

2016年8月20日

「環境毒性化学とメダカに関する研究会 around 九州」のご案内

はじめに

環境研究における「分析」「毒性」の各分野は車の両輪の関係にあり、互いに意見・情報を交換することで活性化され、発展性を維持することができます。日本には、環境化学会・環境毒性学会・環境ホルモン学会・水環境学会など、分析や毒性を専門とする研究者の集まりが複数あるものの、組織的な独立性が高いのが実情です。今後、組織間の有機的・生産的な連携・交流を深めることができれば、環境毒性化学の分野において世界に向けた発信力強化に繋がると思われます。一方、メダカは汚染評価の代表的な指標種として古くから知られています。近年、ゲノムの解析・編集によりモデル生物としての精度が格段に向上しており、汚染研究へのさらなる応用が期待されます。

そこで今回、日本環境化学会九州支部と九州を中心とした環境化学・毒性学の専門家および国内のメダカ研究者が中心となり、合同研究会（通称：**メダカ研究会**）を企画しました。職場のお仲間や研究室の学生さんにもお声かけいただいでご参加いただきますよう、お願い申し上げます。

なお、本研究会は2016年4月29日～30日に開催予定でしたが、その直前に発生した熊本地震の影響で実施時期が延期されました。日程を再調整するにあたり、講演者および関係の皆さまのご理解とご協力に深く感謝申し上げます。

開催日：2016年9月17日（土）～18日（日）

- ・ 9/17（土）（10:00～17:20）：**メダカ研究会**（15分（一部25分）発表・5分質疑）

場所：熊本大学理学部3号館2階D201講義室

- ・ 9/18（日）（09:00～17:00）：**メダカ技術研修会** [定員：10名程度]

場所：熊本大学理学部1号館3階

主催：「環境毒性化学とメダカに関する研究会 around 九州」実行委員会

共催：一般社団法人日本環境化学会 九州地区部会

大学共同利用機関法人自然科学研究機構 基礎生物学研究所 IBBP センター

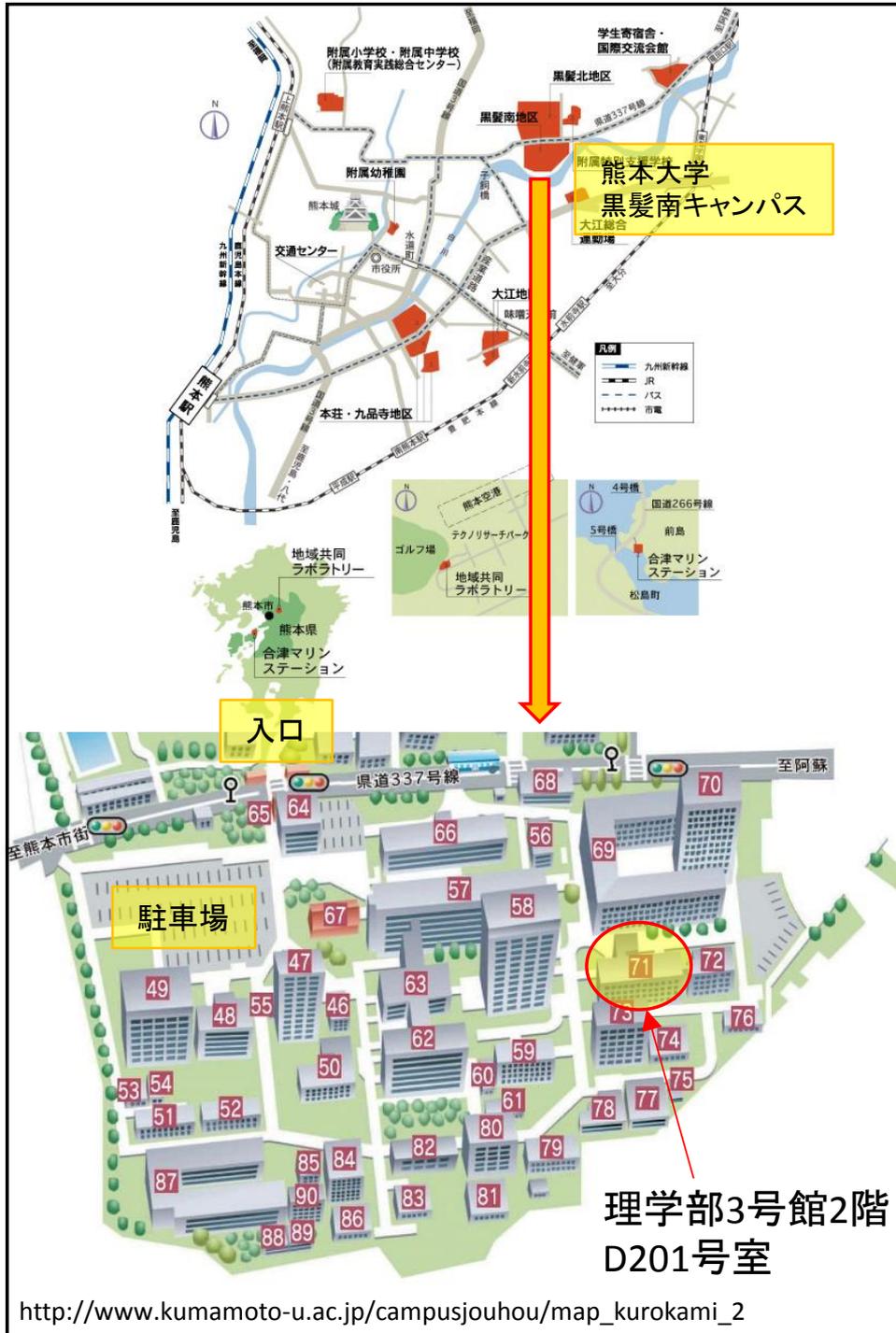
お知らせ

- ・ どなたでも参加可能です。参加費は無料です。
- ・ 車で来場の方は、熊本大学黒髪南キャンパスの駐車場（次頁）をご利用ください。
- ・ 9月17日（土）の夜に懇親会を行います。懇親会のみ参加も歓迎します。
- ・ 受付の際、研究会参加者に質問や感想記入用の用紙を配布します。パネルディスカッションの前に用紙を回収して、それも参考に議論する予定です。
- ・ メダカ研究会終了後、その内容を写真入りでまとめたパンフレットを作成します。

(会場案内)

熊本大学理学部 3号館 2階 D201号室

(〒熊本県熊本市中央区黒髪 2-39-1 熊本大学黒髪南キャンパス)



9月17日(土)メダカ研究会(10:00~17:20)
熊本大学理学部3号館2階D201号室

09:00 参加・発表者受付
09:55-10:00 開会挨拶(中田 晴彦 熊本大学・准教授)

Session I 多環芳香族炭化水素類の分析とメダカ暴露および環境分析(10:00-12:00)
(座長:篠原 亮太・熊本県立大学 名誉教授)

時間	講演番号	講演者	所属
10:00-10:20	Session I-1	上田 守男	(一財 九州環境管理協会・研究員)
10:20-10:40	Session I-2	吉田 愛	(熊本大学・大学院生)
10:40-11:00	Session I-3	Kun Chen	(九州大学・大学院生)
11:00-11:20	Session I-4	小山 次朗	(鹿児島大学・教授)
11:20-11:40	Session I-5	小林 淳	(熊本県立大学・准教授)
11:40-12:00	Session I-6	阿草 哲郎	(熊本県立大学・准教授)
12:00-13:00	昼食		

Session II メダカにおける内分泌かく乱作用の影響評価(13:00-14:40)
(座長:鑓迫 典久 国立環境研究所・主席研究員)

時間	講演番号	講演者	所属
13:00-13:20	Session II-1	大嶋 雄治	(九州大学・教授)
13:20-13:40	Session II-2	長江 真樹	(長崎大学・教授)
13:40-14:00	Session II-3	富永 伸明	(有明工業高等専門学校・教授)
14:00-14:20	Session II-4	大西 悠太	(いであ株式会社・所長代理)
14:20-14:40	Session II-5	堀江 好文	(国立環境研究所・研究員)
14:40-14:50	休憩		

Session III メダカの基盤研究(14:50-16:10)
(座長:北野 健 熊本大学・准教授)

時間	講演番号	講演者	所属
14:50-15:20	Session III-1	成瀬 清	(基礎生物学研究所・准教授)
15:20-15:40	Session III-2	澤村 理英	(熊本大学・研究員)
15:40-16:10	Session III-3	亀井 保博	(基礎生物学研究所・准教授)
16:20-16:30	休憩		

Session IV パネルディスカッション (司会：中田 晴彦 熊本大学)

16:30-17:15 テーマ：メダカと環境化学・環境毒性学研究の将来展望

(パネリスト (五十音順))

- ・ 大嶋 雄治 (九州大学・教授)
- ・ 亀井 保博 (基礎生物学研究所・准教授)
- ・ 小山 次朗 (鹿児島大学・教授)
- ・ 篠原 亮太 (熊本県立大学・名誉教授)
- ・ 鑪迫 典久 (国立環境研究所・主席研究員)
- ・ 成瀬 清 (基礎生物学研究所・准教授)

17:15-17:20 閉会挨拶 (北野 健 熊本大学・准教授)

19:00 懇親会 (場所は後日アナウンスします)

(講演者の方へ)

1. 発表は Power Point で行います。Windows 7 の OS で Power Point2013 をインストールした PC を準備しますので、あらかじめファイルをコピーして動作確認をお願いします。

9月18日(日)メダカ技術研修会 (09:00~17:00)
熊本大学理学部1号館3階生物会議室

午前： 受精卵への顕微注入とゲノム解析

午後： 精子凍結保存と IR-LEGO 顕微鏡観察

講師： 亀井保博・成瀬清 (基礎生物学研究所)・北野健 (熊本大学)

その他：準備物はとくにございませんが、必要に応じて後日ご連絡するかも知れません。

問い合わせ先 (順不同)

「環境毒性化学とメダカに関する研究会 around 九州」実行委員会 事務局

- ・ 中田 晴彦 (なかた はるひこ)
所属等：熊本大学大学院自然科学研究科化学講座 准教授
電話：096-342-3380 メール：nakata@sci.kumamoto-u.ac.jp
- ・ 北野 健 (きたの たけし)
所属等：熊本大学大学院自然科学研究科生物学講座 准教授
電話：096-342-3031 メール：tkitano@kumamoto-u.ac.jp

講演要旨

Session I 多環芳香族炭化水素類のメダカ暴露と環境分析 (10:00-12:00)

(座長：篠原亮太)

Session I-1

飛行時間型質量分析計を用いた網羅的分析手法の検討

上田 守男

(一般財団法人 九州環境管理協会)

様々な試料中の目的成分を測定するには、化合物毎に分離や精製する前処理手法を検討し、測定する必要がある。また、化合物によっては、前処理では分離精製が不可能なもの、回収が困難な物質も存在する。そこで、高い分離能を持つ二次元包括的ガスクロマトグラフと、高分解能四重極飛行時間型質量分析計を組み合わせ、前処理を行わない測定方法の検討を行った。また、本装置は、測定データの取込速度が速く、さらに検出した化合物の精密質量値が得られるため、分析試料に含まれる成分を網羅的に分析することが可能である。本報告では、二次元包括的ガスクロマトグラフ四重極型質量分析計(GC×GC/QTOFMS)を用いて、石油、環境大気そして食品試料を測定した結果について報告する。

Session I-2

重油燃焼実験による多環芳香族炭化水素類の新規生成 —大規模災害時の重度化学汚染を想定して—

吉田 愛・中田 晴彦

(熊本大学大学院 自然科学研究科)

東日本大震災の津波により、宮城県の気仙沼湾では大量の燃油が流出し、大規模な海上火災（津波火災）が発生した。そこで本研究は、室内で重油燃焼実験をおこない、津波火災時に生成する多環芳香族炭化水素類 (PAHs) について調べることを目的とした。

燃焼実験の結果、燃焼時間の経過に伴い強毒性が疑われ A 重油中にも含まれる高分子量成分の Benzo[a]pyrene と C1-Benzopyrenes/Perylene (C1-BPs/Pery) 類の濃度が増加した。また、燃焼後の大気や海水等からは毒性が懸念される Benzo[c]phenanthrene とアルキル化体の C1-BPs/Pery 類が新たに検出され、燃焼によるこれらの新規生成が認められた。また、重油燃焼後の試料中 C1-BPs/Pery 類の組成は、2011 年に気仙沼湾で採取した底質のそれと一致し、本結果は津波火災の影響を反映した可能性が示唆された。過去の研究において、C1-BPs/Pery 類を対象に環境分析を行った例は少なく、水生生物への毒性評価の例も限られている。こ

の種の物質群の新規生成を詳細に同定・解析することは、今後起こりうる大規模災害時の化学汚染の実態を予測しリスク評価を行う上で有用な知見になると思われる。

Session I-3

Developmental acceleration and gene expression variation of 3-hydroxybenzo[c]phenanthrene (3-OHBcP) microinjected medaka embryo

Kun Chen, Yuki Tsutsumi, Shuhei Yoshitake (Kyushu Univ.), Yasuyuki Hashiguchi (Osaka medical Coll.), Kosuke Tashiro (Kyushu Univ.), Nobuo Suzuki, Kazuichi Hayakawa (Kanazawa Univ.), Xuchun Qiu, Shimasaki Yohei, Yuji Oshima (Kyushu Univ.)

[Background] Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are abundant and persistence pollutants in the world. PAHs have multiple toxic effects on vertebrates. There is little research about the toxicity of 3-hydroxybenzo[c]phenanthrene (3-OHBcP). In the present study, a microinjection-Next Generation Sequencing (NGS) method was developed to assess the toxic effects of 3-OHBcP on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). The Japanese Medaka is a model fish in the fields of biology and ecotoxicology. Microinjection can be used to inject accurate concentration of toxicant into the embryos without destroying it. NGS is also called high-throughput sequencing, which can achieve multiple purposes on gene level (e.g. mRNA sequencing) with low cost.

[Materials and Method] Medaka embryos were sampled from spawning pairs of medaka maintained in our lab. Toxicant and control solutions were microinjected within two hours post fertilization. There were two experiments set: 1) In ‘toxicity test’, survival condition and developmental stages of medaka embryo were observed every day, and heart beating measurement was conducted on 5th day post fertilization (dpf). 2) In ‘differential gene expression test’, samples of medaka embryos for mRNA extraction were collected on the 3rd dpf. The mRNA-Seq was conducted after checking the quality of mRNA. The NGS data was analyzed by softwares for searching significant difference in gene expression between control and exposure groups.

[Results] 1) In the ‘toxicity test’, survival rate of embryos exposed to 1 nM 3-OHBcP was 80% of that in control group. On 1st, 4th and 6th dpf, development of exposed medaka embryos was significantly accelerated, compared with the control groups. The exposed embryos’ heart beating rates on 5th dpf was significantly faster than that in control. 2) In the ‘gene expression difference test’, the NGS analysis showed that 780 genes have significant expression difference ($p < 0.01$) between control and 1nM 3-OHBcP exposure groups. Some genes, which have significant increasing expression, are related to eye formation (*lim2.5*, *crybb1*, *bfs1*, *etc.*), artery development (*jarid2b*, *fgfb02b*, *cp*), muscle formation (*pvalb1*, *mylpfb*, *ckma*, *tnnt3a*, *ect.*), energy supply (*atp1b4*, *atp5g3a*,

etc.), and heat shock protein family (hspa8, hsp90, hsp70, etc.). In summary, our results suggested that there was acceleration of embryo development in medaka after 3-OHBCP exposure. NGS result supported the physiological toxic effect of 3-OHBCP on medaka embryo.

Session I-4

ジャワメダカに対する PAHs、alkPAHs の毒性評価

小山 次朗・川村 凌平・宇野 誠一

(鹿児島大学 水産学部)

石油水溶性画分の魚類に対する毒性を調べた結果、多環芳香族炭化水素化合物 (PAHs) およびアルキル化 PAHs (alkPAHs) が主たる原因物質であることが判明した。PAHs および alkPAHs の 48 時間半数致死濃度(LC50)を調べ、それらの値とそれぞれの水オクタノール分配係数(Kow)との相関関係を明らかにし、試験未実施の PAHs および alkPAHs の LC50 値推定の可能性を明らかにすることを目的とした。

石油成分を、シリカゲルカラムーヘキサン・ジクロロ・メタノールにより分離した分画の水溶性画分を調製し、孵化後 2 週間のジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) 稚魚の毒性試験を行ったところ、PAHs・alkPAHs 分画のみで死亡が観察された。そこで、naphthalene、fluorene、pyrene などの PAHs の毒性試験を実施したところ、これらの LC50 値と logKow の間により相関が認められ、試験未実施の PAHs および alkPAHs の LC50 値を推定できる可能性が示唆された。

Session I-5

沿岸域における有害化学物質の食物連鎖蓄積評価手法の開発

—アミノ酸窒素安定同位体比を用いて

吉本 未来・原 健斗・小林 淳

(熊本県立大学 環境共生学部)

ポリ塩化ビフェニル (PCB) などの残留性有機汚染物質は高い蓄積性や毒性を持つため、食物連鎖を通して高次消費者の魚類やそれらを食するヒトへの蓄積や影響が懸念されている。一般に、化学物質の食物連鎖蓄積の程度の評価には Trophic magnification factor (TMF) が用いられているが、TMF の報告値 は研究間で大きな幅があり、精度の向上が課題である。TMF の精度向上のためには、生物の栄養段階の値を正確に得ることが必須であるが、これ

までの全窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) を用いた方法では複数の課題が指摘されている。そこで、本研究では、より正確に栄養段階が推定できるアミノ酸の窒素安定同位体比を適用し、PCB・水銀の TMF を明らかにすることを目的とした。

試料採取は 2014 年 12 月に東京湾本牧沖で底曳網によって行い、10 種の生物（シャコ、アナゴ、シログチ、ヒラメ等）を採取した。これらの生物について PCB、総水銀および全窒素・アミノ酸の安定窒素同位体比を測定した。解析の結果、各生物中の PCB・総水銀濃度と全窒素の $\delta^{15}\text{N}$ では相関関係は見られなかったが、アミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ から得た栄養段階を用いた場合には相関関係を示すことが明らかになった。今後、季節変化や他の海域での適用について検討を進める予定である。

Session I-6

ベトナムの地下水ヒ素汚染とヒトへの曝露

阿草 哲郎

(熊本県立大学 環境共生学部)

地下水のヒ素汚染は世界各地で顕在化しており、数千万人の人々が地下水を飲用することでヒ素による健康リスクに曝されている。しかしながら、地下水のヒ素汚染の実態はまだ限定的であり、幅広いモニタリング調査が望まれる。とくに、ヒトの曝露実態について明らかにした研究はきわめて少ない。そこで、本研究ではベトナムの紅河およびメコン川流域の地下水ヒ素汚染の実態を調査するとともに、ヒトの曝露について評価した。分析の結果、地下水中ヒ素濃度は $<0.1 - 502 \mu\text{g/L}$ であった。また、一部の地下水から WHO の飲料水の安全基準値 ($10 \mu\text{g/L}$) を超える濃度のヒ素が検出され、飲用には不適切であることが判明した。また、飲用水中総ヒ素濃度とヒト毛髪・尿中ヒ素濃度の間に有意な正の相関関係がみられたことから、地下水を経由した地域住民のヒ素曝露が示唆された。

Session II メダカによる内分泌かく乱作用の影響評価 (13:00-14:40)

(座長：鑑迫典久)

Session II-1

メダカを用いた環境毒性学分野への利用：逃避・情動行動影響評価と遺伝子編集技術を用いた異物結合結合排出タンパク質遺伝子ノックアウト

大嶋 雄治・長野 陽介・野道 彩夏・島崎 洋平

(九州大学 農学部)

本研究室ではメダカを用いて化学物質の環境毒性学的研究を進めている。その一つとしてクロルピリホス (CPF) をメダカに曝露してその逃避・情動行動影響を検討した。メダカ (各 4 グループ、5 匹/1 グループ) を 0.024 mg/L (96 時間 LC_{50} の 1/5 濃度) の CPF に 96 時間曝露し、曝露終了直後、1、3 週間後に遊泳速度、遊泳距離、個体間距離、不安様行動の頻度、小球落下に対する反応行動を算出した。その結果曝露直後も遊泳速度の上昇、不安様行動の増加、逃避速度の有意な低下が認められた。曝露 1 週間後以降では、小球落下に対する反応時間及びパニック反応の有意な増加が認められた。

また異物結合タンパク質 (TBT-bps) の機能解析を行っている。本タンパク質はリポカリンスーパーファミリーに属する α 1-酸性糖タンパク質 (AGP) 様タンパク質と推定され、薬物結合性や抗炎症等の機能が報告されるとともに、魚類では異物や病原菌等によりその発現量が変動することが報告されている。そこで近年遺伝子編集技術のひとつとして注目を浴びている CRISPR/Cas9 system を用いて、TBT-bp ノックアウトメダカを作製し、TBT-bp の機能解析を進めている。その他 mRNA-Seq や、メダカ裸胚を用いた毒性評価を進めている。

Session II-2

メダカ臀鰭に形成される性特異的形質を利用した化学物質の性ホルモン作用検出の検討

西 ななみ・古瀬 江里菜・山城 加奈子・加島 未奈子・三島 和也・江崎 遥加・高尾 雄二・

鑑迫 典久・井口 泰泉・長江 真樹

(長崎大学 水産学部)

成熟したメダカ (*Oryzias latipes*) の臀鰭軟条には、性特異的形質が形成される。雄の乳頭状小突起および雌の軟条先端分枝である。これまで、乳頭状小突起の形成には男性ホルモンによる刺激が必須であることは知られていたが、臀鰭軟条の先端分枝形成誘導に関する知見はほぼ皆無であった。本研究では、本形質形成における女性ホルモンの関与について調査した。

孵化後4週齢のメダカ（外形からは雌雄判定不可）に17β-エストラジオール（E2, 200ppt）を2ヶ月間流水曝露し、腎緒軟条先端の分枝状態を観察した。その結果、通常は分枝形成しない遺伝的雄個体においても、E2曝露により分枝数が有意に（遺伝的雌のそれと同程度に）増加した。次に、受精直後の受精卵にE2を100および500pptの濃度で4週間曝露し、その後通常の飼育水で2か月間飼育し、同様の観察を行った。E2 500ppt曝露により、遺伝的雄の腎緒軟条先端分枝数が有意に増加し、100ppt曝露においても増加傾向を示した。性分化期のE2曝露が生殖腺を卵巣へと分化させ、二次性徴期において内因性女性ホルモンが分泌されたことによるものと推察された。

以上の結果から、メダカ腎緒軟条の先端分枝形成には、二次性徴期における一定濃度以上の女性ホルモン刺激が不可欠であることが示唆された。

Session II-3

簡便な発生毒性影響試験へのメダカ卵の利用可能性

富永 伸明・山口 明美・河野 晋（有明工業高専）・有菌 幸司（熊本県立大）

内分泌かく乱物質問題が明らかになるにつれて、医薬品・化学物質の発生毒性評価の重要性が今まで以上に認識されている。一方で、動物試験は愛護等の観点から難しくなっていることから、従来の哺乳類等による発生毒性試験の適切な代替法が急務である。魚類卵は、自活栄養摂取をしないことから、栄養摂取を始めるまでは動物とみなされないことから、発生毒性の評価に優れたモデルとなると考えられる。特にメダカおよびゼブラフィッシュは卵が透明で内部の観察が容易であるだけでなく、哺乳類との比較研究が広くなされていることから、利用性は極めて高い。メダカは、取り扱いやすいが、堅牢な殻を持ち、物質導入が難しいため、ゼブラフィッシュの応用事例が多い。我々は、極短パルス高電界の電氣的刺激がメダカ卵殻の膜透過性を一時的に変化させ、容易に外液中の化学物質の取り込みを引き起こすことを見出した。本法は、マイクロインジェクションとは異なり、熟練が要らない容易な手法で狭いウインドウでの物質導入を可能とする。今回は、本法でメダカ卵に数種の化学物質を導入し、発生毒性および催奇形性を調査した結果を紹介し、メダカ卵の発生毒性試験の評価方法・応用性について各分野からのご意見をいただきたい。

Session II-4

内分泌かく乱作用のスクリーニングへのメダカ短期繁殖試験法の適用

大西 悠太

(いであ株式会社環境創造研究所)

化学物質の内分泌かく乱作用に関して、OECD では、魚類を対象とする 4 つの生態毒性試験法がテストガイドライン化されている。このうち、魚類短期繁殖試験 (TG229) は、ビテロゲニン、二次性徴に加えて産卵状況をエンドポイントとすることで、化学物質の魚類に対するエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体を介した作用以外に、アロマトラーゼ阻害のような HPG 軸への作用も検出できるとされている。そのため環境省や米国環境保護庁が実施している化学物質の内分泌かく乱に関する試験・評価プログラムにおいて、Tier-1 で実施するスクリーニング試験法に 1 つに採用されている。

化学物質のメダカに対する内分泌かく乱に関する研究は、ノニルフェノールなどエストロゲン作用を対象にしたものが多く、その他の作用モードを対象とした事例は少ない。そこで、魚類に対して何らかの内分泌かく乱作用を示すことが示唆されている種々の化学物質を用いてメダカでの魚類短期繁殖試験を実施し、各エンドポイントの反応性等から試験法の適用性や有効性を評価した。

(本発表の内容は、環境省より受注した業務の成果に基づくものである。)

Session II-5

メダカを用いた内分泌かく乱化学物質の検出試験法について

堀江 好文

(国立環境研究所環境リスク研究センター)

1990 年代以降、環境中に排出または存在する様々な化学物質が野生生物の体内に取り込まれた結果、ホルモン作用の誘導や阻害などの内分泌かく乱を引き起こす「内分泌かく乱物質問題」が注目されている。内分泌かく乱物質問題は、世界中で社会問題となっており、人の健康や生態系への影響を正確に把握するためには、科学的な評価を積み重ねる必要がある。そこで経済協力開発機構 (OECD) では、化学物質の内分泌かく乱作用を検出するための試験方法 (OECD テストガイドライン) が確立されている。

メダカ (*Oryzias latipes*) は、化学物質の安全性試験において、水系食物連鎖における高次消費者の試験魚として OECD テストガイドラインにおいて推奨されている。そこで、本発表ではメダカを用いた化学物質の安全性試験について、抗男性ホルモン様化学物質検出

試験や魚類短期繁殖試験 (TG229)、メダカ拡張一世代繁殖試験 (Medaka Extended One-generation Reproduction Test: MEOGRT)など、特に内分泌かく乱検出に用いられる試験方法について紹介したい。

Session III メダカの基盤研究 (14:50-16:10)

(座長：北野 健)

Session III-1

メダカバイオリソースプロジェクトの現状と展望 —“住みよい”メダカコミュニティの育成を目指して—

成瀬 清

(基礎生物学研究所バイオリソース研究室)

2002年より始まったメダカバイオリソースプロジェクト(NBRP Medaka)も14年目を迎えた。第2期よりこのプロジェクトに参加し、中核の代表を拝命して7年が経過した。第2期では第1期で名古屋大学が中心となって収集・保存した系統をすべて基礎生物学研究所へ移管し、これに加えてcDNA/BAC/Fosmid等のメダカゲノムリソース及び孵化酵素の収集・保存・提供も開始した。またこれらのリソースに加えゲノム情報、系統情報、実験マニュアルなどを充実させることで、メダカ研究に必要なリソースと情報を一度に得ることができるone stop service化を推進し、より利用しやすいメダカバイオリソースプロジェクトを目指して事業の展開を図っている。さらに基礎生物学研究所の施設を最大限活用した国内外向けWorkshopの開催やメダカ研究に関する国際会議の開催等をおこなうことで研究者間の交流機会を提供し、より親しみやすいメダカコミュニティの育成にも貢献しようとしている。第3期では個別研究をより推進できるNBRP Medakaを目指すためメダカコミュニティ共通のfacility(ライトスキャナー、PCR装置、マイクロインジェクション装置、メダカ飼育設備等)を整備した。これによりTILLINGライブラリーのスクリーニングやCRISPR-Cas9によるゲノム編集のためのマイクロインジェクションなどの実験を基礎生物学研究所で行うことができる。研究所が公募する個別共同利用研究を利用することで旅費と滞在費を支援することも可能である。

Session III-2

メダカにおけるCRISPR/Cas9 systemを用いた高効率F0ノックアウト個体作製法の検討

澤村 理英・長船 奈津美・村上 貴浩・北野 健

(熊本大学大学院自然科学研究科)

[目的] ゲノム編集技術を用いた変異体の作製において、F0世代では野生型遺伝子を含むモ

ザイク個体であることが多く、次世代以降での解析が主流である。特に世代交代に時間がかかる魚種の場合、表現型解析までに長い期間を要する。そこで本研究においては、表現型解析の迅速化を目的に、CRISPR/Cas9 system による F0 世代での高効率ノックアウト個体作製法の確立を試みた。

[方法] 供試魚として、生殖細胞を赤色蛍光で可視化できるトランスジェニックメダカを使用した。またノックアウト標的遺伝子として表現型(生殖細胞消失)が予想される *dead end (dnd)*、コントロールとして *arginine vasotocin (avt)* を用いた。実験方法は、リコンビナント Cas9 タンパク質、tracrRNA、crRNA (*dnd* crRNA または *avt* crRNA) の混合液を 1 細胞期のメダカ胚に顕微注入して孵化まで飼育後、そのメダカ胚の生殖細胞を蛍光観察及び組織学的観察し、遺伝子変異パターンをゲノム PCR 及びシーケンス解析により調べた。

[結果] 顕微注入した個体の生殖細胞数を計数したところ、*avt* crRNA を注入した個体では非注入個体と同様の生殖細胞数を示したが、*dnd* crRNA を注入した個体では全ての個体で生殖細胞が完全に消失していた。また、それぞれの crRNA を注入した個体における遺伝子変異パターンをゲノム PCR 及びシーケンス解析したところ、調べた全ての個体で変異が検出された。以上の結果から、本研究条件により、高効率で F0 ノックアウト個体を作製できることが明らかとなった。

Session III-3

生体内の単一細胞に遺伝子発現誘導する顕微鏡技術のメダカへの応用

亀井 保博

(基礎生物学研究所)

顕微鏡は生物学者が「光で観る」ための道具として発展してきました。近年の顕微鏡技術で特筆すべきは分子生物学との融合です。緑色蛍光タンパク質 (GFP) は、タンパク質の局在や、細胞の標識など、ライブイメージングを可能にすることで生物学に新たな世界を広げました。一方で、顕微鏡を「観る」から「操作する」する新たな可能性を示す技術も生まれています。ライブで、しかも能動的に刺激して応答を観察できるので、今まで受動的だった観察が大きく変わりつつあります。一方で、私は赤外線を生体の局所に当て細胞を暖めて、生物が本来持つ熱ショック応答を応用して遺伝子を発現させる「操作する」顕微鏡技術 (IR-LEGO) を開発しました。本講演では、この日本発のこの顕微鏡技術の原理紹介と、それを利用した共同研究 (特にメダカ) を幾つかご紹介させていただきます。