

「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 第一病理学講座 講師)

「内分泌かく乱物質が減数分裂、相同組換えに与える影響」

1. 研究実施の概要

我々は、現在までの研究により、相同組み換えや減数分裂に関与する可能性のある新規遺伝子DIF-2, DIF-3 (Dioxin Inducible Factor-2, 3)を含むいくつかの遺伝子が、ダイオキシンによって発現制御を受けることを新規に同定している。今年度は、昨年度に引き続き、DIF-2に関し詳細な検討を行った。その結果、DIF-2が生理的に染色体のヘテロクロマチン構造に関与していること、Heterochromatin Protein 1 (HP1)と共局在することを見出した。また、DIF-2の過剰発現が誘導する染色体不安定性には、HP1の異常局在が関与することも見出した。さらに、DIF-2遺伝子、DIF-3遺伝子をそれぞれ欠失したマウスの作製にも成功した。これらのマウスの詳細な解析は、環境ホルモンがDIF-2, DIF-3を通じて直接的に相同組み換え、減数分裂に関与する分子メカニズムを明らかにするであろう。また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。

一方、ダイオキシンに発現制御を受ける遺伝子の一つとして新規に同定したDIF-1/IgE-dependent Histamine Releasing Factor (HRF) は、子宮内膜症との関連が示唆され、現在、疫学的にその発現量と環境ホルモンとの相関を解析するシステムを開発中である。

2. 研究実施内容

「研究項目1：環境ホルモンがDIF-2遺伝子の発現制御により減数分裂に影響を与える可能性」

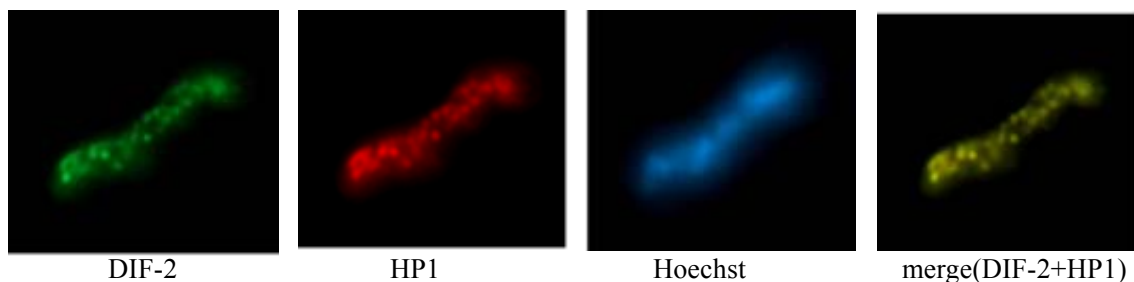
我々は、環境ホルモンが相同組み換え、減数分裂に関与する可能性を指摘しているが、現在までの研究により、ダイオキシンによって誘導される遺伝子の一つとして、染色体の構成に関与する遺伝子DIF-2の単離に成功した。これまでに、DIF-2が精子形成のパキテン期に強く発現し、精子形成の第一期減数分裂のシナプトネマ構造体に局在することを確認したが、今年度は、DIF-2の生理的な機能の解析を行った。その結果、DIF-2はSister Chromatid Exchangeに関与することから、特に減数分裂の組換えに直接的に関与することが示唆された。また、DIF-2ノックアウトマウスの作製を行なった。その結果ホモ接合性のDIF-2欠失マウスは胎生致死であることが示された。今後は、ヘテロ接合性にDIF-2を欠

失したマウスでの解析を検討していく。

「研究項目2：環境ホルモンがepigeneticな作用を通じて、遺伝子発現に影響を与える可能性」

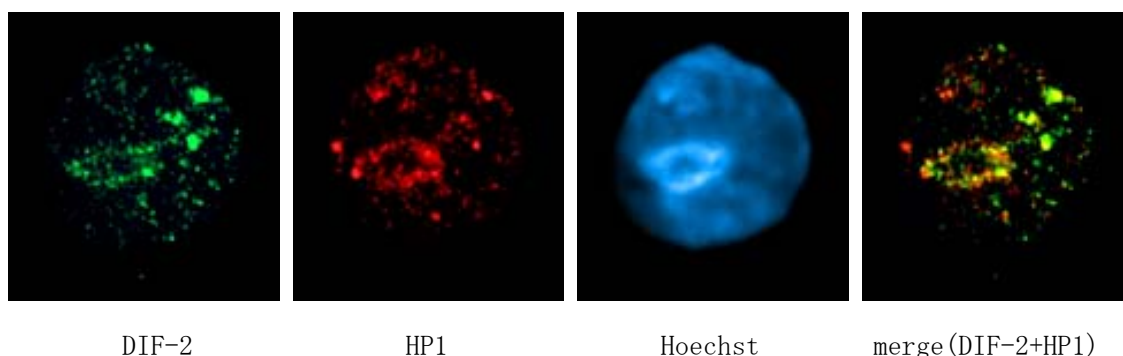
ショウジョウバエにおけるDIF-2ホモログがヘテロクロマチンに関与することから、今年度、DIF-2遺伝子とヘテロクロマチンの構造体との関係についても検討を行った。その結果、ヘテロクロマチンの重要な構成成分であるHP1とDIF-2が、染色体及び間期の細胞において共局在することが明らかになった(図1、図2)。また、DIF-2は環境ホルモンによって誘導を受けることから、DIF-2の過剰発現がHP1の異常をもたらすかどうかの検討を行った。その結果、細胞内でDIF-2を過剰発現させた場合にHP1が通常の核内ではなく、核外あるいは、核辺縁部に局在することが明らかになった(図3)。また、このようなHP1の異常局在を示す細胞は、最終的に染色体不安定性がひきおこされた。現在HP1は、ヒストンH3のリジン9のメチル化部位に結合し、epigeneticに遺伝子発現の抑制、あるいは染色体のヘテロクロマチン領域の構成に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。このようなことを考慮すると、環境ホルモンがDIF-2の発現異常を通じて、遺伝子のepigeneticなコントロールに影響を及ぼす可能性が想定される。

図1 DIF-2とHP1の染色体における共局在



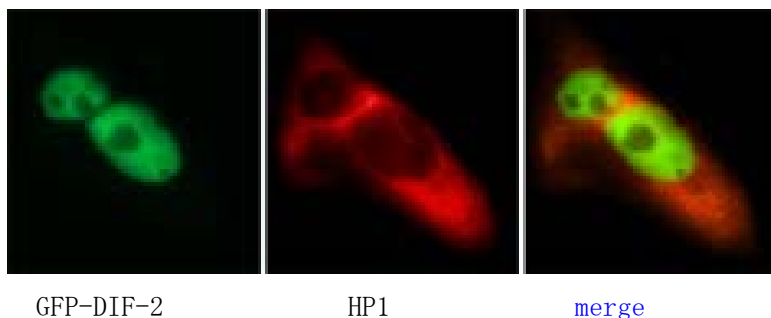
CHO細胞の染色体におけるDIF-2とHP1の免疫染色。左からDIF-2:緑、HP1:赤、DNA(Hoechst):青、merge:DIF-2とHP-1を重ね合わせたものを示す。

図2 CHO細胞の間期におけるDIF-2とHP1の共局在



CHO細胞の間期におけるDIF-2とHP1の免疫染色。左からDIF-2:緑、HP1:赤、DNA(Hoechst):青、merge:DIF-2とHP-1を重ね合わせたものを示す。

図3 DIF-2過剰発現によるHP1の局在異常



CHO細胞において、DIF-2を過剰発現させると、HP1が細胞質に異常局在する。

「研究項目3：環境ホルモンが染色体テリトリーに影響を与える可能性」

昨年度、我々はDIF-2遺伝子の過剰発現が、細胞周期の間期における染色体の位置すなわち染色体テリトリーに影響を及ぼすことを見出した。この事実は、環境ホルモンが染色体テリトリーに影響を及ぼす可能性を示している。一方で環境ホルモンの染色体テリトリーに対する影響を客観的に定量する実験系の開発が必要になる。このことから、今年度、染色体テリトリーを正確に同定する手法を開発した。具体的には、細胞の染色体テリトリーを共焦点レーザー顕微鏡を用いて3D-FISH法によって解析し、その後コンピューター画像処理によって染色体の距離を計測する方法である。このシステムによって今後、客観的な染色体テリトリーの計測が期待される。

「研究項目4：環境ホルモンがDIF-3遺伝子の発現制御により減数分裂に影響を与える可能性（DIF-3ノックアウトマウスを用いた検討）」

我々は、本研究の過程でcDNA Representational Difference Analysis法（RDA法）によってダイオキシンに誘導される遺伝子として、DIF-3遺伝子の単離に成功した。DIF-3はZn-finger motifを有する転写因子である。生体内では、肝臓、精巣に強い発現が見られる。昨年度このDIF-3遺伝子欠損マウスの作製に成功した。その結果、DIF-3遺伝子をホモ接合性に欠失したマウスは胎生致死であることが明らかになった。現在その胎生致死のメカニズムを検討している。また、今後はヘテロ接合性にDIF-2を欠失したマウスでの解析を検討していく。

「研究項目5：環境ホルモンと子宮内膜症」

我々の研究過程で、ダイオキシンによって誘導される分子として、DIF-1/IgE-dependent Histamine Releasing Factor（HRF）を同定した。DIF-1/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。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。また、昨年度は、環境ホルモンによる関与が疑われる子宮内膜症での発現を検討した結果、興味深いことに内膜症患者の病変部においてDIF-1/HRFが上昇していることが示された。しかし、従来はreal-time PCR法にてDIF-1/HRFの発現を検討していたが、大量の検体を処理するためには限界がある。その結果をふまえ、今年度はDIF-1/HRF特異的抗体を作製し、血清中からwestern

blot法にて、DIF-1/HRFの検出に成功した。その結果、子宮内膜症の患者血清中には正常コントロール血清に比較しDIF-1/HRFが有意に上昇していることが明らかになった。今後はさらに、環境ホルモンの暴露との相関の検討を行っていく。

3. 研究実施体制

(1) 減数分裂期に環境ホルモンによって誘導される新規遺伝子の解析グループ

①研究分担グループ長名（所属、役職）

黒田雅彦（東京医科大学医学部 第一病理学教室 講師）

②研究項目

研究項目2：環境ホルモンがepigeneticな作用を通じて、遺伝子発現に影響を与える可能性

研究項目3：環境ホルモンが染色体テリトリーに影響を与える可能性

(2) 環境ホルモンが相同組み換え、染色体分配に関与する可能性を検討するグループ

①研究分担グループ長名（所属、役職）

黒田雅彦（東京医科大学医学部 第一病理学教室 講師）

②研究項目

研究項目1：環境ホルモンがDIF-2遺伝子の発現制御により減数分裂に影響を与える可能性

研究項目4：環境ホルモンがDIF-3遺伝子の発現制御により減数分裂に影響を与える可能性

(3) 環境ホルモンの子宮内膜症への影響、アレルギー性疾患への影響を検討するグループ

①研究分担グループ長名（所属、役職）

黒田雅彦（東京医科大学医学部 第一病理学教室 講師）

②研究項目

研究項目5:環境ホルモンと子宮内膜症

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

○ Kuroda M, Oikawa K, Ohbayashi T and Mukai K: Effects of TCDD on Mitosis and Meiosis. Environmental Sciences, 10, Supplement: 069-076, 2003.

○ Oikawa K, Kosugi Y, Ohbayashi T, Kameta A, Isaka K, Takayama M, Kuroda M and Mukai K: Increased expression of IgE-dependent histamine-releasing factor in endometriotic implants. J Pathol, 199: 318-323, 2003.

○ Oikawa K, Ohbayashi T, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Teshima S, Rokutan K, Mukai K, Kuro84-987, 2002.

(2) 特許出願

なし