

「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

低濃度の内分泌かく乱物質が女性生殖器系に対しても影響を与える可能性が示唆されているが、それを示す具体的なデータが不足しているのが現状である。私どもは、低濃度の内分泌かく乱物質が女性生殖器系に及ぼす影響を遺伝子発現の変化として捕らえ、それらの遺伝子を同定してデータベースを構築することを目指している。

平成14年度は、昨年度に引き続き低濃度のダイオキシンの遺伝子発現に対する影響をサブトラクションクローニングとDNAマイクロアレイを併用して解析した。In vitroでは、FSHによって分化誘導したラット卵巣顆粒膜細胞に対する低濃度ダイオキシンの影響を、サブトラクションクローニングを中心に解析した。その結果、分化誘導の際に100pM TCDDによって抑制される遺伝子27種類、誘導される遺伝子10種類を同定した。In vivoでの解析は、環境研・遠山グループとの共同研究で、妊娠ラットに1600ng/kgのTCDDを投与したときの胎盤および卵巣を用いて、サブトラクションクローニングとDNAマイクロアレイを併用して行った。スクリーニングに供したクローンは延べ約9000クローン、最終的な発現の確認にはReal-time PCRを用いた。その結果、妊娠ラット胎盤でダイオキシンの誘導された遺伝子42種類、抑制された遺伝子4種類を同定した。胎盤でのダイオキシン誘導性遺伝子群には低酸素時に誘導される遺伝子や、転写因子HNF-4によって調節を受ける遺伝子群が多く含まれ、卵巣でのダイオキシンの影響とは極めて異なるパターンを示した。また妊娠ラット卵巣では、ダイオキシンによって誘導される遺伝子39種類、抑制される遺伝子56種類を同定した。これらの中には、データベースには登録されているものの機能の明らかでない遺伝子29種類、データベースにも登録されていない未知遺伝子19種類が含まれていた。

2. 研究実施内容

1) FSHによるラット卵巣顆粒膜細胞の分化誘導に対するダイオキシンの影響

卵巣顆粒膜細胞では、FSH刺激によりLH受容体をはじめ卵胞成熟に必要とされる様々な遺伝子が発現し黄体化細胞へと分化する。このFSHの作用（卵巣顆粒膜細胞の分化誘導）に対する低濃度のダイオキシンの影響を解析した。ラット卵巣顆粒膜細胞初代培養系に30

ng/mlのFSHを加え分化誘導を行うとともに100 pM TCDDを同時に加え24時間後にmRNAを回収し、サブトラクショナルクロニング、DNAマイクロアレイ、配列解析、RT-PCRの順で解析を行った。その結果、分化誘導の際にTCDDにより誘導される遺伝子10種類、抑制される遺伝子27種類を同定した。内訳は、機能がすでに明らかとなっている遺伝子23種類、データベースには登録されているものの機能が明らかでない遺伝子5種類、データベースにも登録されていない未知遺伝子9種類であった。これらの中には、私どもがはじめて低濃度ダイオキシンの生殖系遺伝子発現に対する影響として報告したLH受容体をはじめとして、SR-BI、P450sccなどステロイドホルモン合成に関わる遺伝子群の一部も抑制性遺伝子として同定された。これは、低濃度ダイオキシンの卵巣顆粒膜細胞の分化に対して抑制的に作用することを示唆している。面白いことに、ステロイド合成に関わる様々な遺伝子のなかで一部の遺伝子だけがダイオキシンにより抑制を受けており、ほかの関連する遺伝子はあまり影響を受けていないことが判明した。

2) ラット胎盤遺伝子発現に対するダイオキシンin vivo投与の影響

ホルツマン系ラット妊娠15日目に1600ng/kgのTCDDを投与し、妊娠20日目に胎盤を採取（サンプルは共同研究により、環境研・遠山先生から提供されたものである）解析を行った。前述と同様、サブトラクショナルクロニングを中心として解析を行ったが、既知遺伝子に関しては、市販のマイクロアレイを用いサブトラクショナルライブラリーをプローブとして一次スクリーニングを行った。未知遺伝子に関しては、サブトラクショナルライブラリーからそれぞれ任意に300クローンずつをピックアップし、配列解析・相同性検索により未知遺伝子のみを選択して、発現解析に供した。発現解析にはReal-time PCRを用い、発現量の差が2倍以上（0.5以下）であった遺伝子をダイオキシン誘導性あるいは抑制性と同定した。その結果、ダイオキシン誘導性遺伝子42種類、抑制性遺伝子4種類を同定した。内訳は、機能がすでに明らかとなっている遺伝子32種類、データベースには登録されているものの機能が明らかでない遺伝子7種類、データベースにも登録されていない未知遺伝子7種類であった。胎盤で発現誘導される遺伝子群は、卵巣などから得られた結果とは大きく異なり、低酸素時に誘導される遺伝子や、転写因子HNF-4によって調節を受ける遺伝子群が多く含まれていた。また、グルコース輸送たんぱく質のひとつであるGlut-2がダイオキシンにより胎盤で誘導されていることを見出した。

3) ラット卵巣遺伝子発現に対するダイオキシンin vivo投与の影響

上記実験で同時に採取した卵巣（同様にサンプルは共同研究により、環境研・遠山先生から提供）を用いて解析を行った。その結果、ダイオキシン誘導性遺伝子39種類、抑制性遺伝子56種類を同定した。内訳は、機能がすでに明らかとなっている遺伝子61種類、データベースには登録されているものの機能が明らかでない遺伝子22種類、データベースにも登録されていない未知遺伝子12種類であった。In vivoでのダイオキシンの卵巣遺伝子発現に対する影響は、卵巣顆粒膜細胞での結果とオーバーラップする点も多く、in vivoでもin vitroと同様、低濃度のダイオキシンが実際の卵巣機能に影響を与えていることが確認された。

このほかに、ヒト子宮内膜間質細胞やヒト卵巣顆粒膜細胞株に対するダイオキシンの影響を同様に解析したが、ダイオキシンの感受性が極めて低く、ヒト卵巣顆粒膜細胞株では150nMという高濃度のダイオキシンの用いても遺伝子発現に対する影響は軽微であった。Real-time PCRで検討してみると、ヒト卵巣顆粒膜細胞株ではAh受容体がほとんど発現しておらず、そのためダイオキシンの感受性がほとんどなくなってしまったものと思われる。

4) 遺伝子データベースの構築に向けての準備

昨年度に引き続き、単離した遺伝子の再クローニングを行い、形質転換大腸菌及びプラスミドDNAを保存している。本研究で用いたサブトラクショナル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、既知もしくはホモログが既知である遺伝子についてはデータベース構築及び公開の一環として、全長を含むクローンを所有・配布しているデータベースへのリンクで対応したいと考えている。また発現解析用のプローブ等の用途に対しては、単離した全クローンの配布が可能である。

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、教授）

②研究項目：

- ・サブトラクショナル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、教授）

②研究項目：

- ・生殖系細胞の採取と培養

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Shou, Z., Yamada, K., Inazu, T., Kawata, H., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Kajitani, T., Okada, K., Miyamoto, K.: Genomic structure and analysis of transcriptional regulation of the mouse zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1) gene. *Gene* 302, 83-94, 2003.
- Kato, M., Inazu, T., Kawai, Y., Masamura, K., Yoshida, M., Tanaka, N., Miyamoto, K., Miyamori, I.: Amphiregulin is a potent mitogen for the vascular smooth muscle cell line, A7r5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 1109-1115, 2003.
- Yazawa, T., Mizutani, T., Yamada, K., Kawata, H., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Kajitani, T., Shou, Z., Miyamoto, K.: Involvement of cAMP response element

binding protein (CREB), steroidogenic factor 1 (SF-1) and Dax-1 in the regulation of gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1 (GIOT1) gene expression by FSH in ovarian granulosa cells. *Endocrinol.* 144, 1920-1930, 2003.

- Satoh, T., Toyoda, M., Hoshino, H., Monden, T., Yamada, M., Shimizu, H., Miyamoto, K., Mori, M. : Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ stimulates the growth arrest and DNA-damage inducible 153 gene in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncogene* 21, 2171-2180, 2002.
- Yoshino, M., Mizutani, T., Yamada, K., Tsuchiya, M., Minegishi, T., Yazawa, T., Kawata, H., Sekiguchi, T., Kajitani, T., Miyamoto, K. : Early growth response gene-1 regulates the expression of the rat luteinizing hormone receptor gene. *Biol. Reprod.* 66, 1813-1819, 2002.
- Inoue, K., Nakamura, K., Abe, K., Hirakawa, T., Tsuchiya, M., Matsuda, H., Miyamoto, K., Minegishi, T. : Effect of transforming growth factor β on the expression of luteinizing hormone receptor in cultured rat granulosa cells. *Biol. Reprod.* 67, 610-615, 2002.
- Hirano, S., Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Yazawa, T., Kajitani, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Shigematsu, Y., Mayumi, M., Miyamoto, K. : Rat zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1), a nuclear factor-YA-interacting nuclear protein, forms a homodimer. *Gene* 290, 107-114, 2002.
- Yamada, K., Kawata, H., Matsuura K., Shou, Z., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Yoshino, M., Sekiguchi, T., Kajitani, T., Miyamoto, K. : Functional analysis and the molecular dissection of zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 368-374, 2002.
- Sekiguchi, T., Mizutani, T., Yamada, K., Yazawa, T., Kawata, H., Yoshino, M., Kajitani, T., Kameda, T., Minegishi, T., Miyamoto, K. : Transcriptional regulation of the Epiregulin gene in the rat ovary. *Endocrinol.* 143, 4718-4729, 2002.
- Onuma, H., Osawa, H., Yamada, K., Ogura, T., Tanabe, F., Granner, D. K., Makino, H. : Identification of the insulin-regulated interaction of phosphodiesterase 3B with 14-3-3 β protein. *Diabetes* 51, 3362-3367, 2002.
- Miyamoto, K., Morishita, Y., Yamazaki, M., Minamino, N., Kangawa, K., Mizutani, T., Yamada, K., Minegishi, T. : Isolation and characterization of vascular smooth muscle cell growth promoting factor from bovine ovarian follicular fluid, and its cDNA cloning from bovine and human ovary. *Arch. Biochem. Biophys.* 390, 93-100, 2001.
- Shimada, N., Yamada, K., Tanaka, T., Kawata, H., Mizutani, T., Miyamoto, K.,

Matsuzawa, T.: Alterations of gene expression in endoderm differentiation of F9 teratocarcinoma cells. Mol. Reprod. Dev. 60, 165-171, 2001.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：2件（研究期間累積件数：2件）