

「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、RNA結合モチーフを持つ核内ホルモンレセプターの活性化因子が減数分裂期のDNAの組み換えに関与している事実をつきとめた。このことは、環境ホルモンが直接的に核内ホルモンレセプターのシグナルを通じて、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

(1) 環境ホルモンに応答する遺伝子の単離

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、一方で環境ホルモンは様々な生理活性を持つことが知られている。

そのような観点から環境ホルモンによって誘導される遺伝子群を単離する事により、作用の全体像を把握することを試みた。具体的には、ES細胞にダイオキシンを暴露し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及び抑制される遺伝子の単離を行った。その結果、ダイオキシンによって誘導される遺伝子を19種同定した。それらを機能的な面から分類すると 細胞周期に関与する遺伝子群 ヒストンアセチル化酵素活性を持つ遺伝子 ERストレスに関与する遺伝子群 GTP-ase-activating protein

細胞骨格に関与する遺伝子群に分けられた。ダイオキシンによって発現が抑制される遺伝子に関しては現在解析中である。このように非常に多彩な遺伝子群に影響を与えることが示されたと同時に今まで明らかにされていないダイオキシンの作用機序が示唆された。さらに、我々が単離した細胞周期に関与する遺伝

子のうち一つは、相同組み替えに関与することも指摘されており今後この点に関しさらに検討を加えていく。

(2) 相同組み換え率測定法の確立

我々は、環境ホルモンが相同組み替え、減数分裂に関与する可能性を指摘しているが、相同組み換え率を客観的に評価するのは非常に難しい。本研究項目においては、相同的なDNAの組み換えが起きるとGFP (Green Fluorescent Protein) が検出されることで相同組み換え率をアッセイする方法を確立する。このカセットをES細胞などの2倍体の染色体をもつ細胞に導入し、環境ホルモン存在下での相同組み換え率を検討する(図1参照)。現在までに、この変異型GFP組み換えカセットの作成は終了し、このカセットを一つのコピーしか持たないES細胞クローンを複数樹立した。今後I-SceIを導入し組み換え率を検討していく。

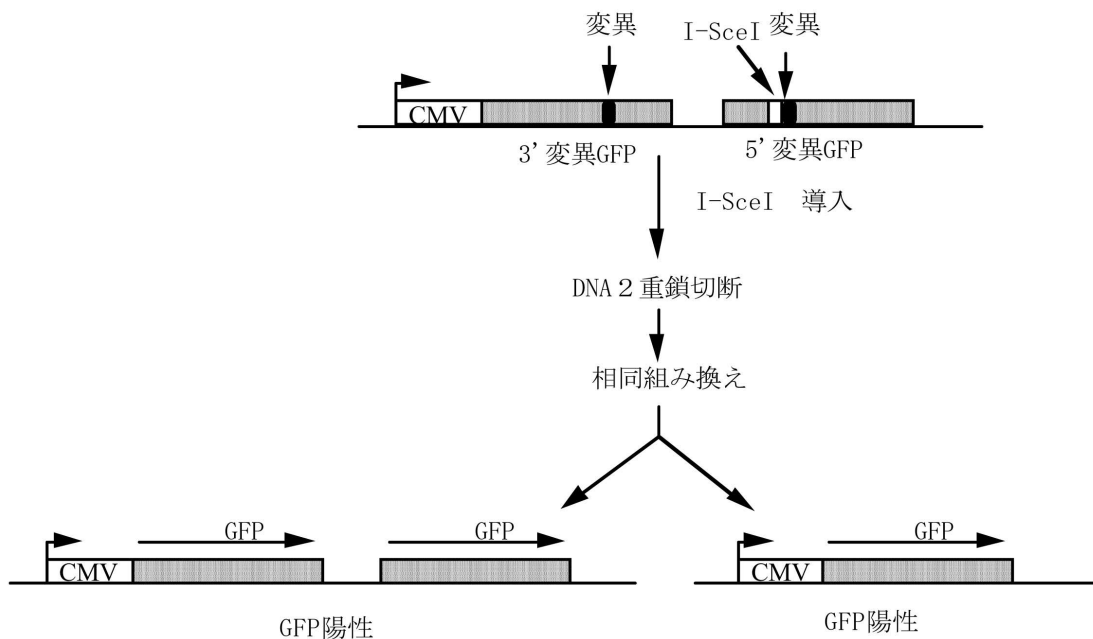


図1 GFPを用いた相同組み換え率測定法の原理

(3) 環境ホルモンの減数分裂に対する影響の検討

本研究項目では、環境ホルモンが減数分裂にどのような影響を与えるか検討する。環境ホルモンを暴露させたマウス及びヒト臨床検体の精子形成時の染色体を観察することにより、減数分裂に対する影響を検討する。また、環境ホルモンは世代を超えて異常をきたす可能性が指摘されている。精子形成においては、stem cellの異常が次世代に影響を与える。この点に関しても、精子のstem cellを観察することによりその影響を評価していく。ダイオキシンに関しては、Ah受容体を欠失したマウスを用いたり、また生殖細胞においてAh受容体を過剰に発現

させたマウスを作成し環境ホルモンの減数分裂に対する影響の検討を行っている。

3 . 主な研究成果の発表（論文発表）

Kuroda, M., Sok, J., Webb, L., Baechtold, H., Urano, F., Yin, Y., Chung, P., de Rooji, DG., Akhmedov AT., Ashley, T., and Ron, D. Male Sterility and enhanced radiation sensitivity in TLS-/- mice. EMBO J 19, 453-462,2000.

Baechtold H., Kuroda, M., Sok, J., Ron, D., Lopez, BS., Akhmedov, AT. Human 75-kDa DNA-pairing protein is identical to the pro-oncoprotein TLS/FUS and is able to promote D-loop formation. J.Biol. Chem. 274(48). 34337-34342, 1999.