内の初期胚に以下の siRNA をそれぞれ 100 μ M、約 0.3 nL 顕微注入した。siRNA の設計には下記のサイトを用いた。

EPPase siRNA : 5'-CAUGGCGAAAGGAUCGACUUCACAUtt-3'

EcR siRNA : 5'- GAUCGAGCUUCCGGUUAACCACUAUAAtt-3'

BLOCK-iT RNAi Designer : <http://rnaidesigner.lifetechnologies.com/rnaiexpress/>

詳細は、Kato et al. (2011) の論文に従い行った。顕微注入後、適宜、蛍光顕微鏡で観察した。

対照となる個体には、無作為に設計し、オオミジンコの遺伝子と一致しない配列であることを BLAST 検索によって確認した以下の siRNA (コントロール siRNA) を EPPase と EcR の siRNA と同様に顕微注入を行った。

Control siRNA : 5'-GGUUUAAGCCGCCUCACAUtt-3'

観察には、蛍光顕微鏡 Leica M165 FC (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を、写真の撮影にはデジタルカラーカメラ Leica DFC500 を使用した (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)。

2-2-11. EcRE コンセンサス配列の検索

EcRE のコンセンサス配列の検索は、Gauhar et al., (2009) を参考にした。以下の EcRE 配列を FASTA 形式に直し、Consensus ソフトウェアでコンセンサス配列のマトリックスを計算させた。

Consensus : <http://stormo.wustl.edu/consensus/html/Html/main.html>

EcRE : 5'-GGTTGAATGAATT-3', 5'-CGGTCATTGGCCG-3', 5'-AGTTCGAGGCACC-3',
5'-GTTTCAGTGAAAG-3', 5'-GGGTCAATAGCCG-3', 5'-CGTTGAATCAATG-3',
5'-ATTTCTTTGAATT-3', 5'-GGTTCAATGCACT-3', 5'-GGGTTCATGCACT-3',
5'-AGTTCAGCGGCTG-3', 5'-AGGTTAATGACCA-3', 5'-AGGTCAGTCACTT-3',

5'-AGTTCATTGGGGT-3', 5'-GGTTAAGTAACT-3', 5'-ATTTTCATTGAATT-3'

(Gauhar et al., 2009、無脊椎動物のホルモン. 1998.)

得られたマトリックスと *HR3*、*E75* 遺伝子配列の上流 (約 3 kbp) について RSA-tools (Hertz & Stormo, 1999) を用いて予測した。

patser : http://rsat.ulb.ac.be/patser_form.cgi

2-3. 結果

2-3-1. オオミジンコにおける *EPPase* 遺伝子の単離

昆虫における *EPPase* は、カイコやショウジョウバエでその存在が確認されている (Davies & Anderson, 2007; Sonobe & Ito, 2009)。しかし、甲殻類における *EPPase* は確認されていなかった。そのため、カイコ *EPPase* のアミノ酸配列を用いて、オオミジンコ EST データベース (Watanabe et al., 2005) で BLAST による関連遺伝子の検索を行った。検索結果より得られた類似配列から PCR プライマーを設計し(*EPPase* 1、*EPPase* 2)、オオミジンコ初期胚 cDNA を用いてクローニングを行った。5' 末端、3' 末端についても配列を決定した。得られた完全長 cDNA と *Daphnia magna* *EPPase* ゲノム配列のマッピングを行った(図 2-1)。ゲノム配列は、オオミジンコ EST データベース (Watanabe et al., 2005) のものを用いた。ゲノム配列の全長は 3292 bp で、完全長 cDNA の長さは、2753 bp であることがわかった (図 2-1)。*EPPase* cDNA は 9 つのエクソンから成り立つことが分かった。図中のエクソン部分の長さは、2738 bp であるが、完全長 cDNA は 2753 bp である。これは、単離した *EPPase* cDNA の最後のエクソン部分に 15 bp の配列の挿入がみられたためである。ゲノム配列を単離したオオミジンコの系統と *EPPase* cDNA 配列を単離したオオミジンコの系統が異なるために、このような違いが表れたと考えられる。先述の通り、完全長 cDNA の長さは 2753 bp であった。ApE (A plasmid Editor) を用いた ORF 解析の結果、コーディング領域は 230 番目のアデニン (A) から始まり、2272 番目のグアニン (G) で

終了する長さが 2043 bp の配列であることがわかった。5' 非翻訳領域の長さは 229 bp、3' 非翻訳領域の長さは 444 bp であった。3' 非翻訳領域内 (2695-2700 番)には poly (A) 付加シグナルと予測される配列 (AATAAT) が 2733 番目から 2738 番目に存在した。コーディング領域から予測されるアミノ酸は、680 個であった (図 2-2)。予測されるアミノ酸配列を NCBI の Specialized BLAST 検索 (Conserved domains; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) にかけた結果、23 番目のロイシン (L) から 56 番目のロイシン (L) に ubiquitin-associated (UBA) ドメインが、107 番目のプロリン (P) から 198 番目のアスパラギン (N) に LigT-like phosphoesterase ドメインが、239 番目のバリン (V) から 297 番目のリシン (K) に Src homology domain 3 (SH3) が、402 番目のアルギニン (R) から 631 番目のバリン (V) に histidine phosphatase (HP) ドメインが保存されていることがわかった。予測されるアミノ酸配列とキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) と カイコ (*Bombyx mori*) EPPase、ヒト Sts-1 タンパク質のアミノ酸配列とアラインメントを行った結果、オオミジンコの EPPase は昆虫の EPPase とヒトの Sts-1 タンパク質 (suppressor of T-cell receptor signaling) と高い相同性をもつことがわかった。UBA ドメインは、キイロショウジョウバエ、カイコ、Sts-1 タンパク質とそれぞれ 79 %、76 %、68 % の相同性を持つことが明らかとなった。LigT-like phosphoesterase ドメインは、29 %、38 %、36 %、SH3 ドメインは、59 %、47 %、49 %、HP ドメインは、52 %、41 %、43 % の相同性を持つことがわかった (図 2-3)。特に触媒領域を持つ HP ドメインでは、脱リン酸化のモチーフ (RHG モチーフ) が存在し (Rigden, 2008)、そのモチーフが 407 番目から 409 番目のアミノ酸に保存されていることが予測された (図 2-4)。予測されるアミノ酸をもとに系統樹を描くと図 2-5 のようになり、甲殻類であるオオミジンコ (*D. magna*)、ミジンコ (*D. pulex*) のもっとも近くに原始的な昆虫である半翅目のエンドウヒゲナガアブラムシ (*A. pisum*) が配置され、ついで比較的高等な昆虫である双翅目のネッタイシマカ (*A. aegypti*)、キイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) が

くる。以上のようなことから、配列については高く保存されていることが確認できた。

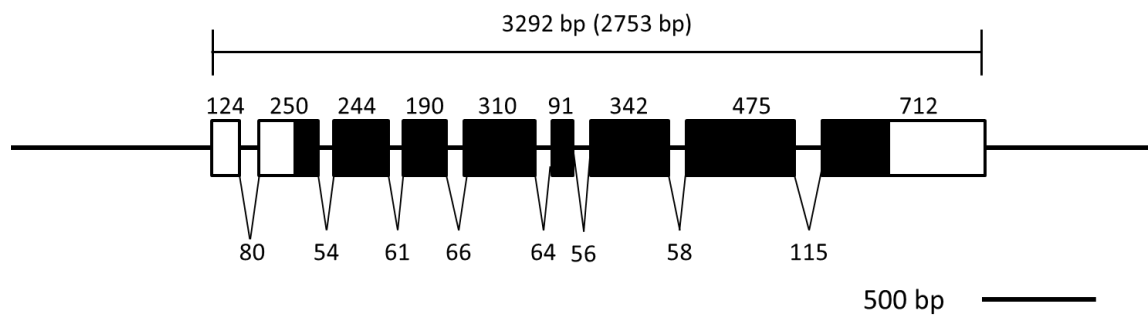


図 2-1. EPPase 遺伝子の構造

エクソンを BOX で表している。白抜き部分は非翻訳領域を、黒の部分はコーディング領域を示す。下の数字はイントロンを示す。

AGATATAACCTAAAGCGAGTGAAGTAATTTGGCAACCGCAATGAAGAGTTAGAAAAAAATAACAGTATGAAGGAAAGATAATGTCATATGCTTTTTC 100
 AAGAGCTCAAGAAAATTTCTTACGTCTACAGAGCCATGTTATCGTCAACGC TACTCGACTTCATTAGGAGGAATAATCAGGAAAATTTGTTGACCGTGG 200
 ACTTTAAATCTTATTTGTGATTATATGCGTTCCATACAAGCCGCAAGTGTTCGTGAGAGACATGGCTGAAC TACCACCCAGGAAGAATGCAACT 300
 M A E L P P R K N A T 11
 CCTACAAGCTGACCAAAATGTTGATCTCCCTCTGAAGGTTCTACTGCAGATGGGTTTTCCGAAGCACAGAGCTGAGAAAGCCCTTGCTGCAACTGGCT 400
 P T K L T K L L I S P L K V L L Q M G F P K H R A E K A L A A T G Y 45
 ATAGAAATGTTCAACTAGCATCGGATGGTGTGGCCACGTAATGACC CAACTTTAGATGACCTACAACCAAGAGAATATCTTCTTACCTATGCCC 500
 R N V Q L A S D W L L A H V N D P T L D D L Q P R E Y L L Y L C P 78
 GTCTGGTTTACTGCAAGTCAGCTGCAGGAATTTGGGCCAGATCGGCAGAGAAGATGTGGTGAAGATGGCGCCATGAGTTCCTACCCCATGCTACTTA 600
 S G L L Q S Q L Q E F W A R S A E E C G R N G A H E F L P H V T L 111
 GTTCCCCCTTTAAGGTACCTGATAGTGTGCTTCCAGTATTGTGAGCCTTCTGGAAGGATTGCTGAGCATGAAAATCAACCCATTCTGAATTGAGGC 700
 V P P F K V P D S A V P S I V S L L E R I A E H E N Q P I P E L R L 145
 TAGAAATCTATATTTCCAAAATTTTATGGGTTCTTCTCAATCAAGATTCGCTGAAGTCATTAAGTCGTGGCGTCCGGTTTGCCAGAGAATTAGC 800
 E T Y I S Q N F M G F F L N Q D S A E V I K V V A S R F A R E L A 178
 TCAATAAATCTGAGCAGAGGCCACACGCAAGCTTGCATTTGACATTGGCTTACAATTTCTTCTGGTCAATACAGTACGCTAGAATATCTAGTA 900
 Q I N I A A E A H T Q A L H L T L A Y N F P S G Q Y S T L E Y L V 211
 AGAAACATAAACCCCAACACCGACGCTTCCACTGGCACTGCGTCTATATTCAGAGATATCGCCTGTCCGGGAAGAGGTGTACAAGGTCTATCTCC 1000
 R N I N P N T D A S H W Q L R L Y S R D I R L S G K K V Y K V I F P 245
 CGCAGCTTCCACGAGAACTGACGAGTTGGAACGCTTCTAGGTGATTTCTGTTATGTCGATCGGAAGCATGTAATAATTCATAGACGGATGGATAGA 1100
 H V P R E T D E L E L L L G D F V Y V D P E A C N N S I D G W I E 278
 AGGCATCTCTTGGCTTACTGGTGTTCGGGTTTCTTACCAAAAACTACGTTGAAAAACCGCGAATCAGACGCTTGACCCCTACACAAGAGCTAGAA 1200
 G I S W L T G C S G F L P K N Y V E K T A E S D A W T L H K S V E 311
 CTGAATCTATCGCTGATGAACGGAGAAATAGACGGCGTGTGAGTATGAGTATCAAGCCCTCAGACTGTTGAATCAAAATGTCACCGGAATGGGCT 1300
 L N L S A D E L D E I D G V S A S S D Q A L R L L N Q M S P E L G C 345
 GCAACATGACACAAATTCGACAGGGATCAGC CACTAGCACAGAGTAGTGTGTTGGTGGC CAACGGAGCTTCCAAATGTACAGAAAATGACCAA 1400
 N N D T N S H R D Q P T S T R V V A V R P T E L S K C T E N Y A N 378
 TTTCAATTTGGATATGGCTGGATGTCTCAGTGGTGAACGACCTTACGCTTCAAAACAGGACCTCGGCGATTGTTATAGTGCCTGCGCAAGG 1500
 F N L D M A G L S P V V E R P L A F K Q G P R R L F I V R H G E R 411
 ATCGACTTCACATTTGGTACATGGATACCTTACTGCTTCGATGAACGGGAAGTACGTTGAAAGGATTAAATATGCCGTTGAGCGTTCCCAAGCGAC 1600
 I D F T F G T W I P Y C F D E T G K Y V R K D L N M P L S V P K R Q 445
 AAGGATCACCCGAATCTGTTCTACAGGATTGCCCACTAACCATATTGGGGAAACGCAAGCGGACTTTAGGCCAAGCTTTCGCTGCGGTTGGCGGATC 1700
 G S P E S F Y K D C P L T I L G E T Q A G L L G Q A L R A V G G S 478
 CAACAGGATTCAGCAGCTTACTGCTCGCGTCTTCTCGCTCTTACAGACTTGTCAAAATATTTGAAAGGCCTCGAGATTGAGCACTCTGTACCCATT 1800
 N R I Q H V Y C S P S L R S L Q T C Q N I L K G L E I E H S V P I 511
 TGTTTGGAACCGGATTATTCGAATGGTGGTGGTACCAAGATTCATGCTCAGTTTATGACTCCATCAGAGATGCTCGATGCCGTTCCGCTGTGC 1900
 C L E P G L F E W L V W Y Q D S M P Q F M T P S E M L D A G F R L R 545
 GTGAGAATCATCAGTACTTTTACTGTTTACGAGCTTTCGATCGGCGTGAAGTACGCGGAGTACTATATGCTTCACATTACGTACCCCAATGCGC 2000
 E N H Q Y F I D F S E L S D R R E S A E Q Y Y M R S H Y V T Q C A 578
 TCTTCGTGCACCGAGCATATCGGTGAGAGCTCTTCTCATTGGACATGCCTCAACGCTGGATGCATGTTGCGGACAACGTTGGGGGATTACCGGCA 2100
 L R C T E H I G G D V L L I G H A S T L D A C S R Q L V G G L P R 611
 TCCGCCAAGAGCTATCCGGAATCGTCATCGGATCCCTTACTGAGTTTGGTGCCTGCAACAGTGTCTTCAGAAAGTCTTCGCTCGATGATTAC 2200
 S A Q E L S R I V H R I P Y C S L A A V Q Q C L P E E S S L D D S P 645
 CCGACGAGACGGGCGAGTAATAAAATCAATGGAAGTTGATTGAACGCGCTGCTCCTCTATGACTTATCCGCCAATTTGCGTTTGTGGAACAACTTT 2300
 D E T G S N K I K W K L I E P P V P P M T Y S A N L R F D W Q T L 678
 ACTTCTTAGCGGTGCGCCACCATTTGCAACCTATATATTTAACAAGAACATCAGAACTCAACGGGAACAGAAGATTGCGATTTATGCGAGGTAGTATG 2400
 L P * 680
 CAACATCTCTTCTTAAATCGAGTTCAAAAGTGATTTTTTTTTTCAACAAAACCAACGAAATCTCTCTTTTAAACATACCAATAGTACGCGAAT 2500
 CAAATAGTACGGAATCTTTGTTATCAAGTCGCGTTTCAAGTTTATTGGAAGAAAGAAACCTTTCTTTTAAATGGGTTGTTTTTTTGTCT 2600
 GCCTTCTTGTGTTGATCTGTTGTTGACGCAATGTGACCTGTACGAAACATAGAAGTGTATGACACGGAATGTTGAATCACCCGTCCTCTTTTTAA 2700
 GCTTTAATTTACTCCTAAGTGCAAGGAATGGATAATACATATTGTAGATTGC 2753

図 2-2. EPPase cDNA 配列と予測されるアミノ酸配列

オオミジンコから単離された EPPase 遺伝子とそれから予測されるアミノ酸配列。■ が UBA ドメイン、
 ■ が LigT ドメイン、□ が SH3 ドメイン、□ が HP ドメイン、□ が poly(A)付加シグナルを示す。

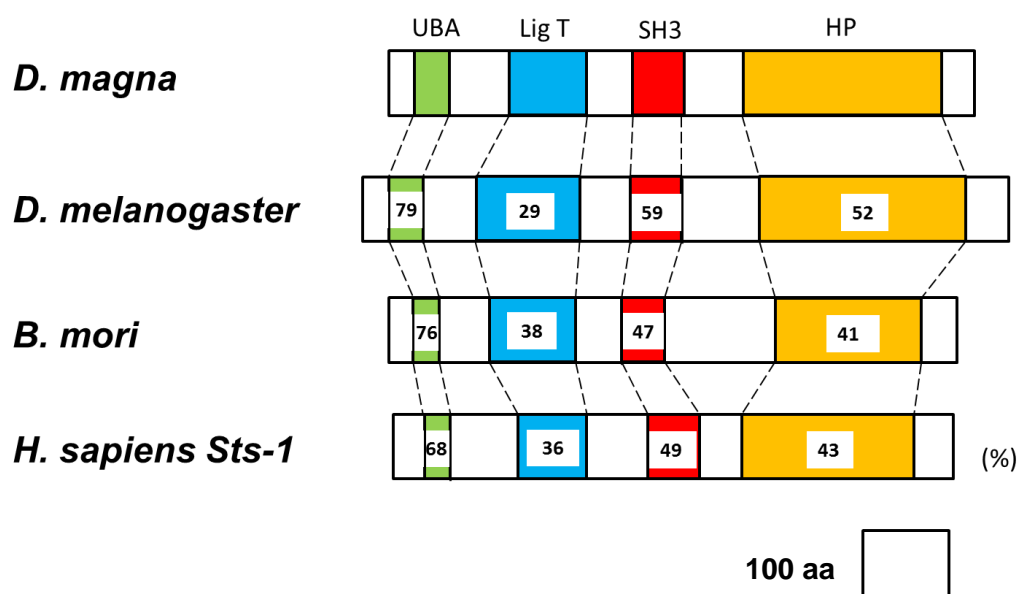


図 2-3. オオミジンコ EPPase と昆虫とヒトのオーソログのドメイン構造比較

キイロシヨウジョウバエ (*D. melanogaster*)、カイコ (*B. mori*) とヒト (*H. sapiens*) のオーソログを比較した。白抜き部分の数字は、オオミジンコにおけるドメインとの相同性を示す。それぞれのオーソログのドメインとオオミジンコ EPPase のドメインでのアミノ酸の一致率を示してある。

<i>D. magna</i>	RLFI ^{***} VRHGER	IDFTFGT-WI	PYCFDETGKY	VRKDLNMPLS	VPKRQGSPES
<i>D. melanogaster</i>	KIYIMRHGER	VDFTFGT-WI	PYCFDEFGNY	MRKDLNMPKT	LPRRKNSPEG
<i>B. mori</i>	WVFAPRHGER	VDLTYP-WV	PICF-NDTY	VRKDLNPLK	LAHRAGGKGG
<i>H. sapiens Sts-1</i>	-LFCRHGER	MDVVF [*] GKYWL	SQCFDAKGRY	IRTNLNMPHS	LPQRS [*] GGFRD
<i>D. magna</i>	FYKDCPLTIL	GETQAGLLGQ	ALRAVGGSNR	IQHIVYCPSL	RSLQTCQNIL
<i>D. melanogaster</i>	WQNDSPLTNV	GVYQANLIGQ	AL--LEAQVQ	IDHIVYCPSY	RCIQTCT [*] SAL
<i>B. mori</i>	YVKDTPLTRL	GNFQALLVGE	GMRMAGVS--	IKHIVYASPAL	RCVETAQGF [*] L
<i>H. sapiens Sts-1</i>	YEKDAPIITVF	GCMQARLVGE	AL--LESNTI	IDRVYCPSL	RCVQTAHNIL
<i>D. magna</i>	KGLEIEHSVP	ICLEPGLFEW	LVWYQDS-MP	QFMT [*] PSEM [*] LD	AGFRLRENHQ
<i>D. melanogaster</i>	EGLKLTGKQK	IKLEPGLFEW	MAWYPSG-VP	DWLT [*] KNELTE	AKFDV [*] DL [*] DYE
<i>B. mori</i>	DGLRADPSVK	IKVEPGLFEF	KNWHMPK-GI	DFMTPIELCK	AGLNVD [*] MTYK
<i>H. sapiens Sts-1</i>	KGLQQENHLK	IRVEPGLFEW	TKWVAGSTLP	AWIPPS [*] ELAA	ANLSVD [*] TTYR
<i>D. magna</i>	YFIDFSELS [*] D	R-RESAEQYY	MRSHYVTQCA	LRCTEHIGGD	VLLIGHASTL
<i>D. melanogaster</i>	PVQPASELTA	RLKESTEQFY	ERNHDVI---	LQLLEQTTGN	ILVVAHATT [*] L
<i>B. mori</i>	PYVAM----D	ASAETMDEFF	KRGEVAMQAA	VNDTEKDGGN	VIFIGHAIT [*] L
<i>H. sapiens Sts-1</i>	PHIPISKLV-	-VSESYDTYI	SRSFQVTKEI	ISECKSKGN	ILIVAHASSL
<i>D. magna</i>	DACSRQLVGG	LPRSAQELSR	IVHRIPYCSL	AAV	
<i>D. melanogaster</i>	-----	-----	-----	---	
<i>B. mori</i>	D----QMVGA	LHRLRDD--	-----	---	
<i>H. sapiens Sts-1</i>	EACTCOLQG	SPQNSKDF--	-----	---	

図 2-4. HP ドメインのアミノ酸アラインメント

オオミジンコ EPPase とキイロショウジョウバエ、カイコ、ヒトのオーソログにおける Histidine phosphatase ドメインのアミノ酸配列のアラインメントを示した。黒の BOX は一致しているアミノ酸を、赤字は同じ性質をもつアミノ酸を示す。脱リン酸化モチーフは*で示した。

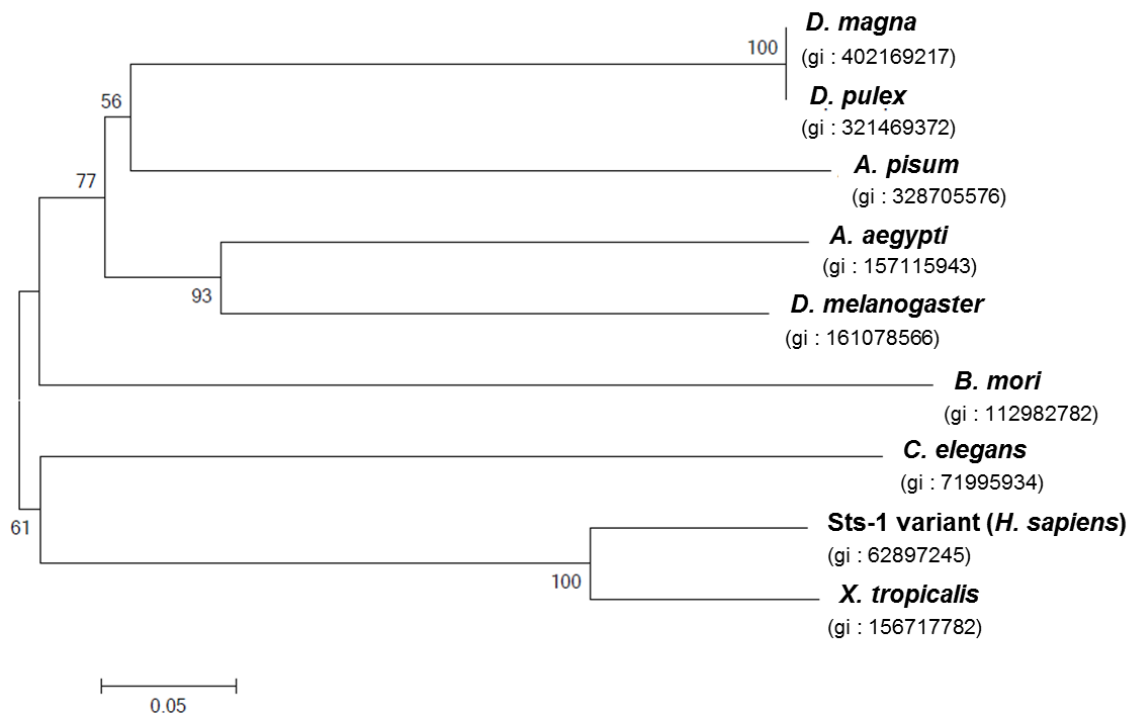


図 2-5. EPPase HP domain での分子系統樹

根の部分はブートストラップ値を示す。図、上より、オオミジンコ、ミジンコ、エンドウヒゲナガアブラムシ、ネッタイシマカ、キイロショウジョウバエ、カイコ、線虫、ヒト Sts-1 タンパク質、アフリカツメガエルの順で並んでいる。

2-3-2. EPPase 遺伝子の発現解析

昆虫では、EPPase は産卵後の卵で、不活性型のエクジステロイドを活性型に転換するために用いられることが分かっている。EPPase の機能が甲殻類についても保存されているかを確かめるため、mRNA の発現解析、siRNA によるノックダウンを試みた。リアルタイム PCR を用いて、初期胚発生における EPPase mRNA 量の変動を解析した (図 2-6)。その結果、産卵直後から EPPase の mRNA の発現が観察され、その発現は産卵後 9 時間までに一度落ちるものの、その後は一定量発現していた。休眠卵と非休眠卵での EPPase mRNA の発現量は、非休眠卵ではるかに高いことを示した (図 2-7)。次に、オオミジンコ初期胚において、EPPase が機能しているかを調べるために EPPase siRNA を設計し、産卵直後

の HG2 系統(Kato et al., 2012)の初期胚に顕微注入を行った (図 2-8)。EPPase siRNA は 1489 番目から 1513 番目の塩基配列を標的とした。この領域は、脱リン酸化反応に関与する HP ドメイン部分であるという理由から選定した。HG2 系統を用いた理由は、野生型のオオミジンコ初期胚では、図 2-9 のように産卵後 24 時間で一度脱皮をむかえるまでは、初期胚の形態におおよそ変化がなく、観察が困難であるためである。HG2 系統は、GFP が核へと局在化することで、胚発生の様子の観察が可能であった。予備実験より、EPPase siRNA の顕微注入後、3、6、9 時間を観察することとした。EPPase siRNA の HG2 系統への顕微注入の結果、産卵後 3・6 時間では、コントロール siRNA を顕微注入した初期胚 (図 2-8, 3 h と 6 h, 写真左上, Ctl.) との差は見られなかった。しかし、産卵後 9 時間では、コントロール siRNA 顕微注入した初期胚 (図 2-8, 9 h, 写真左上, Ctl.) は、順調に発生が進行しているのに対し、EPPase siRNA を顕微注入した初期胚では、発生が停止している様子が観察された。これは、顕微注入を行った 10 個体全てにおいて、同様の結果が観察された。EPPase siRNA の顕微注入を行った初期胚では、胚発生の停止後、GFP シグナルが初期胚中で偏る様子が観察された。これは、オオミジンコの卵割様式が表割であることに起因すると考えられる。

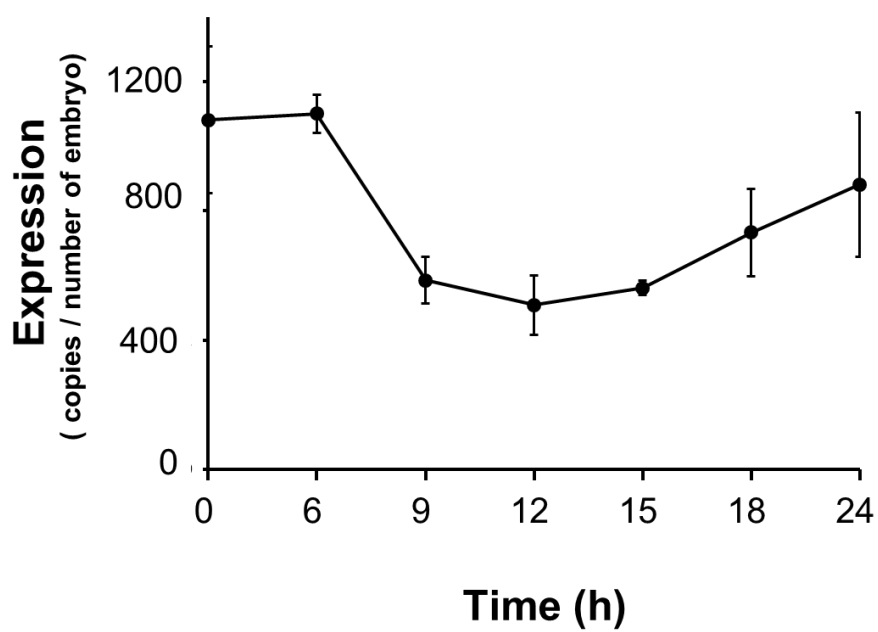


図 2-6. オオミジンコ初期胚での EPPase mRNA 発現

それぞれの時間での初期胚から EPPase mRNA の発現をリアルタイム PCR を用いて測定した。

EPPase mRNA の発現は、初期胚の数で標準化した。産卵直後の卵を 0 時間とした。

n=3

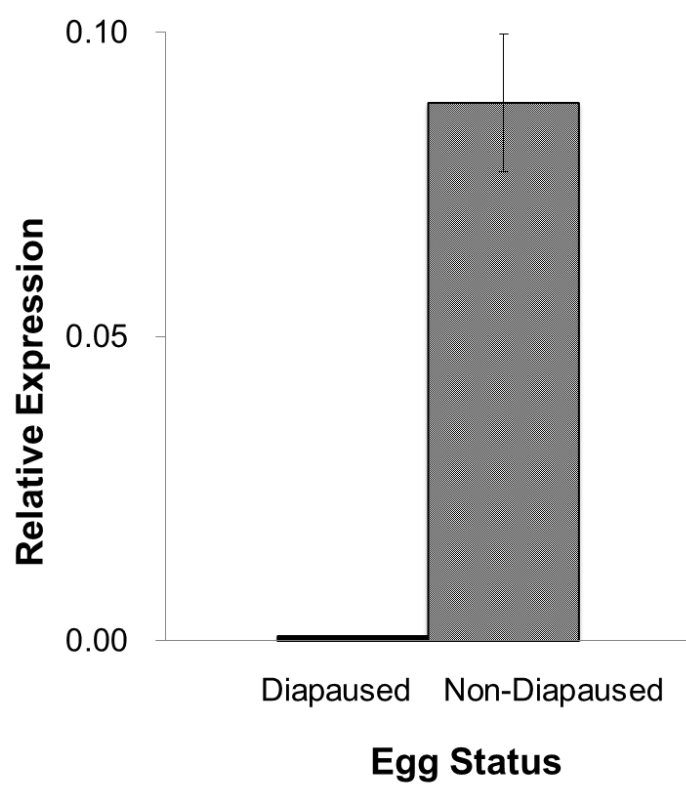


図 2-7. 休眠卵・非休眠卵での EPPase mRNA 発現量

同ステージの休眠卵・非休眠卵から EPPase mRNA と *L32* の発現をリアルタイム PCR を用いて測定した。EPPase mRNA の発現は、*L32* で標準化した。n=3

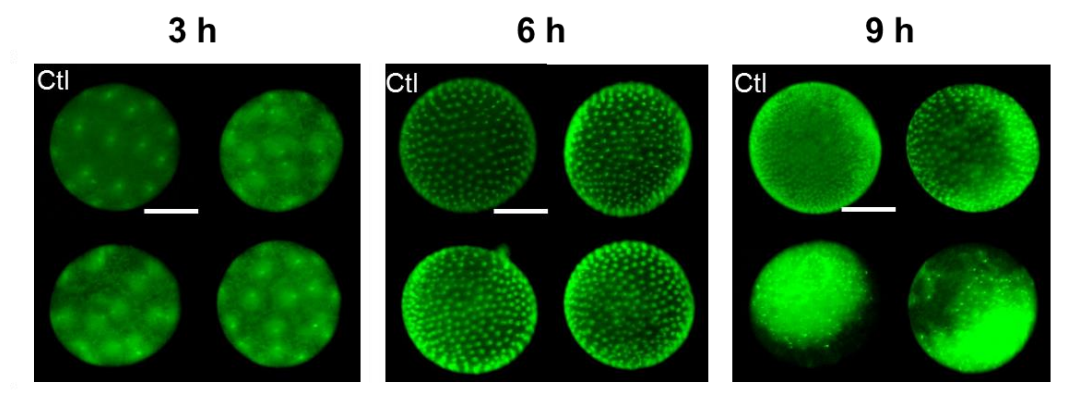


図 2-8. EPPase siRNA によるノックダウン結果

EPPase siRNA を産卵直後の遺伝子組み換え体 (HG2 ライン) の初期胚に顕微注入した。写真上に顕微注入後の時間を示してある。4 つ並べた写真はそれぞれ別の初期胚で、左上 (Ctl.) は、対照として、コントロール siRNA を顕微注入した初期胚である。それ以外の 3 つの初期胚が EPPase siRNA を顕微注入した初期胚である。対照の写真中の白の直線が 250 μm を示す。核に局在化した GFP によって細胞分裂の様子が観察できる。写真は、顕微注入後、3、6、9 時間に撮影を行ったものである。

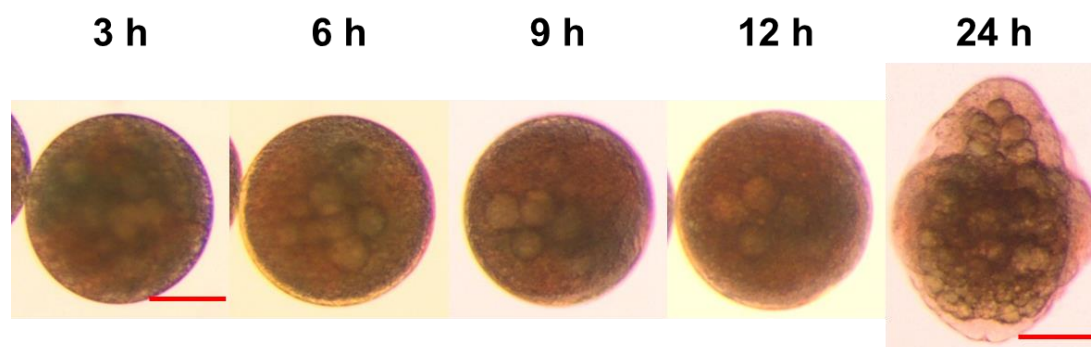


図 2-9. オオミジンコ初期胚発生 (野生型)

野生型のオオミジンコ初期胚発生の様子。写真上に産卵後の時間を示してある。産卵後 3、24 時間の写真中の赤の直線は、250 μm を示す。産卵後 3-12 時間まで見てわかる変化はない。24 時間で 1 度脱皮すること、成長していることがわかるようになる。

2-3-3. エクジステロイド受容体遺伝子の発現解析

エクジステロイドが目的遺伝子の発現を誘導するためには、いくつかの過程が存在する。まず、エクジステロイドの機能的受容体となる Ecdysteroid receptor (EcR) と Ultraspiracle (USP) がヘテロダイマーを形成し、次に、そのヘテロダイマーにエクジステロイドが結合する。そして、エクジステロイドが結合し、形成された複合体が Ecdysteroid response elements (EcRE) に結合することで、EcRE の下流に存在する目的遺伝子の発現が促される。これらの一連の反応は、エクジステロイドの作用について研究の進んでいる昆虫からわかっていることである。甲殻類であるオオミジンコ初期胚についても、同様の機構が働いているかどうかは、解明されていなかった。そのため、初期胚でレポーターアッセイ系を確立するためには、エクジステロイド受容体の発現と機能を確認しておくことが必要であった。

先行の研究からオオミジンコには EcR のサブタイプが 3 つ存在していることが分かっていた (Kato et al., 2007)。EcR-A1 と EcR-A2、EcR-B である(図 2-10)。EcR-A1、EcR-A2 を EcR-A に特異的な配列部分をもとにプライマー (EcR-A Forward、EcR-A Reverse) を作製し、EcR-A として検出することとし、EcR-A、EcR-B の mRNA の発現を確認した。それに加え、USP のリアルタイム PCR のプライマーについてもデザインし (USP Forward、USP Reverse)、胚発生初期段階でのそれぞれの mRNA の発現を確認した。その結果、USP は産卵直後より検出され、その発現は恒常的で、2 つの EcR の発現量よりも高いことが分かった (図 2-11)。それに対し、EcR-A は産卵直後 (0 時間) より発現しており、その発現量は産卵後 3 時間で一度落ちるが、その後は、12 時間まで増加した。EcR-B は、産卵直後は発現していないが、産卵後 6 時間より検出され、9 時間がピークであった (図 2-11)。

また、オオミジンコ初期胚において、EcR が機能しているかを調べるために EcR siRNA を設計し、産卵直後の HG2 系統(Kato et al., 2012)の初期胚に顕微注入を行った (図 2-12)。

EcR siRNA は、EcR-A1、EcR-A2、EcR-B の共通領域であり、DNA 結合ドメインである

部分を標的とした。HG2 系統を用いた理由は、EPPase siRNA 時と同様の理由からである。

予備実験より、EcR siRNA の顕微注入後、8、12、16 時間を観察することとした。EcR siRNA の HG2 系統への顕微注入の結果、産卵後 8 時間では、コントロール siRNA を顕微注入した初期胚との差は見られず、GFP シグナルが非常に多く観察された(図 2-12, 8 h)。これは、順調に細胞分裂が進行していることを示す。産卵後 12 時間経つと、コントロール siRNA 顕微注入初期胚は、写真上に示す赤の点線部分に右の模式図のように器官が形成する様子が観察できた(図 2-12, 12 h, Ctl.)。それに対して EcR siRNA 顕微注入した初期胚では、顕微注入後 8 時間と比べると、GFP シグナルの様子に変化があるものの、器官の形成は観察されなかった(図 2-12, 12 h, 写真下)。産卵後 16 時間では、コントロール siRNA 顕微注入初期胚は、写真上に示す赤の点線部分に右の模式図のように器官が形成され、それは、産卵後 12 時間よりも進行していた(図 2-12, 16 h, Ctl.)。EcR siRNA 顕微注入した初期胚では、GFP シグナルが観察できるものの、器官は観察できなかった(図 2-12, 16 h, 写真下)。

このことから EcR siRNA を顕微注入した初期胚は顕微注入後 12 時間で発生が停止した。

同様の結果が、EcR siRNA の顕微注入を行った 9 個体全てにおいて、観察された。EcR siRNA の顕微注入個体とコントロール siRNA の顕微注入個体の顕微注入後 6 時間での EcR-A の mRNA と EcR-B の mRNA 発現量をリアルタイム PCR を用いて、比較を行った。

その結果、EcR siRNA を顕微注入した個体での EcR-A の mRNA 発現量は、コントロール siRNA を顕微注入した個体の約 3.7 分の 1 であった(資料未記載)。また、EcR siRNA を顕微注入した個体での EcR-B の mRNA 発現量は、コントロール siRNA を顕微注入した個体の約 11.6 分の 1 であった(資料未記載)。以上のようなことから、設計した EcR siRNA は、EcR-A、EcR-B の発現を抑制したと考えられる。

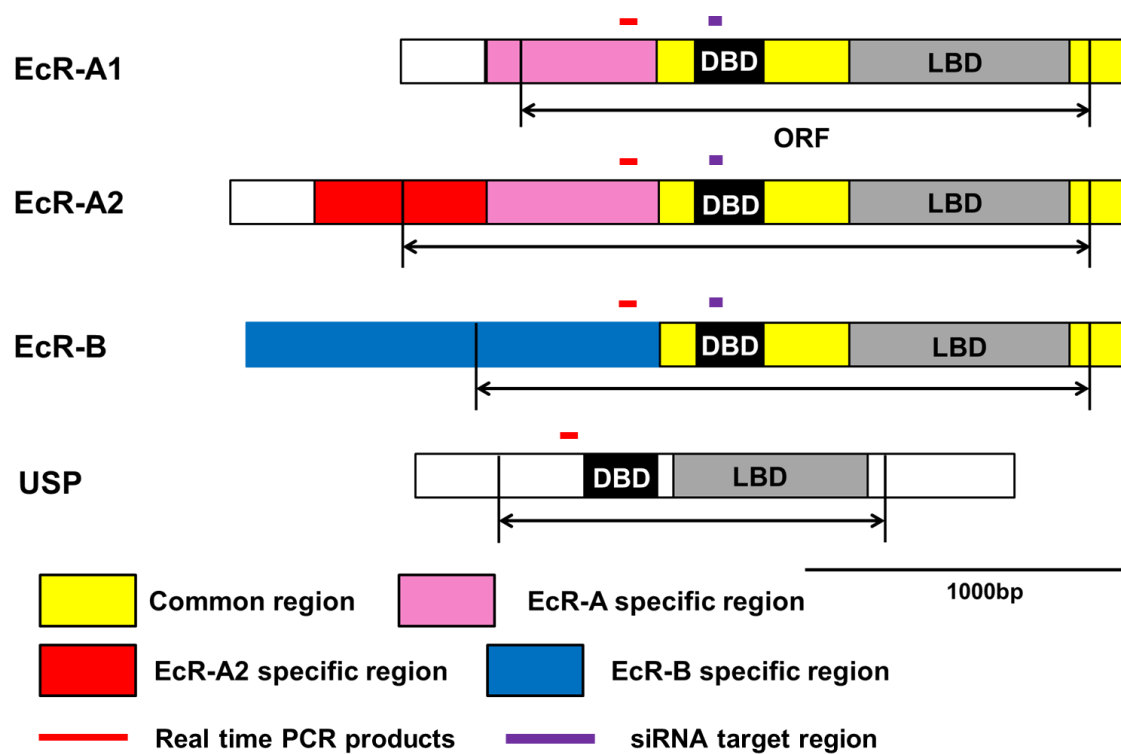


図 2-10. EcR-A1、EcR-A2、EcR-B と USP の構造

オオミジンコ EcR-A1、EcR-A2、EcR-B と USP の構造を図示した(Kato et al. (2007)改変)。EcR-A の PCR 産物は 102 bp、EcR-B の PCR 産物は 116 bp、USP の PCR 産物は 71 bp である。

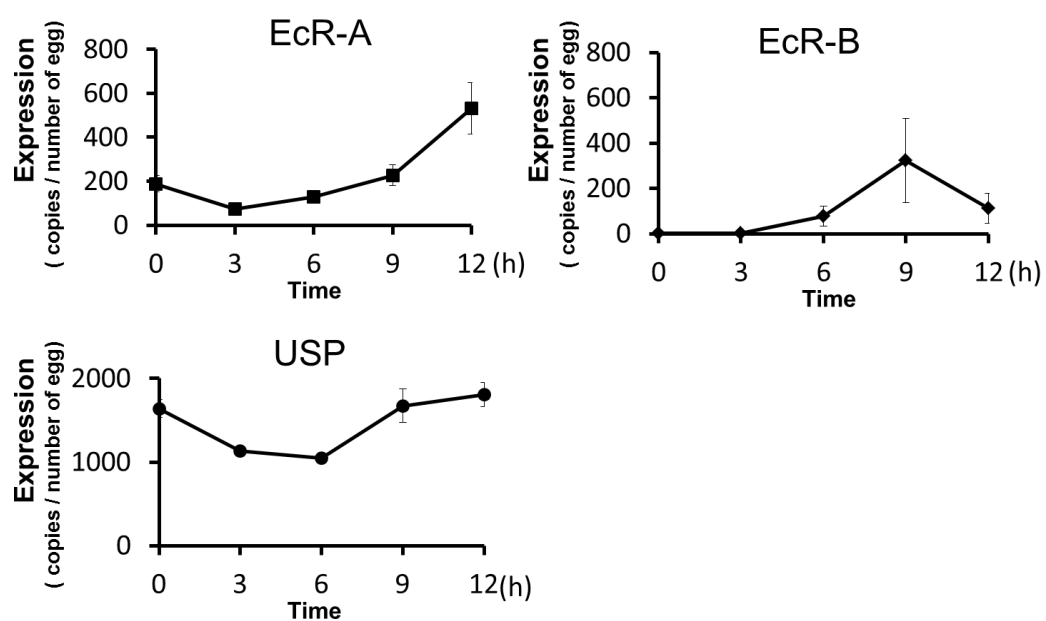


図 2-11. オオミジンコ初期胚での EcR-A、EcR-B、USP の mRNA 発現量

それぞれの時間での初期胚から EcR-A、EcR-B、USP mRNA の発現をリアルタイム PCR を用いて測定した。それぞれの mRNA の発現は、初期胚の数で標準化をした。産卵直後の初期胚を 0 時間とした。n=3

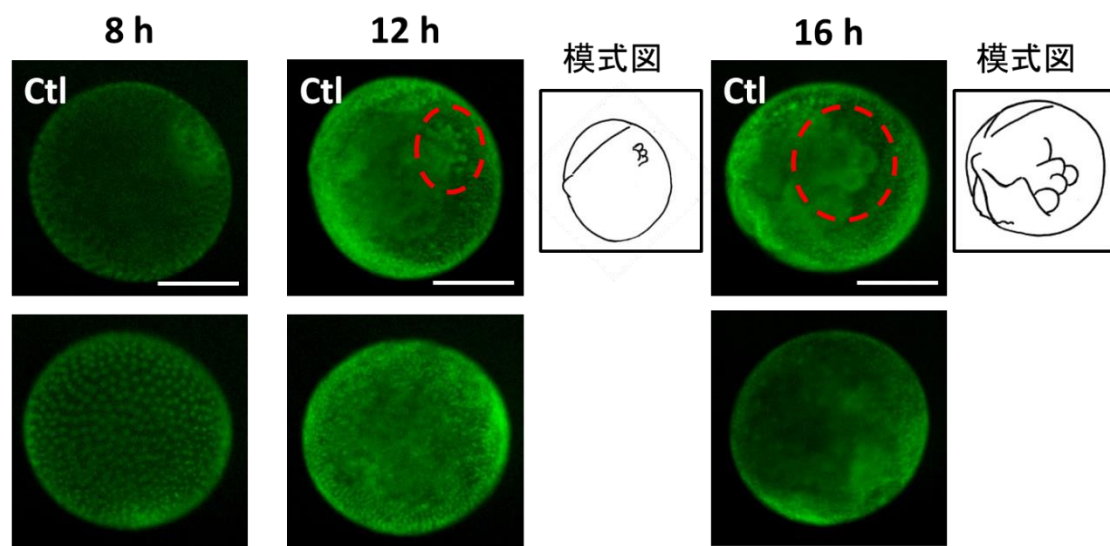


図 2-12. EcR siRNA によるノックダウン結果

EcR siRNA を産卵直後の遺伝子組み換え体 (HG2 ライン) の初期胚に顕微注入した。図上に顕微注入後の時間を示してある。上の写真 (Ctl.) が、対照として、コントロール siRNA を顕微注入した初期胚であり、下の写真が、EcR siRNA を顕微注入した初期胚である。対照の写真中の白の直線が 250 μm を示す。核に局在化した GFP によって細胞分裂の様子が観察できる。写真は、蛍光顕微鏡を用いて、顕微注入後、8、12、16 時間に撮影を行った。対照となる siRNA を顕微注入した初期胚 (Ctl.) では、赤の点線で囲った部分に時間が経つにつれて器官が形成される様子が観察できる。右に形成中の器官を模式図として示した。

2-3-4. 初期応答遺伝子の発現解析

エクジステロイドの初期応答遺伝子である*HR3*、*E75*の発現時期を確認し、エクジステロイドによるシグナル伝達の有無を確認しようとした。その結果、*HR3* のmRNA発現は産卵直後より検出され、その発現量は産卵後 6 時間を境に上昇し、9 時間がピークであった。*E75*のmRNA発現は、産卵後 6 時間から検出され、*HR3*のmRNAの発現と同様に 9 時間が発現のピークであった (図2-13)。初期応答遺伝子である*HR3*と*E75*がともにオオミジンコでも存在することをリアルタイムPCRを用いて確認できた。これらの発現が E-EcR-USP が EcRE に結合したことによるものかを確認するために、エクジステロイドのアンタゴニストである Cucurbitacin B のオオミジンコ初期胚への曝露を行った。Cucurbitacin B は、主にウリ科で単離されるトリテルペノイド系に属する化合物であり、Cuc. B を含む植物は、殺虫作用を持つことで知られる(Miro, 1995)。キイロショウジョウバエのEcRE (*hsp27*)、EcR、USPを用いたゲルシフトアッセイの結果、20E、Cuc. B どちらも加えない際に検出できたバンドの濃さを100%とすると、20E 1 μ M、Cuc. B 100 μ Mを加えた際に検出できたバンドの濃さは51%まで下がった(Dinan et al., 1997)。このことからCuc. B はエクジステロイドに対してアンタゴニスト作用を持つ物質であると考えられている。予備実験の結果から、10 nM Cucurbitacin B を産卵直後のオオミジンコ初期胚に曝露し、9 時間後、*HR3* のmRNA発現量を確認した (図2-14)。産卵後 9 時間の初期胚を選んだ理由は、*HR3*のmRNA発現量のピークが産卵後 9 時間であったためである。その結果、Cucurbitacin B を曝露したオオミジンコ初期胚では、*HR3*のmRNAの発現量が約5分の1になっていた。

オオミジンコの*HR3*、*E75*遺伝子上流にEcREが存在するかを確かめるため、Gauhar et al., (2009) の論文を参照し、EcREコンセンサス配列の検索を行った。EcREの配列は、ショウジョウバエのものを用いて推測した。その結果、*HR3*、*E75*遺伝子上流に図2-15のような配列が見つかった。

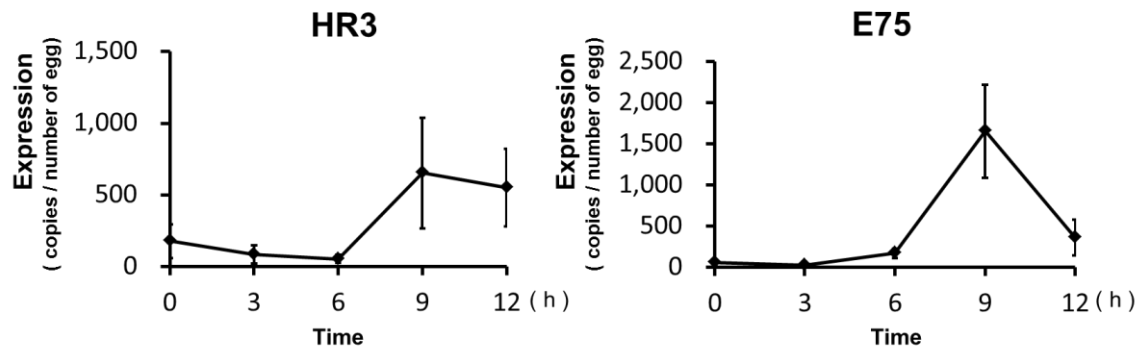


図 2-13. オオミジンコ初期胚での HR3、E75 mRNA 発現量

それぞれの時間での初期胚から HR3、E75 mRNA の発現をリアルタイム PCR を用いて測定した。それぞれの mRNA の発現は、初期胚の数で標準化した。産卵直後の初期胚を 0 時間とした。n=3

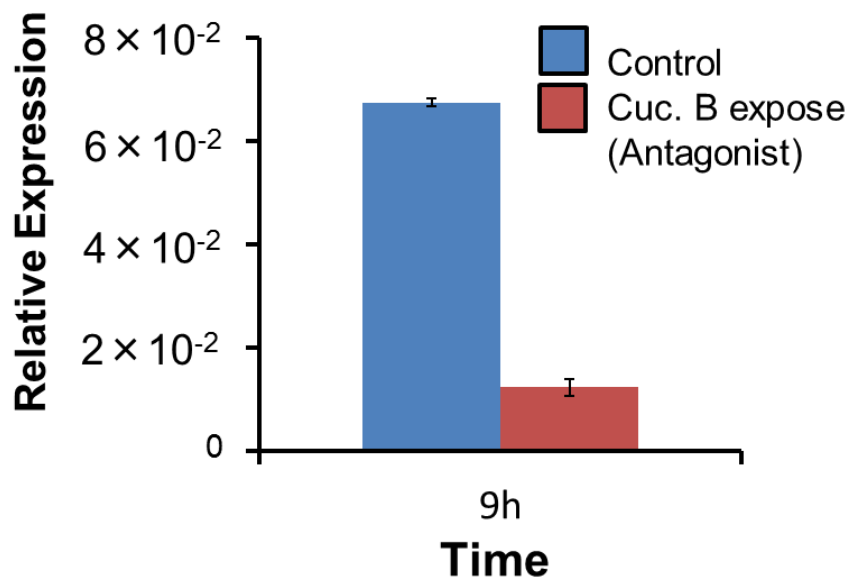


図 2-14. HR3 mRNA 発現量の Cuc. B 曝露個体との比較

アンタゴニストを曝露した初期胚 (Cuc. B expose) と、対照となる初期胚 (Control) から HR3 mRNA と *L32* の発現をリアルタイム PCR を用いて測定した。HR3 mRNA の発現は、*L32* で標準化した。n=3

EcRE core sequence		GGGTTCAA-TGCACT
HR3	-592	AGG-TCAA-TGGACT
E75	-1185	-AGTTCAACGGC-CG

図 2-15. EcRE コンセンサス配列

レポーターに使用した EcRE 配列と RSA-tools を用いた結果、*HR3*、*E75* 遺伝子上流に発見したコンセンサス配列をアラインメントした。

2-4. 考察

本章では、初期胚発生におけるエクジステロイドの作用の解明を行った。初期胚においてエクジステロイドによる転写活性の開始に必要と考えられる *EPPase*、*EcR*、*USP* が甲殻類であるオオミジンコにおいても作用を持つか、また、エクジステロイドのシグナル伝達の有無を初期応答遺伝子である *HR3*、*E75* の mRNA の発現から確認しようとした。

EPPase は初期胚発生において、重要な因子の 1 つである。しかし、これまで甲殻類では *EPPase* の機能は確認されていなかった。甲殻類であるオオミジンコにおいても *EPPase* の作用を確認することを目的とし、オオミジンコ初期胚 cDNA より、*EPPase* 遺伝子を単離した。単離された *EPPase* 遺伝子より、予測されるアミノ酸を既に機能の確認されたカイコ、ショウジョウバエの *EPPase* のアミノ酸と比較したところ、その相同性は、30%を超えた。一般に、アミノ酸配列の相同性が 30%を超えるとそれらのタンパク質の構造や機能は、共通の進化起源を持つと考えられる(Wiltgen & Tilz, 2009)。保存されていたドメインの 1 つ、HP ドメインでのアラインメントの結果、脱リン酸化に関与すると考えられるモチーフ (RHG モチーフ) が保存されていた(図 2-4)。さらに、初期胚での *EPPase* mRNA

の発現をみたところ、EPPase mRNA は、産卵直後より発現していた(図 2-6)。カイコでは、ノーザンブロッティングの結果、EPPase の mRNA の発現が検出され始めるのは、産卵後 1 日目の卵であり、この時の卵内の胚は初期原腸胚期にさしかかる(Ryouichi Yamada & Sonobe, 2003)。また、EPPase 活性のピークがみられるのは、産卵後 3 日目の卵である。この時、卵内の胚は内胚葉、外胚葉、中胚葉から器官が形成され始める初期の段階である(Ryouichi Yamada & Sonobe, 2003)。オオミジンコが幼体になるまでにかかる日数が 2 日であるのに対し、カイコが幼虫になるまでにかかる日数は 10 日である。オオミジンコとカイコにおいて、EPPase の mRNA の発現時期が異なる理由は、EPPase の mRNA 発現解析法が、リアルタイム PCR とノーザンブロッティング法と異なるため、一概には言えないが、発生速度の違いによるものと考えられる。また、オオミジンコの休眠卵、非休眠卵での EPPase mRNA の発現を比較すると、非休眠卵での発現が高かった(図 2-7)。これは、非休眠卵では、EPPase が発現し、卵に蓄積されたエクジステロイドのリン酸抱合体が脱リン酸化され、活性型のエクジステロイドが胚発生に関与していることを示す。休眠卵は、活性型のエクジステロイドが生産されず、胚発生のステージが停止したままであると考えられる。最後に、RNAi によって EPPase のノックダウンを行ったところ、その胚発生は停止した(図 2-8)。以上のことから、EPPase がオオミジンコ初期胚発生に必要であるといえる。

エクジステロイドの受容体である EcR と EcR とヘテロダイマーを形成する USP について、その作用の解明を行った。初期胚での EcR のアイソフォーム、EcR-A、EcR-B と USP について mRNA の発現をみたところ、USP の mRNA が恒常的に発現しているのに対し、EcR-A、EcR-B の mRNA の発現には、変化があった(図 2-11)。これは、オオミジンコにおいて、EcR-USP からなる機能的な受容体は、EcR によって転写活性の調節がなされている可能性を示した。次に、RNAi によって EcR のノックダウンを行ったところ、胚発生は停止した(図 2-12)。以上のことから、機能的なエクジステロイド受容体(EcR-USP)がオオミジンコ初期胚発生に必要であるといえる。

本章では、昆虫の胚発生で重要な働きを持つ **EPPase** が甲殻類であるオオミジンコにも存在し、昆虫の **EPPase** と同様の機能を持つことが示唆された。また、オオミジンコの初期胚発生におけるエクジステロイドの初期応答遺伝子の発現によって、**E·EcR·USP** の複合体によるシグナル伝達の有無を解析しようとした。初期応答遺伝子は、すでにオオミジンコで確認された *HR3*、*E75* を用いた。オオミジンコ初期胚での *HR3*、*E75* の mRNA 発現をみたところ、それぞれの発現のピークは産卵後 9 時間であった (図 2-13)。これは、**EcR** の mRNA の発現が産卵後 6 時間以降上昇する結果と対応させると、妥当な結果であると考えられる。さらに、エクジステロイドのアンタゴニストである **Cucurbitacin B** を曝露した初期胚の *HR3* の mRNA の発現は、対照と比べ、約 5 分の 1 になっていた (図 2-14)。これは、エクジステロイドと **Cucurbitacin B** が受容体への結合で競合したため、*HR3* の mRNA の発現が阻害された結果と考えられる。オオミジンコの EST の配列データを用いて、*HR3*、*E75* 遺伝子上流を検索した結果、**EcRE** のコンセンサス配列がみられた (図 2-15)。以上の結果から、オオミジンコ初期胚において、**E·EcR·USP** によるシグナル伝達働いていることが示唆された。このことから、オオミジンコ初期胚においてもエクジステロイドが作用していることが明らかとなった。このため、オオミジンコ初期胚は、レポーターベクターの評価に使用可能であると結論づけた。

第3章 初期胚におけるエクジステロイド応答レポーターの評価

3-1. 緒言

前章でオオミジンコ初期胚において、エクジステロイドの一連の反応に重要となる因子、EPPase、EcR、USP について解析を行った。その結果、オオミジンコ初期胚においても、昆虫と同様にエクジステロイドが作用しており、オオミジンコ初期胚を用いたエクジステロイド応答レポーターベクターの評価が可能であると結論づけた。

核内受容体はモノマー、もしくは、ホモダイマーやヘテロダイマーを形成し (Giguère, 1999)、リガンドとしてのホルモンと結合して転写因子として働く。その複合体は、目的遺伝子上流に存在するであろうホルモン応答配列と結合し、目的遺伝子の転写活性を開始させる。エクジステロイドの場合、核内受容体が EcR-USP 複合体であり、ホルモン応答配列がエクジステロイド応答配列 (EcRE) である。エクジステロイドは、受容体 (EcR-USP) に結合し、E-EcR-USP の複合体が EcRE へと結合することで初期応答遺伝子の発現を促進する。その後、初期応答遺伝子群→後期遺伝子群と順次階層的にその情報を伝えていき、最終的にはエクジステロイドに特異的な応答を引き起こすと考えられている (Thummel, 2002; Yao et al., 1993)。

本章では、E-EcR-USP 複合体が結合する DNA 配列である EcRE を利用し、エクジステロイド応答レポーターベクターを作製し、その評価を行った。具体的には、EcRE の下流にレポーター遺伝子として、GFP 遺伝子を配置したレポーターベクターをオオミジンコ初期胚へと顕微注入し、エクジステロイド依存的な GFP の発現を検出することで、エクジステロイド活性を可視化によって評価することとした。

EcRE は大きくパリンドローム型 (Niedziela-Majka et al., 2000) とダイレトリピート型 (Antoniewski et al., 1996) に分けられる。 *Drosophila* では、パリンドローム型には *heat shock protein gene (hsp27)* (G Riddihough & Pelham, 1987; Guy Riddihough & Pelham, 1986)、 *hsp23*、 *Drosophila Eip28/29* (ecdysone-induced polypeptide)、 *Lsp-2* (larval serum protein)、 *Drosophila Sgs-4* (salivary gland secretion protein) *gene* があり、ダイレトリピート型には *nested gene (ng)* がある (Nakagawa & Henrich, 2009)。エクジステロイド応答レポーターベクターに用いた EcRE は、キイロショウジョウバエ *hsp27* 由来の配列である。これは、既に *in vitro* 実験において、オオミジンコ EcR-USP と活性型のエクジステロイドにより転写活性を促すことが確認されているためである (Kato et al., 2007)。レポーター遺伝子には、H2B-GFP を用いた (Kato et al., 2012)。H2B によって GFP が核へと局在し、観察がよりしやすくなるためである。オオミジンコ初期胚におけるエクジステロイドの局在は、不明であった。そのため、レポーターベクターは、エクジステロイド応答検出領域 (4xEcRE-H2B-GFP) とレポーターベクター局在検出領域 (EF1 α -DsRed2) をもったバイナリーベクターとした。エクジステロイドが存在しない細胞へとレポーターベクターが挿入された場合にも、EF1 α -DsRed (Kato et al., 2012) によってレポーターベクターの局在を検出することが可能である。このようなレポーターベクターを作製し、エクジステロイドの転写活性が検出可能かどうかを、オオミジンコ初期胚へレポーターベクターを様々な条件で顕微注入することで評価した。また、実際に環境試料の試験の際には、曝露が主流となるため、作製したレポーターベクターによって培地に含まれたエクジステロイドの検出が可能かどうかについても評価を行った。

3-2. 実験方法

3-2-1. 動物

前章と同様。

3-2-2. 飼育方法

前章と同様。

3-2-3. 餌

前章と同様。

3-2-4. レポーターベクターの作製

4xEcRE-H2B-GFP プラスミド DNA 作成

4xEcRE-TATA-Luc (Sawatsubashi et al., 2004) と EF1 α -1-H2B-GFP (Kato et al., 2012) を用いた。4つ並んだ EcRE の下流に H2B-GFP 遺伝子を挿入した。3'-UTR は EF1 α -1 のものを使用した。

4xEcRE-H2B-GFP, EF1 α -DsRed2 プラスミド DNA 作成

オオミジンコの *elongation factor 1 α -1* (EF1 α -1) のプロモーター領域 (Kato et al., 2012) 下に赤色蛍光タンパク質(DsRed2) 遺伝子を配置したプラスミド DNA を構築し、上記でできた 4xEcRE-H2B-GFP プラスミドの約 350 bp 下流にそれを挿入した。EF1 α -DsRed2 配列により、プラスミド DNA の局在する領域を DsRed2 の蛍光シグナルによって確認できる。3'-UTR は EF1 α -1 のものを使用した。

全てのプラスミド DNA 作成過程には、In-fusion HD Cloning Kit (Clontech) を使用した。

3-2-5. 顕微注入

顕微注入の方法は、Kato et al. (2011) に従った。共注入の場合、レポーターベクター (62.5 ng/ μ l) と 1.1 mM 20-hydroxyecdysone (Enzo Life Sciences)、もしくは、Cucurbitacin B (SIGMA-ALDRICH) を産卵後 1 時間以内のオオミジンコ初期胚に顕微注

入した。その後、96-well プレートに M4 培地を 100 μ l 添加し、その中で飼育した。その後、適切な時間に観察を行った。曝露実験の場合、レポーターベクター (62.5 ng/ μ l) のみを産卵後 1 時間以内のオオミジンコ初期胚に顕微注入した。その後、96-well プレートに適切な濃度の 20E、もしくは、Cucurbitacin B を溶かした M4 培地を 100 μ l 添加し、その中で飼育した。その後、適切な時間に観察を行った。観察は、前章、2-2-10 に記載した方法で行った。

3-2-6. GFP シグナルの定量化

GFP シグナルの定量化には、ImageJ (National Institutes of Health) を使用した。ImageJ を用いた写真からの蛍光強度の計算方法は、すでに先行研究 (Gavet & Pines, 2010) がなされていた。それを参考に以下の式を用いて GFP シグナルを定量化した。

ミジンコ卵の総蛍光量=ミジンコ卵の全てのピクセルの強度の総量=X

背景の蛍光量=同一写真内の任意の範囲の総蛍光量/ピクセル数=Y

X- (ミジンコの卵の範囲/同一写真内の任意の範囲) \times Y=真のミジンコ卵の総蛍光量

3-3. 結果

3-3-1. レポーターベクターの応答性の評価

前述の通り、エクジステロイドと EcR-USP の複合体が EcRE に結合することで下流の目的遺伝子の発現が活性化される。本実験では、EcRE については、ショウジョウバエ由来のものを使用した。これは、既に *in vitro* 実験において、オオミジンコ EcR-USP と活性型のエクジステロイドにより転写活性を促すことが確認されているためである (Kato et al., 2007)。この EcRE を 4 つ直列に並べた配列の下流に H2B-GFP を挿入した。通常、キイロショウジョウバエのエクジステロイド初期応答遺伝子上流には、EcRE は 1 つのみである。EcRE を 4 つ直列に並べた理由は、E-EcR-USP が結合する EcRE を増やすことで感度を上

げるためである。また、H2B-GFP を用いた理由は、H2B によって GFP が核に局在化されることでより観察しやすくするためである。これによってオオミジンコ初期胚でエクジステロイドが存在した場合、EcRE 下流の H2B-GFP の転写が活性化され、GFP シグナルにより、エクジステロイドの局在が確認できると考えた。また、レポーターベクターの局在を知るために、4xEcRE-H2B-GFP の下流に EF1 α -1-DsRed2 を挿入した。EF1 α -1-DsRed2 の配列により、プラスミドが局在する部分が DsRed のシグナルで確認できる。これは、オオミジンコ初期胚でエクジステロイドの局在に偏りがある可能性を考慮した。EF1 α -1 プロモーターはオオミジンコのどのステージ、どの組織でも発現するプロモーターである (Kato et al., 2012)。そのため、オオミジンコ初期胚でエクジステロイドが存在しない組織にレポーターベクターが導入された場合でも、DsRed のシグナルによってレポーターベクターの局在を知ることができる(図 3-1)。観察時間が 3-4、6-7、9-10、12-13 時間と 1 時間に渡った理由には、レポーターベクターを顕微注入した初期胚の数が多かったということ、レポーターベクターを顕微注入した初期胚を 96-well プレートから観察用のプレパラートへ移動させるのに時間が掛かったということ、1 つの卵につき GFP シグナル用のフィルターと DsRed シグナル用のフィルター、可視光とフィルターを交換しなければならなかったということ、また、GFP シグナルを写真に収めるため、写真でつぶれている部分が無いように露光の条件を 2 条件ずつ撮っていたということが。作製したレポーターベクターをオオミジンコ初期胚に顕微注入した結果、産卵後 6-7 時間より GFP シグナルが検出され、そのシグナルは時間を経るごとに増幅した (図 3-2・Endo)。次に、確認された GFP シグナルがエクジステロイドに起因するものであることを確認するために、エクジステロイドのアンタゴニストである Cucurbitacin B (1.1 mM)を構築したレポーターベクターとともに顕微注入した。その結果、GFP シグナルの検出は、産卵後 9-10 時間まで遅延した (図 3-2・+Cuc. B)。また、その GFP シグナルの範囲は、レポーターベクターのみを顕微注入した時よりも狭いことが観察された。一方、エクジステロイドの 1 つである、20E (1.1 mM)をレ

ポーターベクターとともに初期胚に顕微注入した。その結果、GFP のシグナルは、レポーターベクターのみを顕微注入した時と同様に、顕微注入後 6-7 時間から観察され、その後、蛍光強度とその範囲が増加した。(図 3-2・ +20E)。画像解析ソフトである ImageJ を用いて、それぞれのオオミジンコ初期胚における GFP シグナルの強度を、定量化したところ、図 3-3 のようになった。観察時間全体を通じてレポーターベクターとともに 20E を顕微注入した初期胚での蛍光強度が最も高く、次いでレポーターベクターのみ、最後がレポーターベクターとアンタゴニストである Cuc. B を一緒に顕微注入した個体の写真での蛍光強度という結果になった。以上のようなことから、作製したレポーターベクターは、オオミジンコ初期胚におけるエクジステロイドの活性を検出可能であることが明らかとなった。そのため、エクジステロイドの検出のレポーターベクターとして使用できる。

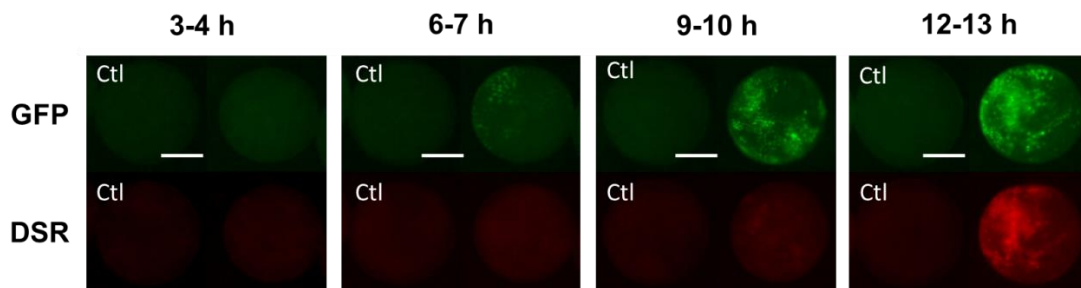


図 3-1. レポーターベクターの局在

オオミジンコ初期胚にレポーターベクターを顕微注入し、レポーターベクターの局在を知るために、顕微注入後 3-4、6-7、9-10、12-13 時間後に蛍光顕微鏡を用いて観察した。対照(Ctl.)は、顕微注入を行っていない初期胚である。対照の写真中の白の直線が 250 μm を示す。写真左、GFP、DSR はそれぞれフィルターセットの名称である。GFP で GFP シグナル (写真上段) を、DSR で DsRed2 シグナル (写真下段) を観察した。顕微注入後 12-13 時間の結果では、顕微注入したレポーターベクターの局在(DsRed)と GFP シグナルの検出領域が同一であることがわかる。

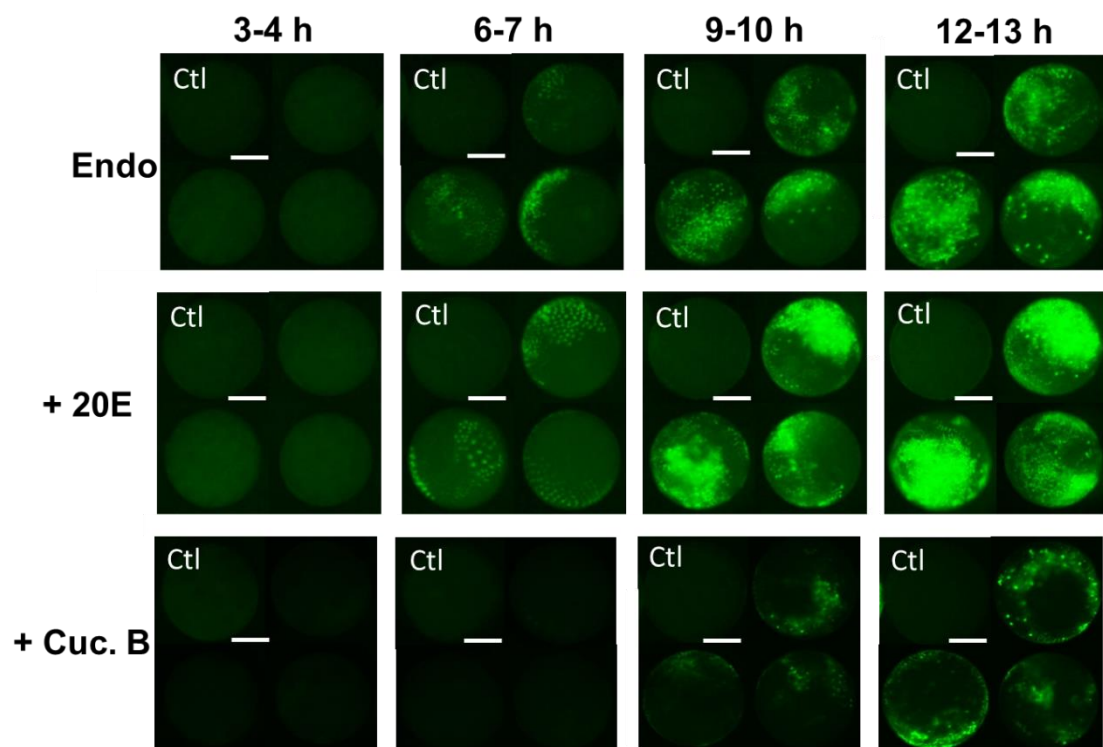


図 3-2. オオミジンコ卵へのレポーターベクターの顕微注入

産卵直後のオオミジンコ初期胚にレポーターベクターを顕微注入し、顕微注入後 3-4、6-7、9-10、12-13 時間後に蛍光顕微鏡を用いて観察した。対照 (Ctl.) は顕微注入を行っていない初期胚である。一番上 (Endo) はレポーターベクターのみをオオミジンコ初期胚に顕微注入した写真である。中央 (+20E) は、20E をレポーターベクターとともに顕微注入した写真、一番下はエクジステロイドのアンタゴニストである Cucurbitacin B とともに顕微注入した写真である。対照の写真中の白の直線が 250 μm を示す。

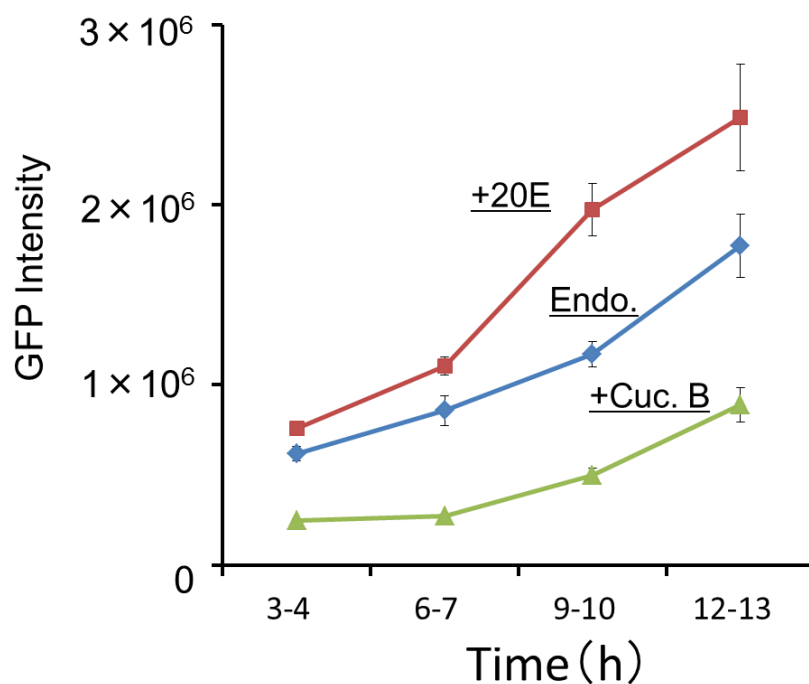


図 3-3. 初期胚における GFP シグナルの定量

図 4 の写真から画像解析ソフトである ImageJ を用いて GFP シグナルを実験方法に書いた手法を用いて定量した。n=3

3-3-2. 曝露によるレポーターベクターの応答性の評価

実際にエクジステロイド検出レポーターベクターとして使用する際には、初期胚へ被験物質を注入するのは、熟練の技を必要とするため、被験物質を含む培地を曝露することの方が簡単で理想的といえる。このため、レポーターベクターを顕微注入したオオミジンコ初期胚の20Eを含む培地への曝露についても実験を行った。レポーターベクターを顕微注入

した初期胚を10 μ M、100 μ M 20Eを含む培地に曝露し、12 時間後に写真を撮影し、それを数値化した結果が図3-3である。10 μ M、100 μ M 20E、どちらにおいても対照 (Ctl.) との有意差がみられた。

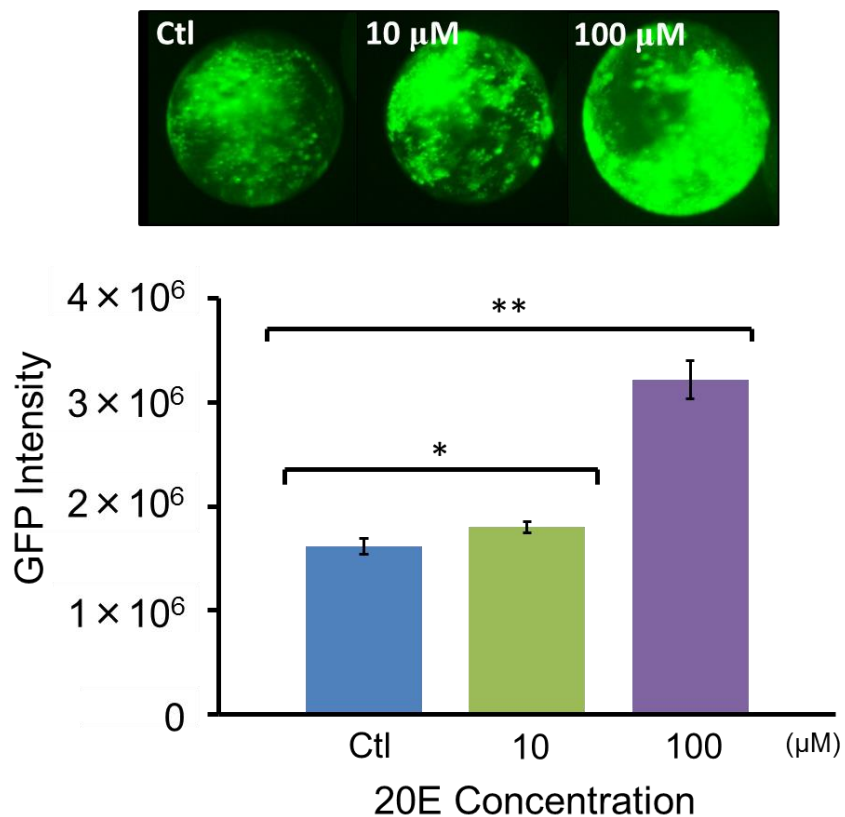


図 3-4. レポーターベクター顕微注入個体による外因性のエクジステロイドへの応答

レポーターベクターを顕微注入したオオミジンコ初期胚を 20E に曝露し、顕微注入後 12 時間で蛍光顕微鏡を用いて撮影を行った。得られた写真から GFP シグナルを定量した。* $p<0.05$, ** $p<0.01$

3-4. 考察

本章では、エクジステロイドによる転写活性を利用したレポーターベクターの構築と評価を行った。具体的には、E-EcR-USP 複合体が結合する配列であるエクジステロイド応答配列 (EcRE) の下流に GFP 遺伝子を挿入したプラスミド DNA を構築し、レポーターベクターとした。このレポーターベクターをオオミジンコ初期胚に顕微注入し、内在性・外在性のエクジステロイドにより、レポーターベクターの評価を行なった。

まず、構築したレポーターベクターのみをオオミジンコ初期胚に顕微注入したところ、GFP のシグナルは、顕微注入後 6 時間より検出され、9 時間でその範囲は大幅に広がった (図 3-2・Endo)。写真の表記はレポーターベクターを用いて、内在性のエクジステロイドを検出しているため、Endo とした。また、20E をレポーターベクターとともに顕微注入した場合でも、GFP シグナルが検出され始めるのは、顕微注入後 6 時間であったが、その後 9 時間ではレポーターベクターを顕微注入した場合よりも GFP シグナルの範囲が広く、また、強度が高かった (図 3-2・+20E)。これは顕微注入されたレポーターベクターが、内在性のエクジステロイドに加え、ともに注入された 20E についても検出していることを示す。顕微注入後 6 時間で GFP シグナルの検出が始まるのは、EcR-B の mRNA 発現と一致している。これは、EcR-B が USP、エクジステロイドと結合し、その複合体がレポーターベクターへと結合して GFP の発現を促しているためと考えられる。また、9 時間で GFP シグナルの検出範囲が広がるのは、初期応答遺伝子である HR3、E75 の mRNA 発現のピークと一致する。EcRE の下流に位置する初期応答遺伝子である HR3、E75 遺伝子の発現のタイミングは、EcRE の下流に挿入されたレポーター遺伝子の H2B-GFP の発現のタイミングと一致すると推測できるためである。アンタゴニストである Cucurbitacin B (Dinan et al., 1997) をレポーターベクターとともに顕微注入すると、GFP シグナルの検出は、顕微注入後 9 時間まで遅れた (図 3-2・+Cuc. B)。これは、顕微注入した Cucurbitacin B が、内在

性のエクジステロイドと競合し、エクジステロイド受容体に結合したために GFP シグナルの検出が遅れ、GFP シグナルの検出範囲が狭まったと考えられる。この結果はエクジステロイド初期応答遺伝子である HR3 の mRNA の発現が Cucurbitacin B 曝露個体では減少した結果と一致する。以上のことから、構築したレポーターベクターによってエクジステロイドによる応答が検出できるということが示された。

実際にバイオアッセイで使用するとなると、曝露されたエクジステロイド様物質に対して応答することが必須となる。そこで、レポーターベクターのみを顕微注入した個体に 20E の曝露を行った。その結果、10 μ M、100 μ M どちらについても、対照 (図 3-4・Ctl.) と比較し、GFP シグナルに有意差があった (図 3-4)。このことから、レポーターベクターは体内・体外、どちらのエクジステロイドに対する応答も可視化できるということが示唆された。

先行の研究より、産卵後 0-15 時間のオオミジンコ初期胚におけるエクジステロイド量は、1 初期胚につき 25 pg であるとラジオイムノアッセイを用いて測定されている。(Kast - Hutcheson et al., 2001; Mu & LeBlanc, 2004)。この値を用いて考えると、1 初期胚におけるエクジステロイド濃度は 54 fM となる。図 3-2 での Endo や、図 3-4 の Ctl. は、レポーターベクターの顕微注入のみであることから初期胚の内在性のエクジステロイドを検出していると考えられる。図 3-2・+20E での顕微注入後 12-13 時間における GFP シグナルの強度は、Endo の約 1.4 倍であった。この時、オオミジンコ初期胚に共注入した 20E の最終的な濃度は 100 nM になるようにした。これは、初期胚におけるエクジステロイド濃度の 2000 倍である。図 3-4 では、10 μ M 20E に曝露にしたレポーターベクター注入初期胚は、培地に置いたレポーターベクター注入初期胚の約 1.1 倍の GFP シグナルの強度であった。図 3-2 での結果とこの結果から、曝露した 10 μ M 20E のうち、100 nM 以下が初期胚へと働きかけていると考えられる。また、図 3-4 の 100 μ M 20E に曝露にしたレポーターベクター注入初期胚は、培地に置いたレポーターベクター注入初期胚の約 2 倍の GFP シグナル

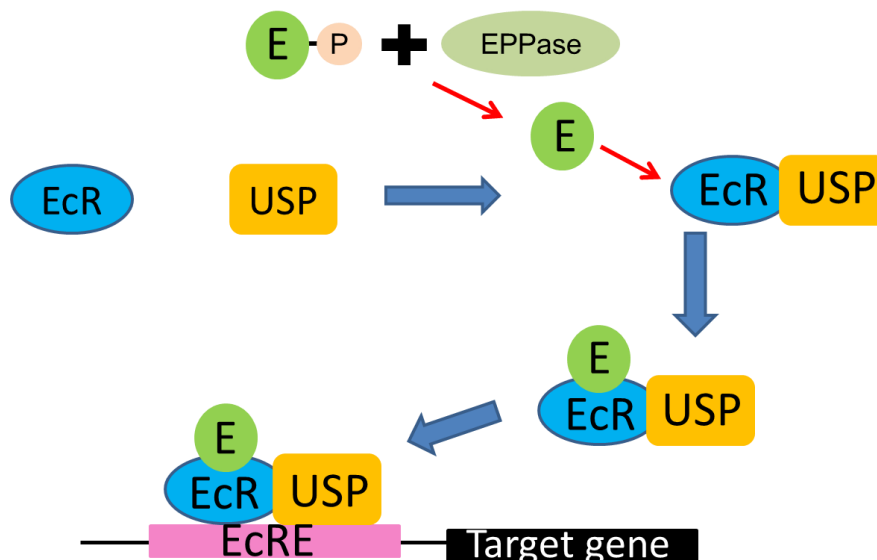
の強度であった。図 3-2 での結果とこの結果から、曝露した 100 μ M 20E のうち、100 nM 以上が初期胚へと働きかけられていると考えられる。

第4章 総括

本研究では、生体内でのエクジステロイド様活性を可視化し、検出するためのレポーターベクターの開発を目的とした。以下に概要・結果・結論を示す。

4-1. 全体を通した考察

第2章では、図4-1のスキームをもとに、オオミジンコ初期胚におけるエクジステロイドの機能について解析を行った。初期胚において不活性型のエクジステロイドを



EcR : Ecdysone Receptor USP : Ultraspiracle E : Ecdysone

EcRE : Ecdysone response element EPPase : Ecdysteroid phosphate phosphatase

図 4-1. オオミジンコ初期胚におけるエクジステロイドの作用メカニズムモデル

第2章の結果から、オオミジンコ初期胚においても、昆虫と同様のエクジステロイドの作用メカニズムが考えられる(Thummel, 2002)。

活性型へと転換する酵素である EPPase をクローニングし、mRNA の発現解析、siRNA

を用いたノックダウンを行った。その結果、EPPase は胚発生に必要であることを明らかにした。エクジステロイドの機能的な受容体を形成する EcR、USP についても mRNA 発現解析、siRNA を用いたノックダウンを行い、胚発生に必要であることを明らかにした。以上により、オオミジンコ初期胚において、エクジステロイドは必須であり、オオミジンコ初期胚をレポーターベクターの評価に用いることが可能であると結論づけた。

第 3 章では、ショウジョウバエ由来の EcRE の下流に GFP 遺伝子を挿入したレポーターベクターを作製した。これをオオミジンコ初期胚へと顕微注入し、レポーターベクターのエクジステロイド応答性について評価を行った。

作製したレポーターベクターをオオミジンコ初期胚に顕微注入したところ、顕微注入後 6 時間より GFP シグナルが検出された。このシグナルがエクジステロイドに起因することを確認するため、レポーターベクターと 20E をともにオオミジンコ初期胚に顕微注入すると、シグナルの範囲が拡大し、その強度が増した。一方、レポーターベクターとエクジステロイドのアンタゴニストである Cuc. B をともに顕微注入したところ、シグナルの検出時間が顕微注入後 9 時間まで遅れ、シグナルの範囲も縮小した。この結果から、レポーターベクターはエクジステロイドに応答していることが分かった。また、レポーターベクターを顕微注入した初期胚を 20E を含む培地に曝露したところ、シグナルの強度が増した。この結果から、レポーターベクターは外因性のエクジステロイド活性に対しても応答することが分かった。以上のようなことから、レポーターベクターを初期胚に注入することで、生体内外のエクジステロイド活性の検出が可能となることが示された。

これまでのエクジステロイドの検出システムには、Kato et al., (2007)の論文にあるレポーター遺伝子にルシフェラーゼ遺伝子を用いた検出系と Tran et al., (2001)の論文にあるレポーター遺伝子に *lacZ* 遺伝子を用いたものがある (表 4-1)。Kato et al.,

(2007) は、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞において、two-hybrid システムを用いて、*D. magna* 由来の EcR-USP とリガンドの相互作用をルシフェラーゼ遺伝子によって検出する系を確立した。Tran et al., (2001) は、酵母において、ネッタイシマカ (*A. aegypti*) 由来の EcR-USP とリガンドの相互作用を *D. melanogaster hsp27* 由来の EcRE 下流に挿入された *lacZ* 遺伝子によって検出する系を作製した。Kato et al., (2007) の用いた two-hybrid システムとは、遺伝子の転写活性化タンパク質が、DNA の特異的な塩基配列に結合する部分と転写を活性化する部分から成り立ち、これら 2 つのタンパク質ドメインによって働くという性質を利用した手法である。レポーター遺伝子の転写活性を指標として 2 つのタンパク質間の相互作用の検出が可能となる。この手法は酵母で最初に確立された手法であるため、酵母での場合をモデルとして書くと、標的タンパク質の DNA 配列を遺伝子転写活性化タンパク質の DNA 結合ドメインの配列と融合させたベクターと、標的タンパク質に結合すると考えられる候補タンパク質の DNA 配列に遺伝子転写活性化タンパク質の活性化ドメインの配列を融合したベクターを作製する。作製したベクターをともに酵母へと導入すると、遺伝子転写活性化タンパク質の DNA 結合ドメインをもった標的タンパク質と、遺伝子転写活性化タンパク質の活性化ドメインをもった候補タンパク質が産生される。これら二つが結合し、酵母に組み込まれたレポーター遺伝子上流の転写活性化タンパク質の結合部位へと結合すると、レポーター遺伝子が転写されることで 2 つのタンパク質間の相互作用を解明することができる (図 4-2) (Molecular Biology of THE CELL, Fifth edition 細胞の分子生物学 第 5 版, 2010)。Kato et al., (2007) では、CHO 細胞に EcR のリガンド結合部位を図 4-2 における標的タンパク質とし、USP を候補タンパク質として発現させた。そこにリガンドであるエクジステロイドを曝露し、転写が活性化され、生産されるルシフェラーゼを基質と反応させることで間接的にエクジステロイドを検出する方法である。この方法で検出できた 20E の濃度は、1 μM である。一方、Tran et

al., (2001) では、レポーター遺伝子である *lacZ* プロモーター領域と *lacZ* 構造遺伝子の
上流に *D. melanogaster hsp27* 由来の EcRE を 6 つ並べたものを酵母に導入し、ネッ
タイシマカの EcR と USP をともに酵母内で発現させ、リガンドとしてエクジステロ
イド様物質である RH-5992 に曝露し、リガンドと EcR、USP が EcRE へと結合する
ことで *lacZ* の転写が活性化され、産生される β -ガラクトシダーゼを基質と反応させる
ことで間接的にエクジステロイド様物質を検出する方法である。この方法で検出でき
たエクジステロイド様物質の濃度は、10 μ M である。

本論文で作製したレポーターは、現在、曝露量が 10 μ M の 20E が検出可能である。
これは、Kato et al., (2007) の CHO 細胞の系と比較すると感度の点では劣っている。
その一方で、Tran et al., (2001) の酵母の系と比較すると、リガンドが異なるため、一
概には言いにくいだが、同程度の感度を持つと考えられる。Tran et al., (2001) の酵母の
系では、EcRE を 6 つ並べているのに対し、本論文で構築した系では、EcRE の数は 4
つであることを考慮すると、本論文で構築した系の方が感度が良い可能性もある。

他の 2 つの系は、EcR-USP が存在しない細胞で EcR-USP を発現させているため、
EcR-USP の構造が実際と異なる可能性があり、本来のリガンドとの親和性とは異なっ
ている可能性が考えられる。本論文で構築した系では、オオミジンコの内在性の
EcR-USP により検出しているため、上記のような問題がない。これは、他の 2 つの系
と比べ有意な点である。他の 2 つの系は、それぞれ検出するために細胞を破碎し、基
質と反応させるという前処理を必要とするのに対し、本論文で構築した系では、作製
したレポーターを導入した初期胚に試料を曝露するだけその試料のエクジステロイド
様の活性を検出することができるため、比較的簡単といえる。

本論文で構築した系は、オオミジンコの初期胚に試験の度に等量のレポーターを顕
微注入によって導入する必要がある、この方法は熟練の技を必要とする。それに対し
て、他の 2 つの系は、細胞にベクターを感染させるだけなので誰にでもできる。また、

本論文で構築した系では、GFP をレポーター遺伝子として用いているため、蛍光顕微鏡のシステムが必要となる。他の 2 つがもともとエクジステロイドを持たない細胞であるのに対し、オオミジンコの初期胚を用いている本論文で構築した系は内在性のエクジステロイドも検出してしまう。以上が本論文で構築した系で今後の改良が期待される点である。

	本論文	Kato et al., (2007)	Tran et al., (2001)
検出系に用いた細胞・生物種	<i>D. magna</i>	CHO 細胞	酵母
EcR-USP	<i>D. magna</i> (内在性)	<i>D. magna</i> 由来	<i>A. aegypti</i> 由来
EcRE	<i>D. melanogaster hsp27</i> 由来		<i>D. melanogaster hsp27</i> 由来
EcREの個数	4		6
レポーター遺伝子	GFP	ルシフェラーゼ	lacZ
リガンド	20E	20E	エクジステロイド様物質 RH-5992
リガンド濃度	10 μ M	1 μ M	10 μ M

表 4-1. エクジステロイド様物質検出系の比較

本論文で構築した系、Kato et al., (2007)でのエクジステロイド様物質検出系、Tran et al., (2001)でのエクジステロイド様物質検出系を比較した表。

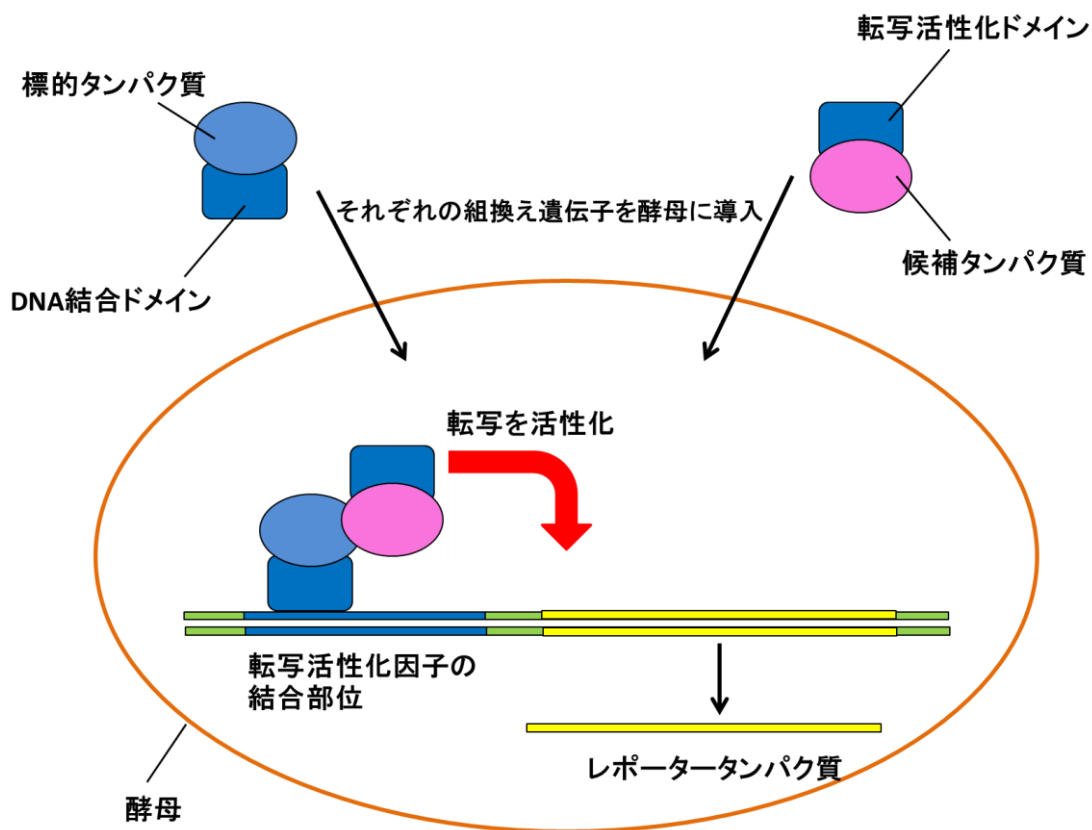


図 4-2. 酵母を用いた two-hybrid 法

(Molecular Biology of THE CELL, Fifth edition 細胞の分子生物学 第5版, 2010. 改変)

4-2. おわりに

本研究の結果、作製したレポーターベクターによって生体内外のエクジステロイド活性を可視化できることが分かった。しかし、レポーターベクターのオオミジンコ初期胚への注入は、簡易であるとは言い難く、レポーターベクターの注入量によっては結果に差異が表れる可能性がある。また、胚発生段階では、エクジステロイドは生理的に機能しているため、生体外のエクジステロイド活性の検出には、比較的高濃度の

曝露が必要であった。

これらの問題を解決する 1 つの方法として、本論文で構築したレポーターベクターをオオミジンコのゲノムに組み込み、得られた組み換え体を用いて生物試験を行う方法が考えられる。これにより、体内のエクジステロイドが比較的低い時期に試験対象物質を曝露することが有効であるかもしれない。さらに、これまで不可能であったエクジステロイド活性を持つ化学物質の標的器官を明らかにすることも可能になると考えられ、内分泌かく乱物質の作用メカニズムの解明にもつながることが期待される。今後は、本論文で構築したレポーターベクターをゲノムに組み込んだ系統を作製し、種々の化学物質によるレポーターベクターの応答性を確認する必要がある。これにより、将来的に組み換え体を利用することでエクジステロイド作用を評価する生物試験を確立することが可能となると考えられる。

引用文献

[欧文論文]

- Antoniewski, C., Mugat, B., Delbac, F., & Lepesant, J. a. (1996). Direct repeats bind the EcR/USP receptor and mediate ecdysteroid responses in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, *16*, 2977–86.
- Baldwin, W. S., Bailey, R., Long, K. E., & Klaine, S. (2001). Incomplete ecdysis is an indicator of ecdysteroid exposure in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, *20*, 1564–9.
- Beatty, J., Fauth, T., Callender, J. L., Spindler-Barth, M., & Henrich, V. C. (2006). Analysis of transcriptional activity mediated by *Drosophila melanogaster* ecdysone receptor isoforms in a heterologous cell culture system. *Insect Molecular Biology*, *15*, 785–95.
- Bender, M., Imam, F. B., Talbot, W. S., Ganetzky, B., & Hogness, D. S. (1997). *Drosophila* ecdysone receptor mutations reveal functional differences among receptor isoforms. *Cell*, *91*, 777–88.
- Bialecki, M., Shilton, A., Fichtenberg, C., Segraves, W. a, & Thummel, C. S. (2002). Loss of the ecdysteroid-inducible E75A orphan nuclear receptor uncouples molting from metamorphosis in *Drosophila*. *Developmental Cell*, *3*, 209–20.
- Canton, J., & Adema, D. (1978). Short-term and reproduction toxicity experiments with *Daphnia magna* and comparison of the sensitivity of *Daphnia magna* with *Daphnia pulex* and *Daphnia cucullata*. *Hydrobiologia*, *59*, 135–40.
- Carney, G. E., Wade, a a, Sapra, R., Goldstein, E. S., & Bender, M. (1997). DHR3, an ecdysone-inducible early-late gene encoding a *Drosophila* nuclear receptor, is required for embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*, 12024–9.
- Colbourne, J. K., Pfrender, M. E., Gilbert, D., Thomas, W. K., Tucker, A., Oakley, T. H., Tokishita, S., Aerts, A., Arnold, G. J., Basu, M. K., Bauer, D. J., Cáceres, C. E., Carmel, L., Casola, C., Choi, J.-H., Detter, J. C., Dong, Q., Dusheyko, S., Eads, B. D., Fröhlich, T., Geiler-Samerotte, K. a, Gerlach, D., Hatcher, P., Jogdeo, S., Krijgsveld, J.,

- Kriventseva, E. V, Kültz, D., Laforsch, C., Lindquist, E., Lopez, J., Manak, J. R., Muller, J., Pangilinan, J., Patwardhan, R. P., Pitluck, S., Pritham, E. J., Rechtsteiner, A., Rho, M., Rogozin, I. B., Sakarya, O., Salamov, A., Schaack, S., Shapiro, H., Shiga, Y., Skalitzy, C., Smith, Z., Souvorov, A., Sung, W., Tang, Z., Tsuchiya, D., Tu, H., Vos, H., Wang, M., Wolf, Y. I., Yamagata, H., Yamada, T., Ye, Y., Shaw, J. R., Andrews, J., Crease, T. J., Tang, H., Lucas, S. M., Robertson, H. M., Bork, P., Koonin, E. V, Zdobnov, E. M., Grigoriev, I. V, Lynch, M., & Boore, J. L. (2011). The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science*, *331*, 555–61.
- Davies, L., & Anderson, I. (2007). An unsuspected ecdysteroid/steroid phosphatase activity in the key T-cell regulator, Sts-1: Surprising relationship to insect ecdysteroid phosphate phosphatase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *731*, 720–31.
- Dinan, L., Whiting, P., GIRAULT, J., & Lafont, R. (1997). Cucurbitacins are insect steroid hormone antagonists acting at the ecdysteroid receptor. *Biochemical Journal*, *650*, 643–50.
- Gauhar, Z., Sun, L. V, Hua, S., Mason, C. E., Fuchs, F., Li, T.-R., Boutros, M., & White, K. P. (2009). Genomic mapping of binding regions for the Ecdysone receptor protein complex. *Genome Research*, *19*, 1006–13.
- Gavet, O., & Pines, J. (2010). Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Developmental Cell*, *18*, 533–43.
- Giguère, V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocrine Reviews*, *20*, 689–725.
- Hannas, B. R., Wang, Y. H., Baldwin, W. S., Li, Y., Wallace, A. D., & LeBlanc, G. a. (2010). Interactions of the crustacean nuclear receptors HR3 and E75 in the regulation of gene transcription. *General and Comparative Endocrinology*, *167*, 268–78.
- Henrich, V., Szekely, A., & Kim, S. (1994). Expression and Function of the ultraspiracle(usp) Gene during Development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, *165*, 38–52.
- Hertz, G., & Stormo, G. (1999). Identifying DNA and protein patterns with statistically significant alignments of multiple sequences. *Bioinformatics*, *15*, 563–77.

- Horiguchi, T., & Shiraishi, H. (1994). Imposex and organotin compounds in *Thais clavigera* and *T. bronni* in Japan. *Journal of the Marine Biology Association of the United Kingdom*, 1967, 651–69.
- Horner, M., Chen, T., & Thummel, C. (1995). Ecdysteroid regulation and DNA binding properties of *Drosophila* nuclear hormone receptor superfamily members. *Developmental Biology*, 168, 490–502.
- Hu, X., Cherbas, L., & Cherbas, P. (2003). Transcription activation by the ecdysone receptor (EcR/USP): identification of activation functions. *Molecular Endocrinology*, 17, 716–31.
- Ito, Y., Yasuda, A., & Sonobe, H. (2008). Synthesis and phosphorylation of ecdysteroids during ovarian development in the silkworm, *Bombyx mori*. *Zoological Science*, 25, 721–7.
- Kast - Hutcheson, K, Cynthia V. Rider, and G. A. L. (2001). The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 502–9.
- Kato, Y., Kobayashi, K., Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H., & Iguchi, T. (2007). Cloning and characterization of the ecdysone receptor and ultraspiracle protein from the water flea *Daphnia magna*. *The Journal of Endocrinology*, 193, 183–94.
- Kato, Y., Matsuura, T., & Watanabe, H. (2012). Genomic integration and germline transmission of plasmid injected into Crustacean *Daphnia magna* eggs. *PloS one*, 7, e45318.
- Kato, Y., Shiga, Y., Kobayashi, K., Tokishita, S., Yamagata, H., Iguchi, T., & Watanabe, H. (2011). Development of an RNA interference method in the cladoceran crustacean *Daphnia magna*. *Development Genes and Evolution*, 220, 337–45.
- Klüttgen, B., Dülmer, U., Engels, M., & Ratte, H. (1994). ADaM, an artificial freshwater for the culture of zooplankton. *Water Research*, 28, 743–6.
- Koelle, M. R., Talbot, W. S., Segraves, W. a, Bender, M. T., Cherbas, P., & Hogness, D. S. (1991). The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell*, 67, 59–77.

- Kumar, M. B., Fujimoto, T., Potter, D. W., Deng, Q., & Palli, S. R. (2002). A single point mutation in ecdysone receptor leads to increased ligand specificity: implications for gene switch applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*, 14710–5.
- Mangelsdorf, D. J., Borgmeyer, U., Heyman, R. a, Zhou, J. Y., Ong, E. S., Oro, a E., Kakizuka, a, & Evans, R. M. (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes & Development*, *6*, 329–44.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., & Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, *83*, 835–9.
- Miro, M. (1995). Cucurbitacins and their pharmacological effects. *Phytotherapy research*, *9*, 159–68.
- Mouillet, J., & Henrich, V. (2001). Differential control of gene activity by isoforms A, B1 and B2 of the Drosophila ecdysone receptor. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *268*, 1811–9.
- Mu, X., & Leblanc, G. A. (2002). Environmental Antiecdysteroids Alter Embryo Development in the Crustacean Daphnia magna. *Journal of Experimental Zoology*, *292*, 287–92.
- Mu, X., & LeBlanc, G. a. (2004). Synergistic Interaction of Endocrine-Disrupting Chemicals: Model Development Using an Ecdysone Receptor Antagonist and a Hormone Synthesis Inhibitor. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *23*, 1085.
- Mykles, D. L. (2011). Ecdysteroid metabolism in Crustaceans. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *127*, 196–203.
- Nagaraju, G. P. C. (2011). Reproductive regulators in decapod crustaceans: an overview. *The Journal of Experimental Biology*, *214*, 3–16.
- Nakagawa, Y., & Henrich, V. C. (2009). Arthropod nuclear receptors and their role in molting. *The FEBS Journal*, *276*, 6128–57.

- Nakagawa, Y., Takahashi, K., Kishikawa, H., Ogura, T., Minakuchi, C., & Miyagawa, H. (2005). Classical and three-dimensional QSAR for the inhibition of [3H]ponasterone A binding by diacylhydrazine-type ecdysone agonists to insect Sf-9 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 1333–40.
- Niedziela-Majka, a, Kochman, M., & Ozyhar, A. (2000). Polarity of the ecdysone receptor complex interaction with the palindromic response element from the hsp27 gene promoter. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 267, 507–19.
- OECD. (2011). Daphnia magna reproduction test. *In: OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 211. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.*
- Rewitz, K. F., & Gilbert, L. I. (2008). Daphnia Halloween genes that encode cytochrome P450s mediating the synthesis of the arthropod molting hormone: evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 60.
- Riddihough, G., & Pelham, H. R. (1987). An ecdysone response element in the Drosophila hsp27 promoter. *The EMBO Journal*, 6, 3729–34.
- Riddihough, Guy, & Pelham, H. (1986). Activation of the Drosophila hsp27 promoter by heat shock and by ecdysone involves independent and remote regulatory sequences. *The EMBO Journal*, 5, 1653–8.
- Rigden, D. J. (2008). The histidine phosphatase superfamily: structure and function. *The Biochemical Journal*, 409, 333–48.
- Sawatsubashi, S., Maki, A., Ito, S., Shirode, Y., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Kouzmenko, A., Takeyama, K.-I., & Kato, S. (2004). Ecdysone receptor-dependent gene regulation mediates histone poly(ADP-ribosyl)ation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320, 268–72.
- Schubiger, M., Wade, a a, Carney, G. E., Truman, J. W., & Bender, M. (1998). Drosophila EcR-B ecdysone receptor isoforms are required for larval molting and for neuron remodeling during metamorphosis. *Development*, 125, 2053–62.
- Sonobe, H., & Ito, Y. (2009). Phosphoconjugation and dephosphorylation reactions of steroid hormone in insects. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 307, 25–35.

- Stone, B. L., & Thummel, C. S. (1993). The *Drosophila* 78C early late puff contains E78, an ecdysone-inducible gene that encodes a novel member of the nuclear hormone receptor superfamily. *Cell*, *75*, 307–20.
- Subramoniam, T. (2000). Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, *125*, 135–56.
- Talbot, W. S., Swyryd, E. a., & Hogness, D. S. (1993). *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell*, *73*, 1323–37.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, *28*, 2731–9.
- Tatarazako, N., & Oda, S. (2007). The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. *Ecotoxicology*, *16*, 197–203.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, *22*, 4673–80.
- Thummel, C. S. (2002). Ecdysone-regulated puff genes 2000. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *32*, 113–20.
- Tran, H. T., Shaaban, S., Askari, H. B., Walfish, P. G., Raikhel, a S., & Butt, T. R. (2001). Requirement of co-factors for the ligand-mediated activity of the insect ecdysteroid receptor in yeast. *Journal of Molecular Endocrinology*, *27*, 191–209.
- Tsui, M. T.-K., & Wang, W.-X. (2007). Biokinetics and tolerance development of toxic metals in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology*, *26*, 1023–32.
- Tyler, C. R., & Jobling, S. (2008). Roach, Sex, and Gender-Bending Chemicals: The Feminization of Wild Fish in English Rivers. *BioScience*, *58*, 1051.

- Watanabe, H., Tatarazako, N., Oda, S., Nishide, H., Uchiyama, I., Morita, M., & Iguchi, T. (2005). Analysis of expressed sequence tags of the water flea *Daphnia magna*. *Genome*, *609*, 606–9.
- Wiltgen, M., & Tilz, G. P. (2009). Homology modelling: a review about the method on hand of the diabetic antigen GAD 65 structure prediction. *Wien Med Wochenschr*, *159*, 112–25.
- Yamada, R., Yamahama, Y., & Sonobe, H. (2005). Release of ecdysteroid-phosphates from egg yolk granules and their dephosphorylation during early embryonic development in silkworm, *Bombyx mori*. *Zoological science*, *22*, 187–98.
- Yamada, Ryouichi, & Sonobe, H. (2003). Purification, kinetic characterization, and molecular cloning of a novel enzyme ecdysteroid-phosphate phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*, 26365–73.
- Yao, T., Segreaves, W., Oro, A., McKeown, M., & Evans, R. (1992). *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, *71*, 63–72.
- Yao, Tso-pang, Barry Marc Forman, Zeyu Jiang, Lucy Cherbas, J.-Don Chen, Michael McKeown, P. C. & R. M. E. (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle gene. *Nature*, *366*, 476–9.

[和文論文]

- 庄司良と迫田章義. (2004). バイオアッセイを用いた環境分析・計測の動向 *Environmental instrumentation of Bioassay: a comprehensive review*. 学会誌「EICA」, 第9巻.

[図書]

- Bruce Alberts, Julian Lewis, Martin Raff, Peter Walter, Keith Roberts, Alexander Johnson 著, 中村桂子, 松原謙一 青山聖子, 滋賀陽子, 滝田郁子, 中塚公子, 羽田裕子, 宮下悦子 翻訳, *Molecular Biology of THE CELL*, Fifth edition 細胞の分子生物学 第5版. ニュートンプレス. 2010.

日本比較内分泌学会編. 無脊椎動物のホルモン（ホルモンの分子生物学）. 学会出版センター.
1998.

若林明子著. 化学物質と生態毒性 改訂版. 丸善株式会社. 2003.

[その他資料]

EXTEND2010 に基づく平成 25 年度第 1 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会.

EXTEND2010 における内分泌かく乱作用に関する試験及び評価の基本的な流れ. 2013.
http://www.env.go.jp/chemi/end/extend2010/commi_2010/com01-05/ref02.pdf

OECD. (2011). *Daphnia magna* reproduction test. *In: OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 211. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.*

環境省. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について

- ExTEND2005-. 2005. <http://www.env.go.jp/chemi/end/extend2005/01.pdf>

環境省環境保健部環境リスク評価室. 化学物質の環境リスク評価 第 1 巻. 2002.

環境庁. 内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について - 環境ホルモン戦略計画

SPEED' 98-. 2000. <http://www.env.go.jp/chemi/end/speed98/main/full.pdf>

発表論文

1. Miki Asada, Yasuhiko Kato, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe. (2014)
Visualization of ecdysteroid activity using a reporter gene in the crustacean, *Daphnia*.
Marine Environmental Research, 93. 118-122.
2. Miki Asada, Yasuhiko Kato, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe. Early embryonic
expression of ecdysteroid-phosphate phosphatase in the water flea, *Daphnia magna*.
Journal of Insect Science. (in press)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科 渡邊肇教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、日頃より貴重なご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科 松浦友亮准教授、加藤泰彦助教に深く感謝致します。

本論文を作成するにあたり、有益なご指導、ご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科 原島俊教授、福井希一教授に心から厚く感謝申します。

本論文を作成するにあたり、懇切丁寧なご指導、ご助言、励ましを賜りました株式会社陽進堂顧問 兼、大阪大学大学院工学研究科 和田忠士特任教授に心より深く感謝いたします。

本論文を作成するにあたり、貴重なご助言を賜りました国立環境研究所 環境リスク研究センター 鏑迫典久主任研究員に深く感謝いたします。

本研究を行うに際し、日頃より協力、励ましを賜りました生命環境システム工学領域 学生諸氏、事務の方々に心から感謝の意を表します。

最後に、自分を理解し、これまで支えてくれた家族、多くの友人に心から感謝致します。