

「内分泌かく乱物質」

平成 12 年度採択研究代表者

宮本 薫

(福井医科大学 教授)

「生殖系での低濃度内分泌攪乱物質関連遺伝子データベースの構築」

1. 研究実施の概要

内分泌攪乱物質の女性生殖器系への影響は、一般に考えられているよりもずっと低濃度で現れる可能性が示唆されている。しかしながら具体的なデータが不足しているのが現状である。そこで私どもは低濃度の内分泌かく乱物質が女性生殖腺に与える影響を遺伝子の変化としてとらえ、それらの遺伝子群を同定してデータベースを構築したいと考えている。

平成13年度はシステムの確立をかねて卵巣顆粒膜細胞に対する低濃度のダイオキシンの影響を解析した。卵胞の発達と成熟には卵胞内に存在する卵巣顆粒膜細胞の増殖分化が不可欠である。私どもはすでに、卵巣顆粒膜細胞のFSH受容体およびLH受容体の遺伝子発現が、低濃度の(10pM)ダイオキシン(TCDD)によって著しく抑制されることを明らかにしている。

今回はゴナドトロピン受容体以外の遺伝子発現の変化を解析するため、上述と全く同じ条件でラット卵巣顆粒膜細胞に低濃度のダイオキシン(TCDD)を加え、遺伝子発現の変化をサブトラクションクローニングにより解析した。ラット卵巣顆粒膜細胞の初代培養系に低濃度(100pM)のTCDDを加え、サブトラクションクローニングを行い、TCDD 抑制性及び誘導性遺伝子群をそれぞれ含む別個のライブラリーを作成した。それぞれ1440クローンずつを単離、PCR によりインサートのみを増幅して DNA マイクロアレイ用サンプルの調製を行い解析した。

その結果、ダイオキシン誘導性遺伝子71クローン、抑制性遺伝子114クローンが得られ、塩基配列解析により重複するクローンを除いた結果、ダイオキシン誘導性遺伝子29個、抑制性遺伝子69個が単離された。これら全ての遺伝子についてRT-PCRにより最終確認を行い、誘導性遺伝子9個、抑制性遺伝子43個の計52遺伝子がラット卵巣顆粒膜細胞で低濃度のダイオキシンにより実際に影響をうける事を実証した。

2. 研究実施内容

1) ラット卵巣顆粒膜細胞の遺伝子発現に対する低濃度のダイオキシン(TCDD)の影響の解析。

ラット卵巣顆粒膜細胞に低濃度のダイオキシン(TCDD)を加え、遺伝子発現の変化をサブトラクションクローニングにより解析した。ラット卵巣顆粒膜細胞の初代培養系に低濃度(100pM)のTCDDを加え、サブトラクションクローニングを行い、TCDD 抑制性及び誘導性遺伝子群をそれぞれ含む別個のライブラリーを作成した。それぞれの cDNA ライブラリーから1440クローンずつを単

離し、PCR によりインサートのみを増幅して DNA マイクロアレイ用サンプルの調製を行った。DNA マイクロアレイによる解析は、Cy3、Cy5 標識した計4種類のプローブ(独立した2回の実験を行い、ダイオキシン処理及び未処理の細胞から得られたmRNA を、それぞれ Cy3、Cy5 を入れ替えて標識した)を調製して行い、全てのプローブで陽性のクローンのみを単離した。

その結果、ダイオキシン誘導性遺伝子71クローン、抑制性遺伝子114クローンが得られ、塩基配列解析により重複するクローンを除いた結果、ダイオキシン誘導性遺伝子29個、抑制性遺伝子69個が単離された。これら全ての遺伝子についてRT-PCRによる発現解析で最終確認を行い、最終的に誘導性遺伝子9個、抑制性遺伝子43個の計52遺伝子がラット卵巢顆粒膜細胞で低濃度のダイオキシンにより実際に影響をうける事を実証した。

それらの結果を図1に示した。ラット卵巢顆粒膜細胞では CYP1B1, quinone reductase, UDP-glucuronosyltransferase をはじめとする既知の遺伝子群が低濃度のダイオキシンにより誘導されることを確認した。またミトコンドリア由来の遺伝子群の発現が上昇する事も興味深い。さらに2種類の未知の遺伝子群が単離されている。一方、ダイオキシン抑制性の遺伝子群として、43個の遺伝子群が同定されたが、それらの中には細胞骨格系および接着因子関連の遺伝子群が数多く含まれている。また8種類の未知遺伝子群が単離された。

ラット卵巢顆粒膜細胞ではダイオキシン反応性の P450 として CYP1B1 のみが誘導されていることが判明した。

CYP1B1 はエストロゲンを酸化してカテコールエストロゲンに変換する酵素と言われている。カテコールエストロゲンはそれ自身強い変異源性を有することから、子宮内膜癌の発原因の一つであるとする説が有力である。この結果は、卵巢において低濃度のダイオキシンによって CYP1B1 が強く誘導されると、卵巢顆粒膜細胞で生産されたエストロゲンがカテコールエストロゲンに変換され、卵巢及び子宮に作用してそれらの組織の腫瘍化につながる可能性を示唆している。低濃度のダイオキシンが卵巢ゴナドトロピン受容体遺伝子発現の抑制などの生殖機能だけでなく、卵巢および子宮の腫瘍化にも関係する事を示す興味深い結果である。また、単離されたそのほかの遺伝子群に関してもそれぞれ個別に生殖機能との関連を検討して行きたいと考えている。

2) 遺伝子データベースの構築に向けての整備

本研究の目的の一つは、遺伝子データベースを構築した後、それらの遺伝子をリクエストに応じて配布できるようにすることである。その一環として上述の様にして単離した遺伝子群の再クローニングを行い、形質転換した大腸菌及び、プラズミド DNA を再調製し保存している。再調製した全てのプラズミド DNA について両末端からの塩基配列解析を行い、クローンの確認をするとともにインサートの長さ及び領域を確定した。一方、本研究で用いたサブトラクションクローニングでは全長を含むクローンが得られることは希であるため、未知の遺伝子に関しては全長クローンの単離も併せて行っている。

本年度の研究により、生殖系での低濃度ダイオキシンの影響を遺伝子発現の変化として網羅的にとらえることが出来た。この事により内分泌かく乱物質関連遺伝子データベースの構築の為のシステムが確立された。現在、in vitro ではヒト卵巢顆粒膜細胞を用いて、また in vivo ではラット卵巢

及び胎盤を用いて、低濃度ダイオキシンによって影響を受ける遺伝子群の検索を、本年度で確立された上述のシステムを用いて検討中である。

Gene Name	Microarray (Color Ratios)	RT-PCR	
		C	T
1, TCDD-inducible genes (9)			
CYP1B1	5.99		
Q uinone reductase	5.88		
UGT	2.86		
Mitochondrial genome	6.06		
feritin light chain	6.02		
Cyclin G1	2.95		
PTB-like protein	2.94		
gij 15144454	3.86		
gij 14736324	3.60		
2, TCDD-suppressive genes (43)			
Filamin A	6.85		
Catenin α1	5.34		
talin	8.98		
disulfide isomerase-related protein (P5)	5.56		
Calreticulin	11.92		
Serpinh1	10.96		
oxgen regulated protein (150kD)	8.32		
Vascular α-actin	6.70		
cytoplasmic β-actin	4.71		
fibronectin 1	4.63		
Xist	4.17		
connexin 43	3.67		
3α-HSD	5.25		
calnexin	4.67		
damage-specific DNA binding protein 1	4.88		
peptidylglycine α-amidating monooxygenase	3.74		
PARG1	3.43		
α-glucosidase 2	13.86		
Carboxypeptidase D	9.47		
α-actin	8.52		
Eker rat-associated intracisternal-A particle element	7.53		
Integrin α 6 subchain	6.35		
Plod2	3.88		
Fkbp63	5.75		
tricarboxylate carrier-like protein	5.64		
Lysyl oxidase	5.55		
SUP	5.10		
NAP22	5.10		
USF1	4.82		
Vinculin	4.00		
cathrin, heavy plypeptide (Hc)	3.98		
endothelin-converting enzyme	3.87		
Aldehyde dehydrogenase family 9	3.86		
Dystroglycan 1	3.54		
Glucose regulated protein, 58kD	3.43		
gij 13879259	10.65		
gi 15029779	5.14		
gij 14268532	4.97		
gij 14725995	3.35		
2600	8.03		
2140	5.92		
2316	4.89		
1701	3.70		

3. 研究実施体制

(1) 宮本グループ

① 研究分担グループ長:宮本 薫

(福井医科大学・医学部・生化学(2)講座、教授)

② 研究項目

- ・ サブトラクションクローニング及びデータベースの構築
- ・ 低濃度の内分泌攪乱物質による生殖機能関連遺伝子群のデータベースの構築

(2) 峯岸グループ

① 研究分担グループ長:峯岸 敬

(群馬大学・医学部・産婦人科学、教授)

② 研究項目

- ・ 生殖系細胞の採取と培養

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Sekiguchi, T., Miyamoto, K., Mizutani, T., Yamada, K., Yazawa, T., Yoshino, M., Minegishi, T., Takei, Y., Kangawa, K., Minamino, N., Saito, Y., Kojima, M.: Molecular cloning of natriuretic-peptide receptor A from bull frog (*Rana catesbeiana*) brain and its functional expression. *Gene* 273, 251-257, 2001.
- Niiya, T., Osawa, H., Onuma, H., Suzuki, Y., Taira, M., Yamada, K., Makino, H.: Activation of mouse phosphodiesterase 3B gene promoter by adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *FEBS Lett.* 505, 136-140, 2001.
- Mizutani, T., Yamada, K., Yazawa, T., Okada, T., Minegishi, T., Miyamoto, K.: Cloning and characterization of gonadotropin inducible ovarian transcription factors (GIOT1 and 2) that are novel members of the (Cys)₂-(His)₂-type zinc finger protein family. *Mol. Endocrinol.* 15, 1693-1705, 2001.
- Kikkawa, E., Hinata, M., Keng, V. W., Myint, Z., Sato, A., Yamada, K., Tanaka, T., Noguchi, T.: Sp family members stimulate the transcription of *Hex* gene via interactions with GC boxes. *J. Biochem. (Tokyo)* 130, 885-891, 2001.

(2) 特許出願

なし