

分担研究者 西原 真杉 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室

脳の性分化誘導因子であるグラニューリン (grn) 遺伝子に注目し、内分泌かく乱化学物質への暴露が新生ラット視床下部における遺伝子発現に与える影響を解析するための基礎研究を行った。合成エストロジェンの一種であるエチニルエストラジオール (EE) を妊娠ラットに経口投与し、胎盤あるいは乳汁を経由して胎子あるいは新生子に移行させた。その結果雌雄新生ラット視床下部における grn 遺伝子の発現は、EE 処置により増加した。本研究の結果は grn の内分泌攪乱化学物質の標的分子としての可能性を示唆するものである。

A. 研究目的

哺乳動物における性行動の発現パターンや性腺刺激ホルモンの分泌パターンには雌雄差が存在する。このような雌雄差は脳の機能的・形態的な雌雄差に起因している。ラットの場合、出生後数日の特定の時期（臨界期）に精巣から分泌されるアンドロジェンが脳内で芳香化酵素によりエストロジェンへと代謝され、未分化な脳に作用して雄型に分化誘導することが知られている。本研究は、内分泌かく乱化学物質がこのような脳の性分化の過程にどのように作用し、生殖機能に影響を与えるかを解明しようとするものである。

B. 研究方法

我々は以前より、上皮系の細胞の成長を調節する因子として知られるグラニューリン (grn) が脳の性分化誘導因子であることを見出している。本年度は、エチニルエストラジオール (EE) などの合成エストロジェンを妊娠ラットに経口投与し、胎盤あるいは乳汁を経由して胎子あるいは新生子に移行させた際の、新生ラット視床下部における grn 遺伝子の発現への影響を検討することにした。処置群としては 1) EE を妊娠ラットに経口投与し、胎盤あるいは乳汁を経由して胎子あるいは新生子に移行させたもの (EE 群)、2) 出生 2 日齢のラットにエストラジオールベンゾエート (EB) を 25 μg 皮下投与したもの (EB 群)、3) 対照群 (control ; CO 群) の 3 群を設けた。

これら処置群の新生子の出生 6 日後および 10 日後に視床下部を採取し、新生ラット視床下部における grn 遺伝子発現に与える影響を検討するこ

ととした。Grn 遺伝子発現の検討には、定量的な逆転写-遺伝子増幅法 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction ; RT-PCR) 法を用いた (図 1)。

視床下部サンプル

視床下部 total RNA の回収

cDNA の合成

PCR による DNA 増幅

- ・各 cDN 溶液に同量の competitor DNA を添加
- ・グレンリン遺伝子に対するプライマーにより増幅

カプラー電気泳動

エチニウムアゾライトによる染色

バンド画像の取り込み

デジタルメトリックなバンド解析

図 1 : 定量 RT-PCR 法の概略

なおこれらの研究を行うに当たっては、東京大学農学部動物実験委員会に実験計画書を提出し、承認を得た上で実施している。

C. 研究結果

EE 処置により出生時の新生子の体重及び膈-肛門間隔などの性分化の異常が観察された。さらに各処置群の出生 6 日と 10 日齢の新生ラット視床下部から total RNA を回収し、grn 遺伝子に対するプライマーを用いた RT-PCR 法により遺伝子増幅を行っ

た。その後アガロース電気泳動を行ない、新生ラット視床下部における grn 遺伝子発現量を検討することとした。出生 6 日において、EE 群の雄ラット視床下部における grn 遺伝子発現は有意に増加した (図 2)。出生 10 日においては、EE 群の雌ラットで grn 遺伝子発現の上昇が観察された (図 3)。EB 処置は、出生 6 日後では変化なかったが、出生 10 日後では雌雄ともに grn 遺伝子発現は増加した。

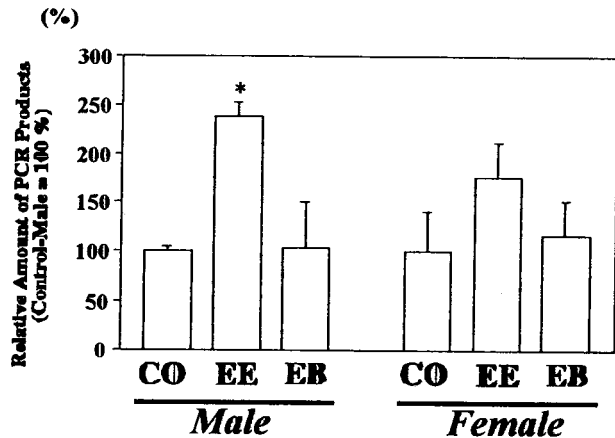


図 2: 出生 6 日齢の雌雄ラット視床下部における grn 遺伝子発現。*: $P < 0.05$ vs. CO

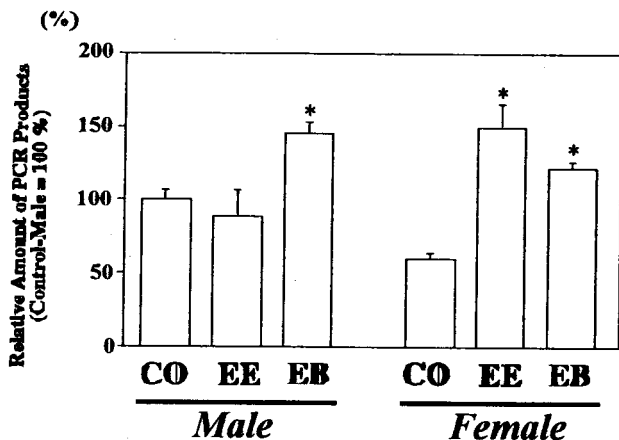


図 3: 出生 10 日齢の雌雄ラット視床下部における grn 遺伝子発現。*: $P < 0.05$ vs. CO

D. 考察

内分泌攪乱化学物質の生体への影響を評価することは緊急の課題であるが、各国ともそのための適切なパラメーターを模索しているのが現状である。我々は以前より、上皮系の細胞の成長を調節する因子として知られるグラニューリン (grn) が脳の性分化誘導因子であることを見出している。EE を母体に摂取させることによりエストロジェンが胎盤ある

いは乳汁を介してが胎子あるいは新生子に移行することが確認され、さらに、このような経路で移行したエストロジェンにより視床下部における grn 遺伝子の発現が誘導されることが初めて示された。

E. 結論

本研究の結果は grn の内分泌攪乱化学物質の標的分子としての可能性を示唆するものであり、今後の新生ラット中枢における内分泌かく乱化学物質の影響の検討に有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Granulin is a sex-steroid inducible gene in the hypothalamus and involved in sexual differentiation of the rat brain. Journal of Reproduction and Development, 投稿中, 2000 (鈴木らと共著)

2) Suppression of copulatory behavior by intracerebroventricular infusion of antisense oligodeoxynucleotide of granulin in neonatal male rats. Physiology & Behavior, 印刷中, 2000 (鈴木らと共著)

3) Induction of granulin precursor gene expression in neonatal hypothalamus by estrogen treatment. (鈴木らと共著) 投稿準備中

2. 学会発表

1) 新生雄ラット脳室内へのグラニューリンアンチセンス DNA 投与による雄性行動の発現抑制 (鈴木らと共著) 第 92 回 日本繁殖生物学会、1999 年 9 月、仙台

2) 脳の性分化誘導因子としてのグラニューリン遺伝子の単離とその機能解析 (鈴木らと共著) 第 128 回 日本獣医学会学術集会、1999 年 10 月、熊本

G. 知的所有権の取得状況

特になし