

「内分泌かく乱物質」

平成12年度採択研究代表者

宮本 薫

(福井大学 医学部 医学科 生命情報医科学講座 分子生体情報学 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。さらにそれらに基づいて、低濃度内分泌かく乱物質の女性生殖器系に対する作用のメカニズムを分子レベルで明らかにする。

平成15年度は、*in vivo*での低濃度ダイオキシン投与による妊娠ラットの胎盤、及び卵巣における遺伝子発現変化の全容を明らかにした。網羅的解析法であるサブトラクショナルクローニング、DNAマイクロアレイおよびリアルタイムPCRをさらに改良し、昨年度の解析で同定した遺伝子群に加え、ラット胎盤では、ダイオキシン誘導性遺伝子81種類、抑制性遺伝子21種類を同定した。ラット卵巣では、ダイオキシン誘導性遺伝子66種類、抑制性遺伝子88種類を同定した。また、ラット胎盤のダイオキシン誘導性遺伝子として4種類のグルコース輸送体に加え、一連のインターフェロン誘導性遺伝子群を新たに同定した。

これらの遺伝子の誘導は、ダイオキシンの胎盤に対する作用の分子メカニズムを解明する上で重要と思われる。ラット卵巣での結果は、胎盤でのそれとはまったく異なっており、ダイオキシンが卵巣と胎盤とで違った作用機構を通して働くことが示唆された。

また、エストロゲン様作用を持つジエチルstilbestrol (DES) の*in vivo*投与により、卵巣顆粒膜細胞の異常増殖が引き起こされることを見出し、その際に誘導もしくは抑制されるいくつかの遺伝子を同定した。DESによる卵巣顆粒膜細胞増殖のメカニズムを解明するため、これらの中から細胞増殖に関与すると思われる転写因子MRG-2/CITED-4などに注目し、その分子機構の解明を行っている。

2. 研究実施内容

1) *In vivo*における低濃度ダイオキシン投与による遺伝子発現変化。

昨年に引き続き、ホルツマン系ラット妊娠15日目に1600nk/kgのTCDDを投与し、妊娠

20日目に採取した胎盤及び卵巣での遺伝子発現の変化を主にDNAマイクロアレイ及びリアルタイムPCRを用いて解析した（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）。昨年サブトラクショナルクロニングを中心とした解析とあわせ、胎盤ではダイオキシン誘導性遺伝子81種類、抑制性遺伝子21種類を同定し、卵巣ではダイオキシン誘導性遺伝子66種類、抑制性遺伝子88種類を同定した。胎盤では、低酸素時に誘導される遺伝子群や転写因子HNF-4により調節される遺伝子に加え、主要な4種類のグルコース輸送体や、インターフェロン誘導性の遺伝子群が誘導されることを明らかにした。ダイオキシン投与ホルツマンラット胎盤では、グリコーゲンの蓄積が観察されており（環境研・遠山、石村ら）、今回の解析結果はその分子メカニズムの基盤となるものである。また、インターフェロン誘導性遺伝子群の中には、IP10をはじめとしたケモカインが多くふくまれ、非常に強く誘導されていることが明らかとなった。これらのケモカインや、またインターフェロン自体にも血管新生を抑制する働きがあると報告されていることから、胎盤に対するダイオキシン作用の分子メカニズムを考える上で重要な知見が得られたものと考えられる。一方、卵巣でのダイオキシンによる遺伝子発現変化は、胎盤でのそれとはまったく異なっており、ダイオキシンが卵巣と胎盤とで違った作用機構を通して働くことが示唆された。ダイオキシンの卵巣遺伝子発現に対する影響は、*in vitro*での卵巣顆粒膜細胞での結果（昨年度報告）とオーバーラップする点も多く、*in vivo*でも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おり、ゴナドトロピンによる分化誘導に抑制的に作用していることが確認された。

- 2) ジエチルスチルベステロール（DES）は強力なエストロゲン様作用をもつ内分泌かく乱物質のひとつだが、幼若ラットに腹腔内投与すると、卵巣では未分化の顆粒膜細胞の増殖が著しく促進されることを見出した。図に示されるように、DES投与72時間後の卵巣では顆粒膜細胞が密に詰まった大きな卵胞が出現し、増殖の指標であるBrdUの取り込みからもDESが顆粒膜細胞の増殖を著しく促進していることが明らかとなった。この際、サブトラクショナルクロニング、DNAマイクロアレイ及びリアルタイムPCRによる遺伝子発現変化の解析より、30種類以上のDES感受性卵巣遺伝子群を同定した。これらの中からDESによって卵巣で最も強く誘導される遺伝子であり、細胞増殖に関与すると思われる転写因子MRG-2/CITED-4に注目し、DESによる顆粒膜細胞増殖促進の分子メカニズムの解明を目指している。図に示すように *in situ* hybridizationで、顆粒膜細胞が増殖を開始するDES投与後24時間以降に、MRG-2/CITED-4は顆粒膜細胞層に強く発現してくる。MRG-2/CITED-4は、C末端にED-richドメインを持つ新たに同定されたCITEDファミリーの一員であり、核内コアクチベーターCBP/p300と結合して転写を活性化すると考えられているがその生理的役割は不明であった。CITEDファミリーのCITED-2は細胞の増殖と癌化に関与する転写調節因子として報告されていることから、本研究によりMRG-2/CITED-4はDESによる卵巣顆粒膜細胞増殖を仲介する因子であることが示唆された。

- 3) 昨年度に引き続き、遺伝子データベースの整備を行っている。ヒトゲノムプロジェクトの完了や遺伝子アノテーションの整理が大きく進んだことにより、昨年度報告した機能未知の遺伝子及び未知遺伝子50種類以上の大半について同定することができた。その結果、本研究で得られたほとんどすべての遺伝子に関して、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が可能となった。また発現解析用のプローブ等の用途に対しては、昨年度報告の通り単離した全クローンの配布が可能である。
- 4) 生殖腺分化における内分泌かく乱物質の影響を探る上で、ステロイドホルモン産生細胞の分化メカニズムの解明は欠かせない。本研究では、間葉系幹細胞からアンドロゲン産生細胞、及びグルココルチコイド産生細胞へと分化誘導させる系を初めて確立した。これにより、ステロイドホルモン産生細胞の分化メカニズムの解析と、それに及ぼす内分泌かく乱物質の影響を、遺伝子発現変化として解明していくことが可能となった。

3. 研究実施体制

宮本グループ

- ① 研究分担グループ長：宮本 薫（福井大学 医学部、教授）
- ② 研究項目：サブトラクショナルクロニングとデータベースの構築を担当
生殖系での低濃度内分泌かく乱物質作用の分子メカニズムの解明

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を担当
ゴナドトロピン受容体に対する内分泌かく乱物質作用の分子メカニズムの解明

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

- Osawa, H., Niiya, T., Onuma, H., Murakami, A., Ochi, M., Nishimiya, T., Ogura, T., Kato, K., Shimizu, I., Fujii, Y., Ohashi, J., Yamada, K., Liang, S.-J., Manganiello, V. C., Fujita-Yamaguchi, Y., Makino, H.: Systematic search for single nucleotide polymorphisms in the 5' flanking region of the human phosphodiesterase 3B gene: absence of evidence for major effects of identified polymorphisms on susceptibility to Japanese type 2 diabetes. *Mol. Genet. Metab.* 79, 43-51, 2003.
- Minegishi, T., Hirakawa, T., Abe, K., Kishi, H., Miyamoto, K.: Effect of IGF-1 and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the expression of LH

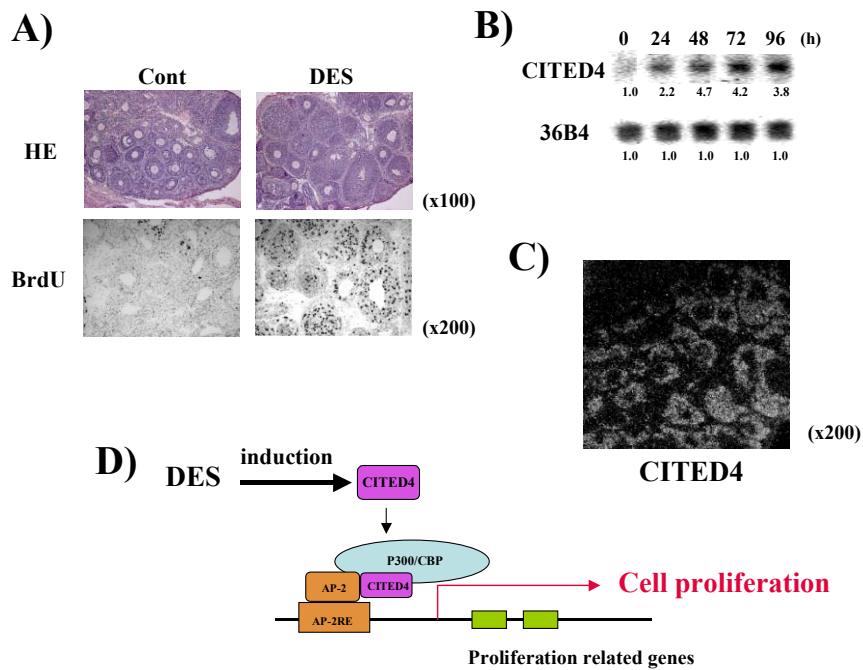
- receptors during cell differentiation in cultured granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 202, 123-131, 2003.
- Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Kajitani, T., Miyamoto, K.: Analysis of zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) 1-interacting proteins: molecular cloning and characterization of a member of the ZHX family, ZHX3. *Biochem. J.* 373, 167-178, 2003.
 - Asai, Y., Yamada, K., Watanabe, T., Keng, V. W., Noguchi, T.: Insulin stimulates expression of pyruvate kinase M gene in 3T3-L1 adipocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1272-1277, 2003.
 - Kawata, H., Yamada, K., Shou, Z., Mizutani, T., Yazawa, T., Yoshino, M., Sekiguchi, T., Kajitani, T., Miyamoto, K.: Zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) 2, a novel member of the ZHX family, functions as a transcriptional repressor. *Biochem. J.* 373, 747-757, 2003.
 - Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Noguchi, T., Miyamoto, K.: Insulin induces the expression of the SHARP-2/Stra13/DEC1 gene via a phosphoinositide 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 30719-30724, 2003.
 - Inoue, K., Nakamura, K., Abe, K., Hirakawa, T., Tsuchiya, M., Oomori, Y., Matsuda, H., Miyamoto, K., Minegishi, T.: Mechanisms of action of TGF-beta on the expression of FSH receptor messenger ribonucleic acid levels rat granulosa cells. *Biol. Reprod.* 69, 1238-1244, 2003.
 - Tsuchiya, M., Inoue, K., Matsuda, H., Nakamura, K., Mizutani, T., Miyamoto, K., Minegishi, T.: Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and LH receptor in MA-10 cells. *Life Sci.* 73, 2855-63, 2003.
 - Sato, K., Nakamura, T., Mizuguchi, M., Miura, K., Tada, M., Aizawa, T., Gomi, T., Miyamoto, K., Kawano, K.: Solution structure of epiregulin and the effect of its C-terminal domain for receptor binding affinity. *FEBS Lett.* 553, 232-238, 2003.
 - Kawata, H., Yamada, K., Shou, Z., Mizutani, T., Miyamoto, K.: The mouse zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) family: ZHX2 forms a heterodimer with ZHX3. *Gene* 323, 133-140, 2003.
 - Kajitani, T., Mizutani, T., Yamada, K., Yazawa, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Kawata, H., Miyamoto, K.: Cloning and characterization of GCX-1, a novel HMG-box transcriptional regulator strongly expressed in rat ovarian granulosa cells. *Endocrinol.* 145(5), 2307-2318, 2004.
 - Yamada, K., Kawata, H., Mizutani, T., Arima, T., Yazawa, T., Matsuura, K., Shou, Z., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Kajitani, T., Miyamoto, K.: Gene

expression of basic helix-loop-helix transcription factor, SHARP-2, is regulated by gonadotropins in the rat ovary and MA-10 cells. *Biol. Reprod.* 70, 76-82, 2004.

- Hirano, S., Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Shigematsu, Y., Mayumi, M., Miyamoto, K.: The rat enhancer of split- and hairy-related protein-2 gene: hepatic expression, genomic structure, and promoter analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 422, 81-90, 2004.
- Shou, Z., Yamada, K., Kawata, H., Yokoyama, O., Miyamoto, K.: A mechanism of induction of the mouse zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1) gene expression by interleukin-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 885-890, 2004.
- Miyamoto, K.: Effects of dioxin on gene expression in female reproductive system in the rat. *Environ. Sci.* 11, 47-55, 2004.
- Minegishi, T., Hirakawa, T., Abe, K., Kishi, H., Miyamoto, K.: Effect of insulin-like growth factor-1 and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the expression of luteinizing hormone receptors in cultured granulosa cells. *Environ. Sci.* 11, 57-71, 2004.
- Sato, A., Keng, V. W., Yamamoto, T., Kasamatsu, S., Ban, T., Tanaka, H., Satoh, S., Yamada, K., Noguchi, T.: Identification and characterization of the hematopoietic cell-specific enhancer element of the mouse Hex gene. *J. Biochem. (Tokyo)* 135, 259-268, 2004.
- Yazawa, T., Nakayama, Y., Fujimoto, K., Matsuda, Y., Abe, K., Kitano, T., Abe, S., Yamamoto, T.: Abnormal spermatogenesis at low temperatures in the Japanese red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*: possible biological significance of the cessation of spermatocytogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 66, 60-66, 2003.
- Yamamoto, T., Yazawa, T., Fujimoto, K., Kitano, T., Abe, S.: Low temperature promotes annexin V expression in newt testis. *Zoolog. Sci.* 20, 733-735, 2003.
- 梶谷 宇、水谷哲也、宮本 薫：性腺系特異的に発現する新規 HMG-box 蛋白質の解析. *日本生殖内分泌学会雑誌* 8, 35-39, 2003.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：3件）



図の説明

DES投与による、卵巣顆粒膜細胞増殖促進と転写調節因子MRG2/CITED4

- A) DES処理による幼若ラット卵巣での顆粒膜細胞増殖促進（HE染色及びBrdU取り込み。Control及びDES処理96時間後の卵巣）
- B) DES処理による転写調節因子MRG2/CITED4の誘導（DES処理0、24、48、72、96時間後の卵巣におけるMRG2/CITED4の発現、Northern blotting）
- C) DES処理による卵巣でのMRG2/CITED4の発現誘導（DES処理96時間後の卵巣 in situ hybridization）
- D) 卵巣におけるMRG2/CITED4の作用（模式図）