

「内分泌かく乱物質」  
平成11年度採択研究代表者

黒田 雅彦

(東京医科大学 講師)

## 「内分泌かく乱物質が減数分裂、相同組み換えに与える影響」

### 1. 研究実施の概要

近年、環境ホルモンが、地球上の生命の連続性という生殖細胞を介した世代から世代への遺伝情報に影響を与えることが明らかになってきた。しかし、どのようなメカニズムで内分泌かく乱物質が生殖細胞に作用するかは未だに不明な点が多い。卵胞数や精子数の減少の原因は、減数分裂の異常といった直接的な原因の他、ホルモンの作用調節の異常によることが考えられる。我々は、現在までの研究により、ダイオキシンが相同組み換え、減数分裂に関与する可能性のある遺伝子の発現制御に影響を与えることを見いだした。この事実は、環境ホルモンが直接的に相同組み換え、減数分裂に関与する可能性を示唆するものである。本研究において我々は、環境ホルモンが相同組み換え、減数分裂に与える影響を検討し、さらにその影響の大きさ、程度をモニタリングするシステムを開発することを目指していく。

### 2. 研究実施内容

[ 研究項目 1 : 減数分裂期に環境ホルモンによって誘導される遺伝子の単離 ]

我々は、環境ホルモンが相同組み換え、減数分裂に関与する可能性を指摘しているが、cDNA Representational Difference Analysis法 (RDA法) によってダイオキシンによって誘導される遺伝子のうち、染色体分配に関与する遺伝子 (DIF-2、Dioxin inducible factor-2) 特に精子に発現がみられる遺伝子 (DIF-3、Dioxin inducible factor-3) を単離することに成功した。構造的には、DIF-2は、C末端側にDrosophilaにおいて染色体の分配に関与する遺伝子と相同の構造を有する。現在、この遺伝子がどのように環境ホルモンの影響を受けているのか、その生理的機能も含め検討している。DIF-3はZnフィンガーモチーフを有する転写因子で、TCDD濃度依存性に発現が誘導される(図1)。さらに、興味深いことにDIF-3は、ビスフェノールA、diethylstilbestrol (DES) によっても発現が誘導される。抗体を用いた検索では、細精管の各成熟段階の細胞の核内に局在が確認された。



図1 ES細胞におけるTCDDによるDIF-3の誘導左よりTCDDの濃度は各0、1、10、100、1000nM

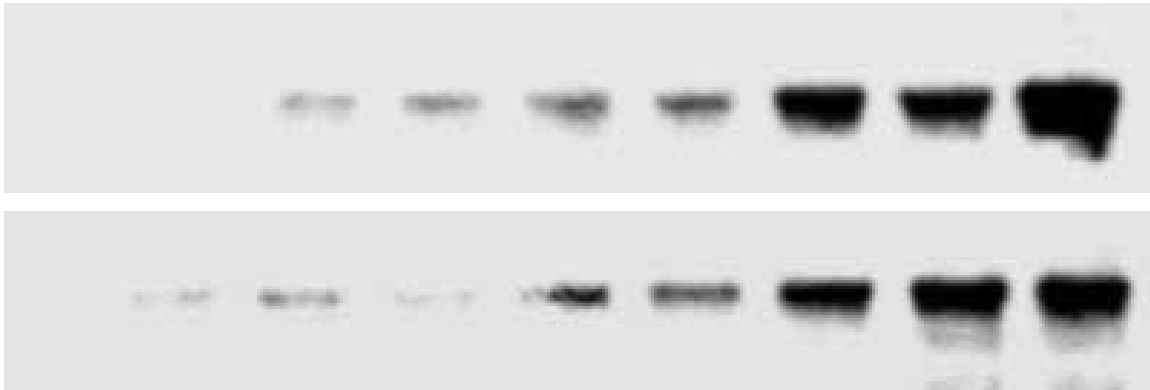


図2 ビスフェニールA、DESによるES細胞におけるDIF-3の誘導  
上がビスフェニールA、下がDES各レーンはそれぞれ0、2、4、6、8、10、14、16、18時間御を示す

[ 研究項目 2 : ダイオキシンによるG2/M期チェックポイントの制御 ]

Mad2は、mitotic checkpoint proteinとしてAPC complexに結合しG2/M期の制御に重要な役割を果たしている。また最近の報告では、減数分裂第二期において、染色体の分配に重要な役割を果たすことが示されている。我々は、TCDDによってMad2遺伝子産物の発現が抑制されることを見いだした(図3)。一方、ダイオキシンの細胞毒性はbHLH/PAS転写受容体であるArylhydrocarbon receptor (AhR)によって仲介されることが証明されているが、このTCDDによるMad2の発現抑制は、AhRを持たない細胞でも確認された(図4)。この事実から、TCDDによるMad2の制御は新規のTCDD情報伝達系が働いていることが推定される。

また、Nocodazoleなどの染色体紡錘系阻害剤によって細胞はcheck point機構によりG2/M期に停止するが、その際Mad2は重要な役割を果たす。Mad2が減少ないし欠失した細胞は、Nocodazoleによって細胞周期は停止しない。我々はTCDDによってもMad2の減少によるM期の停止の阻害を確認することができた(図5)。TCDDの発がんの分子機構は明らかではないが、染色体不安定性を示すがん細胞にMAD2遺伝子産物の発現が低下している症例の存在が示されている。この事

からTCDDがMad 2 の減少をもたらし、染色体不安定性を誘導することにより、細胞の発がんに関与している可能性が示唆された。



図 3 TCDDによるMad 2 mRNAの減少。MEF (mouse embryonic fibroblasts) 細胞をTCDDで2時間処理後ノーザンはイブリダイゼーションを行った。左よりTCDDの濃度は0、1、10、100、1000nM



図 4 AhRを欠失したMEF細胞におけるMad 2 のTCDDによる発現抑制

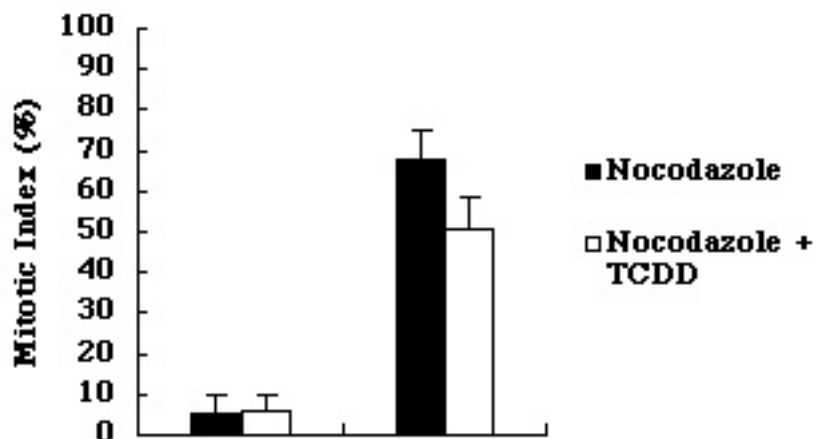


図 5 NocodazoleによるG 2 / M期の細胞周期停止のTCDDによる阻害を示す。HeLa細胞をNocodazole単独およびNocodazole + TCDDで12時間処理をし、Mitotic Index( MI )を計測した。左は0h、右は12h。12時間後にMIの減少が見られる。

[ 研究項目 3 : 新規遺伝子トラップ法を用いた環境ホルモンに応答する相同組み換えに関与する遺伝子群の単離 ]

本研究項目においては環境ホルモンに応答する相同組み換えに関与する遺伝子群の単離を遺伝子トラップ法を用い検討している。すでに我々の研究室では、レトロウイルスによる遺伝子トラップを実用化しているが、平成12年度では、GFP

を指標にした遺伝子トラップの開発に成功した。このシステムを用い今後遺伝子の単離を目指していく。

「研究項目 4：減数分裂期特異的ライブラリーを用いた環境ホルモンに応答する相同組み換えに關与する遺伝子群の単離」

生体内では、減数分裂、DNAの相同組み換えは、生殖細胞およびDNAに放射線などの傷害によって二重鎖切断が生じたときに応じる。精子形成においては、第一減数分裂、第二減数分裂をへて成熟した精子となる。その際染色体の組み換え、交差は第一減数分裂におこる。この時期の細胞はパキテン期とよばれるが、遠心密度勾配によりこのパキテン期の細胞は分離することが可能である。これまでに、松田らのグループはこのパキテン期の細胞を分離しこの細胞からmRNAを単離し遺伝子ライブラリーを作製している。このライブラリーには減数分裂期のDNA相同組み換えに關与する遺伝子が濃縮されている。平成12年度はこの遺伝子ライブラリーのEST化を行いクローンのシークエンスおよびDNA chipの作製を行った。現在約500遺伝子の解析を終了している。

「研究項目 5：環境ホルモンとアレルギー疾患」

ダイオキシンとDESの両者によって発現量が増加したものの一つとして、IgE-dependent Histamine Releasing Factor( HRF ) を同定した。HRFはIgE依存的に好塩基球からヒスタミンやIL-4、IL-13を遊離させる作用を持つ事で知られ、さらに、最近では好酸球にも直接作用することが明らかになってきた。一般的には炎症の後期反応において炎症反応を悪化すると考えられている。従って、近年増加しているアレルギー疾患と環境ホルモンの汚染との関連が示唆された。



図 6 ES細胞におけるTCDDによるIgE-dependent HRFの誘導  
左よりTCDDの濃度は各0、1、10、100、1000nM

### 3．主な研究成果の発表（論文発表）

なし